

Description de 21 souches d'*Escherichia coli* 0157 isolées de bovins et d'une chèvre

P. POHL ⁽¹⁾, P. LINTERMANS ⁽¹⁾, K. VAN MUYLEM ⁽¹⁾,
A. KAECKENBEECK ⁽²⁾, J. MAINIL ⁽²⁾

(1) Institut national de recherches vétérinaires
Groeselenberg, 99 / B-1180 Bruxelles.

(2) Faculté de médecine vétérinaire
Chaire de bactériologie
rue des Vétérinaires 45 / B-1070 Bruxelles

RESUME

Vingt et une souches d'*Escherichia coli* 0157 sont décrites. Elles proviennent de dix veaux et d'un chevreau. Elles forment un groupe hétérogène quant à leurs propriétés sérologiques et biochimiques. Toutefois contrairement aux *E. coli* 0157 observées chez l'homme elle fermentent toutes le sorbitol et produisent une bêta-glucuronidase. On peut les classer en EHEC (16 souches SLT-I+ et parfois SLT-II+ ; ETEC (1 souche LT-II+, adhésine +); et saprophytes (4 souches qui ne répondent à aucune des sondes STaP, STaH, STb, LT, SLT-I, SLT-II, LT-II, K99, F41, K88, 987 P, INV ni E.A.F.) (Cfr Levine, 1987).

Chez cinq veaux à partir desquels plusieurs souches ont été isolées, les *E. coli* 0157 toxigènes sont accompagnées de souches toxigènes appartenant à d'autres sérogroupes (026; 0111; 0113 et 0128).

INTRODUCTION

On observe des *Escherichia coli* appartenant au séro groupe 0157 chez l'homme

et chez des mammifères domestiques (Karmali, 1989). Les souches humaines produisent une ou deux toxines apparentées à la toxine de *Shigella dysenteriae* type 1 (SLT-I et SLT-II); elles sont responsables de diarrhée hémorragique et d'un syndrome hémolytique-urémique (HUS). On les classe parmi les EHEC

(Enterohaemorrhagic *E. coli*) (Levine et al., 1987). Les souches 0157 du porc sont différentes : elles possèdent l'adhésine K88ac et sécrètent les entérotoxines thermostables de type b (STb) et thermolabiles (LT) (Morris et Sojka, 1985). Il s'agit donc de souches ETEC classiques (Enterotoxigenic *Escherichia coli*). Les souches bovines sont moins connues. Clarke a isolé quatre *E. coli* 0157:H7 à partir de selles de 600 bovins; Wells (cités par Karmali, 1989) a trouvé 19 souches semblables à partir de 900 vaches et veaux et Borczyk et al. (1987) ont observé deux porteurs sains dans un troupeau de 67 vaches laitières. Jusqu'à présent il n'est pas démontré qu'elles jouent un rôle dans la pathologie intestinale du gros bétail.

Toutefois les bovins ont été considérés par certains auteurs comme le réservoir des souches d'*E. coli* 0157 qui contaminent l'homme (Borczyk et al., 1989; Karmali, 1989).

Les buts de cette étude sont :

- 1) de préciser la prévalence de telles souches principalement chez les bovins en Belgique;
- 2) de déterminer leurs facteurs de virulence;
- 3) de les caractériser afin de pouvoir les comparer aux souches humaines.

MATERIEL ET METHODES

Deux mille sept cent vingt-cinq souches d'*E. coli* provenant dans la très grande majorité des cas de veaux diarrhéiques ont été étudiées. Elles appartiennent aux collections de la Faculté de médecine vétérinaire de l'Université de Liège. Elles ont été isolées entre 1967 et 1989.

On y a recherché par hybridation ADN-ADN sur colonies les gènes correspondant

aux toxines SLT-I, SLT-II, LT-II⁽¹⁾ (Mainil et al., 1989); aux toxines thermostables (STaP, STaH, STb) et thermolabile (LT) des souches ETEC classiques ainsi qu'aux adhésines K99, K88, F41 et 987P de ces mêmes souches (Mainil et al., manuscrit accepté); aux propriétés d'invasion des entérocytes (INV) des souches entéro-invasive (EIEC) d'origine humaine (Boileau et al., 1984) ainsi qu'au facteur d'adhérence des souches entéropathogènes (EPEC) «sensu stricto» d'origine humaine (EPEC adherence factor: EAF), qui confère à ces souches des propriétés d'adhérence localisée à des cellules en culture (Nataro et al., 1987).

Sur 343 souches reconnues par une ou plusieurs de ces sondes (Mainil et al., manuscrit accepté; résultats non publiés), 229 ont été sérotypées. Les *E. coli* qui appartiennent au séro-groupe 0157 ont été caractérisées. La même étude fut faite sur 100 souches qui ne répondaient à aucune sonde. (Sojka, 1965; Pohl et al., 1989). Les souches 0157 ont également été étudiées par le test des villosités intestinales isolées de veaux (Girardeau, 1980) afin de rechercher la production de facteurs d'attachement spécifiques.

RESULTATS

a. Toxines et adhésines des souches 0157

Parmi les 329 souches sérogroupées, 21 appartiennent au séro-groupe 0157. Sur ces 21 souches, 14 répondent à la sonde SLT-I (SLT-I+), deux répondent aux sondes SLT-I et SLT-II (SLT-I+ SLT-II+), une à la sonde LT-II (LT-II+) (souches dites toxigènes); les quatre dernières souches ne sont reconnues par aucune des sondes (tableau 1). Aucune des souches reconnues par les sondes

⁽¹⁾ LT-II = variant de la toxine thermolabile LT des souches ETEC classiques, produites par des *E. coli* isolées d'humains et de ruminants. (Seriwatana et al., 1988).

Tableau 1. Description des souches d'*E. coli* 0157*

Ref.	Anti-gène K	Anti-gène H	Colicine	Réponses aux sondes -(1)	Raffinose (2)	Dulcité (2)	Saccharose (2)	Attachement (3)
292S89	+	+	-	LT-II	+	+	+	+
310S89	+	+	-	SLT-I et II	+	-	+	-
316S89	+	+	-	SLT-I et II	+	-	+	-
329S89	-	+	-	SLT-I	+	-	+	-
333S89	-	-	+	SLT-I	+	+	+	-
334S89	-	+	+	SLT-I	+	+	-	-
346S89	+	-	-	SLT-I	+	-	+	-
347S89	+	-	-	SLT-I	+	-	+	-
349S89	-	-	+	SLT-I	+	-	-	-
350S89	-	-	+	SLT-I	-	+	-	-
352S89	-	-	+	SLT-I	-	+	-	-
354S89	+	-	+	SLT-I	-	+	-	-
356S89	-	-	+	SLT-I	+	+	-	-
357S89	-	-	+	SLT-I	+	+	-	-
359S89	-	-	+	SLT-I	+	+	-	-
360S89	-	-	+	SLT-I	+	+	-	-
362S89	-	-	+	SLT-I	+	+	-	-
758S89	+	-	-	-	-	+	-	-
759S89	+	-	-	-	-	+	-	-
763S89	+	-	-	-	+	+	+	-
774S89	+	-	+	-	+	-	+	-

* Toutes les souches fermentent le sorbitol en 24 h et produisent une bêta-glucuronidase

(1) Sondes utilisées : STaP, STaH, STb, LT, SLT-I et II, LT-II, INV, EAF, K99, F41, K88 et 987P

(2) + = fermentation en 24 h.

(3) Test d'attachement aux villosités intestinales du veau (Girardeau, 1980)

dérivées des facteurs de virulence des souches ETEC classiques n'appartient au séro-groupe 0157.

Parmi ces 21 souches une seule adhère aux villosités intestinales du veau «in

vitro». Il s'agit de la souche 292S89 qui est LT-II+ mais ne répond pas aux diverses sondes dérivées de gène codant pour des adhésines classiques (K99, K88, F41, 987P, EAF).

Tableau 2. Origine des *E.coli* 0157 toxinogènes

Références Cureghem I.N.R.V.	Années d'isolement	Localités	Animaux
070A/ 329S89	1967	Anderlues	veau, 15 jours
288A/ 333S89	1968	Champlon	veau, 9 jours
298A/ 334S89	1968	Champlon	veau, 12 jours
33.049/ 292S89	1983	Leeuw St Pierre	veau, 6 semaines
33.505-3/ 310S89	1984	Cureghem	veau, 1 jour
35.593-3/ 316S89	1984	Cureghem	veau, 1 jour
35.947-3/ 345S89	1986	Ath	veau, 3 semaines
-4/ 347S89	1986	Ath	même animal
35.965-2/ 349S89	1986	Tielt (Br.)	chevreau, 12 jours
36.819-1/ 350S89	1987	Cureghem	veau, 3 mois
-3/ 352S89	1987	Cureghem	même animal
-5/ 354S89	1987	Cureghem	même animal
36.914-3/ 356S89	1987	Cureghem	veau, 1 1/2 mois
-4/ 357S89	1987	Cureghem	même animal
36.926-2/ 359S89	1987	Walcourt	veau, 3 sem.
-3/ 360S89	1987	Walcourt	même animal
-5/ 362S89	1987	Walcourt	même animal

b. Animaux chez lesquels les souches toxinogènes 0157 ont été isolées

Elles proviennent de dix veaux et d'un chevreau (cf tableau 2). L'âge des ani-

maux varie de un jour à quatre mois. Lorsqu'elles sont disponibles, les anamnèses font état de diarrhées et les autopsies de gastro-entérites accompagnées d'ulcères.

Elles ont été observées dans huit foyers différents. La souche la plus ancienne a été isolée en 1967 et la plus récente en 1987.

Dans cinq cas, plusieurs *E. coli* toxigènes ont été isolées à partir d'un même échantillon. Chaque fois on observe une association de sérotypes différents. Ainsi on trouve :

1 ^{er} cas	: une souche 0157:H+	SLT-I et II
	une souche 0133:H-	STL-I et II
	une souche non typable:H+	SLT-I et II
2 ^e cas	: deux souches 0157:H-	SLT-I
	trois souches 026:H-	SLT-I
3 ^e cas	: trois souches 0157:H-	SLT-I
	une souche 026:H-	SLT-I
	une souche 0128:H-	SLT-I
4 ^e cas	: deux souches 0157:H-	SLT-I
	deux souches 0111:H-	SLT-I
5 ^e cas	: trois souches 0157:H-	SLT-I
	une souche 0111:H-	SLT-I

Phénotypes

Toutes les souches, qu'elles soient toxigènes ou ne le soient pas, fermentent le sorbitol en 24 h. et possèdent une bêta-glucuronidase. Leur comportement vis-à-vis du raffinose, de la dulcité et du saccharose est variable. Il en va de même de leurs propriétés colicinogènes (cf. tableau 1).

Dix souches possèdent un antigène K et cinq un antigène H.

Une des souches toxigènes est hémolytique sur gélose au sang de mouton : il s'agit de la souche 310S89 isolée à partir d'un veau d'un jour. Les 20 autres souches ne le sont pas.

DISCUSSION

Les *E. coli* 0157 représentent 2,3 % de l'ensemble des souches que nous avons

étudiées. Elles forment un groupe hétérogène tant au point de vue sérologique (antigènes K et H) qu'au point de vue biochimique (fermentation du raffinose, de la dulcité et du saccharose) et quant à leurs propriétés colicinogènes et toxigènes. Ces observations confirment celles de Wittham et Wilson (1988) et celles de Scotland (Scotland *et al.*, 1987).

Leurs propriétés toxigènes et leur propriétés d'adhérence permettent de les répartir en 3 classes (tableau 3). Une souche (292S89) qui est adhérente «in vitro» aux villosités intestinales isolées et est LT-II+ s'apparente aux ETEC. Cette souche produit vraisemblablement une adhésine différente de celles qui ont été observées jusqu'à présent chez les ETEC du veau. En effet, non seulement n'hybride-t-elle pas avec les sondes K99 et F41 (Mainil *et al.*, manuscrit accepté) mais aussi n'est-elle pas agglutinée par les sérums antiAtt25 (F17) et Att111 (Bertels *et al.*, 1989).

Quatorze souches SLT-I+ et deux souches SLT-I+ SLT-II+ peuvent être considérées comme des EHEC. Enfin, 4 souches qui n'hybrident avec aucune des sondes génétiques utilisées sont vraisemblablement des saprophytes.

Cent souches non toxigènes ont été sérotypées, parmi elles quatre appartiennent au groupe 0157, soit 4 % de cet échantillon.

D'autre part, parmi l'ensemble des 2725 souches étudiées, 343 répondent à une ou plusieurs des sondes SLT-I ou II, LT-II ou STaP (résultats non publiés). De ces 343 souches 229 ont été sérotypées et 17 appartiennent au groupe 0157. C'est-à-dire que les souches 0157 toxigènes représentent moins de 1 % de l'ensemble. Bien que les effectifs soient trop peu nombreux pour tirer des conclusions statistiquement valables, il faut souligner

Tableau 3. Classification des *E.coli* 0157 en fonction de leurs propriétés pathogènes

Classes	Animaux	Nombre de souches	Sondes hybridées	Adhésine (3)
ETEC-like (1)	Veau	1	LT-II	+
EHEC (2)	a) Veau	2	SLT-I et II	-
	b) Veau Chevreau	13 1	SLT-I SLT-I	- -
Saprophytes	Veau	4	-	-

(1) enterotoxigenic *E.coli*

(2) enterohémorragic *E.coli*

(3) + = adhésine détectée par le test d'attachement aux villosités intestinales du veau "in vitro"

le fait que les souches 0157 non toxigènes sont relativement plus fréquentes que les souches toxigènes.

L'appartenance d'une *E. coli* au groupe 0157 ne permet donc en rien de préjuger de son caractère pathogène.

Les 21 souches fermentent le sorbitol en 24 h. et produisent une bêta-glucuronidase. Elles sont donc différentes des EHEC du groupe 0157 observées chez l'homme, qui elles ne possèdent pas ces deux propriétés (Ratman et al., 1988).

A plusieurs reprises, nous avons observé chez un même animal, des colibacilles toxigènes appartenant à des sérotypes différents. Ce fait signifie qu'au

niveau bactériologique l'infection est multiple. Toutefois, on sait que les toxines SLT-I et SLT-II sont le plus souvent codées par des bactériophages tempérés appartenant à la famille des lambdaïdes (Scotland et al., 1983; Newland et Neill, 1988). Il est dès lors possible que les *E. coli* toxigènes appartenant à des sérotypes différents soient en fait lysogénisés par des phages identiques. S'il en était ainsi, les agents pathogènes réels seraient ces phages et non pas les colibacilles. Ces derniers ne seraient que des vecteurs occasionnels qui permettraient aux bactériophages d'exprimer leurs gènes de virulence. Nous tentons actuellement de contrôler cette hypothèse.

REFERENCES

- BERTELS A., POHL P., SCHLICKER C., VAN DRIESSE E., CHARLIER G., DEGREVE H., LINTERMANS P. Isolatie van het Att111 fimbrial antigen op *Escherichia coli* geïsoleerd uit kalverdiarree : karakterisatie en evaluatie van de noodzaak tot aanpassing van de vaccins ter bestrijding van neonatale colidiarree. *Vlaams dierg. Tijds.*, 1989, **58**, (sous presse).
- BOILEAU C.R., d'HAUTEVILLE H.M. and SANSONETTI P.J. DNA hybridation technique to detect *Shigella* species and enteroinvasive *Escherichia coli*. *J. clinic. Microbiol.*, 1984, **20**, 959.
- BORCZYK A.A., KARMALI M.A., LIOR H., DUCAN L.M.C. Bovine reservoir for verotoxin-producing *Escherichia coli* 0157:H7. *Lancet*, 1987, january 10, 98.
- GIRARDEAU J.P. A new *in vitro* technique for attachment to intestinal villi using enteropathogenic *Escherichia coli*. *Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur)*, 1980, **131 B**, 31.
- KARMALI M.A. Infection by verocytotoxin-producing *Escherichia coli*. *Clin. Microbiol. Rev.*, 1989, **2**, 15.
- LEVINE M.M. *Escherichia coli* that cause diarrhea : enterotoxigenic, enteropathogenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic, and enteroadherent. *J. infect. dis.*, 1987, **155**, 377.
- MAINIL J.G., BEX F., JACQUEMEIN E., POHL P., COUTURIER M. and KAECKENBEECK A. Prevalence of four enterotoxin (STaP, STaH, STb, LT) and four adhesin subunit (K99, K88, 987P, F41) genes among bovine *Escherichia coli* isolates. *Am. J. Vet. Res.* (accepté pour publication).
- MORRIS J.A. and SOJKA W.J. *Escherichia coli* as pathogen in animals in «The virulence of *Escherichia coli*». Sussman M. Editor. Academic Press. London 1985, p. 7.
- NATARO J.P., MAHER O.K., MACKIE P. and KAPER J.B. Characterization of plasmids encoding the adherence factor of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.*, 1987, **55**, 2370.
- NEWLAND J.W. and NEILL R.J. DNA probes for Shiga-like toxins I and II for toxin-converting bacteriophages. *J. clinic. Microbiol.*, 1988, **26**, 1292.
- POHL P., LINTERMANS P., MAINIL J. et DEPRez P. Production de vérocytotoxine par les *Escherichia coli* du porc. *Ann. Méd. Vét.*, 1989, **133**, 31-38.
- RATNAM S., MARCH S.B., AHMED R., BEZANSON G.S. and KASATIYA S. Characterization of *E. coli* 0157:H7. *J. clinic. Microbiol.*, 1988, **26**, 2006.
- SCOTLAND S.M., SMITH H.R., WILLSHAW G.A. and ROWE B. Verocytotoxin production in strain of *Escherichia coli* is determined by genes carried on bacteriophage. *Lancet*, 1983, July 23, 216.
- SCOTLAND S.M., WILLSHAW G.A., SMITH H.R. and ROWE B. Properties of strains of *Escherichia coli* belonging to serogroup 0157 with special reference to production of verocytotoxins VT1 and VT2. *Epidem. Inf.*, 1987, **99**, 613.
- SERIWATANA J., ECHEVERRIA P., TAYLOR D.N., RASRINAUL L., BROWN J.E., PEIRIS J.S.M. and CLAYTON C.L. Type II heat-labile enterotoxin-producing *Escherichia coli* isolated from animals and humans. *Infect. Immun.*, 1988, **56**, 1158.
- SOJKA W.J. *Escherichia coli* in domestic animals and poultry. Review series n. 7 of the commonwealth bureaux of animal health. Weybridge 1965.
- WHITTAM T.S. and WILSON R.A. Genetic relationships among pathogenic *Escherichia coli* of serogroup 0157. *Infect. Immun.*, 1988, **56**, 2467-2473.