

# Toxines et fimbriae produites par les souches *Escherichia coli* isolées de fèces de veaux diarrhéiques en Algérie

A. Mohamed Ou Said <sup>1,4</sup> P. Pohl <sup>2</sup>

J. De Rycke <sup>3</sup> M. Contrefois <sup>4\*</sup>

## Mots-clés

Bovin - Veau - Diarrhée - *Escherichia coli* - Toxicité - Algérie.

## Résumé

Cent soixante-cinq souches de *Escherichia coli* isolées dans différents secteurs géographiques (200 km autour d'Alger) de 45 veaux diarrhéiques et de 4 veaux sains ont été étudiées pour la production de cytotoxines (CNF1, CNF2, VT1 et VT2) et de fimbriae (K99, F17a, F17b, F17c, Att111 et CS31A). La plupart des veaux étaient âgés de deux à quatre semaines. Les souches *E. coli* produisant CNF2 et les fimbriae F17b ou F17c prédominaient dans la région de Ain Défla et de Bordj Bou Arréridj où respectivement 100 et 75 p. 100 de veaux étaient positifs. Dans la proche périphérie d'Alger, des souches *E. coli* non cytotoxinogènes produisant les fimbriae CS31A et (ou) F17c ont été isolées. Dans la région de Médéa ces deux types de souches ont été isolées. Peu de souches *E. coli* VT+ ont été identifiées. L'étude spécifique des souches cytotoxiques pour la production des fimbriae F17 a montré que 50 p. 100 des souches CNF2+ produisaient F17b ou F17c.

## INTRODUCTION

*Escherichia coli* est une bactérie commune mais certains pathotypes sont associés à des infections intestinales ou septicémiques chez l'homme et l'animal (25). Parmi les principaux facteurs de virulence, on peut citer la production d'entérotoxines (thermostable ou thermolabile) ou de cytotoxines (vérotoxines VT1 ou VT2 et les facteurs nécrosants CNF1 ou CNF2) (22, 35, 36). L'adhésion aux entérocytes agit en synergie avec les entérotoxines en permettant aux souches entérotoxigènes (ETEC) de coloniser massivement l'intestin grêle (41). On peut aussi avancer l'hypothèse que l'adhésion aux entérocytes des *E. coli* VT+ (VTEC) ou CNF+ (NTEC pour *necrotoxigenic E. coli*) favorise la colonisation intestinale et donc augmente la quantité des cytotoxines qui agissent localement ou diffusent dans l'organisme.

Les ETEC du veau ont été étudiées de façon approfondie pour leurs entérotoxines et leurs facteurs de colonisation (30, 40). Kownalchuck et coll. (23) ont décrit des souches VTEC parmi les

isolats d'origine humaine ou animale. Certains *Escherichia coli* vérotoxigènes possèdent le gène *eae* (pour entérocyte attachement effacement) codant pour la protéine intimine, associée avec les propriétés d'adhérence et la capacité de produire des lésions d'attachement-effacement des microvillosités intestinales (21). Ultimeurement ont été identifiés les NTEC chez l'homme (8) puis chez le veau (5, 13). Les travaux initiés par De Rycke et coll. (12, 13) et poursuivis par Oswald et coll. (31) ont conduit à distinguer les toxines CNF1 et CNF2. La première correspond à la toxine décrite par Caprioli et coll. (8), la seconde est la toxine Vir identifiée par Smith (39). CNF2 est décrite uniquement parmi les souches d'origine bovine ou ovine (4, 13, 37). Les gènes gouvernant la biogenèse de CNF1 sont chromosomiques et souvent associés à ceux codant pour l'hémolysine  $\alpha$  (18) et les fimbriae de type Pap (6), l'ensemble de ces gènes étant regroupés dans un îlot de pathogénicité (43). Au contraire, les gènes codant pour CNF2 sont décrits à ce jour sur un plasmide pVir en association avec ceux gouvernant la biogenèse des fimbriae F17b (15). A ce groupe de gènes seraient aussi associés ceux codant pour une autre toxine dite CD-TIII (pour *cytolethal distending toxin* de type III) récemment décrite, l'ensemble étant regroupé sur un îlot de pathogénicité du plasmide pVir (33). Les fimbriae F17b sont des facteurs de colonisation de l'intestin de veau et ils appartiennent à la famille des fimbriae F17 dans laquelle on distingue au moins les quatre variants F17a, F17b, F17c et Att111 (2).

Dans cette étude, les auteurs montrent que des souches *E. coli* produisant CNF2 représentent un des pathotypes majeurs isolé de veaux atteints de diarrhées en Algérie et les fimbriae de la famille F17 produits par les souches *E. coli* CNF2+ ont été identifiées.

1. Ecole nationale vétérinaire d'Alger, BP 161, El-Harrach 16200, Algérie

2. Institut national de recherches vétérinaires, Groeselenberg 99, B-1180 Bruxelles, Belgique

3. Ecole nationale vétérinaire, Laboratoire associé Inra de Biologie moléculaire, 23 chemin des capelles, 31076 Toulouse, France

4. Inra, Centre de recherches de Clermont Ferrand-Theix, Laboratoire de microbiologie, 63122 Saint-Genès Champanelle, France

\* Auteur pour la correspondance :

Tél. : +33 (0)4 73 62 42 44 ; fax : +33 (0)4 73 62 45 81

E-mail : contrefois@clermont.inra.fr

## MATERIEL ET METHODES

### Les souches bactériennes

Dans une étude antérieure, 492 souches de *E. coli* isolées de 45 veaux diarrhéiques et de 4 veaux sains provenant de sept zones géographiques correspondant à un périmètre de 200 km autour d'Alger (tableau I) ont été étudiées. Les caractères recherchés étaient les facteurs de colonisation et de production de colicines, la présence d'aérobactine, d'hémolysine  $\alpha$ , d'entérohémolysine, les sérogroupes O et la résistance aux antibiotiques (28). Dans cette étude, environ 10 souches de *E. coli* ont été isolées des fèces de chaque veau. Les caractéristiques des 10 souches et le profil électrophorétique des extraits bactériens obtenus par chauffage à 60 °C (42), migration en gel de polyacrylamide dans des conditions dénaturantes et coloration à l'argent, ont permis de sélectionner 1 à 4 souches représentatives des 10 souches de la flore colibacillaire dominante de chaque veau. Les 165 souches ainsi sélectionnées ont été conservées sur milieu Dorset-egg à +4 °C. Elles ont fait l'objet dans ce travail d'une étude spécifique pour la production des cytotoxines VT et CNF, des facteurs de colonisation K99, F17a, F17b, F17c, Att111 et CS31A et la présence du gène *eae*. Les souches de référence pour les différents facteurs de virulence sont indiquées dans le tableau II.

### Recherche des cytotoxines et du gène *eae*

#### Hybridation avec des sondes ADN spécifiques pour VT1, VT2, CNF1, CNF2 et EAE

L'hybridation sur colonies a été effectuée selon les méthodes décrites par Mainil et coll. (27) et Oswald et coll. (32). Les sondes ADN provenaient des souches *E. coli* H30, B2F1/3, BM2-1, S5 et E2348/69 respectivement pour les gènes correspondant à VT1, VT2, CNF1, CNF2 et EAE. Après transfert sur papier filtre (Whatman 541, Whatman Inc. Pleuger, Belgique), les cellules ont été lysées, l'ADN dénaturé et l'hybridation des sondes s'est faite pendant une nuit à 65 °C. Après lavage, les filtres ont été autoradiographiés pendant 1 à 2 jours.

#### Cytotoxicité sur des cellules en culture

Les souches *E. coli* ont été cultivées à 37 °C pendant 18 h sur bouillon trypticase soja (Difco). Après centrifugation (10 000 g, 30 min), les bactéries en PBS ( $10^{10}$  cellules/ml) ont été lysées par sonification à 4 °C (MSE ultrasonic disintegrator, Crawley, UK). Les lysats ont été centrifugés (10 000 g, 15 min) et le surnageant filtré à 0,22  $\mu$ m a été testé sur les cellules HeLa en culture (13). Les toxines VT ont produit la lyse des cellules, alors que les toxines CNF ont induit une multinucléation des cellules.

#### Toxicité sur souris

Les lysats stériles obtenus selon la procédure décrite précédemment ont été injectés par voie intrapéritonéale à des souris âgées de 7 à 8 semaines (0,5 ml/souris). Après observation des souris pendant une semaine les lysats ont été considérés toxiques lorsqu'au moins 3 souris sur 5 sont mortes. La mortalité était le plus souvent de 5 souris sur 5. La toxicité sur souris a été utilisée pour valider ce test pour les laboratoires qui ne disposent pas de cellules en culture ou ne peuvent pas utiliser les méthodes moléculaires.

### Identification des fimbriae

#### Méthodes biochimiques et immunologiques

Les souches ont été cultivées sur Minca gélosé (20) supplémenté avec 0,2 p. 100 de glucose pendant 18 h à 37 °C. Les bactéries à la

Tableau I

Age et répartition géographique des veaux

Secteur géographique	Age des veaux			Total
	4 à 15	16 à 30	31 à 45	
Ain Défla		8	3	11
Médéa	1	9	1	11
Alger	2	2		4
Bordj Bou Arréridj		3	1	4
Bouira		3		3
Tipaza	2	6		8
(1)		3	1	4
Béjaïa	1	3		4
Total	6	37	6	49

(1) Veaux sains

Tableau II

Souches de *Escherichia coli* de référence utilisées pour cette étude

Nom de la souche	Facteurs de virulence et fimbriae	Références
K12 (HB101)	Contrôle négatif	Davis et coll., 1982
H30	VT1	Konowalchuck et coll., 1977
B2F1/3	VT1 + VT2	Scotland et coll., 1985
BM2-1	CNF1	De Rycke et coll., 1990
H209 Vir+	CNF2, F17b	Smith, 1974 El-Mazouari et coll., 1994
S5	CNF2, F17b	Smith, 1974
B41	K99, STa	Ørskov et coll., 1975
25KH9	F17a	Pohl et coll., 1982 Lintermans et coll., 1988
111KH86	Att111	Bertels et coll., 1989
31A	CS31A	Girardeau et coll., 1988
31A	F17c	Bertin et coll., 1996a
E2348/69	EAE	Jerse et coll., 1990

surface de la gélose dans une boîte de Pétri ont été collectées dans 1 ml d'une solution de NaCl à 8,5 g/l et chauffées 20 min à 60 °C (42). Après centrifugation (7 000 g, 10 min), le surnageant a été soumis à une électrophorèse en conditions dénaturantes (24). Après migration, le gel de polyacrylamide a été coloré à l'argent (29). Les sous-unités des fimbriae avaient des masses moléculaires

apparentes de 18, 18,5 et 29 kDa respectivement pour Att111, K99 et CS31A. Les sous-unités pour F17a, F17b et F17c avaient des poids moléculaires apparents de 20 kDa. L'identification des fimbriae a été complétée par des méthodes immunologiques en utilisant des antisérums spécifiques des différents fimbriae. L'agglutination des bactéries sur lame a été utilisée pour K99, Att111 et F17a. Une méthode immunodot utilisant les extraits bactériens obtenus par chauffage à 60 °C a été mise en œuvre pour identifier F17b, F17c et CS31A (10, 19).

#### Identification des gènes correspondant aux pilines et aux adhésines des fimbriae F17

La méthode PCR utilisée était celle proposée par Bertin et coll. (3). L'électrophorèse en gel d'agarose des produits de la réaction PCR ont fourni des bandes correspondant à 322, 326, 419 et 242 paires de bases respectivement pour les gènes *f17a*, *f17b*, *f17c* et *f111-1*. Les amorces pour les gènes des adhésines des sous-familles I (*f17a-G*, *f111-G*) ou II (*f17b-G*, *f17c-G*) ont conduit à l'amplification de segments de 618 paires de bases.

## ■ RESULTATS

### Souches de *Escherichia coli* cytotoxigènes et présence du gène *eae*

Cinquante et une souche (31 p. 100) étaient positives pour la toxicité sur souris, la cytotoxicité sur cellules HeLa et l'hybridation avec les sondes, la corrélation étant de 100 p. 100 pour les trois méthodes (tableau III). L'hybridation avec les sondes indique qu'aucune souche *E. coli* n'a produit CNF1 mais que les souches CNF2<sup>+</sup> ont prédominé (84 p. 100 des souches cytotoxiques). Treize souches ont produit VT1 ou VT2 en association ou non avec CNF2. Les souches *E. coli* cytotoxiques ont été isolées chez 53 p. 100 des veaux mais avec une fréquence différente selon les secteurs géographiques. Les souches de *E. coli* CNF2<sup>+</sup> ont été isolées en grand nombre pour les onze veaux étudiés près de Ain Défla (100 p. 100 des veaux positifs) et pour trois des quatre veaux de la région de Bordj Bou Arréridj. Des souches *E. coli* CNF2<sup>+</sup> ont aussi été isolées chez plusieurs veaux (5/11) du secteur de Médéa. Une souche CNF2<sup>+</sup> a été isolée chez un veau sain de la région de Tipaza. Cinq souches provenant de trois veaux étaient VT<sup>+</sup> et CNF2<sup>+</sup> alors que huit autres souches provenant de six veaux étaient VT<sup>+</sup> seulement. A l'exception de quatre souches isolées chez un veau de 15 jours, toutes les souches CNF2<sup>+</sup> provenaient de veaux âgés de 20 à 45 jours. Les souches VT<sup>+</sup> ont été isolées chez les veaux de 15 à 21 jours. Parmi les cinq souches possédant le gène *eae*, une seulement produisait une cytotoxine (VT1).

### Identification des fimbriae

Des fimbriae ont été identifiées pour 60 des souches (36 p. 100). Aucune souche ne produisait F17a. Deux souches de *E. coli* K99<sup>+</sup> ont été identifiées chez un veau de quatre jours dans la région de Tipaza. Att111 a été trouvé chez deux souches non cytotoxigènes d'un veau de la région de Bouira. CS31A a été identifié seul ou en association avec F17c chez six souches de *E. coli* non toxigènes provenant de deux veaux de la région d'Alger et neuf souches chez six veaux de la région de Médéa. F17b a été identifié exclusivement chez des souches *E. coli* CNF2<sup>+</sup> des veaux de Ain Défla et de Médéa. F17c était produit par 20 des 165 souches étudiées dont 5 positives pour CNF2<sup>+</sup>.

Tableau III  
Fréquence des souches de *Escherichia coli* produisant les toxines et (ou) les fimbriae

Secteur géographique	Nombre de :		Nombre de souches positives pour :										% veaux positifs pour <i>E. coli</i> cytotoxiques		
	Veaux	Souches	Les cytotoxines					EAE			Les fimbriae				
			CNF2	VT1	VT2	CNF2+VT	F17b	F17c	Att111	CS31A	K99				
Ain Défla	11	44	23	1		3	1		16						100
Médéa	11	40	11	1		2	3		7	6		9			45
Alger	4	15		1						7		6			25
Bordj Bou Arréridj	4	11	3							4				2	75
Bouira	3	6									2				0
Tipaza	8	30			3										37,5
	4*	6	1												25
Béjaïa	4	13		1	1			1		1					50

\* Veaux sains

L'identification génotypique pour les pilines et les adhésines de la famille F17 a été conduite exclusivement chez les 51 souches cytotoxiques afin de confirmer les résultats de l'étude phénotypique (tableau IV). Trente pour cent des 53 souches CNF2<sup>+</sup> étaient positives pour les pilines ou les adhésines de la famille F17, alors que la majorité des souches VT<sup>+</sup> (77 p. 100) étaient négatives pour les gènes de la famille F17. Pour 23 souches il s'agissait des gènes codant pour les fimbriae F17b et pour 6 souches, pour les fimbriae F17c et dans tous les cas associés aux gènes des adhésines de la sous-famille II définie par Bertin et coll. (3). Une trentième souche CNF2<sup>+</sup> était positive seulement pour les gènes des adhésines de la sous-famille II. L'étude électrophorétique des souches *E. coli* F17b<sup>+</sup> a mis en évidence une hétérogénéité pour le poids moléculaire apparent (environ 20 kDa) des sous-unités F17b-A (figure 1).

## DISCUSSION ET CONCLUSION

Ces travaux sont un élément d'une étude plus globale visant à préciser l'étiologie infectieuse des diarrhées rencontrées chez les veaux en Algérie, incluant la recherche des virus et parasites. L'étude spécifique des colibacilles entéropathogènes n'a mis en évidence des colibacilles entérotoxigènes K99<sup>+</sup> que chez un veau âgé de quatre jours. Il s'agit d'un cas très particulier puisque le veau était issu d'une vache importée d'Europe en fin de gestation. La majorité des autres veaux diarrhéiques étaient plus âgés, la plupart ayant deux à quatre semaines. L'étude a permis d'identifier plusieurs secteurs géographiques où dominaient certains pathotypes. Dans la région de Ain Défla ont été identifiées majoritairement des souches *E. coli* CNF2<sup>+</sup>, F17b<sup>+</sup> et dans celle de Bordj Bou Arréridj des souches CNF2<sup>+</sup>, F17c. Dans la périphérie d'Alger, les souches *E. coli* produisaient CS31A et F17c. Dans la région de Médéa ont été isolées des souches CNF2<sup>+</sup>, F17b ou CS31A et F17c. En revanche, si 13 souches *E. coli* VT<sup>+</sup> ont été identifiées (7,8 p. 100) dont 5 associant la production des cytotoxines CNF2 et VT, ces isolats provenaient de veaux répartis dans les différentes zones géographiques.

Les *E. coli* CNF2<sup>+</sup> ont été associés aux diarrhées et septicémies chez l'agneau (12) et le veau (37). Par ailleurs, l'infection expérimentale du porcelet par des souches *E. coli* produisant les toxines CNF (17, 44) indique que les cytotoxines CNF contribuent à la pathogénicité des *E. coli* dans la colibacillose du porc. Toutefois, différentes études montrent qu'on isole *E. coli* CNF2<sup>+</sup> avec une fréquence comparable chez les animaux malades ou sains (5, 7, 35) et, dans cette étude, l'échantillonnage des quatre veaux sains ne permet pas une comparaison significative avec les animaux malades.

La production de VT est fréquente pour les souches *E. coli* isolées de bovins malades ou sains, mais ce sont seulement les souches VT<sup>+</sup> produisant l'intimine (souches EAE<sup>+</sup>) et donc les lésions d'attachement-effacement qui seraient pathogènes (34). Ce n'était pas le cas pour la majorité des souches VT<sup>+</sup> identifiées au cours de cette étude puisqu'une seule souche possédait le gène *eae*. Pour l'autre pathotype correspondant aux souches *E. coli* CS31A<sup>+</sup>, ce caractère est corrélé à des propriétés septicémiques (10) ou à un syndrome de gastro-entérite avec des signes d'ataxie (16). *E. coli* CS31A<sup>+</sup> se classe dans la famille des bactéries septicémiques pathogènes opportunistes.

L'étude des fimbriae des souches *E. coli* CNF2<sup>+</sup> confirme que la majorité d'entre elles produisent les fimbriae F17b (15) connues également sous l'appellation de Vir (39), mais certaines expriment le variant F17c comme cela avait été mentionné par Bertin et coll. (3). Les légères différences dans les poids moléculaires apparents

Tableau IV

Gènes gouvernant la biogenèse des pilines ou des adhésines de la famille F17 parmi les souches de *E. coli* cytotoxiques

Souches positives pour :	Nombre
CNF2, F17b-A, adhésine groupe II	21
CNF2, F17c-A, adhésine groupe II	5
CNF2	11
CNF2, adhésine groupe II	1
CNF2, VT	2
CNF2, VT, F17b-A, adhésine groupe II	2
CNF2, VT, F17c-A, adhésine groupe II	1
VT1	4
VT2	4

1 2 3 4 5 6

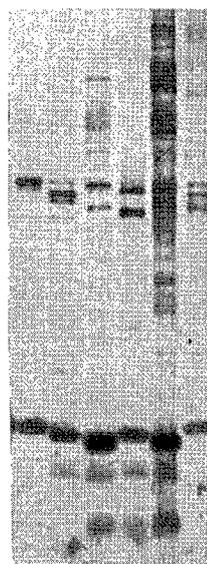


Figure 1 : Profil électrophorétique des souches bactériennes  
 1. Souche de *Escherichia coli* H209 F17b<sup>+</sup>, référence pour F17b  
 2. Souche de *Escherichia coli* HC22, variant F17b, type 1  
 3. Souche de *Escherichia coli* AD52, variant F17b, type 2  
 4. Souche de *Escherichia coli* AD16, variant F17b, type 1  
 5. Souche de *Escherichia coli* AD1a, variant F17b, type 2  
 6. Souche de *Escherichia coli* S5, référence pour F17b.

des sous-unités de F17b (figure 1) suggèrent une certaine hétérogénéité des fimbriae F17b. On peut penser qu'une petite différence des séquences en acides aminés des sous-unités explique la diversité des profils électrophorétiques comme cela a déjà été noté pour d'autres fimbriae (9, 14). Enfin, une étude complémentaire montre que les sérotypes O3:K?:H19 et O55:K?:H32 sont largement représentés pour la famille des souches CNF2, F17b<sup>+</sup>, alors que les souches CNF2, F17c<sup>+</sup> ont pour sérotype O115:K?:H10.

En conclusion, si cette étude apporte des précisions intéressantes sur les caractéristiques des colibacilles cytotoxiques, elle se proposait en premier lieu de préciser l'étiologie colibacillaire des pathologies diarrhéiques chez les veaux en Algérie. Les résultats obtenus ne sont pas complètement démonstratifs. Ils mettent en exergue des cytotoxines et des facteurs de colonisation dont les effets *in vitro* sont bien documentés. Toutefois, différents résultats épidémiologiques publiés à ce jour montrent que l'isolement de colibacilles CNF2<sup>+</sup> ne différencie pas clairement les animaux malades des animaux sains (5, 35). De même, les bovins sont porteurs asymptomatiques pour les souches *E. coli* VT<sup>+</sup>, le pouvoir pathogène s'exprimant seulement en association avec le caractère EAE<sup>+</sup> (34). Par ailleurs, les colibacilles CS31A<sup>+</sup> sont des pathogènes opportunistes (10). Si on ne peut pas écarter le rôle de ces colibacilles dans les pathologies diarrhéiques, d'autres caractères complémentaires plus discriminants restent à identifier.

### Remerciements

Ce travail est dédié au Pr Jacques Sevestre de l'Env de Nantes. A. Mohamed Ou Said remercie le Conseil régional des Pays-de-Loire pour son aide financière. Nous remercions M. Marin de l'Inrv de Bruxelles ainsi que C. Tasca de l'Env de Toulouse pour leur assistance technique.

### BIBLIOGRAPHIE

1. BERTELS A., POHL P., SCHLICKER F., VAN DRIESSE E., CHARLIER G., DE GREVE H., LINTERMANS P., 1989. Isolatie van het Att111 fimbriële antigen op *Escherichia coli* geïsoleerd uit kalverdiarree: karakterisatie en evaluatie van de noodzaak tot aanpassing van de vaccins ter bestrijding van neonatale colidiarree. *Vlaams Diergeneesk. Tijdschr.*, **58**: 18-122.
2. BERTIN Y., GIRARDEAU J.P., DARFEUILLE-MICHAUD A., CONTREPOIS M., 1996a. Characterisation of 20K-fimbriae, a new adhesin of septicemic and diarrhea-associated *Escherichia coli* strains, that belongs to a family of adhesins with N-acetyl-D-glucosamine recognition. *Infect. Immun.*, **64**: 332-342.
3. BERTIN Y., MARTIN C., OSWALD E., GIRARDEAU J.P., 1996b. Rapid and specific detection of F17-related pilin and adhesin genes in diarrheic and septicemic *Escherichia coli* strains by multiplex polymerase chain reaction. *J. clin. Microbiol.*, **34**: 2921-2928.
4. BLANCO M., BLANCO J., BLANCO J.E., RAMOS J., 1993. Enterotoxigenic, verotoxigenic and necrotizing *Escherichia coli* isolated from cattle in Spain. *Am. J. vet. Res.*, **54**: 1446-1451.
5. BLANCO J., GONZALEZ E.A., BLANCO M., REGEIRO B., BERNADEZ I., 1988. Production of toxins by *Escherichia coli* strains isolated from calves with diarrhoea in Galicia (north-western Spain). *Vet. Microbiol.*, **18**: 297-311.
6. BLUM G., FALBO V., CAPRIOLI A., HACKER J., 1995. Gene clusters encoding the cytotoxic necrotizing factor type 1 Prs-fimbriae and  $\alpha$  hemolysin from the pathogenicity island II of the uropathogenic *Escherichia coli* strain J96. *FEMS Microbiol. Lett.*, **126**: 189-196.
7. BURNS A.L., BALL H.J., FINLAY D.A., 1996. CNF producing *Escherichia coli* isolated from cattle in Northern Ireland. *Vet. Microbiol.*, **49**: 235-241.
8. CAPRIOLI A., FALBO F., RODA G.L., RUGGERI F.M., ZONA C., 1983. Partial purification and characterization of an *Escherichia coli* toxic factor that induces morphological cell alterations. *Infect. Immun.*, **39**: 1300-1306.
9. CONTREPOIS M., BERTIN Y., GIRARDEAU J.P., PICARD B., GOULET P., 1993. Clonal relationships among bovine pathogenic *Escherichia coli* producing surface antigen CS31A. *FEMS Microbiol. Lett.*, **106**: 217-222.
10. CONTREPOIS M., DUBOURGUIER H.C., PARODI A.L., GIRARDEAU J.P., OLLIER J.L., 1986. Septicaemic *Escherichia coli* and experimental infection of calves. *Vet. Microbiol.*, **12**: 109-118.
11. DAVIS R.W., BOSTEIN D., ROTH J.R., 1982. Advanced bacterial genetics. Cold Spring Harbor, NY, USA, Cold Spring Harbor Laboratory.
12. DE RYCKE J., GONZALES E.A., BLANCO J., OSWALD E., BOIVIN R., 1990. Evidence of two types of cytotoxic necrotizing factor (CNF1 and CNF2) in human and animal clinical isolates of *Escherichia coli*. *Op. Clin. Microbiol.*, **28**: 694-699.
13. DE RYCKE J., GUILLOT J.F., BOIVIN R., 1987. Cytotoxins in non enterotoxigenic strains of *Escherichia coli* isolated from feces of diarrheic calves. *Vet. Microbiol.*, **15**: 137-157.
14. DI MARTINO P., BERTIN Y., GIRARDEAU J.P., LIVRELLI V., JOLY B., DARFEUILLE-MICHAUD A., 1995. Molecular characterization and adhesive properties of CF29K an adhesin of *Klebsiella pneumoniae* strains involved in nosocomial infections. *Infect. Immun.*, **63**: 4226-4344.
15. EL-MAZOUARI K., OSWALD E., HERNALSTEENS J.P., LINTERMANS P., DE GREVE H., 1994. F17-like fimbriae from an invasive *Escherichia coli* strain producing cytotoxic necrotizing factor type 2 toxin. *Infect. Immun.*, **62**: 2633-2638.
16. ESPINASSE J., NAVETAT H., CONTREPOIS M., BAROUX D., SCHELCHER F., 1991. A new diarrheic syndrome with ataxia in young charolais calves: clinical and microbiological studies. *Vet. Rec.*, **128**: 422-425.
17. FAIRBROTHER J.M., NGELKA M., 1994. Extraintestinal *Escherichia coli* infections in pigs. In: Gyles C.L. Ed., *Escherichia coli* in domestic animals and man. Oxford, UK, CAB international, p. 221-267.
18. FALBO V., PACE T., PICCI L., PIZZI E., CAPRIOLI A., 1993. Isolation and nucleotide sequence of the gene encoding cytotoxic necrotizing factor 1 of *Escherichia coli*. *Infect. Immun.*, **61**: 4909-4914.
19. GIRARDEAU J.P., DER VARTANIAN M., OLLIER J.L., CONTREPOIS M., 1988. CS31A, a new K88-related fimbrial antigen on bovine enterotoxigenic and septicemic *Escherichia coli* strains. *Infect. Immun.*, **56**: 2180-2188.
20. GUINEE P.A.M., JANSEN W.H., AGTERBERG C.M., 1976. Detection of the K99 antigen by means of agglutination and immuno electrophoresis in *Escherichia coli* isolated from calves and its correlation with enterotoxigenicity. *Infect. Immun.*, **13**: 1369-1377.
21. JERSE A.E., YU J., TALL B.D., KAPER J.B., 1990. A genetic locus of enteropathogenic *Escherichia coli* necessary for the production of attaching and effacing lesions on tissue culture cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**: 7839-7843.
22. KARMAI M.A., 1989. Infection by verocytotoxin-producing *Escherichia coli*. *Clin. Microbiol. Rev.*, **2**: 15-38.
23. KONOWALCHUK J., SPEIRS J.L., STAVRIS S., 1977. Vero response to a cytotoxin of *Escherichia coli*. *Infect. Immun.*, **18**: 775-779.
24. LAEMMLI U.K., 1970. Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature (London)*, **227**: 680-685.
25. LEVINE M.M., 1987. *Escherichia coli* that cause diarrhea: enterotoxigenic, enteropathogenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic and enteroadherent. *J. infect. Dis.*, **55**: 377-389.
26. LINTERMANS P., POHL P., DEBOECK F., BERTELS A., SCHLICKER C., VANDEKERCKHOVE J., VAN DAMME J., VAN MONTAGU M., DE GREVE H., 1988. Isolation and nucleotide sequence of F17-A gene encoding the structural protein of the F17 fimbriae in bovine enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.*, **56**: 1475-1484.
27. MAINIL J., BEX F., JAQUEMIN E., POHL P., COUTURIER M., KAECKENBEECK A., 1990. Prevalence of four enterotoxin (STaP, STaH, STb and LT) and four adhesin subunit (K99, K88, 987P and F41) genes among *Escherichia coli* isolates from cattle. *Am. J. vet. Res.*, **51**: 187-190.

28. MOHAMED OU SAID A., CONTREPOIS M., DER VARTANIAN M., GIRARDEAU J.P., 1994. Facteurs et marqueurs de virulence de souches *Escherichia coli* isolées de diarrhées chez des veaux âgés de 4 à 45 jours en Algérie. *Revue Elev. Méd. vét. Pays trop.*, **47** : 169-175.
29. OAKLEY B.R., KIRSCH D.R., MORRIS N.E., 1980. A simplified ultrasensitive silver stain for detecting protein in polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.*, **105**: 361-365.
30. ORSKOV F., ORSKOV I., SMITH H.W., WILLIAMS H., SOJKA W.J., 1975. The establishment of K99, a thermolabile transmissible *Escherichia coli* K antigen, previously called "Kco" possessed by calf and lamb enteropathogenic strains. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.*, **83**: 31-36.
31. OSWALD E., DE RYCKE J., LINTERMANS P., VAN MUYLEM K., MAINIL J., DAUBE G., POHL P., 1991. Virulence factors associated with the cytotoxic necrotizing factor type two (CNF2) in bovine diarrheic and septicemic strains of *Escherichia coli*. *J. clin. Microbiol.*, **29**: 2522-2527.
32. OSWALD E., POHL P., JACQUEMIN E., LINTERMANS P., VAN MUYLEM K., O'BRIEN A. D., 1994. Specific DNA probes to detect *Escherichia coli* strains producing cytotoxic necrotizing factor type 1 or type 2. *J. Med. Microbiol.*, **40**: 428-434.
33. PERES S.Y., MARCHES O., DAIGLE F., NOUGAYREDE J.P., HERAULT F., TASCIA C., DE RYCKE J., OSWALD E., 1997. A new cytotolethal distending toxin (CDT) from *Escherichia coli* producing CNF2 blocks HeLa cell division in G2/M phase. *Mol. Microbiol.*, **24**: 1095-1107.
34. POHL P., 1991. Les *Escherichia coli* verotoxinogènes isolés des bovins. *Ann. Méd. vét.*, **135** : 569-576.
35. POHL P., IMBERECHTS M., MARIN M., SCHLINCKER C., STOCKMANS F., 1997. Prévalence des gènes codant pour les cytotoxines nécrosantes (CNF1 et CNF2) chez les *Escherichia coli* isolés de bovins malades ou asymptomatiques. *Ann. Med. vét.*, **141**: 161-164.
36. POHL P., LINTERMANS P., VAN MUYLEM K., SCHOTTE M., 1982. Colibacilles entérotoxigènes de veau possédant un antigène d'attachement différent de l'antigène K99. *Ann. Méd. vét.*, **126** : 569-571.
37. POHL P., OSWALD E., VAN MUYLEM K., JACQUEMIN E., LINTERMANS P., MAINIL J., 1993. *Escherichia coli* producing CNF1 et CNF2 cytotoxins in animals with different disorders. *Vet. Res.*, **24**: 311-315.
38. SCOTLAND S.M., SMITH H.R., ROWE B., 1985. Two distinct toxins active on vero cells from *Escherichia coli* O157. *Lancet*, **19**: 885-886.
39. SMITH H.W., 1974. A search for transmissible characters in invasive strains of *Escherichia coli*: the discovery of a plasmid-controlled toxin and a plasmid-controlled lethal character closely associated, or identical, with colicine V. *J. gen. Microbiol.*, **83**: 95-111.
40. SMITH H.W., HALLS S., 1967. Studies on *Escherichia coli* enterotoxin. *J. Pathol. Bacteriol.*, **93**: 531-543.
41. SMITH H.W., HUGGINS M.B., 1979. Experimental infections of calves piglets and lambs with mixture of invasive and enteropathogenic strains of *Escherichia coli*. *J. Med. Microbiol.*, **12**: 507-510.
42. STIRM S., ORSKOV F., 1967. Episome carried surface antigen K88 of *E. coli* II. Isolation and chemical analysis. *J. Bacteriol.*, **143**: 731-739.
43. SWENSON D.L., BUKANOV N.O., BERG D.E., WELCH R.A., 1996. Two pathogenicity islands in uropathogenic *Escherichia coli* J96: Cosmid cloning and sample sequencing. *Infect. Immun.*, **64**: 3736-3743.
44. WRAY C., PIERCY D.W.T., COOLEY W.A., 1993. Experimental infection of neonatal pigs with CNF toxin-producing strains of *Escherichia coli*. *Res. vet. Sci.*, **54**: 290-298.

Reçu le 26.3.98, accepté le 18.11.98

## Summary

**Mohamed Ou Said A., Pohl P., De Rycke J., Contrefois M.**  
Toxins and fimbriae produced by strains of *Escherichia coli* isolated from feces of diarrheic calves in Algeria

One hundred and sixty-five *Escherichia coli* strains isolated from several geographic areas (200 km around Algiers) from 45 diarrheic and 4 healthy calves were studied for cytotoxins (CNF1, CNF2, VT1, VT2) and fimbrial antigens (K99, F17a, F17b, F17c, Att111 and CS31A). Most of the calves were 2 to 4 weeks old. *E. coli* strains producing CNF2 and F17b or F17c fimbrial antigens were highly prevalent in the Ain Defla and Bordj Bou Arreridj areas with 100 and 75% of positive calves, respectively. In suburban Algiers, non-cytotoxic *E. coli* strains producing CS31A and/or F17c surface antigen(s) were isolated. In the Medea area both strain types were isolated. Only few VT-producing *E. coli* strains were identified. A specific study focusing on F17-related fimbriae produced by cytotoxin-producing *E. coli* strains showed that 50% of CNF2 producing isolates were F17b or F17c positive.

**Key words:** Cattle - Calf - Diarrhea - *Escherichia coli* - Toxicity - Algeria.

## Resumen

**Mohamed Ou Said A., Pohl P., De Rycke J., Contrefois M.**  
Toxinas y fimbrias producidas por las cepas de *Escherichia coli* aisladas en heces de terneros diarréicos en Argelia

Se estudiaron 165 cepas de *Escherichia coli*, aisladas en diferentes sectores geográficos (200 km alrededor de Argel), a partir de 45 terneros diarréicos y de 4 terneros sanos, con el fin de detectar la producción de citotoxinas (CNF1, CNF2, VT1 y VT2) y de fimbrias (K99, F17a y F17b, F17c, Att111 y CS31A). La mayoría de los terneros tenían entre dos y cuatro semanas de edad. Las cepas de *E. coli* que produjeron CNF2 y las fimbrias F17b o F17c predominaron en la región de Ain Defla y de Bordj Bou Arreridj, donde, respectivamente, 100 y 75% de los terneros fueron positivos. En la periferia cercana de Argel, se aislaron las cepas de *E. coli* no citotóxicas que produjeron las fimbrias CS31A y/o F17c. En la región de Medea, se aislaron estos dos tipos de cepas. Se identificaron pocas cepas de *E. coli* VT<sup>+</sup>. El estudio específico de las cepas citotóxicas para la producción de fimbrias F17 mostró que 50% de las cepas CNF2<sup>+</sup> produjeron F17b o F17c.

**Palabras clave:** Ganado bovino - Ternero - Diarrea - *Escherichia coli* - Toxicidad - Argelia.