

Caractérisation génotypique de souches invasives aviaires d'*Escherichia coli* isolées en Belgique.

STORDEUR P., BEAUPAIN N., MAINIL J.

Département des Maladies Infectieuses et Parasitaires; Service de Bactériologie et Pathologie des Maladies Bactériennes
Faculté de Médecine Vétérinaire – Université de Liège; Boulevard de Colonster, 20, Bâtiment B43A; B-4000 Liège; Belgique

Correspondance : Dr. Philippe Stordeur, Tél : +32 04/366 40 52; Fax : +32 04/366 41 22; Email : pstordeur@ulg.ac.be

RESUME : Une collection de 383 souches d'*Escherichia coli* pathogènes aviaires d'origine belge ont été étudiées par hybridation sur colonies à l'aide de sondes spécifiques pour des adhésines fimbriaires ou afimbriaires (F17, F18, S <Sfa/F1c>, Cs31a, Afa-8, Intimin <Eae>) identifiées à partir de souches d'*E. coli* intestinales, urinaires ou invasives ainsi qu'à l'aide de sondes spécifiques de l'aérobactine (lutA) et de l'adhésine fimbriaire P, de souches d'*E. coli* urinaires ou invasives de mammifères et d'oiseaux. Trois cents six souches (79,8 %) sont positives pour la sonde lutA, 70 souches (18,3 %) sont positives pour la sonde P, 27 souches (7 %) sont positives pour la sonde F17A, 26 souches (6,7 %) sont positives pour la sonde AfaE-8, 23 souches (6 %) sont positives pour la sonde AfaD-8, 16 souches (4,1 %) sont positives pour la sonde S et 4 souches (0,1 %) sont positives pour la sonde Eae. Aucune souche n'hybride avec les sondes F18 et Cs31a. Parmi les souches F17 positives, dont l'opéron est localisé sur le chromosome, 74 % des souches possèdent le variant F17A-c, 7,4 % des souches possèdent le variant F17A-a, 3,7 % les variants F17A-a et F17A-c, 11,1 % le variant F17A-d et 3,7 % des souches n'étaient pas typables. La localisation de l'opéron *afa-8* est lui aussi chromosomique. Parmi les souches positives pour cette adhésine, 85 % étaient positives par PCR pour la présence du gène *afaD-8*. Parmi les souches positives pour la sonde Eae, toutes possèdent le variant bêta.

Une analyse des profils génétiques par champs pulsé montre que les souches d'*E. coli* pathogènes aviaires sont assez hétérogènes. Cependant, une relation peut être établie entre les profils de restriction et la présence de facteurs de virulence spécifiques.

INTRODUCTION

La colibacillose, associée aux souches d'*Escherichia coli* pathogènes aviaires (APEC) est une maladie qui affecte le plus souvent les poulets de chair et dont les signes cliniques (mortalités embryonnaires, troubles respiratoires (dyspnée, toux, jetage), boiteries, chute de ponte) et lésions peuvent être variés : omphalite, septicémie, ovarite, salpingite, arthrite. Différents agents biologiques sont susceptibles de favoriser les infections de la volaille par les souches APEC : le virus de la bronchite infectieuse, le virus de la maladie de Newcastle ou de Gumboro, *Mycoplasma gallisepticum*; mais

aussi des facteurs non-biologiques comme des teneurs trop élevées en ammoniac ou en poussière dans les élevages (Stordeur et Mainil, 2002). Bien que souvent considérés comme pathogènes secondaires, les souches APEC sont responsables de pertes économiques qui peuvent parfois être considérables. Certains sérogroupes ont été plus particulièrement associés aux souches APEC : O₁, O₂ et O₇₈ (Dozois *et al.*, 1992); toutefois, de récentes études ont montré l'émergence d'autres sérogroupes (O₈, O₁₅, O₁₈, O₃₅, O₈₈, O₁₀₉, O₁₁₅ and O₁₁₆) (Babai *et al.*, 1997; Blanco *et al.*, 1998; Dho-Moulin et Fairbrother, 1999).

Différents facteurs de virulence ont été décrits et associés aux souches APEC. Parmi ceux-ci, on peut citer les fimbriales de type 1 et de type P, le système de captation du fer (aérobactine) (Lafont *et al.*, 1987), l'hémagglutination liée à la présence de la protéine Tsh et la résistance au sérum (Dho-Moulin et Fairbrother, 1999). D'autre part, de récentes études ont montré pour la première fois que des adhésines fimbriaires telles que F17 et afimbriaires telles que Afa-8, décrites sur des colibacilles présents chez des mammifères comme le bovin, le mouton, le porc ou l'homme sont aussi présentes chez la volaille et associées aux souches APEC (Stordeur *et al.*, 2002).

Les objectifs de ce travail étaient d'étudier dans une collection récente de souches aviaires belges d'*E. coli* isolées d'animaux morts de colibacillose, la prévalence respective des facteurs de virulence et de caractériser de façon plus approfondie les souches positives pour les adhésines F17 ou Afa-8.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Collection de souches

Une collection de 383 souches aviaires d'*E. coli* (182 souches isolées de poulets de chair, 107 souches isolées de poules pondeuses, 13 souches isolées de dinde, 4 souches isolées de faisan, 77 souches sans anamnèse) isolées en Belgique de cas d'animaux morts de colibacillose en 2002 et 2003 a été étudiée.

Sondes génétiques et hybridation sur colonies

Les sondes F18 et Cs31A furent dérivées par restriction enzymatique de plasmides recombinants et les sondes F17, P, S, Eae, Aéro bactéine (IutA) et AfaE-8 à partir d'un produit de PCR. Les sondes F17, F18, P et S détectent toutes les séquences connues relatives à l'opéron *f17*-, *f18*-, *pap/prs*- et *sfa/foc*- respectivement (Bertin *et al.*, 1996a; Johnson, 1997; Mainil *et al.*, 1997; Le Bouguéneec and Bertin, 1999; Mainil *et al.*, 2000). Les souches témoins positifs sont les souches 25KH9 (F17+) (Lintermans *et al.*, 1988), 107/86 (F18+) (Imberechts *et al.*, 1994), J96 (Pap+Sfa+) (Blum *et al.*, 1995).

Les sondes IutA, Cs31A et AfaE-8 sont spécifiques de gènes particuliers qui font partie des opérons iut, clp et *afa*-8 (Martin *et al.*, 1991; Bertin *et al.*, 1996b; Lalioui *et al.*, 1999). Les souches témoins positifs sont les souches 31A (IutA+) (Cs31A+) (Martin *et al.*, 1991) et la souche 239KH89 (AfaE-8+) (Mainil *et al.*, 1997; Gérardin *et al.*, 2000). La sonde Eae détecte tous les variants du gène *eae* (Adu-Bobie *et al.*, 1998; China *et al.*, 1999b; Oswald *et al.*, 2000). La souche témoin positif est la souche entéro pathogène (EPEC) E2348/69 (Eae+) (Jerse *et al.*, 1990).

La souche contrôle négatif pour toutes les sondes fut la souche HS isolée de matières fécales d'un humain sain (O'Brien *et al.*, 1982).

Les différents fragments sondes furent purifiés par le kit GeneClean II (Bio 101, Buena Vista, CA, USA) ou par le Qiaquick PCR purification kit (Qiagen, Hilden, Germany) et marquées à l'aide de [α -³²P] dCTP par la méthode d'amorçage aléatoire à l'aide d'un kit de marquage (Ready-to-go, Pharmacia, Uppsala, Sweden). Les sondes d'ADN marquées furent purifiées à l'aide de colonnes de type Microcon-YM30 (Millipore, Beverly, MA, USA).

Les hybridations sur colonies furent réalisées sur papier filtre (Whatman 541, Belgolabo, Overijse, Belgium) à 65°C (Mainil *et al.*, 1997).

Sous-typage des souches F17A, Afa-8 et Eae positives

Les souches F17A+, AfaE-8+ et Eae+ furent étudiées plus en détails afin d'identifier les variants génétiques codant pour ces adhésines.

Les souches F17+ furent sous-typées par PCR multiplex pour les variants a, b, c, et d du gène *f17A*, lequel code pour la sous-unité majeure du fimbriae (Bertin *et al.*, 1996b). Les souches témoins positives furent les souches 25KH9 (variant *f17Aa*) (Lintermans *et al.*, 1988), S5 (variant *f17Ab*) (El Mazouari *et al.*, 1994), 31A (variant *f17Ac*) (Bertin *et al.*, 1996a), et 111KH86 (variant *f17Ad*) (Bertels *et al.*, 1989).

Les souches AfaE-8+ furent testées par sondes et par PCR pour le gène *afaD*-8 et confirmées par PCR pour le gène *afaE*-8, qui codent respectivement pour une invasine et une adhésine (Lalioui *et al.*, 1999). La souche témoin positif est la souche NTEC 239KH89 (Mainil *et al.*, 1997; Gérardin *et al.*, 2000).

Les souches Eae+ furent sous-typées par PCR multiplex pour les variants α , β et γ du gène *eae*. Les souches témoins positives sont la souche EPEC E2348/69 pour le sous-type α , la souche EPEC RDEC-1 pour le sous-type b et la souche O157: H7 entéro hémorragique (EHEC)

ATCC43888 pour le sous-type γ (China *et al.*, 1999a).

Hybridation de profils plasmidiques

Etant donné que les opérons *f17* et *afa*-8 peuvent être à localisation plasmidique chez les *E. coli* isolés de mammifères (Mainil *et al.*, 1997; 1999; Le Bouguéneec et Bertin, 1999; Gérardin *et al.*, 2000), l'ADN plasmidique a été extrait des souches F17A+ et AfaE-8+ selon la méthode décrite par Kado et Liu et modifiée par Broes et collaborateurs (1988). Les bandes plasmidiques furent séparées par électrophorèse sur gel d'agarose 0,5% (20 heures à 40V). Les marqueurs de taille sont les plasmides extraits de la souche d'*E. coli* 39R681: 98, 42, 23,9 et 4,6 Mda (Mainil *et al.*, 1997). Les gels furent extraits et hybridés, comme décrits précédemment (Broes *et al.*, 1988), avec les sondes F17 et AfaE-8. Les plasmides contrôles furent extraits des souches NTEC 648S89 et 1649S89 pour les sondes F17A et AfaE-8, respectivement (Mainil *et al.*, 2000; Gérardin *et al.*, 2000).

Etude des profils génétiques par champs pulsés

La méthode d'extraction et d'analyse des profils génétiques est basée sur l'article de Tenover et collaborateurs, 1995. Brièvement, l'ADN total de 15 souches porteuses des opérons *f17* et *afa*-8 fut extrait et digéré pendant une nuit à 37°C à l'aide de l'enzyme *Xba*1 (Invitrogen, Merelbeke, Belgium). Les produits de la digestion ont été déposés dans un gel d'agarose à 1% spécial pour champs pulsés (Biorad, Nazareth, Belgium) pour une migration de 21 heures dans du tampon TBE 0,5M. Les paramètres de la migration sont les suivants: voltage 6V/cm, switch time de 2 à 20 secondes, angle de 120°, *ramping factor* de 1,379. Le marqueur de taille est le lambda ladder (Biolabs, New England). Une souche de *Salmonella* spp. fut ajoutée au gel pour déraciner le dendrogramme. Les résultats de la migration furent analysés par le logiciel Biogene (Vilber Lourmat, France), le pourcentage de confiance pour l'analyse du gel est de 3%.

Tableau I: Combinaison de sondes chez les 365 souches d'*Escherichia coli* aviaires positives par hybridation sur colonies

Résultats d'hybridation	Nombre de souches positives (total de 365 souches)	Pourcentage de souches positives
IutA	259	70,9 %
P-IutA	37	10,1 %
P	22	%
AfaE-8/F17A	20	5,5 %
S	8	2,2 %
Eae	4	1 %
P/IutA/F17A/AfaE-8	4	1 %
S/IutA	3	<1 %
P/IutA/S	3	<1 %
P/S	2	<1 %
F17A/AfaE-8/P	2	<1 %
F17A	1	<1 %

Tableau II: Facteurs de virulence associés aux souches F17A+ étudiées par champs pulsé.

Souches	N° Champs pulsé	Espèce	F17A	AfaE-8	AfaD-8	Pap	Aérobactine
BE2465	1	PP	+	+	+	+	+
BE2492	2	PP	+	+	+	+	+
BF2249	6	PP	+	+	+	+	+
PF38	15	ND	+	+	+	+	+
P912	16	PP	+	+	+	+	-
BG1832-1	5	P	+	+	+	+	-
BF172	7	P	+	+	+	-	+
BF2275	8	P	+	+	+	-	+
AP16	13	PP	+	+	+	-	+
BG3183	14	PP	+	+	+	-	+
01AP778	9	PP	+	+	+	-	+
9501AP103	10	PP	+	+	+	-	+
BH1510	18	PP	+	+	-	-	+
BF2248	4	PP	+	+	-	-	+
BH543	17	ND	+	-	-	-	+
<i>Salmonella</i> spp.	11	/	/	/	/	/	/

PP correspond à 'Poule Pondeuse', P correspond à 'Poulet' et ND correspond à 'Non Défini'.

RÉSULTATS

Sondes génétiques et hybridation sur colonies

Trois cent soixante cinq des 383 souches de la collection d'*E. coli* (95,3%) ont donné un résultat positif avec au moins une des sondes F17A, AfaE-8, P, S, IutA et/ou Eae, mais aucune avec les sondes F18 et Cs31A.

Trois cent six souches ont donné un résultat positif avec la sonde IutA (79,8%), 70 souches (18,3%) avec la sonde P, 27 souches (7%) avec la sonde F17A, 26 souches (6,7%) avec

la sonde AfaE-8, 16 souches (4,1%) avec la sonde S et 4 souches (0,1%) avec la sonde Eae (tableau I).

Sous-typage des souches positives avec les sondes F17A, Afa-8 et Eae

Les 27 souches F17A positives furent sous-typées par PCR multiplex pour les variants a, b, c, et d du gène A: 20 souches (74%) étaient positives pour le variant *f17Ac*, 2 souches (7,4%) pour le variant *f17Aa*, 1 souche (3,7%) pour les variants *f17Aa* et *f17Ac*, 3 souches (11,1%) pour le variant *f17Ad* et 1 souche (3,7%)

n'était pas typable. Aucun résultat positif n'a été obtenu pour le variant F17b.

Les 26 souches AfaE-8 positives ont été confirmées par PCR pour la présence du gène *afaE-8*. Par ailleurs, toutes ces souches étaient positives avec la sonde AfaD-8 alors que la PCR montrait que seulement 85 % de ces souches (23 souches) amplifiaient le gène *afaD-8*.

En ce qui concerne le sous-typage du gène *eae*, les résultats ont montré que l'ensemble des souches possédaient le variant β .

Association de facteurs de virulence

Différentes associations entre facteurs de virulence ont été observées chez 71 souches issues du groupe des 365 souches positives par hybridation sur colonies (tableau I). La combinaison entre les sondes P et IutA (37 souches soit 10,1%) était plus fréquemment rencontrée en association avec les sondes F17A et AfaE-8 pour quatre souches et avec la sonde S pour 3 souches.

L'association des sondes F17A et AfaE-8 était la seconde association la plus fréquente (20 souches à savoir 5,5%), en association avec les sondes P et IutA chez 4 souches et avec la sonde P chez 2 souches. Les autres associations représentaient moins de 1% chacune (tableau I).

Hybridation des profils plasmidiques

L'ADN plasmidique fut extrait des 27 souches d'*E. coli* positives avec la sonde F17A et des 26 souches positives avec la sonde AfaE-8. Cet ADN fut ensuite hybridé avec les sondes F17A et AfaE-8 respectivement. Aucun résultat positif ne fut obtenu excepté pour les plasmides extraits des souches contrôles positifs.

Etude des profils génétiques par champs pulsés

L'ADN total fut extrait de 15 souches d'*E. coli* positives pour l'adhésine F17A (tableau II). L'analyse du profil de migration montre que les souches sont divisées en 4 groupes principaux (figure 1).

Au sein du premier groupe constitué

de 6 souches (champs pulsés 1, 2, 5, 6, 15, 16) l'élément commun, outre la présence des gènes codant pour l'adhésine Afa-8, est la présence des gènes codant pour l'adhésine de type P. En outre, les souches (5 et 16) se détachent du reste du groupe mais ne peuvent être rapprochées entre elles malgré leur pathotype commun (figure 1).

Le second groupe est composé de 5 souches (champs pulsés 4, 9, 10, 13 et 14) négatives pour l'adhésine P mais positives pour l'aérobactine et l'adhésine Afa-8. Au sein de ce groupe, on constate la présence d'une souche plus isolée (champs pulsé 4) qui correspond à la souche négative pour la présence du gène *afaD-8*. Le troisième groupe n'est composé que de 2 souches (champs pulsés 7 et 8) sans caractère particulier si ce n'est l'absence d'hybridation avec la sonde P. Enfin, le dernier groupe composé lui aussi de 2 souches (champs pulsés 17 et 18), se caractérise par la présence de souches positives pour l'aérobactine mais négatives pour les facteurs de virulence P et AfaD-8 (figure 1).

DISCUSSION ET CONCLUSIONS

Il a été démontré que les souches APEC sont responsables d'infections systémiques chez la volaille. Or, sur base des facteurs de virulence classiquement décrits chez ces souches tels que les adhésines de type F1 ou de type P, le sérotypage, le système de captation du fer tel que l'aérobactine, la résistance au sérum ou l'hémagglutination liée au gène *tsh*, il n'est actuellement possible que de diagnostiquer environ 65% des souches

APEC; ce qui reste décevant.

Des études menées par Gérardin et collaborateurs en 2000 et Mellata et collaborateurs en 2001 sur quelques souches d'*E. coli* aviaires irlandaises et algériennes et une étude récente menée par Stordeur et collaborateurs en 2002 sur une collection de 1600 souches APEC, ont montré que des facteurs de virulence tels que les adhésines F17, Afa-8 et S ainsi que des séquences relatives au gène *eae*, décrits chez d'autres espèces comme le bovin, le mouton ou l'homme pouvaient aussi être rencontrés chez les souches APEC.

Les résultats de cette étude menée sur des souches APEC belges sont similaires à ceux de Stordeur et collaborateurs en 2002 quant à la présence des facteurs de virulence tels que F17A, Afa-8, P, S et Eae. D'une manière analogue, la présence de séquences génomiques similaires à l'aérobactine confirme les données exposées par Lafont et collaborateurs en 87 et par Dho-Moulin et Fairbrother en 1999.

Le sous-typage des adhésines F17 et Afa-8 montre la présence de sous-variants similaires à ceux retrouvés chez d'autres espèces. Le variant *f17Ac* est le plus fréquent des sous-variants F17A et seul l'opéron *afa-8* a été mis en évidence chez les souches aviaires belges comme décrit précédemment (Bertin *et al.*, 1996b; Le Bouguéneq et Bertin, 1999; Gérardin *et al.*, 2000; Mainil *et al.*, 2000; Stordeur *et al.*, 2002). Différents auteurs (Mainil *et al.*, 1997; 1999; 2000; Gérardin *et al.*, 2000) avaient mis en évidence la possible localisation plasmidique des opérons *f17* et *afa-8* chez les mammifères. Les résultats obtenus avec des souches APEC belges confirment les données de Stordeur et collaborateurs en 2002 sur la localisation chromosomique de ces facteurs de virulence.

Une souche F17A est non typable; ceci pourrait suggérer que cette souche soit porteuse d'un nouveau variant de ces gènes comme d'autres l'ont déjà suggéré (Bertin *et al.*, 1996b; Stordeur *et al.*, 2002). Une souche possédait deux sous-variants, ceci suggère la présence de deux copies de l'opéron *f17* comme déjà

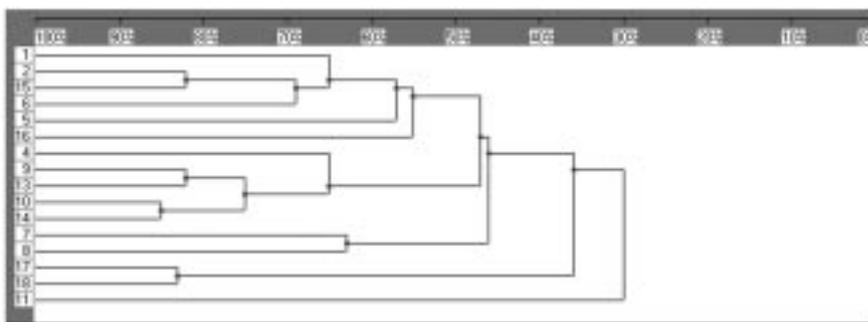


Figure 1: Dendrogramme des souches d'*E. coli* pathogènes aviaires positives avec la sonde F17A. L'axe des ordonnées correspond aux différentes souches testées et l'axe des abscisses, au pourcentage d'homologie entre les différentes souches.

décrit précédemment (Bertin *et al.*, 1996b).

Quatre souches APEC furent positives avec la sonde *Eae*, dérivée du gène *eae*. Ce gène, codant pour la protéine intime, fait partie de l'îlot de pathogénicité LEE (*Locus of Enterocyte Effacement*) présent chez les souches EPEC et EHEC et est impliqué dans la formation de la lésion d'attachement et effacement des microvillosités des entérocytes (Nataro and Kaper, 1998). Le sous-typage de ces souches par PCR montre qu'elles possèdent le variant b, résultats similaires à la majorité de ceux obtenus sur les souches EPEC et EHEC isolées de mammifères ou de volaille (China *et al.*, 1999a; Oswald *et al.*, 2000; Goffaux *et al.*, 2000; Stordeur *et al.*, 2002).

Des associations entre gènes de virulence ont été observées parmi les souches APEC d'origine belge. Les associations les plus fréquemment rencontrées sont entre l'aérobactine et le fimbriae de type P d'une part, et entre les adhésines F17 et Afa-8

d'autre part comme l'ont déjà constaté Stordeur et collaborateurs en 2002 dans leurs travaux et par Mainil et collaborateurs en 97 et 99 sur des souches NTEC2 isolées de bovins.

Des associations génétiques ont été observées par analyse des profils génétiques par champs pulsé. De ces analyses, il ressort que les souches d'*E. coli* pathogènes aviaires sont hétérogènes. Cependant, cette analyse montre aussi que les souches possédant les mêmes profils génétiques correspondent aux souches ayant les mêmes facteurs de virulence comme le démontre encore récemment De Brito et collaborateurs en 2003 sur des souches APEC isolées d'animaux morts de coli-dermatite.

D'une manière générale, ces différents résultats de typage moléculaire montrent une importante diversité au sein des souches APEC en matière de facteurs de virulence. Cette diversité devra nécessairement être prise en compte dans l'élaboration d'un futur vaccin efficace contre ces souches. D'autre part, de meilleures connais-

sances des rôles éventuels de certains facteurs de virulence (adhésines F17 ou Afa-8) dans la pathogénie de la colibacillose, permettront l'élaboration de vaccins plus efficaces qu'actuellement.

REMERCIEMENTS

Les auteurs tiennent particulièrement à remercier le Ministère des Classes Moyennes et de l'Agriculture (Convention S-6037, les souches aviaires d'*E. coli* pathogènes: étude *in vivo* du rôle dans l'adhésion et la colonisation des adhésines F17 et Afa) pour l'octroi de subsides dans le cadre des recherches menées à ce sujet. Les auteurs remercient aussi les centres provinciaux de lutte et de prévention des maladies contagieuses de Mons, Drongen et Torhout, le CODA-CERVA de Uccle, ainsi que le service de Médecine Aviaire et Cunicole de la Faculté de Médecine Vétérinaire de l'Université de Liège pour l'envoi des souches d'*E. coli* aviaires nécessaires à cette étude.

BIBLIOGRAPHIE

- ADU-BOBIE J., FRANKEL G., BAIN C., GONCALVES A.G., TRABULSI L., DOUCE G., KNUTTON S., DOUGAN G. Detection of intimins a, b, g, and d, four intimin derivatives expressed by attaching and effacing microbial pathogens. *J. Clin. Microbiol.*, 1998, **36**, 662-668.
- BABAI R., BLUM-OEHLER G., STERN B.E., HACKER J., RON E.Z. Virulence patterns from septicemic *Escherichia coli* O78 strains. *FEMS Microbiol. Lett.*, 1997, **149**, 99-105.
- BERTELS A., POHL P., SCHLICKER C., VAN DRIESSCHE E., CHARLIER G., DE GREVE H., LINTERMANS P. Isolation of F111 fimbrial antigen on the surface of a bovine *Escherichia coli* isolated from a calf diarrhea: characterization and discussion of the need to adapt recent vaccines against neonatal calf diarrhea. *Vlaam. Diergeneesk. Tijdschr.*, 1989, **58**, 118-122.
- BERTIN Y., GIRARDEAU J.P., DARFEUILLE-MICHAUD A., CONTREPOIS M. Characterization of 20K, 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.*, 1996a, **64**, 332-342.
- BERTIN Y., MARTIN C., OSWALD E., GIRARDEAU J.P. Rapid and specific detection of F17-related pili and adhesin genes in diarrheic and septicemic *Escherichia coli* strains by multiplex PCR. *J. Clin. Microbiol.*, 1996b, **34**, 2921-2928.
- BLANCO J.E., BLANCO M., MORA A., JANSEN W.H., GARCIA V., VASQUEZ M.L., BLANCO J. Serotypes of *Escherichia coli* isolated from septicemic chickens in Galicia (Northwest Spain). *Vet. Microbiol.*, 1998, **61**, 229-235.
- BLUM G., FALBO V., CAPRIOLI A., HACKER J. Gene clusters encoding the cytotoxic necrotizing factor type 1, Prs-fimbriae and alpha-hemolysin form the pathogenicity island II of the uropathogenic *Escherichia coli* strain J96. *FEMS Microbiol. Lett.*, 1995, **126**, 189-195.
- BROES A., FAIRBROTHER J.M., MAINIL J.G., HAREL J., LARIVIERE S. Phenotypic and genotypic characterization of enterotoxigenic *Escherichia coli* serotype O8, KX105 and O8, K2829 strains isolated from piglets with diarrhea. *J. Clin. Microbiol.*, 1988, **26**, 2402-2409.
- CHINA B., GOFFAUX F., PIRSON V., MAINIL J. Comparison of *eae*, *tir*, *espA* and *espB* genes of bovine and human attaching and effacing *Escherichia coli* by multiplex polymerase chain reaction. *FEMS Microbiol. Lett.*, 1999a, **178**, 177-182.
- CHINA B., JACQUEMIN E., PIRSON V., DEVRIN A.C., MAINIL J. Heterogeneity of the *eaeA* genes in

- Attaching/Effacing *Escherichia coli* from cattle: comparison with human strains. *Res. Microbiol.*, 1999b, **150**, 323-332.
- DE BRITO B.G., GAZIRI L.C.J., VIDOTTO M.C. Virulence factors and clonal relationships among *Escherichia coli* strains isolated from broiler chickens with cellulitis. *Infect. Immun.*, 2003, **71**, 4175-4177.
- DHO-MOULIN M., FAIRBROTHER J.M. Avian pathogenic *E. coli* (APEC). *Vet. Res.*, 1999, **30**, 299-316.
- DOZOIS C.M., FAIRBROTHER J.M., HAREL J., BOSSE M. Pap- and pil-related DNA sequences and other virulence determinants associated with *Escherichia coli* isolated from septicemic chickens and turkeys. *Infect. Immun.*, 1992, **60**, 2648-56.
- EL MAZOUARI K., OSWALD E., HERNALSTEENS J.P., LINTERMANS P., DE GREVE H. F17-like fimbriae from an invasive *Escherichia coli* strain producing cytotoxic necrotizing factor type 2 toxin. *Infect. Immun.*, 1994, **62**, 2633-2638.
- GERARDIN, J., LALIOUI L., JACQUEMIN E., LE BOUGUENEC C., MAINIL J.G. The *afa*-related gene cluster in necrotoxicogenic and other *Escherichia coli* from animals belongs to the *afa-8* variant. *Vet. Microbiol.*, 2000, **76**, 1-10.
- GOFFAUX F., JANSSEN L., JACQUEMIN E., CHINA B., MAINIL J. Genotypic characterization of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) isolated in Belgium from dogs and cats. *Res. Microbiol.*, 2000, **151**, 865-871.
- IMBERECHTS H., VAN PELT N., DE GREVE H., LINTERMANS P. Sequences related to the major subunit gene *fedA* of F107 fimbriae in porcine *Escherichia coli* that express adhesive fimbriae. *FEMS Microbiol. Lett.*, 1994, **3**, 309-314.
- JERSE A.E., YU J., TALL B.D., KAPER J.B. 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*, 1990, **87**, 7839-7843.
- JOHNSON J.R. Urinary tract infection. In: Sussman, M. (Ed.) *Escherichia coli: mechanisms of virulence*. Cambridge University Press: Cambridge, 1997, 495-549.
- LAFONT J.P., DHO M., D'HAUTEVILLE H.M., BREE A., SANSONETTI P.J. Presence and expression of aerobactin genes in virulent strains of *Escherichia coli*. *Infect. Immun.*, 1987, **55**, 193-197.
- LALIOUI L., JOUVE M., GOUNON P., LE BOUGUENEC C. Molecular cloning and characterization of the *afa-7* and *afa-8* gene clusters encoding afimbrial adhesins in *Escherichia coli* strains associated with diarrhea or septicemia in calves. *Infect. Immun.*, 1999, **67**, 5048-5059.
- LE BOUGUENEC C., BERTIN Y. AFA and F17 adhesins produced by pathogenic *Escherichia coli* strains in domestic animals. *Vet. Res.*, 1999, **30**, 317-342.
- LINTERMANS P., POHL P., DEBOECK F., BERTELS A., CHARLIER G., VANDEKERCKOVE J., VAN DAMME J., SCHOUPE J., SCHLICKER C., KORHONEN T., DE GREVE H., VAN MONTAGU M. Characterization and purification of the F17 adhesin on the surface of bovine enteropathogenic and septicemic *Escherichia coli*. *Am. J. Vet. Res.*, 1988, **49**, 1794-1799.
- MAINIL J. Shiga/Verocytotoxins and Shiga/Verotoxigenic *Escherichia coli* in animals. *Vet. Res.*, 1999, **30**, 235-258.
- MAINIL J.G., GERARDIN J., JACQUEMIN E. Identification of the F17 fimbrial subunit- and adhesin-encoding (*fl7A* and *fl7G*) gene variants in necrotoxicogenic *Escherichia coli* from cattle, pigs and humans. *Vet. Microbiol.*, 2000, **73**, 327-335.
- MAINIL J.G., JACQUEMIN E., HERAULT F., OSWALD E. Presence of *pap*-, *sfa*-, and *afa*-related sequences in necrotoxicogenic *Escherichia coli* isolates from cattle: evidence for new variants of the AFA family. *Can. J. Vet. Res.*, 1997, **61**, 193-199.
- MAINIL J.G., JACQUEMIN E., POHL P., FAIRBROTHER J.M., ANSUINI A., LE BOUGUENEC C., BALL H.J., DE RYCKE J., OSWALD E. Comparison of necrotoxicogenic *Escherichia coli* from farm animals and from humans. *Vet. Microbiol.*, 1999, **70**, 123-135.
- MARTIN C., BOEUF C., BOUSQUET F. *Escherichia coli* CS31A fimbriae: molecular cloning, expression and homology with the K88 determinant. *Microb. Pathog.*, 1991, **10**, 429-442.
- MELLATA M., BAKOUR R., JACQUEMIN E., MAINIL J. Genotypical and phenotypical characterization of potential virulence of intestinal avian *Escherichia coli* strains isolated in Algeria. *Avian Dis.*, 2001, 670-679.
- NATARO J.P., KAPER J.B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin. Microbiol. Rev.*, 1998, **11**, 142-201.
- O'BRIEN A.D., LA VECK G.D., THOMPSON M.R., FORMAL S.B. Production of *Shigella dysenteriae* type 1-like cytotoxin by *Escherichia coli*. *J. Infect. Dis.*, 1982, **146**, 763-769.
- OSWALD E., SCHMIDT H., MORABITO S., KARCH H., MARCHES O., CAPRIOLI A. Typing of intimin genes in human and animal enterohemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli*: characterization of a new intimin variant. *Infect. Immun.*, 2000, **68**, 64-71.
- STORDEUR P., MAINIL J. La colibacillose aviaire. *Ann. Méd. Vét.*, 2002, **146**, 11-18.
- STORDEUR P., MARLIER D., BLANCO J., OSWALD E., BIET F., DHO-MOULIN M., MAINIL J. Examination of *Escherichia coli* from poultry for selected adhesin genes important in disease caused by mammalian pathogenic *E. coli*. *Vet. Microbiol.*, 2002, **84**, 231-241.
- TENOVER F.C., ARBEIT R.D., GOERING R.V., MICKELSEN P.A., MURRAY B.E., PERSING D.H., SWAMINATHAN B. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulse-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J. Clin. Microbiol.*, 1995, **33**, 2233-2239.