

**Université de Montréal**

**Analyse de la distribution d'*Escherichia coli*, utilisée comme un marqueur  
microbiologique, dans un réseau de production porcin.**

**par Gabriel Desmarais**

**Département de pathologie et microbiologie**

**Faculté de médecine vétérinaire**

Mémoire présenté à la Faculté de médecine vétérinaire en vue de l'obtention du grade de  
maître ès sciences (M. Sc.) en sciences vétérinaires option hygiène vétérinaire et innocuité des  
aliments

Août 2015

© Gabriel Desmarais, 2015

## Résumé

La présence d'*Escherichia coli* pathogènes en élevages porcins entraîne des retards de croissance et la mortalité. La transmission des *E. coli* pathogènes entre les élevages et l'abattoir d'un même réseau de production n'est pas bien décrite. La détection des gènes de virulence des *E. coli* pathogènes pourrait permettre d'identifier un marqueur de contamination dans le réseau. L'objectif de cette étude a été d'identifier un marqueur de contamination *E. coli* dans un réseau de production porcine défini afin de décrire certains modes de transmission des *E. coli* pathogènes. Pour ce faire, une région géographique comprenant 10 fermes d'engraissement, un abattoir et un réseau de transport a été sélectionnée. Trois lots de production consécutifs par ferme ont été suivis pendant 12 mois. Des échantillons environnementaux ont été prélevés à l'intérieur et à l'extérieur des fermes (3 visites d'élevage), dans la cour de l'abattoir (2 visites lors de sorties de lot) et sur le camion de transport. La détection des gènes de virulence (*eltB*, *estA*, *estB*, *faeG*, *stxA*, *stx2A*, *eae*, *cnf*, *papC*, *iucD*, *tsh*, *fedA*) dans les échantillons a été réalisée par PCR multiplexe conventionnelle. La distribution temporelle et spatiale des gènes de virulence a permis d'identifier le marqueur de contamination ETEC/F4 défini par la détection d'au moins un gène d'entérotoxine ETEC (*estB*, *estA* et *eltB*) en combinaison avec le gène de l'adhésine fimbriaire (*faeG*). La distribution des échantillons positifs ETEC/F4 qualifie la cour de l'abattoir comme un réservoir de contamination fréquenté par les transporteurs, vecteurs de contamination entre les élevages. Ceci suggère le lien microbiologique entre l'élevage, les transporteurs et l'abattoir jouant chacun un rôle dans la dissémination des microorganismes pathogènes et potentiellement zoonotiques en production porcine.

**Mots-Clés :** *Escherichia coli*, marqueur microbiologique, ETEC/F4, réseau de production, ferme, abattoir, porc, environnement, source de contamination, distribution

## **Abstract**

*Escherichia coli* is an important constituent of the pig intestinal microbiota. The transmission of pathogenic *E. coli* between herds and a slaughterhouse in a production network, in particular to illustrate its dissemination in a zoonotic perspective, is not well characterized. The detection of *E. coli* virulence genes could be used as an indicator of contamination to describe transmission between herds and the slaughterhouse. The objective was to identify an *E. coli* contamination marker to describe some transmission modes of pathogenic *E. coli* in a well-defined swine production network. A defined geographical area containing 10 farms, a slaughterhouse, and a transportation network was selected. Environmental samples were collected at various sites inside and outside the farms (3 visits), at the slaughterhouse yard (2 visits), and on the vehicles of the animal transporter. Three consecutive production batches were followed during 12 months. The presence in the samples of virulence genes (*eltB*, *estA*, *estB*, *faeG*, *stxA*, *stx2A*, *eae*, *cnf*, *papC*, *iucD*, *tsh*, *fedA*) commonly associated with pathogenic *E. coli* was examined by conventional multiplex PCR. The monitoring of the virulence gene profile distribution both temporally and spatially resulted in the proposing of an ETEC/F4 contamination marker. ETEC/F4 positive samples were defined by the detection of at least one ETEC enterotoxin gene (*estB*, *estA* and *eltB*) in combination with the *faeG* gene encoding F4 fimbriae in samples by PCR. The distribution of ETEC/F4 positive samples suggests that the slaughterhouse yard may act as a reservoir of contamination frequently visited by transporters, which are mechanical vectors of contamination between herds. These results illustrated the

need to improve the biosecurity relationship between herds and the slaughterhouse, both playing a role in dissemination of pathogenic (and potentially zoonotic) microorganisms in swine production.

**Keyword :** *Escherichia coli*, contamination marker, ETEC/F4, production network, farms, slaughterhouse, swine, environment, contamination sources, distribution

## Table des matières

|  |      |
|--|------|
| <b>Résumé</b> .....  | ii   |
| <b>Abstract</b> .....  | iii  |
| <b>Table des matières</b> .....  | v    |
| <b>Liste des tableaux</b> .....  | viii |
| <b>Liste des figures</b> .....   | ix   |
| <b>Liste des sigles et abréviations</b> .....  | x    |
| <b>Introduction</b> .....  | 1    |
| <b>Recensement de la littérature</b> .....   | 5    |
| Portrait de la production et de la consommation de la viande de porc .....               | 6    |
| La filière porcine coopérative .....   | 6    |
| L'utilisation des antimicrobiens en production animale .....                             | 8    |
| La biosécurité en élevage .....  | 9    |
| La présence d' <i>E. coli</i> en élevage .....   | 11   |
| Les <i>E. coli</i> pathogènes .....  | 12   |
| Les <i>E. coli</i> pathogènes extra-intestinaux (ExPEC).....                             | 13   |
| Les <i>E. coli</i> entéro-pathogènes (EPEC).....   | 14   |
| Les <i>E. coli</i> entérohémorragiques (EHEC) et producteurs de shigatoxine (STEC) ..... | 15   |
| Les <i>E. coli</i> entérotoxigéniques (ETEC) .....                                       | 17   |

|  |    |
|--|----|
| Les fimbriae associés aux souches ETEC en lien avec la DPS .....   | 19 |
| Le fimbriae F4 (K88) .....   | 19 |
| Le fimbriae F18.....   | 20 |
| L'adhésine AIDA-1.....   | 21 |
| Les entérotoxines associées aux ETEC dans les cas de DPS .....   | 22 |
| Les principaux virotypes des isolats d' <i>E. coli</i> pouvant causer des maladies chez le porc<br>..... | 23 |
| La pathogenèse des ETEC chez le porc .....   | 24 |
| Les facteurs de risque en lien avec le développement de la diarrhée postsevrage (DPS)<br>.....           | 24 |
| Le système digestif du porcelet et la DPS .....  | 25 |
| La susceptibilité des porcelets à la diarrhée postsevrage .....  | 26 |
| La vaccination contre la diarrhée postsevrage .....  | 28 |
| La transmission de microorganismes dans le réseau .....  | 29 |
| La caractérisation des <i>E. coli</i> pathogènes par le sérotypage .....                                 | 30 |
| Les groupes phylogénétiques des <i>E. coli</i> pathogènes .....  | 32 |
| Les mécanismes de résistance aux antimicrobiens .....  | 33 |
| Le transfert horizontal des gènes de résistances .....   | 35 |
| Les organismes indicateurs et les marqueurs de contamination .....                                       | 36 |
| La distribution des microorganismes pathogène en élevage.....  | 38 |

|  |     |
|--|-----|
| Les <i>E. coli</i> à caractère zoonotiques ..... | 40  |
| <b>Problématique générale</b> .....              | 40  |
| <b>Méthodologie et Résultats</b> .....           | 42  |
| Summary .....                                    | 44  |
| Introduction .....                               | 45  |
| Materials and methods .....                      | 46  |
| Results .....                                    | 49  |
| Discussion .....                                 | 52  |
| Conclusion .....                                 | 57  |
| <b>Discussion générale</b> .....                 | 67  |
| <b>Conclusion</b> .....                          | 77  |
| <b>Bibliographie</b> .....                       | xiv |

## Liste des tableaux

Méthodologie et Résultats:

**TABLEAU 1 :**

Distribution of pathogenic *E. coli* virulence genes in a swine production network in Quebec. (Page 58)

**TABLEAU 2 :**

Distribution of ETEC virulence genes on the farms in a swine production network in Quebec. (Page 59)

**TABLEAU 3 :**

Spatial distribution of ETEC/F4 in sample on the farms of the network.  
(Page 59)

**TABLEAU 4 :**

Spatial distribution of ETEC/F4 marker positive samples at the slaughterhouse.  
(Page 60)

**TABLEAU 5 :**

The distribution of ETEC/F4 positive samples on truck-associated objects.  
(Page 63)



## Liste des figures

Méthodologie et Résultats :

### FIG 1

Spatial distribution and proportion of ETEC/F4 samples in a typical schematic representation of the 10 fattening farms after 3 visits. (Page 61)

### FIG 2

Spatial distribution and proportion of ETEC/F4 positive samples in a typical schematic representation of the yard of the slaughterhouse during 18 visits before and after the passage of the delivery truck in the main track. (Page 62)

### FIG 3

The temporal distribution of ETEC/F4 positive samples in the farm environment throughout the sampling period suggesting a higher level of contamination for a majority of farms in the network from September 2011 to January 2012. (Page 63)

### FIG 4

The temporal distribution of ETEC/F4 positive samples in the slaughterhouse yard throughout the sampling period suggesting a higher level of ETEC/F4 contamination in the same time period as in the farm environment, from September 2011 to January 2012. (Page 64)

## Liste des sigles et abréviations

Ac : Adénylate cyclase

ADN : Acide désoxyribonucléique

AEEC: Attaching and effacing *E. coli* (*E. coli* attachant et effaçant)

AIDA-1 Adhesin-involved-in-diffuse-adherence (adhésine impliquée dans l'adhérence diffuse)

AMPc : Cyclic adenosine monophosphate

BPI: Bactericidal/permeability-increasing protein (Protéine bactéricide/augmentant la perméabilité)

CFTR: Cystic fibrosis transmembrane regulator (régulateur transmembranaire CFTR)

CNF: Cytotoxic necrotizing factor (facteur nécrosant cytotoxique)

DPS: Diarrhée postsevrage du porcelet

EAST1: Enteroaggregative *E. coli* heat-stable enterotoxin 1 (entérotoxine résistante à la chaleur 1 *E. coli* entéro-agrégatifs)

EPEC: Enteropathogenic *E. coli* (*E. coli* entéropathogène)

EPQ: Les Éleveurs de porcs du Québec (EPQ)

ESBL: Extended-spectrum beta lactamases (bêta-lactamase à spectre étendu)

ETEC : Enterotoxigenic *E. coli* (*E. coli* entérotoxique)

ExPEC : Extraintestinal pathogenic *E. coli* (*E. coli* pathogènes extra-intestinales)

FPPQ : Fédération des producteurs de porcs du Québec

HUS : Syndrome urémique et hémolytique

IgA : Immunoglobulines A

IgM : Immunoglobulines M

IMTGP : Mucin-type sialoglycoproteins (sialoglycoprotéine de type Mucin)

LEE: Locus of enterocyte effacement (locus effacement enterocyte)

LPS: Lipopolysaccharide

LT : Heat-labile enterotoxin (entérotoxine labile à la chaleur)

MLST : «Multilocus sequence typing»

OCDE : Organisation de coopération et de développement économiques

Paa: Porcine attaching and effacing associated (protéine Paa)

PBP : penicillin-binding protein (protéine «penicillin-binding»)

PEDv : Virus épidémique porcine

PFGE : «Pulsed-field gel electrophoresis»

PICRA : Programme intégré canadien de surveillance de la résistance aux antimicrobiens

PKA: Protéine kinase A

SAAT: Self-Associating AutoTransporter (auto transporteur SAAT)

SNP : single nucléotide polymorphism (polymorphisme de nucléotide unique)

STa : Heat-stable enterotoxin a (entérotoxine résistante à la chaleur a)

STb : Heat-stable enterotoxin b (entérotoxine résistante à la chaleur b)

STEC: Shiga toxin-producing *E. coli* (*E. coli* producteur de toxine shiga)

TFRC : Récepteur de la transferrine

THG : Transfert horizontal de gènes

Tsh: Temperature-sensitive hemagglutinin (hémagglutinine sensible à la chaleur)

UFC/g : Unité formatrice de colonie / gramme

UPEC : (*Escherichia coli* uropathogène)

VTEC : Verotoxin-producing *E. coli* (*E. coli* producteur de vérotoxine)

*Remerciements*

Merci à mon directeur, codirecteur et codirectrice de recherche, Dr Philippe Fravalo, Dr John Morris Fairbrother et Dre Ann Letellier pour leur support tout au long du projet.

Merci à mes collègues et amis de la Chaire de recherche en salubrité des viandes et du Laboratoire EcL pour votre aide et conseils.

Merci aux membres de mon comité-conseil et aux membres du jury d'évaluation de ce mémoire.

Merci au Groupe de recherche et d'enseignement en salubrité alimentaire (GRESA) et au Centre de recherche en infectiologie porcine et avicole (CRIPA) pour la contribution au projet.

Merci à mes proches pour leurs encouragements et leur support constant tout au long de mes études.

## **Introduction**

Plusieurs études démontrent que la présence de certaines souches d'*Escherichia coli* (*E. coli*) pathogènes dans les élevages porcins est en lien avec le développement de maladies comme la diarrhée colibacillaire et la maladie de l'œdème engendrant la mortalité et des pertes économiques importantes en industrie (Fairbrother et al., 2007; Melkebeek et al., 2013; Moxley, 2000). L'administration d'antimicrobiens, comme la néomycine, est un traitement qui peut être appliqué lors d'épisode de maladie en élevage. L'antimicrobien est administré aux animaux atteints de la maladie, mais aussi aux animaux sains de manière préventive. Il est reconnu depuis de nombreuses années que l'usage répété d'antimicrobiens à des doses sous thérapeutiques favorise l'émergence de souches résistantes à ces derniers, limitant ainsi les options disponibles pour le traitement des maladies d'origine bactériennes. Par conséquent, il est primordial d'envisager des alternatives afin de minimiser l'utilisation des antimicrobiens en élevage. Plusieurs molécules antimicrobiennes utilisées en élevages sont aussi administrées chez les humains lors de cas d'infections bactériennes diverses. En sachant que de plus en plus d'isolats d'origine animale peuvent être responsables de zoonoses, il est préférable d'éviter l'apparition d'isolats multirésistants. En d'autres mots, l'utilisation excessive des antimicrobiens en production animale peut restreindre le choix de traitements disponibles lors de cas d'infection en santé humaine.

Une meilleure compréhension des voies de dissémination des microorganismes pathogènes dans les réseaux de production peut aider à amoindrir les risques d'éclosion de maladie et par conséquent diminue le nombre de cas où les molécules antimicrobiennes sont nécessaires. L'amélioration du statut sanitaire de l'élevage ainsi que le contrôle de la contamination par des souches d'*E. coli* pathogènes jusqu'à la fin du processus d'abattage passent aussi par une

meilleure compréhension des façons par lesquelles ces souches entrent dans les différents paliers de cette production alimentaire. Les souches d'*E. coli* présentes dans les élevages se déclinent en une variété de clones passant de souches pathogènes et zoonotiques à non pathogènes commensales et constituent potentiellement des marqueurs microbiologiques de contamination bactérienne en production. La pathogénicité des souches *E. coli* est caractérisée par la présence de gènes de virulence spécifiques. Ces gènes de virulence peuvent être retrouvés sur les îlots de pathogénicité au sein du chromosome bactérien ou bien véhiculés par des prophages ou des plasmides. Les gènes de virulence, lorsque présents, sont généralement inégalement distribués dans le génome de ces bactéries. Ils peuvent cependant être étroitement associés avec d'autres gènes, comme certains gènes de résistance aux antimicrobiens à l'intérieur d'un même plasmide.

La production porcine comme elle est pratiquée aujourd'hui nécessite la participation d'intervenants qui prennent part au processus de production. En effet, plusieurs intervenants comme les transporteurs de porcs, les vétérinaires et les techniciens sillonnent le réseau de production et peuvent agir en tant que vecteur de contamination entre les élevages et l'abattoir. Il est impératif de mieux comprendre cette dynamique ainsi que leur potentiel comme vecteur de contamination dans le réseau de production. Une meilleure compréhension peut aider à établir des stratégies de contrôle afin de prévenir la diffusion de microorganismes pathogènes dans le réseau. La détection et l'étude de la distribution des gènes de virulence et de résistance aux antimicrobiens présents dans la population des *E. coli* pathogènes sont primordiales afin de comprendre et d'identifier les modes de dissémination entre les élevages et l'abattoir. Jusqu'à aujourd'hui, la distribution des gènes de virulence des *E. coli* pathogènes dans un

réseau de production porcine comprenant des fermes d'élevage, un transporteur et un abattoir n'est pas bien caractérisée. L'étude de cette distribution peut permettre d'identifier des marqueurs microbiologiques de contamination dans le réseau. Ceci pourrait permettre de décrire certains modes de dissémination des souches *E. coli* pathogènes. L'étude de la dissémination d'un marqueur microbiologique dans un réseau de production permettra ultimement d'améliorer les mesures de biosécurité en élevage et de minimiser la transmission d'isolats à caractère zoonotiques. Ce projet est fondé sur l'hypothèse que la détection ainsi que le suivi de certains facteurs de virulence des *E. coli* pathogènes peuvent permettre d'identifier des marqueurs de contamination dans le réseau de production. L'objectif de cette étude est en premier temps d'élaborer un protocole d'échantillonnage et une méthodologie permettant la détection des *E. coli* pathogènes dans le réseau. Ensuite, l'analyse des profils de détection dans les échantillons permettra d'identifier un marqueur permettant de suggérer certaines sources de contamination et de documenter les modes potentiels de diffusion des *E. coli* pathogènes entre les élevages et l'abattoir. Plus spécifiquement, il aura fallu constituer un réseau de production regroupant un abattoir et 10 fermes d'élevage. Finalement, la caractérisation des profils de contamination des *E. coli* de manière spatio-temporelle pourrait ultimement permettre de faire ressortir des liens épidémiologiques entre les isolats et entre les sources de contaminations afin d'améliorer les mesures de biosécurité à la ferme et dans la production agroalimentaire.



## **Recensement de la littérature**

### **Portrait de la production et de la consommation de la viande de porc :**

Au Canada, la viande d'origine porcine occupe le troisième rang parmi les viandes les plus consommées après la viande de bœuf et la volaille (Statistique Canada, 2007). Les trois quarts de la production annuelle de porc proviennent du Manitoba, de l'Ontario et du Québec. À titre d'exemple, en 2012, la production porcine québécoise s'est élevée à 7,35 millions de porcs.

Repéré à [http://www.stat.gouv.qc.ca/statistiques/agriculture/production-porcine/porcs\\_ra\\_2011-2012.html](http://www.stat.gouv.qc.ca/statistiques/agriculture/production-porcine/porcs_ra_2011-2012.html)

Selon les statistiques de l'OCDE, 189 691 tonnes de viande porcine ont été consommées au Québec en 2007, soit plus de 24 kg par habitant. L'exportation de la viande porcine représente plus de 60 % de la production de la province (Monographie de l'industrie porcine au Québec, 2010). Selon les Éleveurs de porcs du Québec, les principaux partenaires commerciaux des producteurs porcins québécois sont les États-Unis et le Japon avec respectivement 31 % et 27 % de la valeur totale des exportations. Suivent ensuite la Russie (9 %), Hong Kong (3 %) et l'Australie (5 %). Plusieurs prédisent que d'ici 2017, une croissance de 21,7 % de la consommation de la viande de porc est prévue à l'échelle mondiale (Monographie de l'industrie porcine au Québec, 2010). Les avantages de cette denrée alimentaire sur le plan nutritionnel et gastronomique favorisent le commerce où la consommation de cette viande est pratiquée. La demande croissante en produits porcins a permis le développement des élevages au fil des années. Au Québec, l'industrie est parvenue à augmenter la taille et le nombre de fermes d'engraissements un peu partout sur le territoire.

### **La filière porcine coopérative :**

Afin d'offrir un produit de qualité à un prix compétitif, l'industrie porcine québécoise s'est

uniformisée en prônant le partenariat entre les parties prenantes impliquées dans la production porcine. Repéré à <http://www.statcan.gc.ca/pub/96-325-x/2014001/article/14027-fra.htm#a3>

Des producteurs de porcs aux fournisseurs de génétique et d'alimentation, de l'abattage à la transformation, la coopération entre toutes ces entreprises a permis de créer la filière porcine coopérative québécoise. Ces acteurs travaillent en étroite collaboration afin d'améliorer la valeur du produit et d'offrir un produit qui respecte les normes de qualité établies.

Repéré à <http://www.porclacoop.coop/fr/default.shtml>

Les fermes d'engraissement agglomérées dans un secteur sont desservies par un même réseau d'intervenants qui regroupe les vétérinaires, techniciens et transporteurs. Ceux-ci sont responsables du respect des réglementations, de la salubrité, de la santé animale et du transport entre les étapes de production. Les transporteurs, particulièrement, amènent les porcs en fin de production vers une usine d'abattage autorisée définie selon un réseau de production. L'assignation des porcs à un abattoir est réalisée par Les Éleveurs de porcs du Québec (EPQ) et a pour objectif de réduire les déplacements de porcs tout en respectant les liens existants entre les éleveurs et les acheteurs. Aussi, les abattoirs s'assurent d'un écoulement des porcs harmonieux. Repéré à

<http://www.leseleveursdeporcsduquebec.com/lorganisation-fr/production/le-portrait-economique/la-mise-en-marche.php>

Le transporteur est aussi appelé à transiter entre les élevages afin de distribuer les animaux entre les fermes. Dans un contexte de production intensif, le statut sanitaire du troupeau influence grandement le rendement et le coût de production. En effet, tout au long de sa vie, l'animal est sujet à être contaminé par divers microorganismes pathogènes qui affectent sa santé. L'utilisation des antimicrobiens à des fins préventives ou curatives est réglementée afin

que les animaux reçoivent le traitement approprié en s'assurant que les porcs mis sur le marché soient exempts de résidus d'antibiotiques. Pour cela, les éleveurs et le regroupement Les Éleveurs de porcs du Québec travaillent ensemble afin d'assurer que les porcs livrés aux abattoirs sont exempts de résidus antibiotiques.

### **L'utilisation des antimicrobiens en production animale :**

Lors d'épisode de maladies associées à des infections bactériennes, le traitement privilégié est l'administration d'antimicrobiens à des doses thérapeutiques. Parallèlement, les antimicrobiens peuvent être utilisés en prophylaxie. L'administration d'antimicrobiens à des doses sous-thérapeutiques est utilisée en élevage afin de prévenir les maladies d'origine bactérienne et aussi comme promoteur de croissance (McEwen and Fedorka-Cray, 2002). La présence d'antimicrobien dans l'environnement bactérien applique une pression de sélection qui favorise l'apparition et la propagation de gènes de résistance dans la population bactérienne. En effet, les bactéries qui possèdent ces gènes de survie qui permettent la résistance aux agents antimicrobiens (gènes de résistance) sont favorisées et ont l'opportunité de coloniser un environnement donné tout en propageant ces gènes dans la population bactérienne (Juhas, 2015). Les infections par des souches bactériennes résistantes aux antimicrobiens engendrent souvent des échecs de traitement. Au Canada, un programme de surveillance de la résistance aux antimicrobiens a été mis sur pied afin de décrire l'état de la situation (Rapport annuel du PICRA, 2009). Il est préférable de limiter l'utilisation de certains antimicrobiens de crainte qu'ils ne deviennent complètement inopérants dans un futur proche. Le retrait d'antibiotiques utilisés comme promoteurs de croissance tels que l'avoparcine, la bacitracine, la spiramycine, la tylosine et la virginiamycine a été associé à une augmentation

du nombre d'épisodes de diarrhée en élevage (Fairbrother et al., 2007). Pour traiter ces maladies, les vétérinaires administrent d'autres antimicrobiens à des doses curatives comme les aminoglycosides, le triméthoprim sulfonamide, les macrolides, les lincosamides et les polymyxines (Fairbrother et al., 2007; Quesada et al., 2015). Ces derniers étant souvent utilisés en derniers recours pour traiter les infections induites par des souches résistantes (Casewell et al., 2003). La prévention de la contamination des troupeaux peut minimiser l'incidence des maladies associées à l'infection par ces microorganismes pathogènes. Une des méthodes de prévention est d'instaurer des mesures de biosécurité strictes en élevage afin de limiter l'entrée de microorganismes pathogènes dans l'élevage.

#### **La biosécurité en élevage :**

La biosécurité en élevage est l'instauration de mesures préventives afin d'assurer un contrôle de la sécurité biologique dans le but de maintenir le statut sanitaire de l'élevage. L'instauration de ces procédures contribue à prévenir les risques liés à la transmission d'agents pathogènes par diverses voies de contamination. Par exemple, la mise en application de mesures de biosécurité peut prévenir l'introduction de pathogènes en élevage. Ces mesures peuvent aussi limiter la dispersion vers d'autres élevages en contenant les microorganismes déjà présents à la ferme.

Repéré à <http://www.mapaq.gouv.qc.ca/fr/Publications/Fichebiosecurite.pdf>

Afin de contrôler les contaminants, les producteurs sont fortement encouragés à porter le survêtement de travail ainsi que les bottes de caoutchouc à l'intérieur de l'établissement. Il est aussi recommandé de se laver les mains à l'entrée et à la sortie de la ferme. Le port de matériels de protection individuelle comme le masque de type N95 certifié par le National

Institute for Occupational Safety Health peut être à considérer si le troupeau présente des signes de maladies transmissibles aux humains comme le virus de la grippe.

Repéré à <http://www.cdc.gov/h1n1flu/masks.htm>

Le lavage et la désinfection de la porcherie entre chaque lot ainsi que l'implantation d'une entrée danoise sont d'autres stratégies de contrôle contre la contamination dans les élevages. L'entrée danoise inclut une délimitation qui présente une aire réservée au changement de vêtements et de chaussures et où est prévu un endroit pour la désinfection des mains avant l'entrée en élevage. Il est aussi important de contrôler la transmission d'agents pathogènes entre les élevages de différentes fermes. Dans la production porcine de type coopérative, les intervenants comme les vétérinaires, techniciens et transporteurs peuvent être des vecteurs de contamination.

Repéré à <http://www.fao.org/docrep/012/i1435e/i1435e00.htm>

Ceux-ci doivent se soumettre aux mesures de biosécurité pour minimiser la transmission des contaminants entre les élevages. En effet, il est décrit que les camions et autres véhicules de transport peuvent être contaminés par des microorganismes pathogènes, comme certaines souches d'*E. coli* responsables de maladies (Dee et al., 2004; Hernandez et al., 2013; Keelara et al., 2013). Dans la plupart des coopératives agricoles, les transporteurs sont responsables de faire le lavage et la désinfection de leur véhicule entre chaque transport. Par contre, le manque de station de lavage et l'importance du rendement économique peuvent jouer au détriment de l'assiduité des lavages et de la désinfection des camions. Dans la littérature, peu de données existent sur le rôle des véhicules des vétérinaires et techniciens dans le transfert de la contamination dans un réseau de production. Une chose est sûre, l'amélioration de la biosécurité constitue un moyen efficace afin d'accroître la rentabilité et la durabilité à long

terme de l'industrie (Heikkilä, 2011).

### **La présence d'*E. coli* en élevage :**

Les souches d'*E. coli* commensale non pathogène par définition font partie intégrante du microbiote des mammifères. Ces bactéries participent activement à la digestion des aliments et sont bénéfiques pour l'hôte, par exemple par la synthèse de vitamine K (Bentley and Meganathan, 1982). Cependant, une variété de clones présentant des propriétés pathogènes sont responsables de maladies qui entraînent la mortalité en élevage. Les principales pathologies dues à ces souches sont la diarrhée postsevrage du porcelet (DPS), la maladie de l'œdème, des cas de méningites et d'autres infections extra-intestinales. L'acquisition de gènes de virulence par certaines souches *E. coli* peut procurer un avantage compétitif au sein de la flore résidente du système digestif de l'animal. Ces souches sont alors capables de coloniser puis d'infecter l'animal. Certaines souches *E. coli* sont pathogènes, comme les souches *E. coli* productrices de shigatoxine (STEC), tandis que d'autres sont opportunistes comme les *E. coli* extra-intestinaux (ExPEC) (Kaper et al., 2004). Les souches dites opportunistes peuvent être présentes dans la flore digestive sans causer de problème. Par contre, lorsque les conditions physiologiques sont propices, ces souches ont la capacité de causer une maladie. On retrouve parfois ce type d'infection chez certains groupes à risque comme les individus avec une flore digestive déficiente et les immunosupprimés (Fernandez-Romero et al., 2015). Aussi, certaines souches *E. coli* présentes chez l'animal, lorsque transmises à l'homme, ont le potentiel de causer une maladie. Ces souches sont dites zoonotiques (Jakobsen et al., 2010).

### **Les *E. coli* pathogènes:**

La bactérie *E. coli* est un bacille Gram négatif, anaérobie facultatif. Les souches *E. coli* sont mésophiles et sont capables de fermenter les sucres comme le glucose et le lactose.

Repéré à <http://www.cdc.gov/ecoli/index.html/>

La bactérie se retrouve en majeure partie dans le tractus digestif des mammifères à une densité de population entre  $10^4$ - $10^9$  UFC/g de matière fécale (Tenaillon et al., 2010). Suite à la naissance de l'animal, les bactéries *E. coli* présentes dans l'environnement colonisent rapidement le petit intestin et font partie intégrante de la flore normale de l'animal (Schierack et al., 2009). La densité de population est plus faible dans la partie proximale du petit intestin et augmente progressivement jusqu'à une concentration maximale dans le colon (Tenaillon et al., 2010). La plupart des isolats résidents du système digestif sont commensaux (Tenaillon et al., 2010). Par contre, certaines souches possèdent un pouvoir pathogène. Ces dernières sont regroupées en différents groupes ou pathotypes basés sur la présence de gènes de virulences spécifiques et par les mécanismes utilisés pour engendrer une maladie. Les pathotypes d'*E. coli* les plus importants retrouvés chez les animaux sont les *E. coli* entérotoxigéniques (ETEC), entéropathogènes (EPEC), entérohémorragiques (EHEC), les producteurs de shigatoxines (STEC) aussi appelés vérotoxines (VTEC) et extra-intestinaux (ExPEC). Certains pathotypes sont pathogènes opportunistes pour l'animal tandis que d'autres peuvent être hautement pathogènes. Repéré à <http://www.ecl-lab.com/en/ecoli/index.asp>

Ces derniers peuvent entraîner une variété d'infections entériques et extra-intestinales chez les animaux et parfois chez les humains. La présence de certains pathotypes *E. coli* dans l'environnement de l'animal est un facteur important pour le développement de la diarrhée (Goswami et al., 2011). D'autant plus que ces bactéries peuvent survivre jusqu'à 6 mois dans



l'environnement lorsqu'elles sont protégées par de la matière organique (van Beers-Schreurs et al., 1992).

**Les *E. coli* pathogènes extra-intestinaux (ExPEC) :**

Ce pathotype regroupe les souches *E. coli* responsables d'une variété d'infections extra-intestinales comme des septicémies, des méningites, des infections du système urinaire, des organes génitaux et des glandes mammaires chez les humains et chez les animaux (Kohler and Dobrindt, 2011). Il est important de noter que les isolats ExPEC font partie de la microflore commensale normale des humains et de plusieurs animaux à sang chaud et ne sont pas systématiquement associés au développement de maladies (Kohler and Dobrindt, 2011). De façon intéressante, les isolats ExPEC retrouvés chez les humains peuvent partager certains gènes de virulence et de résistance aux antimicrobiens avec des isolats provenant d'animaux d'élevage (Belanger et al., 2011). Récemment, un lien clonal a été identifié entre des isolats ExPEC retrouvés dans la viande de volaille et des isolats humains (Jakobsen et al., 2012). Cela met l'accent sur le potentiel zoonotique de ces souches et sur la transmission possible entre les animaux et les humains par la manipulation et la consommation de viandes contaminées. Conséquemment, les élevages peuvent donc être vus comme un réservoir de souches ExPEC. Contrairement aux autres pathotypes, comme les ETEC, EPEC et STEC, les ExPEC ne sont pas caractérisés par la présence de gènes de virulence particuliers (Johnson and Russo, 2002). Les ExPEC possèdent une grande variété de gènes de virulence dont la distribution diffère grandement entre les souches. Ces gènes codant des facteurs de virulence sont impliqués dans la colonisation bactérienne (fimbriae P), l'invasion (CNF et Tsh), les systèmes d'acquisition du fer (aérobactine) et la résistance à la phagocytose et au complément (capsule Kps). De

manière générale, la plupart des ExPEC chez l'humain font partie du groupe phylogénétique B2 et D (Clermont et al., 2000).

### **Les *E. coli* entéropathogènes (EPEC) :**

Le pathotype EPEC est impliqué dans les cas de diarrhée chez l'humain et chez plusieurs animaux. Ces souches colonisent l'épithélium de l'intestin et induisent l'effacement des microvillosités à la surface de la muqueuse intestinale et réorganisent le cytosquelette de la cellule en formant un piédestal (Schmidt, 2010). Ces souches *E. coli* sont caractérisées comme «attaching and effacing *E. coli*» (AEEC). Les gènes qui encodent les protéines impliquées dans le développement de l'effacement des microvillosités sont regroupés dans le « locus of enterocyte effacement » (LEE) décrit pour la première fois chez des isolats EPEC humains (Nataro and Kaper, 1998). Ce locus contient aussi les gènes permettant la synthèse du système de sécrétion de type 3 (T3SS) et les protéines effectrices permettant la formation du piédestal (Brown et al., 2008; Deng et al., 2005). D'autres facteurs de virulence comme l'intimine EaeA (97kDa), une protéine extramembranaire, sont nécessaires à l'apparition des lésions A/E (Zhu et al., 1996). La protéine EaeA permet aussi l'adhérence bactérienne à l'épithélium intestinal favorisant ainsi la colonisation (Kaper et al., 1997). La protéine Paa (27.6 kDa) «porcine attaching and effacing associated» a aussi été identifiée comme acteur pouvant contribuer à l'effacement des microvillosités intestinales et est souvent associée à la présence de l'intimine EaeA chez les EPEC et les STEC et de l'entérotoxine LT chez les ETEC.

### **Les *E. coli* entérohémorragiques (EHEC) et producteurs de shigatoxine (STEC) :**

Le pathotype EHEC et le sous-groupe STEC sont reconnus pour causer des colites

hémorragiques de façon épidémique chez les humains. En 1983 Riley et ses collaborateurs identifient pour la première fois la souche *E. coli* O157: H7 comme l'agent causal d'une épidémie de diarrhée sanglante aux États-Unis. Les réservoirs des souches EHEC O157: H7 sont les ruminants comme les bovins et les moutons qui abritent ce microorganisme de manière asymptomatique dans leur système digestif (Fairbrother and Nadeau, 2006). D'autres animaux comme le poulet, le dindon, le porc et le lapin peuvent aussi être porteurs de ce pathogène (Doane et al., 2007). De manière intéressante, la moulée de nutrition animale a aussi été documentée comme étant contaminée par *E. coli* O157:H7 de façon sporadique pouvant agir comme vecteur de contamination (Davis et al., 2003) (Doane et al., 2007). La transmission des souches EHEC O157: H7 vers les humains se fait principalement par la consommation de viandes hachées contaminées dont la cuisson est inadéquate. D'autres modes de contamination ont aussi été décrits, comme le contact direct avec les fèces des animaux porteurs et l'ingestion de végétaux crus contaminés par le lisier provenant des ruminants (Arthur et al., 2010; Marder et al., 2014). Le contrôle de la contamination est important puisque la dose infectieuse n'est seulement qu'une dizaine de microorganismes (Tuttle et al., 1999). Occasionnellement, l'infection progresse en syndrome urémique et hémolytique (HUS), qui entraîne des défaillances rénales et de la mortalité chez les jeunes enfants et les personnes âgées (Tserenpuntsag et al., 2005). La shigatoxine ou vérotoxine produite par les souches STEC (ou VTEC) est létale sur les lignées de cellules rénales de singes verts africains, cellules Vero (Rowe, 1995). La shigatoxine de type AB(5) est composée d'une sous-unité A à l'action N-glycosidase et de cinq sous-unités B qui permettent l'attachement au globotriaosylceramide (Gb3) de la membrane des entérocytes (Nakao and Takeda, 2000). Les toxines Stx1 (VT1) et Stx2 (VT2) sont les deux types de shigatoxines

retrouvées chez les souches STEC et certains isolats encodent l'une, l'autre ou les deux types de toxines (Blanco et al., 2004). Les shigatoxines sont caractérisées en sous-types dont certaines, comme Stx2e, sont particulièrement retrouvées dans les cas de maladie de l'œdème chez le porc. D'autres sous types, comme les toxines Stx2a et Stx2d, sont associées à des cas sévères de diarrhées chez les humains (Persson et al., 2007). Récemment, des variants de Stx2d ont été identifiés chez le mouton. Ces variants démontrent une substitution d'un acide aminé dans la sous-unité A (Maluta et al., 2013). Par convention, les souches *E. coli* EHEC sont des STEC (VTEC) qui possèdent des facteurs de virulence additionnels qui leur donnent le pouvoir de causer la colite hémorragique et le HUS chez les humains. Certaines souches EHEC possèdent les gènes LEE qui leur permettent de causer l'effacement des microvillosités. Le sérotype O157:H7 n'est pas le seul pouvant causer la maladie chez l'homme. En effet, d'autres souches EHEC non-O157 au sein des sérogroupes O26, O91, O103, O104, O111, O113, O117, O118, O121, O128 et O145 sont de plus en plus retrouvés dans les cas de colites hémorragiques et de HUS (Brooks et al., 2005). Ces souches EHEC non-O157 nécessitent une attention particulière en laboratoire puisque les méthodes de diagnostic basées sur la détection du sérotype O157 ne permettent pas leur identification. De plus, les méthodes basées sur la détection des gènes de virulence *stx*<sub>1</sub>, *stx*<sub>2</sub> et les gènes spécifiques au sérotype O ne permettent pas de distinguer spécifiquement les souches EHEC. D'autres méthodes comme la détection des gènes issus des îlots génétiques OI-122 et OI-71 d'*E. coli* O157:H7 augmentent la spécificité, mais ne permettent pas de discriminer entre les isolats EHEC et EPEC. De nouveaux marqueurs génétiques comme les gènes candidats Z2098 et Z2099 présents sur l'îlot génétique OI-57 sont étroitement liés avec les isolats EHEC ainsi que leurs dérivés stx-négatif (Delannoy et al., 2013). L'identification de gènes spécifiques aux EHEC permet un meilleur

diagnostic des souches EHEC typiques et EHEC émergentes.

**Les *E. coli* entérotoxigéniques (ETEC) :**

Les infections par le pathotype ETEC sont les causes la plus communes de colibacillose chez les animaux d'élevage (Nagy and Fekete, 2005). La pathogénicité de ces souches repose sur la production d'entérotoxines et d'adhésines fimbriae ou non-fimbriae. Ces dernières permettent l'adhérence à l'épithélium intestinal et permet la colonisation. Les entérotoxines les plus fréquemment produites sont les toxines thermostables STa, STb, la toxine entéroagrégative EAST1 et la toxine thermolabile LT. Afin d'être en mesure de coloniser le tractus intestinal de l'animal, le microorganisme se doit de produire des adhésines qui permettent l'attachement à des récepteurs présents à la surface de l'épithélium intestinal de l'animal . Les fimbriae sont de très fins appendices de 3 à 10 nm de diamètre sur plusieurs µm de long retrouvés à la surface des bactéries à Gram négatifs et permettent leur attachement (Kaper et al., 2004). D'autres facteurs de virulence comme la capsule et l'antigène O permettent de résister au système immunitaire de l'hôte prévenant la phagocytose par les macrophages et la désactivation par le complément (Sarkar et al., 2014). Ces facteurs de virulence favorisent la survie de la bactérie dans les environnements parfois hostiles. Chez le porc, les adhésines les plus rencontrées chez les ETEC sont les fimbriae F4 (K88), F5 (K99), F6 (987P), F41, F18 et une adhésine non-fimbriae AIDA-I «adhesin involved in diffuse adherence». L'isolement d'*E. coli* provenant de porcelets diarrhéiques qui possèdent les facteurs de virulence STa, STb et LT, mais négatifs pour la présence des adhésines fimbriae F4, F5, F6, F18 et F41 suggère qu'il existe des facteurs d'adhérences jusqu'à maintenant inconnus. La majorité des ETEC isolées des cas de diarrhée postsevrage produisent une hémolysine résultant en une hémolyse-

$\beta$  des érythrocytes (Frydendahl, 2002). La diarrhée postsevrage du porcelet (DPS), aussi appelée colibacillose postsevrage, est une maladie pouvant causer la mort des porcelets d'environ une semaine après le sevrage. Cette maladie est diagnostiquée partout à travers le monde (Fairbrother et al., 2007). Aussi, des épisodes de diarrhée peuvent être rapportés chez les porcs en engraissement (Amezcuca et al., 2002). La manifestation de la DPS est souvent associée au pathotype *E. coli* ETEC et particulièrement le pathotype ETEC :F4. Les diarrhées causées par les souches ETEC :F4, en plus d'affecter considérablement le bien-être animal, sont considérées comme l'une des maladies ayant un impact économique des plus importants dans l'industrie porcine. Il est évalué que pour un élevage de 500 truies l'impact de la DPS peut s'élever jusqu'à 20 000 \$ CAN/an (Amass et al., 2003). La maladie se déclare subitement et la morbidité peut atteindre 50 à 70 % chez les porcelets sevrés. Des porcelets âgés de deux à huit semaines sont retrouvés morts avant même l'apparition des signes cliniques (Dewey et al., 2006). Les épisodes de diarrhée peuvent s'étendre de quatre à sept jours et le taux de mortalité peut atteindre 10 à 25 % en absence de traitement (Laine et al., 2008). La diarrhée est caractérisée par une couleur jaunâtre allant au gris. Les porcelets se contaminent par ingestion des bactéries qui se trouvent dans leur environnement. Mises à part les infections entériques par les ETEC, d'autres pathologies peuvent aussi se développer comme des septicémies secondaires, la manifestation d'hémorragie et la splénomégalie accompagnée de diarrhée sévère (Gyles and Fairbrother, 2010) (Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals, 4th Edition).

#### **Les fimbriae associés aux souches ETEC en lien avec la DPS:**

L'expression des adhésines de type fimbriae joue un rôle déterminant dans la colonisation des

souches *E. coli* qui engendrent la DPS. Les fimbriae F4 et F18 sont fréquemment retrouvés chez les ETEC responsables de la DPS (Frydendahl, 2002). Le fimbriae F18 est souvent détecté lors d'épisodes de diarrhée chez les porcelets sevrés à environ deux semaines d'âge. Tandis que le fimbriae F4 est détecté lors d'épisodes de diarrhée chez les porcelets nouveaux nés (diarrhée néonatale) et après le sevrage (postsevrage). Le développement de la maladie selon le type de fimbriae exprimé, F4 ou F18, est lié à la présence des récepteurs dans le tractus gastro-intestinal de l'animal. On pense alors que les récepteurs capables de lier le fimbriae F4 sont probablement plus nombreux et exprimés plus tôt dans la vie de l'animal comparativement aux récepteurs spécifiques aux fimbriae F18 (Coddens et al., 2007). Les épisodes de diarrhées engendrés par les souches ETEC: F4 sont aussi plus fréquents en production (Sugiharto et al., 2012). De plus, l'infection expérimentale de cellules épithéliales porcines IPEC-J2 suggère les souches ETEC: F4 comme étant plus virulentes comparativement aux souches ETEC: F18 (Zhou et al., 2012).

### **Le fimbriae F4 (K88) :**

Le fimbriae F4 est encodé par des gènes présents sur un plasmide non conjugatif qui transporte souvent les gènes permettant la fermentation du raffinose (Van den Broeck et al., 2000). Du point de vue moléculaire, le fimbriae F4 est composé des sous-unités FaeA à FaeJ. La sous-unité FaeG est responsable des différences antigéniques entre F4ab/ac ainsi que de l'adhésion (Bakker et al., 1992). Le fimbriae F4 est souple et est subdivisé en trois groupes de variants selon la nature des sous-unités présentes, F4ab, F4ac et F4ad. Le fimbriae F4ac est le plus représenté lors d'épisodes de maladie (Van den Broeck et al., 2000). La région «a» est l'épitope conservé et les régions «b, c et d» sont variables. Les différents variants du fimbriae

reconnaissent leurs récepteurs spécifiques à la surface de l'épithélium du petit intestin, du glycocalyx et du mucus. Certains animaux (jusqu'à 50 % de la population) ne possèdent pas les récepteurs qui permettent la liaison du fimbriae F4 ce qui rend ces animaux résistants à l'infection (Schroyen et al., 2012). La mise en contact des souches encodant le fimbriae F4 avec des immunoglobulines anti-F4 résulte en la perte du plasmide contenant les gènes qui codent pour le fimbriae F4 (Nagy et al., 1986). L'expression des gènes encodant les fimbriae est régulée par la température. Ceux-ci sont exprimés à 37 °C et non à 18 °C. Cela est conséquent avec la notion que les fimbriae soient nécessaires à l'adhésion et à la colonisation des parois intestinales des animaux. L'expression de ces composantes représente un coût énergétique désavantageux dans l'environnement extérieur (Williams and Hinson, 1987). L'expression des fimbriae est aussi affectée par le pH et les nutriments disponibles dans le milieu (De Graaf and Mooi, 1986). Récemment, il a été démontré que l'inactivation d'un gène flagellaire qui encode la flagelline (*fliC*) entraîne une diminution de l'expression du fimbriae F4. Ceci se traduit par une baisse de l'adhésion aux cellules IPEC-J2 in vitro. Il existerait donc une corégulation entre l'expression du flagelle et du fimbriae F4 (Melkebeek et al., 2013).

### **Le fimbriae F18:**

Le fimbriae F18 est encodé par les gènes *fedA*, *fedB*, *fedC*, *fedE*, *fedF* (Shepard et al., 2012). Il existe deux proches variants antigéniques de F18 qui sont nommés F18ab et F18ac (DebRoy et al., 2009). Les isolats qui portent le variant F18ab sont principalement associés au pathotype STEC et au développement de la maladie de l'œdème qui affecte les porcelets âgés d'une à deux semaines. Tandis que ceux portant le F18ac sont associés au pathotype ETEC et au développement de la diarrhée postsevrage du porcelet (Fekete et al., 2002; Imberechts et al.,



1997). De façon intéressante, il a été démontré que des isolats portant F18ab ou F18ac peuvent transporter les gènes encodant la shigatoxine et les entérotoxines (Wittig et al., 1995). Les deux types de fimbriae diffèrent par la présence d'une proline au résidu 121 à l'intérieur du gène *fedA* chez F18ac (DebRoy et al., 2009). La sous-unité FedF est responsable de l'adhésion aux cellules épithéliales (Smeds et al., 2001). Le fimbriae F18 est difficilement exprimé in vitro ce qui rend la tâche difficile lors de la caractérisation sérologique avec des anticorps polyclonaux ou monoclonaux (Wittig et al., 1995). Les gènes qui encodent F18ab sont présents sur un plasmide de 42 à 98 MDa qui transporte aussi les gènes encodant pour l'adhésine AIDA-1. Le variant F18ac est quant à lui retrouvé sur un autre plasmide d'environ 98 MDa (Fekete et al., 2002). Le fimbriae F18 est exprimé à 37 °C, mais inhibé à 18 °C. Le fimbriae F18 permet l'adhérence à l'épithélium intestinal des porcs de trois semaines d'âge, mais pas chez les porcs plus jeunes (Fairbrother et al., 2007). Certains porcs ne produisent pas les récepteurs reconnaissant F18 et sont résistants à la colonisation des ETEC qui possèdent le fimbriae F18 (Frydendahl et al., 2003).

### **L'adhésine AIDA-1:**

L'adhésine non-fimbriae AIDA-1 «adhesin-involved-in-diffuse-adherence» a été détectée pour la première fois en 1989 chez une souche *E. coli* diarrhéique humaine (Benz and Schmidt, 1989). Plus tard en 2001, AIDA-I est détectée chez des souches porcines lors d'épisodes de DPS et de maladie de l'œdème en élevage (Niewerth et al., 2001). Cette adhésine permet l'adhérence à une variété de surfaces, permet l'autoagrégation entre bactéries et favorise la formation de biofilms (Sherlock et al., 2004). AIDA-1, grâce à sa structure moléculaire, ces implications dans l'autoagrégation et la formation de biofilm est caractérisée comme une

SAAT «Self-Associating AutoTransporter» (Klemm et al., 2006). Les SAATs, présentes chez plusieurs espèces bactériennes Gram-, permettent aussi des interactions hétérologues entre bactéries de différentes espèces ce qui facilite la formation d'agrégats bactériens mixtes (Henderson and Nataro, 2001). Les autotransporteurs possèdent leur propre système de transport à même la séquence polypeptidique et s'insèrent dans la membrane externe de la bactérie. De récentes études suggèrent que l'acquisition de nouveaux modules par les SAATs est possible et participe à l'évolution des molécules d'adhésion (Cote and Mourez, 2011). Dans la même catégorie, on retrouve l'antigène 43 (Ag43) et l'adhésine TibA chez *E. coli* et *Citrobacter* (Cote et al., 2013). La séquence polypeptidique de l'adhésine AIDA-1 contient une répétition de 19 acides aminés qui est aussi retrouvée chez les autres SAATs. Le gène *aida* qui encode l'adhésine AIDA-1 est retrouvé sur un plasmide et est souvent en colocalisation avec les gènes *fed* qui encode le fimbriae F18 (Mainil et al., 2002). AIDA-1 est retrouvée chez des souches ETEC et STEC diarrhéiques d'origine porcine. Par contre, son rôle dans la colonisation des souches bactériennes reste à éclaircir (Zajacova et al., 2013).

### **Les entérotoxines associées aux ETEC dans les cas de DPS:**

Suite à la colonisation des souches *E. coli* ETEC dans le petit intestin, il y a sécrétion des entérotoxines dans le lumen et la reconnaissance de leurs cibles protéiques ce qui déclenche l'induction de la diarrhée par le déséquilibre de l'homéostasie de l'intestin. Les entérotoxines sont des molécules actives à de très faibles concentrations. Seulement quelques nanomoles de ces molécules sont nécessaires pour intoxiquer leurs cellules cibles (Erume et al., 2013). Les entérotoxines produites par les souches diarrhéiques sont catégorisées comme étant thermostables (ST) ou thermolabiles (LT). Les toxines STa et STb sont les deux types de

toxines thermostables produites par les ETEC. Les entérotoxines ST conservent leur activité toxique après une incubation à 100 °C pendant 30 minutes. Tandis que la toxine LT perd toute son activité toxique suite aux mêmes conditions (Dubreuil, 1997).

### **Les principaux virotypes des isolats d'*E. coli* pouvant causer des maladies chez le porc:**

Les *E. coli* pathogènes peuvent être regroupés en différents virotypes, selon les gènes de virulence qu'ils possèdent. Un virotype est une combinaison spécifique de gènes de virulence. Parmi les facteurs de virulence les plus importants encodés par ces gènes, on retrouve les adhésines fimbriaires, les entérotoxines, les cytokines, la capsule et les lipopolysaccharides (LPS). Repéré à <http://www.ecl-lab.ca/fr/ecoli/virulence.asp>

Il existe un phénomène d'évolution du virotype à travers la population des *E. coli*. C'est-à-dire qu'un virotype retrouvé dans la majorité des cas de maladie à un endroit donné ne sera pas nécessairement retrouvé en aussi grande proportion dans le futur. Dans une étude antérieure réalisée en Ontario, il a été observé que les isolats *E. coli* ETEC : F4 responsables de diarrhée chez le porcelet isolés avant 1990 démontraient un virotype prédominant F4:LT:STb:EAST1. Depuis 1990, un nouveau virotype, F4:LT:STa:STb:EAST1, est apparu et est devenu plus prévalent, ce qui a presque remplacé l'ancien virotype (Noamani et al., 2003). Les isolats ayant acquis le gène *estA* (STa) représentaient dans cette étude 92% des souches récentes. De façon intéressante, aucune des anciennes souches testées ne possédait ce gène. Ceci démontre qu'il existe certaine évolution du virotype au sein de la population des *E. coli* pathogènes.

### **La pathogenèse des ETEC chez le porc:**

L'ingestion d'une quantité suffisante de bactéries ETEC pathogènes par voie orale amorce

l'infection. Une fois ingérée, la bactérie parvient à résister au pH acide de l'estomac et transite jusqu'au petit intestin.

Repéré à <http://www.ecl-lab.ca/en/ecoli/pathogenesis.asp>

De ce site d'implantation, il y a colonisation de l'épithélium suite à l'attachement irréversible des adhésines fimbriae bactériennes F4ab/F4ac à leurs récepteurs spécifiques MUC4, MUC13 et MUC20 présents à la surface du tissu épithélial et dans le glycocalyx intestinal des animaux positifs (Fu et al., 2012; Ji et al., 2011). Il y a ensuite multiplication de la bactérie jusqu'à  $10^9$  UFC/g de matière fécale dans le jéjunum et l'iléon de l'animal (Dubreuil, 2012). Pour reproduire l'infection en condition expérimentale, il est nécessaire d'avoir une forte dose infectieuse de  $10^9$  UFC/ml (communication personnelle avec Dr John Morris Fairbrother). La production subséquente des entérotoxines (LT, STa et STb) entraîne la sécrétion des ions  $Cl^-$  et inhibe la réabsorption des ions  $Na^+$  au niveau membranaire des entérocytes (Dubreuil, 2012). Ceci se traduit par la perte d'eau et d'électrolytes vers la lumière intestinale. Maintenant dysfonctionnel, le processus de réabsorption de l'intestin n'est plus assez performant pour contrebalancer l'action des entérotoxines. Il s'en suit alors une diarrhée qui engendre une déshydratation et souvent la mort de l'animal (Dubreuil, 2012). La contamination de l'environnement par les animaux malades permet la transmission rapide aux porcelets sains à proximité.

### **Les facteurs de risque en lien avec le développement de la diarrhée postsevrage (DPS) :**

La diarrhée postsevrage est une maladie multifactorielle. Une faible hygiène des parcs d'engraissement, une procédure de lavage et de désinfection inadéquate des équipements, une température ambiante moyenne en dessous de 25 °C et des courants d'air excessifs sont tous

des facteurs pouvant promouvoir l'incidence de la DPS en élevages (Gyles and Fairbrother, 2010). Pour le maintien de la température ambiante, il est recommandé d'utiliser un dispositif de contrôle de la température automatisé. Tous ces éléments auraient pour effet d'augmenter le stress soumis aux animaux. Cela a pour effet de réduire le péristaltisme et conséquemment le transit des bactéries et des anticorps de protection provenant du lait maternel (McLamb et al., 2013). Il semble que l'incidence de la DPS est associée avec deux prises de nourriture par jour sous restriction alimentaire comparativement à trois prises par jour ou l'accès à la nourriture *ad libitum* (Laine et al., 2008). La combinaison de ces facteurs favorise le maintien de la flore ETEC dans le système digestif des porcs et dans leur environnement. La contamination par des souches ETEC : F4 à elle seule est bien souvent insuffisante pour causer la maladie. La co-infection avec d'autres virus entériques comme les rotavirus semble favoriser le développement de maladie (de la Fe Rodriguez et al., 2013).

### **Le système digestif du porcelet et la DPS :**

Le pH du système digestif des porcelets fraîchement sevrés, particulièrement celui de l'estomac (pH 2,5) est plus élevé que chez les porcs plus âgés (pH 1-2) ce qui favorise la survie des bactéries dans le système digestif. Cette différence de pH s'explique de plusieurs façons. Premièrement, les porcelets ont une plus faible capacité de production d'acide chlorhydrique dans leur estomac (Ahmed et al., 2014). Deuxièmement, l'alimentation par le lait maternel induit un effet tampon et ne suscite pas la production d'acide dans l'estomac. Repéré à <http://livestocktrail.illinois.edu/porknet/questionDisplay.cfm?ContentID=5546>

Pour finir, les lactobacilles dans le tractus digestif proximal produisent l'acide lactique qui neutralise partiellement l'acide chlorhydrique de l'estomac (Snoeck et al., 2004).

### **La susceptibilité des porcelets à la diarrhée postsevrage :**

L'âge du sevrage est un facteur qui prédispose au développement de la diarrhée postsevrage. En effet, les porcelets sevrés à deux semaines d'âge sont deux fois plus susceptibles que ceux sevrés à cinq semaines d'âge (Svensmark et al., 1989). Afin de coloniser le tractus intestinal, les souches pathogènes ETEC encodent principalement le fimbriae F4 qui reconnaît ses récepteurs spécifiques présents à la surface des bordures en brosse de l'épithélium, dans le glycocalyx ou dans le mucus à l'intérieur du petit intestin (Ji et al., 2011). La présence de ces récepteurs dans le tube digestif de l'animal est obligatoire à la colonisation bactérienne (Van den Broeck et al., 2000). La colonisation dépend donc du phénotype de l'animal qui détermine la susceptibilité ou la résistance à la liaison des trois variants connus du fimbriae F4 (F4ab, F4ac ou F4ad) dont la sous-unité FaeG est responsable de l'adhésion (Van den Broeck et al., 2000). Huit différents phénotypes de susceptibilité sont actuellement identifiés chez le porc, de A à H (Schroyen et al., 2012b). Certains porcs sont susceptibles à tous les variants F4 tandis que d'autres sont susceptibles à seulement deux variants (F4ab/ac ou F4ab/ad). Les animaux qui ne possèdent pas les récepteurs sont résistants à l'adhérence et à la colonisation des souches pathogènes ETEC : F4 et ne développent pas de maladie. Certains phénotypes de récepteurs démontrent de faibles forces de liaison avec tous les types de fimbriae. Néanmoins, la colonisation semble toujours être possible puisqu'il y a développement de la maladie chez les animaux qui expriment ces récepteurs. Ceci suggère qu'il existerait d'autres récepteurs qui permettent la colonisation. Ces récepteurs peuvent être exprimés de manière individuelle ou en combinaison (Schroyen et al., 2012b). Aujourd'hui, une cible est décrite pour chacun des types de fimbriae F4. La composante IMTGP «mucin-type sialoglycoproteins» est reconnue

pour être le récepteur des fimbriae F4ab/ac. IGLad est reconnu par F4ad et GP74 est reconnu par F4ab. Par contre, les gènes qui encodent ces récepteurs sont inconnus. Cependant, il semble que les gènes qui permettent d'encoder les récepteurs pour F4ab et F4ac sont situés sur le chromosome 13 des porcs (*Sus scrofa* 13, SSC13q41). Aussi, les gènes MUC (MUC 4, MUC 13 et MUC20) ainsi que le récepteur de la transferrine «TFRC» sont des gènes candidats pouvant expliquer la susceptibilité des animaux. Des SNP «single nucléotide polymorphism» présents dans ces gènes seraient à l'origine des polymorphismes et contribueraient au phénotype de susceptibilité ou de résistance. Par contre, l'expression des glycoprotéines MUC13 et MUC 20 n'est pas associée à la susceptibilité chez les porcelets (Schroyen et al., 2012a). Jusqu'à aujourd'hui, les mutations qui causent la susceptibilité aux ETEC: F4 sont inconnues. Semblerait-il que les ancêtres des porcs d'élevage étaient résistants à la colonisation par les ETEC: F4. La susceptibilité se serait développée à la suite de la domestication des animaux (Schroyen et al., 2012a). Le croisement de différentes races de porcs pourrait permettre de mettre au point une lignée génétique résistante à la colonisation des ETEC: F4. Actuellement, il n'existe que peu d'informations disponibles quant aux facteurs qui peuvent affecter la susceptibilité aux infections par ETEC: F18. Il est décrit qu'un polymorphisme à l'intérieur du gène *FUT1* qui encode le  $\alpha(1,2)$ -fucosyltransferase permet l'attachement du fimbriae F18 (Meijerink et al., 2000). Aussi il a été indiqué que des polymorphismes dans l'exon 10 du gène qui encode pour BPI «bactericidal/permeability-increasing protein» jouent un rôle dans la susceptibilité à la colonisation par ETEC: F18 (Liu et al., 2013).

### **La vaccination contre la diarrhée postsevrage :**

La contamination des troupeaux par des souches ETEC pathogènes n'est pas bien contrôlée par l'administration d'antimicrobien en prophylaxie (Stahl et al., 2004). Ce phénomène est probablement dû à l'existence de résistances aux antimicrobiens (Do et al., 2006). L'industrie n'a d'autres choix que de se retourner vers des alternatives à l'utilisation d'antimicrobiens comme la prévention à l'aide de vaccins ou l'utilisation de probiotiques, de prébiotiques ou encore de bactériophages (Fairbrother et al., 2007). Une immunité intestinale active est nécessaire aux porcelets fraîchement sevrés puisqu'ils sont alors privés de l'immunité passive conférée par le lait maternel. Les vaccins injectables stimulent l'immunité systémique plutôt que l'immunité mucoale. Les anticorps du sang ne peuvent alors qu'atteindre difficilement les bactéries à l'intérieur de l'intestin (Van den Broeck et al., 1999). Les plaques de Peyer situées dans le jéjunum sont les principaux sites de l'induction de l'immunité mucoale en réponse aux fimbriae bactériens (Bozic et al., 2006). La prévention de la DPS passe par l'administration de vaccins qui activent l'immunité mucoale et stimulent la production des anticorps IgA et IgM spécifiques aux antigènes du microorganisme pathogène (Delisle et al., 2012). Plusieurs de ces stratégies de contrôle sont spécifiques aux adhésines ou au sérotype O de la souche pathogène. Dans ces cas, une souche d'*E. coli* avirulente ou atténuée et négative pour les entérotoxines mais positive pour l'adhésine F4 est administrée sous forme de vaccin oral. De telles souches vaccinales peuvent être ajoutées à l'eau de boisson des porcelets fraîchement sevrés ou bien une semaine avant le sevrage par voie orale. La colonisation de la souche vaccinale et l'induction de la réponse immunitaire mucoale permettent de prévenir l'adhérence des souches pathogènes prévenant ainsi l'infection (Fairbrother et al., 2007). Aussi, il est important de savoir que l'efficacité d'un traitement comme la vaccination passe par une hygiène adéquate des installations et une connaissance des autres facteurs pouvant



favoriser l'apparition de la DPS comme la diète.

### **La transmission de microorganismes dans le réseau :**

Afin de réduire les risques de contamination, il est important d'identifier les modes privilégiés de transmission des contaminants entre les élevages et l'usine d'abattage. De plus, la prévention de la contamination passe par une meilleure compréhension ainsi que l'identification des sources de contamination à la ferme et à l'abattoir en passant par les intervenants associés.

Aujourd'hui, il existe peu d'information sur la transmission des microorganismes pathogènes par les intervenants, comme les transporteurs, vétérinaires et techniciens, en production porcine (Dee et al., 2004; Keelara et al., 2013; Magistrali et al., 2008). La contamination des porcs naïfs par *Salmonella enterica* pendant le transport et particulièrement pendant la période d'attente à l'abattoir, peut expliquer l'augmentation de la prévalence de ce microorganisme pathogène dans les nœuds lymphatiques, les contenus caecaux et les matières fécales (Hurd et al., 2002). En effet, certains environnements comme la remorque des camions et parcs d'attente à l'abattoir sont propices à la contamination par des microorganismes pathogènes (Letellier et al., 2009). Malheureusement, il n'existe que très peu d'information disponible sur la dynamique de la transmission des souches *E. coli* pathogènes au travers le processus de production. Souvent, le niveau d'*E. coli* dans l'environnement est utilisé comme indice de contamination fécale qui se limite à indiquer la présence d'autres microorganismes pathogènes comme *Salmonella* (Rajkowski et al., 1998). Certains virus sont aussi sujets à être diffusés entre les élevages et l'abattoir par le réseau de transport. Le virus épidémique porcin (PEDv), qui a été détecté pour la première fois aux États-Unis en mai 2013, est un exemple de diffusion

favorisé par le transport d'animaux à l'aide de camions et de remorques contaminées (Lowe et al., 2014). La procédure de lavage et de désinfection des remorques ainsi que la mise sur pied de mesures de biosécurité adéquates comme des systèmes d'assainissement des pneus peuvent permettre de réduire la transmission de microorganismes pathogènes (Amass et al., 2003; Hernandez et al., 2013).

### **La caractérisation des *E. coli* pathogènes par le sérotypage :**

Le sérotypage est la caractérisation des isolats sur la base de leur caractère antigénique.

Cette technique permet de discriminer les souches *E. coli* entre elles et de les classifier en fonction de leur sérotype. De plus, le sérotypage, en combinaison avec d'autres tests, peut permettre de retracer les sources d'infection dans le cadre d'une étude épidémiologique (DebRoy et al., 2009). Plusieurs antigènes sont utilisés à cet effet. L'antigène O est une sous-unité thermostable du lipopolysaccharide (LPS) présent à la surface de la bactérie Gram-. En 2014, il existait 178 antigènes O différents chez *E. coli* (O1 à O181) selon la Statens Serum Institut. Parmi les ETEC les principaux sérotypes-O associés à des maladies en élevage porcine sont : O8, O9, O20, O45, O64, O101, O138, O139, O141, O147, O149 et O157 (Gyles and Fairbrother, 2010). Le sérotype O149 est le plus fréquemment isolé lors d'épisodes de diarrhée dans les élevages porcins au Québec (communication personnelle avec Dr John M. Fairbrother). La caractérisation du sérotype O ne semble pas nécessairement liée à la présence de facteurs de virulence spécifiques. En effet, certains isolats *E. coli* d'un sérotype peuvent posséder des gènes de virulence différents tout en ayant le même sérotype. (communication personnelle avec Dr John Morris Fairbrother). Pour détecter les gènes de virulence, une approche génomique est utilisée. Plusieurs tests permettent de révéler la

présence de ces gènes, comme les réactions en PCRs conventionnels ou en temps réels (Luedtke et al., 2014). D'autres techniques comme l'hybridation sur colonies ou les micropuces ADN sont aussi efficaces (Bekal et al., 2003; Gerrish et al., 2007).

Il existe aussi d'autres antigènes qui permettent de faire une distinction entre les isolats.

L'antigène H est quant à lui lié au flagelle. Cet appendice ancré à la membrane bactérienne est considéré comme un facteur de virulence, est antigénique en raison de sa flagelline (*fliC*) et permet le phénotype de motilité (Wolf, 1997; Zhou et al., 2013). Il existe 53 différents antigènes H chez *E. coli* (H1 à H56). Les antigènes H13, H22 et H50 ne font pas partie de la classification (Wang et al., 2003). L'antigène fimbriae F quant à lui est une composante permettant l'adhésion et la colonisation de la muqueuse intestinale. Les antisérums disponibles commercialement permettent de distinguer les fimbriae F4 (K88) et F5 (K99).

Repéré à

[http://www.ssi.dk/English/SSI%20Diagnostica/Products%20from%20SSI%20Diagnostica/Antisera\\_antibodies/E%20coli%20antisera/E%20coli%20F4%20and%20F5%20antisera.aspx](http://www.ssi.dk/English/SSI%20Diagnostica/Products%20from%20SSI%20Diagnostica/Antisera_antibodies/E%20coli%20antisera/E%20coli%20F4%20and%20F5%20antisera.aspx).

La plupart des isolats *E. coli* sont entourés d'une capsule composée de polysaccharide. L'antigène capsulaire K est un facteur de virulence très important pour plusieurs espèces bactériennes comme *Escherichia coli* et *Neisseria meningitidis* (Willis and Whitfield, 2013). Il existe 67 antigènes K chez *E. coli* (K2 à K103). Les antigènes K1, K5, K13, K21, K58-K73, K75-K81, K86, K88, K90, K91 et K99 ne font plus partie de la classification du Statens Serum Institut. Repéré à

[http://www.ssi.dk/English/SSI%20Diagnostica/Products%20from%20SSI%20Diagnostica/Antisera\\_antibodies/E%20coli%20antisera/E%20coli%20K%20antisera.aspx](http://www.ssi.dk/English/SSI%20Diagnostica/Products%20from%20SSI%20Diagnostica/Antisera_antibodies/E%20coli%20antisera/E%20coli%20K%20antisera.aspx)

### **Les groupes phylogénétiques des *E. coli* pathogènes :**

Le groupage phylogénétique permet de discriminer plusieurs souches d'une même espèce bactérienne selon la présence ou l'absence de marqueurs génétiques au sein de leur génome.

La caractérisation des isolats par leur groupe phylogénétique peut permettre d'établir des liens entre les isolats présents dans une population ou entre populations (Carlos et al., 2010). Ces caractéristiques génétiques s'avèrent aussi très efficaces pour discriminer les *E. coli* dans l'environnement. Les souches *E. coli* appartiennent à quatre principaux groupes phylogénétiques, soit A, B1, B2 et D (Clermont et al., 2000). La classification des souches d'*E. coli* à chacun de ces groupes phylogénétiques est en relation avec la présence de gènes spécifiques au sein du génome bactérien. Le typage phylogénétique témoigne en quelque sorte du chemin évolutif emprunté par une sous-population d'*E. coli* et peut permettre d'étudier la niche écologique d'une population donnée (Carlos et al., 2010). De façon intéressante, la prévalence des sous-populations d'*E. coli* appartenant aux différents groupes phylogénétiques n'est pas homogène dans l'environnement. Effectivement, certains facteurs comme le climat, la diète et la masse corporelle de l'organisme hôte influencent les caractéristiques de la niche écologique et peuvent sélectionner préférentiellement des sous-populations *E. coli* de groupes phylogénétiques particuliers (Gordon and Cowling, 2003). Les quatre groupes phylogénétiques retrouvés chez *E. coli* soit, A, B1, B2, et D peuvent être identifiés avec des réactions PCR (Clermont et al., 2000). Ceci est un avantage au point de vue pratique et économique. La caractérisation du groupe phylogénétique des isolats *E. coli* retrouvés lors d'épisode de maladie peut aussi être utilisée pour fournir un indice du risque de pathogénicité des souches *E. coli*. Par exemple, les isolats *E. coli* porcins isolés lors d'épisodes de maladie appartiennent majoritairement au groupe phylogénétique A et B1 (Wang et al., 2010). Chez

d'autres animaux comme le poulet, les isolats appartiennent principalement aux groupes A, D et B1 (Johnson et al., 2008). Tandis que chez les humains les isolats appartiennent principalement aux groupes B2 et D comme la majorité des *E. coli* extra-intestinaux (Johnson et al., 2003).

### **Les mécanismes de résistance aux antimicrobiens:**

Depuis 1940, les microorganismes bactériens, comme *E. coli*, sont reconnus pour présenter une résistance aux antimicrobiens. Des mécanismes de résistance permettent de contourner l'action des molécules antibactériennes permettant ainsi à la population bactérienne de poursuivre leur prolifération.

Plusieurs mécanismes sont aujourd'hui décrits (Wright, 2005). Voici les principaux qui sont reconnus par la communauté scientifique :

1. La restriction de l'accès à la cible de l'antibiotique par le changement de la perméabilité de la membrane bactérienne. Ce mécanisme est retrouvé chez *E. coli* O157:H7 dont l'expression des porines extramembranaires est réduite. Ceci prévient l'absorption des molécules antimicrobiennes (Martinez et al., 2001).
2. L'activation de pompe à efflux qui expulse l'antibiotique de la cellule. La pompe à efflux AcrB retrouvé chez *E. coli* permet l'expulsion des molécules antimicrobiennes toxiques et favorise la virulence (Nishino et al., 2009).
3. La modification enzymatique de l'antibiotique altère la structure moléculaire le rendant inactif. La bêta-lactamase à spectre élargi ESBL qu'encode le plasmide CTX-M-15 permet la résistance à plusieurs classes d'antimicrobiens (Oteo et al., 2010).
4. La dégradation de la molécule antimicrobienne. L'enzyme bêta-lactamase permet la

résistance aux pénicillines, céphalosporines, monobactames et carbapénèmes. Grâce à l'introduction de molécule inhibitrice de bêta-lactamase au traitement comme le clavulanate, le sulbactame et le tazobactam, la résistance antimicrobienne peut être surmontée (Drawz and Bonomo, 2010).

5. L'acquisition d'une voie métabolique alternative autre que celle inhibée par l'antibiotique. La résistance au triméthoprim/sulfaméthoxazole par une voie métabolique alternative (Tenover, 2006).
6. La modification de la cible de l'antibiotique. La modification de la structure moléculaire de la penicillin-binding protein (PBP) réduit son affinité à l'antimicrobien rendant certaines souches de *S. aureus* résistantes au bêta-lactame (Hartman and Tomasz, 1984; Lambert, 2005).
7. La surproduction de la cible de l'antibiotique (Lambert, 2005).

Les souches ETEC isolées lors d'épisodes diarrhéiques peuvent démontrer des caractéristiques de multirésistance à une grande variété d'antimicrobiens (Zeighami et al., 2014). La  $\beta$ -lactamase AmpC a été le premier enzyme pouvant inactiver la pénicilline chez *E. coli* (Abraham and Chain, 1988). Aussi, l'acétyltransférase, *sat2*–*sat4* permet la résistance à la streptothricin chez *E. coli* (Partridge and Hall, 2005). Ces gènes de résistance peuvent être présents à l'intérieur de plasmides qui sont des éléments génétiques transposables et circulaires. Le plasmide Inc11 est fréquemment retrouvé chez les isolats ETEC et possède les gènes ESBL «extended-spectrum beta lactamases» permettant la résistance à différents antibiotiques de la catégorie  $\beta$ -lactame. D'autres gènes qui permettent la résistance comme *bla*TEM, *bla*CMY-2 sont présents sur d'autres plasmides et peuvent être retrouvés chez les ETEC (Johnson et al., 2011). L'activation des pompes à efflux QepA2 permet le rejet des

fluoroquinolones hydrophile comme la ciprofloxacine et l'enrofloxacin ce qui permet la résistance chez *E. coli* (Perichon et al., 2007).

### **Le transfert horizontal des gènes de résistances :**

La plupart des bactéries ont le pouvoir d'échanger du matériel génétique entre entités cellulaires dans leur environnement (Koonin et al., 2001). Ce phénomène s'appelle le transfert horizontal de gènes (THG). Le transfert horizontal de gènes entre microorganismes peut favoriser l'adaptation d'un microorganisme à survivre dans un environnement donné et ainsi améliorer son «fitness». Le «fitness» est la capacité d'un microorganisme à survivre, se reproduire et à être transmis (Andersson, 2003). L'acquisition de gènes de virulence, comme les gènes qui encodent la Shiga-toxine (gènes *stx*), peut favoriser la dissémination d'une souche et ainsi favoriser son «fitness». Les gènes qui permettent d'améliorer le «fitness» d'un microorganisme sont aussi propices à être conservés et à être transférés de façon horizontale (Ogura et al., 2007). Certains de ces gènes acquis encodent des enzymes qui permettent la résistance à un ou plusieurs antimicrobiens, ce qui procure un avantage compétitif face aux autres microorganismes (Poirel et al., 2008). Les gènes de résistance aux antimicrobiens sont fréquemment retrouvés à l'intérieur d'éléments d'ADN mobiles (Mizan et al., 2002). Ces éléments d'ADN circulaires et mobiles, appelés plasmides, possèdent le matériel requis à leur transfert entre cellules et sont capables d'autoréplication. Ces molécules d'ADN mobiles se transfèrent entre cellules par des plasmides conjugatifs ou par conjugaison de transposons. Un plasmide peut aussi être intégré dans le génome et être ensuite transféré de manière verticale aux cellules filles (van Hoek et al., 2011). Les transposons sont capables de translocation d'un site à l'autre au sein du génome bactérien (Jurado-Rabadan et al., 2014).

Les bactériophages jouent aussi un rôle dans le transfert de gènes entre les cellules bactériennes et ce phénomène s'appelle la transduction (Asadulghani et al., 2009). Dans ce mode de livraison, de l'ADN bactérien contenu dans la tête du bactériophage, est injecté dans la cellule hôte. Il y a alors intégration du segment d'ADN dans le génome bactérien. Les bactéries peuvent aussi acquérir du matériel génétique par transformation. Dans ce processus, de l'ADN incapable de se répliquer de lui-même, est recyclé par une bactérie compétente et incorporé dans le génome par recombinaison homologue ou transposition (Sinha and Redfield, 2012). Certains plasmides ont un spectre large et peuvent être transférés chez différentes espèces bactériennes. Tandis que d'autres sont retrouvés chez seulement un genre ou espèce.

#### **Les organismes indicateurs et les marqueurs de contamination :**

Afin de décrire certains modes de transmission des *E. coli* pathogènes dans un réseau de production porcine défini, il est nécessaire de faire la distinction entre ce qu'est un organisme indicateur et un marqueur de contamination. La présence d'organismes indicateurs permet de mesurer l'indice d'hygiène ou de salubrité dans un environnement donné. La détection d'organismes indicateurs est aussi un moyen de refléter la qualité d'un produit en déterminant s'il est exempt de pathogènes ou s'il existe une possibilité qu'il y ait présence d'un contaminant. Repéré à

<http://www.foodsafetymagazine.com/magazine-archive1/februarymarch-2011/indicator-organism-assays-chaos-confusion-and-criteria/>

Par exemple, la mesure du niveau d'organismes indicateurs peut permettre d'estimer la durée de vie d'un produit (Herbert et al., 2015). Certains indicateurs démontrent un comportement semblable à d'autres microorganismes pathogènes dans les mêmes conditions et peuvent être



utilisés comme substituts à ces derniers (Eblen et al., 2005). Concrètement, certains tests de qualité microbiologique de l'eau potable nécessitent l'utilisation d'organismes indicateurs comme *E. coli*. Dans ce cas particulier, cette approche permet d'assurer que l'eau potable soit exempte de contaminants fécaux pathogènes comme *Salmonella*. La bactérie *E. coli* est présente dans le système digestif des humains et des animaux et sa détection peut témoigner d'un niveau anormal de contamination fécale dans l'eau. Dans le cas d'une contamination de l'eau potable par de la matière fécale, la bactérie *E. coli* sera plus facilement détectable et persistera plus longtemps que *Salmonella* (Krometis et al., 2010). D'autres organismes indicateurs définissent un groupe complexe de microorganismes comme les coliformes et les *Enterobacteriaceae*. Ils sont alors caractérisés comme organismes indicateurs non spécifiques. Les marqueurs de contamination, quant à eux, sont des outils permettant la détection d'un profil génétique particulier. Ces marqueurs de contamination peuvent être détectés à l'aide de réactions PCR (McQuaig et al., 2012) et sont utiles afin d'étudier la distribution de gènes particuliers provenant de différentes sources, comme des gènes de virulence et de résistance aux antimicrobiens dans un environnement donné. La présence d'un marqueur de contamination dans les échantillons peut aussi témoigner de la présence potentielle d'un microorganisme contaminant. Lorsque la prévalence d'un marqueur de contamination est faible en élevage, le prélèvement d'échantillons de types composites ou «pools» peut permettre d'améliorer le taux de détection (Arnold and Cook, 2009). L'analyse de la distribution des marqueurs de contamination peut aussi servir d'outil afin de suivre la dynamique de diffusion de certains microorganismes bactériens ou viraux dans un environnement défini (Muller et al., 2016). Aussi, l'étude de la distribution d'un marqueur génétique peut être utilisée dans le cadre d'une étude de prévalence afin de documenter la

présence de traits génétiques entre les microorganismes d'un même environnement. Par exemple, la détection de marqueurs génétiques, comme les îlots de pathogénicité, dans une banque d'isolats UPEC (Uropathogenic *Escherichia coli*) permet de documenter la virulence des souches *E. coli* de ce pathotype dans une niche écologique définie (Sabate et al., 2006). Autrement, la détection d'une variété de marqueurs génétiques suggérant la présence potentielle de microorganismes contaminants peut être utile dans le but de documenter les associations possibles entre les microorganismes et les facteurs de risques lors d'évènement de contamination (McQuaig et al., 2012).

### **La distribution des microorganismes pathogènes en élevage :**

Le suivi de la distribution des microorganismes pathogènes en élevage peut permettre d'identifier les sources potentielles de contamination et mieux comprendre la dynamique de transmission de ces contaminants dans le but d'améliorer le statut sanitaire de l'élevage (Andres-Barranco et al., 2014; Newell and Fearnley, 2003). La description des sources de contamination est aussi importante dans le but de minimiser la transmission de microorganismes pathogènes à caractère zoonotique à travers la chaîne alimentaire (Jakobsen et al., 2012). L'étude de la distribution des microorganismes pathogènes en production animale passe par le prélèvement d'échantillons d'intérêt (souvent d'origine fécale) uniques ou composites «pools» (Arnold et al., 2005). Par la suite, l'isolement en bactériologie des organismes recherchés et la détection de marqueurs spécifiques, par des techniques de biologie moléculaire, permettent d'étudier la diversité, la distribution ainsi que la prévalence des organismes pathogènes. Par exemple, il est possible d'étudier la distribution des sérovars de *Salmonella* et la susceptibilité aux antimicrobiens des isolats présents en élevage de poulet de

chair (Makaya et al., 2012). Ces informations permettent de mieux connaître la réalité quant à la présence ainsi que la prévalence de pathogènes particuliers à caractère zoonotique comme *Salmonella*. Autrement dit, la distribution environnementale d'un pathogène particulier peut être étudiée en relation avec sa présence en élevage et chez des animaux sauvages à proximité des sites de production (Jokinen et al., 2015; Muller et al., 2016). La bactérie *E. coli* est l'un des microorganismes les plus caractérisés et un indicateur de contamination important dans l'environnement. Par contre, il n'existe que peu d'information sur la structure des populations *E. coli* chez ses hôtes. L'étude de la diversité des populations de ce microorganisme est réalisée par la détection de marqueurs permettant de faire la distinction entre les sous-populations d'*E. coli* (Anderson et al., 2006). La caractérisation des isolats par le sérotypage, le ribotypage, le groupage phylogénétique et la détection des gènes de virulence et de résistance aux antimicrobiens permet de documenter la diversité des *E. coli* (Gordon and Cowling, 2003; Martins et al., 2015). Aujourd'hui, l'étude du génome complet permet de caractériser les isolats de manière très détaillée (von Mentzer et al., 2014). De façon intéressante, la distribution des *E. coli* pathogènes en production porcine n'est pas beaucoup documentée.

#### **Les *E. coli* à caractère zoonotiques :**

Certains isolats *E. coli* pathogènes présents au sein de la microflore digestive de l'animal peuvent posséder un potentiel zoonotique. Notamment, les isolats *E. coli* entérohémorragiques producteurs de shigatoxine (STEC) peuvent occasionnellement être présents en élevage et sont associés au syndrome urémique hémolytique chez l'humain (Fairbrother et al., 2007) (Cornick and Vukhac, 2008). Aussi, les isolats *E. coli* extra-intestinaux (ExPEC) retrouvés dans les

élevages de porcs possèdent des gènes de virulence homologues à des gènes retrouvés chez les isolats ExPEC humains provenant de cas de maladies (Belanger et al., 2011). Cette proximité génétique entre les souches ExPEC humaines et animales suggère un lien de contamination entre l'animal et l'homme. Plus spécifiquement, un lien a été tracé entre certains isolats *E. coli* ExPEC retrouvés dans la viande de porc et de poulet et des isolats humains retrouvés dans des cas d'infections urinaires (Jakobsen et al., 2012). Ces évidences suggèrent que des isolats *E. coli* pathogènes opportunistes retrouvés en élevages possèdent un potentiel zoonotique et peuvent infecter les humains (Cornick and Vukhac, 2008; Trotz-Williams et al., 2012). Il est donc primordial de bien comprendre les modes de transmission de ces souches zoonotiques afin de minimiser le risque de propagation à travers la chaîne de production jusqu'à nos assiettes.

**Problématique générale :**

L'information disponible sur le sujet de la transmission des microorganismes pathogènes dans l'environnement intraélevage, mais aussi entre les élevages de différentes fermes jusqu'à l'abattoir est rare et n'est pas bien documentée. La production porcine, comme elle est pratiquée aujourd'hui, nécessite la participation d'intervenants qui prennent part au processus de production. Plusieurs intervenants comme les transporteurs, les vétérinaires et les techniciens sillonnent le réseau de production et pourraient agir en tant que vecteur de contamination entre les élevages et l'abattoir. Il est impératif de mieux comprendre cette dynamique ainsi que leur potentiel comme vecteur de contamination dans le réseau de production. Une meilleure compréhension de cet aspect peut aider à établir des stratégies de contrôle afin de prévenir la transmission de microorganismes pathogènes et ainsi limiter les

éclosions de maladie en élevage. Jusqu'à aujourd'hui, la distribution des gènes de virulence des *E. coli* pathogènes dans un réseau de production porcine comprenant des fermes d'engraissement, un transporteur associé et un abattoir n'est pas bien caractérisée. L'étude de cette distribution peut aussi permettre d'identifier des marqueurs microbiologiques de contamination dans le réseau. La description de marqueurs microbiologiques peut être utile à la préparation d'une étude descriptive des modes de transmission des *E. coli* pathogènes et ainsi aider à promouvoir l'amélioration des mesures de biosécurité en élevage et ultimement limiter la transmission d'isolats à caractère potentiellement zoonotique à travers la chaîne alimentaire. Cette étude a pour hypothèse que la détection ainsi que le suivi de certains facteurs de virulence des *E. coli* pathogènes, présents dans un réseau de production porcine, peuvent permettre d'identifier des marqueurs de contamination dans le réseau. L'objectif de cette étude est d'identifier un marqueur de contamination *E. coli* dans le réseau de production permettant de suggérer certaines sources de contamination et de documenter les modes potentiels de transmission des *E. coli* pathogènes entre les élevages et l'abattoir. La réalisation de cet objectif passe par l'élaboration d'un protocole d'échantillonnage et d'une méthodologie pour la détection et la description des *E. coli* pathogènes dans le réseau.

## **Méthodologie et Résultats**

## Article scientifique

(En soumission dans Applied and Environmental Microbiology)

Identification and distribution of an ETEC/F4 contamination marker in an operating swine production network in Quebec, Canada.

Running title: ETEC/F4 contamination marker in a swine production network

**Gabriel Desmarais<sup>1-2-3-4</sup>, John Morris Fairbrother<sup>2-4</sup>, Ann Letellier<sup>1-3-4</sup>,**

**Virginie Lachapelle<sup>1-3</sup>, Philippe Fravalo<sup>1-3</sup>**

<sup>1</sup> Research Chair in Meat Safety (RCMS), Faculty of Veterinary Medicine, Université de Montréal, 3200 rue Sicotte, CP 5000 St-Hyacinthe, QC, J2S 7C6, Canada

<sup>2</sup> OIE Reference Laboratory for *Escherichia coli* (EcL), Faculty of Veterinary Medicine, Université de Montréal, 3200 Sicotte, Saint-Hyacinthe, QC, J2S 2M2, Canada

<sup>3</sup> Groupe de recherche et d'enseignement en salubrité alimentaire (GRESA), Faculty of Veterinary Medicine, Université de Montréal, 3200 rue Sicotte, CP 5000 St-Hyacinthe, QC, J2S 7C6, Canada

<sup>4</sup> Swine and Poultry Infectious Diseases Research Centre (CRIPA), Faculty of Veterinary Medicine, Université de Montréal, 3200 rue Sicotte, CP 5000 St-Hyacinthe, QC, J2S 7C6, Canada

## Summary

*Escherichia coli* is an important constituent of the pig intestinal microbiota. *E. coli* strains belong to different clonal groups ranging from commensal to pathogenic and potentially zoonotic, the latter being characterized by the presence of specific virulence genes. The transmission of such *E. coli* between farms and the slaughterhouse in a production network, in particular to illustrate the dissemination of *E. coli* strains in a zoonotic perspective, has not been well characterized. The detection of *E. coli* virulence genes can be used as an indicator to demonstrate transmission of contamination between farms and the slaughterhouse. The objective of the study was to identify an *E. coli* contamination marker associated with potential transmission vectors of pathogenic *E. coli* virulence genes in a well-defined swine production network including a slaughterhouse. A defined region containing 10 farms, a slaughterhouse, and a transportation network was selected. Samples of feces, environmental swabs, and dust were collected at various sites inside and outside the animal buildings, at the slaughterhouse yard, and on animal transportation vehicles linking the selected farms and the slaughterhouse. Three consecutive production batches were followed during 12 months. The presence in the samples of virulence genes (*eltB*, *estA*, *estB*, *faeG*, *stxA*, *stx2A*, *eae*, *cnf*, *papC*, *iucD*, and *tsh*), commonly associated with pathogenic *E. coli* in animals, was examined by conventional multiplex PCR. The monitoring of the virulence gene profile distribution both temporally and spatially permitted the identification of a contamination marker indicating the presence of enterotoxigenic *E. coli* (ETEC) positive for adhesin F4. The distribution of ETEC/F4 positive samples suggests the slaughterhouse yard acts as a reservoir of contamination in the network, the ETEC/F4 marker being transmitted back to the farms by mechanical vectors. These results illustrate the need to improve the biosecurity between farms



and slaughterhouse, playing a role in dissemination of both pathogenic and potentially zoonotic microorganisms in swine production.

**Keywords:** *E. coli*, swine, ETEC/F4, contamination marker, dissemination, transmission

## **Introduction**

*Escherichia coli* is an important constituent of the pig intestinal microflora. Most *E. coli* colonize the gastrointestinal tract and show commensal behavior. However, some isolates possess genes encoding enterotoxins or cytotoxins and adhesins which permit adherence to the intestinal epithelium leading to colonization and cellular damage (Vogeleer *et al.*, 2014). In pigs, enterotoxigenic *E. coli* (ETEC), often carrying the fimbrial adhesion F4 (K88), are responsible for diseases such as neonatal diarrhea and post-weaning diarrhea whereas Shiga toxin (Stx)-producing *E. coli* (STEC) carrying the fimbrial adhesin F18 cause oedema disease (Byun *et al.*, 2013). These diseases are important causes of mortality among piglets and economic losses in pig production (Fairbrother *et al.*, 2007). Other *E. coli* are opportunistic and reside in the intestine of healthy animals for long periods. Recently, a close relationship between certain *E. coli* isolated from pork and *E. coli* isolates from extra intestinal infections, such as urinary tract infections in humans has been observed, providing evidence that some pathogenic *E. coli* isolates from pigs are zoonotic (Jakobsen *et al.*, 2012). Pathogenic *E. coli* can also be a reservoir of antimicrobial resistance genes among animal herds and be transmitted to humans via contaminated meat. In fact, *E. coli* isolates from humans and poultry meat can share identical plasmids. These plasmids may harbor several virulence and antimicrobial resistance genes and can be transferred to both poultry meat and human isolates (Voets *et al.*, 2013).

Nowadays, swine production structure involves the interaction of various stakeholders that can act as transmission vectors in a production network. The transmission of pathogenic *E. coli* between herds and the slaughterhouse in a given network, in particular to illustrate the dissemination of pathogenic *E. coli* strains in a zoonotic perspective, has not been well characterized. The objective of this study was to identify an *E. coli* contamination marker associated with potential transmission vectors of pathogenic *E. coli* virulence genes in a well-defined swine production network including a slaughterhouse. The description of transmission routes of pathogenic determinants may lead to strategies for a better understanding of bacterial control to prevent epidemic outbreaks among herds and possible dissemination throughout the slaughter process. In addition, the presence of certain *E. coli* virulence gene profiles could be used as indicators of contamination between herds and the slaughterhouse. The identification of such a contamination marker may be an important tool to improve the knowledge about the transmission of other epidemic agents, needed in the context of situations of concern such as the porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) (Lowe et al., 2014). The monitoring of the *E. coli* virulence gene profile distribution in a temporal and a spatial perspective resulted in the identification of an ETEC/F4 contamination marker suggesting the presence of enterotoxigenic *E. coli* (ETEC) positive for adhesin F4, suggesting the slaughterhouse yard to be a reservoir of contamination.

## **Materials and Methods**

### Sample collection:

A swine production network consisting of 10 finisher farms, a dedicated transportation company, and an associated slaughterhouse processing only pigs was selected. A total of 388 samples were taken inside and outside the buildings where pigs were housed, from each farm during three herd visits representing three successive production batches over a one year period. To permit acclimation, each herd visit occurred at least two weeks after pigs had arrived in the finishing barns. In order to examine direct routes of transmission, pools of five fresh feces to a total of 30g and originating from healthy and sick pigs, when present, taken in three different pens inside the buildings were sampled. Also, different objects which may be involved in indirect routes of transmission were sampled on a 100 cm<sup>2</sup> surface using sterile swabs soaked in buffered peptone water. These included the working desk, office door knob, loading dock floor, out of reach objects such as feed conveyor tubes and ventilation fans, mobile tools used in daily working procedures, such as shovels, panel boards, and scales that were accessible at the time of sampling. Outside the building where pigs were housed, the surfaces of the vehicle tracks, the loading deck, feed, silo base and rendering areas were sampled using a sterile brush. Each sample consisted of 25g of dust taken over a 900 cm<sup>2</sup> surface.

Also, 272 samples were taken in the slaughterhouse yard during the shipping of two production batches for each of nine of the 10 farms, which operated an all-in all-out production procedure. The other farm operated a rotation production procedure and was not included in the sampling. The slaughterhouse samples were taken on the loading dock floor

just prior to arrival of the truck from the particular farm, on tracks to the non-edible viscera and rendering areas used by stakeholders trucks in the yard of the slaughterhouse and the main truck tracks of the yard before and after the shipping procedure. The transporter truck itself was also sampled on each delivery visit to the slaughterhouse, as follows. The truck trailer floor was sampled prior to animal loading at the farm. The mud-guards were sampled at the farm before the departure to the slaughterhouse, at the slaughterhouse entry gate, and at the exit gate following unloading of the pigs. The truck pedals and carpets inside the driver cabin were also sampled at the end of the shipping procedure.

#### Detection of *E. coli* virulence genes in samples:

In order to determine their virulence gene profiles, samples were examined as described previously with slight modifications (Maluta *et al.*, 2014). Briefly, samples were incubated overnight in a non-selective buffered peptone water pre-enrichment broth at 37°C then transferred, respecting a 1:10 ratio, in a Luria-Bertani (LB) enrichment broth and incubated overnight. Cultures were centrifuged at 12 000 rpm for 5 minutes, washed in isotonic buffer (FA Buffer, Difco™) and placed at 100°C for 10 min to prepare the DNA templates for multiplex PCR reactions. The presence in the samples of virulence genes commonly associated with the ETEC (*eltB*, *estA*, *estB*, *faeG*), STEC (*stxA*, *stx2A*, *f18*), enteropathogenic *E. coli* (EPEC) (*eae*) and extraintestinal *E. coli* (ExPEC) (*cnf*, *papC*, *iucD*, *tsh*) pathotypes was examined by conventional multiplex PCR (Techne, Touchscreen gradient, model FTGRAD2D) according to a protocol of the Reference Laboratory for *Escherichia coli* (EcL– Faculté de Médecine Vétérinaire de l'Université de Montréal) available at [http://www.apzec.ca/en/APZEC/Protocols/APZEC\\_PCR\\_en.aspx](http://www.apzec.ca/en/APZEC/Protocols/APZEC_PCR_en.aspx).

The PCR program for the detection of ETEC and ExPEC pathotype was 94°C for 5 min, 25 cycles of 94°C for 30 s, annealing at 55°C for 30 s, and 72°C for 30 s. The final extension step was 72°C for 5 min. The PCR program for the detection of STEC and EPEC pathotype was 94°C for 5 min, 25 cycles of 94°C for 30 s, annealing at 60°C for 30 s, and 72°C for 30 s. The final extension step was 72°C for 5 min. The migrations of PCR reactions were done on 1.8% (w/v) agarose gel in 1X Tris/EDTA. Fisher's exact test was used to compare prevalence of virulence genes by group or sample origins.

## **Results**

### *E. coli* virulence gene detection in samples:

A total of 660 samples from the different farms and slaughterhouse were tested by multiplex PCR for the detection of the most pertinent virulence genes associated with the pathotypes of pathogenic *E. coli* found in animals. The distribution of these genes in farms throughout the network differed with respect to the pathotype. For instance, the distribution of the ExPEC virulence genes was homogenous and these genes were detected throughout the sampling period (Table 1, Supplemental Table S1 and S2). For both the farm and the slaughterhouse environmental samples, ExPEC virulence genes seem to be evenly distributed on the farms and at the slaughterhouse throughout the network. Overall, the STEC and EPEC associated virulence genes, except for Stx2, demonstrated a low prevalence in the network, and on farm specificity (Table 1, Supplemental Tables S3 and S4). Samples from farm E did not demonstrate any STEC and EPEC contamination throughout the sampling period (Supplemental Table S3). F18, the fimbrial adhesion found on STEC associated with edema disease, was only found on farms A, F, and G, and then at a very low frequency. Interestingly,

a higher proportion of Stx1 positive samples (10%) was detected at the slaughterhouse compared to the farms, particularly for departure visits associated with farms I and J (Supplemental Table S4). In contrast, although the ETEC associated virulence genes were found in similar frequencies within the farms and slaughterhouse (Table 1), their distribution between farms was clearly non-homogenous, and showed different contamination profiles for each farm. The genes *estB* and *estA* were detected on all the farms throughout the network (Table 2). On the other hand, *faeG* and *eltB* were only detected on eight farms and their distribution was heterogeneous. For instance, neither *eltB* nor *faeG* was detected on farm F and farm I remained negative for *eltB* virulence gene over the sampling period (Table 2). Also, Farm G remained negative for the detection of *faeG* virulence gene over the sampling period. In contrast, farms A and B demonstrated a significantly higher prevalence of *eltB* virulence gene than any other farms in the network ( $P \leq 0.05$ ). Farm H demonstrated a significantly higher level of detection for the *faeG* virulence gene than farms D, E, F, G and I ( $P \leq 0.05$ ). At the slaughterhouse, the ETEC virulence genes *eltB* and *faeG* were detected on every departure visit (Supplemental Table S5).

In order to more precisely monitor the spatial and temporal distribution of samples potentially contaminated with pathogenic ETEC: F4 isolates, a causative agent of diarrhea in pigs, we established the ETEC/F4 contamination marker. Positive samples were defined by the detection by PCR of at least one ETEC enterotoxin gene (*estB*, *estA* and *eltB*) in combination with the *faeG* gene encoding the F4 fimbriae in samples. These criteria are also used to discriminate against the presence of other pathogenic *E. coli* pathotypes potentially present in samples.

### Spatial distribution of ETEC/F4 positive samples in the network:

ETEC/ F4 positive samples were detected in seven of the 10 farms examined in the network (Table 3). Farms A, B and H demonstrated a significantly higher prevalence of ETEC/F4 contamination in comparison to the other positive farms in the network ( $p \leq 0.05$ ). Positive fecal samples were only found in the three most contaminated farms. In a great proportion of farms ETEC/F4 positive samples were only found on objects inside the building (Table 3), suggesting that environmental sites may be a reservoir of contamination. In the slaughterhouse environment, ETEC/F4 positive samples were detected on objects (5%) and vehicle tracks (6%) in every departure visit except for visits associated with farm E (Table 4). The departure visits associated with farms A, B, G and J showed significantly higher levels of detection compared to visits associated with farms D, E and I ( $p \leq 0.05$ ). Overall on the farms, the ETEC/F4 marker was detected in every sample site inside the animal building over the sampling period, although the contamination level was not significantly different between positive sample sites. Within the farm building environment, the samples taken from the working desk/door knob (10%) and out of reach objects (10%) showed the highest detection level of ETEC/F4 (Fig 1). All vehicle tracks outside the animal buildings and the slaughterhouse yard also showed the presence of ETEC/F4 (Fig 1 and Fig 2). However, vehicle tracks at farms tended to show a lower level of ETEC/F4 compared to tracks in the slaughterhouse yard. The slaughterhouse main track and rendering track samples showed a particularly higher level of ETEC/F4, although no significant differences in regard to the level of ETEC/F4 were observed between track sites (Fig 2). Truck mud guard, cabin, and trailer samples were ETEC/F4 positive on the farms and at the slaughterhouse yard, the level of

positivity being highest in samples from the mud guard at the exit point of the slaughterhouse yard (28%) (Table 5).

#### Temporal distribution of ETEC/F4 positive samples in the network:

Examination of the temporal distribution of the ETEC/F4 positive samples in a defined network permitted the monitoring of the contamination level in the farm and slaughterhouse environments over a one year period. It was observed that 88% of the ETEC/F4 positive samples were detected from September 2011 to January 2012, for most of the farms in the network ( $p \leq 0.05$ ) (Fig 3). Interestingly, the distribution of ETEC/F4 positive samples in the slaughterhouse environment demonstrated a similar profile of contamination, where most positive samples (89%) were detected in the same time frame from September 2011 to January 2012 (Fig 4).

#### **Discussion:**

This study shows for the first time the use of virulence gene detection associated with pathogenic ETEC: F4 in fecal and environmental samples, as a tool in aid of monitoring the distribution of this *E. coli* pathotype in a defined swine production network consisting of farms, a transporter and a slaughterhouse. ETEC isolates encoding the F4 fimbriae, also known as K88, may be pathogenic and have the potential to colonize gastrointestinal tract of susceptible pigs inducing post-weaning diarrhea (PWD) (Fairbrother et al., 2007). The presence of the pathogenic ETEC isolates among herds is related to a mortality rate reaching 10% to 25% in absence of medication and has a great economic impact on production (Laine et al., 2008). Generally, the ETEC/F4 gene combination is detected predominantly among pigs with symptoms of neonatal diarrhea or PWD in the maternity and nursery (Byun et al., 2012)



and (Sugiharto et al., 2012). Nevertheless, we have demonstrated that this profile may be detected in feces of healthy finisher pigs, suggesting a role for these animals in the circulation of ETEC: F4 in the network.

The detection of ETEC/F4 marker on tools and objects inside the animal building indicate that the environment is not less subject to harbor ETEC isolates and can be associated with barn recontamination after non efficient cleaning and disinfection steps. Also, the ETEC/F4 contamination profile was frequently detected on objects less accessible for cleaning and disinfection procedures, such as the residual dust on the ventilation fan and the feed conveyor. The presence of ETEC/F4 in these environments suggests that potentially pathogenic *E. coli* isolates may be resistant to desiccation and persist in the farm environment. Furthermore, an ETEC: F4 *E. coli* was isolated from dust on the feed conveyor inside the animal building on one occasion. The presence of ETEC: F4 strains in dry dust reveals the potential of persistence in the environment and dissemination of the pathogenic *E. coli* strains via dust movement inside and outside the animal building. The isolation of ETEC: F4 colonies in positive samples can be technically difficult in a subclinical context as the proportion of positive isolates is often low in samples. However, the detection of ETEC/F4 profile in samples can be used as a tool to have a better understanding of the circulation of these pathogens in this environment. According to literature, bacteria of other pathogenic *E. coli* pathotypes such as Shiga toxin-producing *E. coli* O157:H7 (STEC) demonstrate tolerance to desiccation in conditions where non-pathogenic *E. coli* were not able to thrive (Hiramatsu et al., 2005; van Elsas et al., 2011). These findings suggest the need to improve application of cleaning and disinfection protocols inside the farm environment to stop cycles of recontamination between production batches.

The detection of the ETEC/F4 marker in the transportation truck tracks outside the animal building suggests continuity between the inside of the animal building and the outside environment with respect to ETEC/F4 contamination. Also, the presence of the ETEC/F4 contamination marker in the truck tracks indicates a possible mechanical transmission of bacteria to truck components such as the tires. Transfer of bacterial contamination to the truck tires has already been shown in the literature (Amass SF, 2005). Therefore, tracks can act as a source of contamination in direct contact with potential vectors such as transporters. Also, environmental sites could act as reservoirs of contamination, permitting transmission of pathogenic *E. coli* strains to pigs of successive batches and from one establishment to another via vectors such as the animal transporters, more specifically by the truck tires and by the driver's boots. Likewise, mechanical vectors may participate in the transmission of pathogenic *E. coli* between sites at different steps of production, such as the nursery, affecting herd health status in the network.

The potential presence of contaminants such as pathogenic *E. coli* in the slaughterhouse yard is currently not a preoccupation for the porcine industry. However, the detection of *E. coli* virulence genes suggests that the slaughterhouse yard is likely to be contaminated by pathogenic *E. coli* and can participate in transmission of these bacteria to transporters via contaminated tires, mud-guards and trailers or cabin with inadequate washing and disinfection measures. Additionally, persistent pathogenic isolates present in the slaughterhouse yard may be transmitted back to the farms by contaminated transport equipment. Since the animal transporter is known to be a vector of pathogens such as *Salmonella* and other enteric viruses

(eg. PEDv) our results highlight the importance of increasing biosecurity measures and applying proper washing and disinfection procedures for truck cleaning (Amass SF, 2005; Hernandez et al., 2013; Keelara et al., 2013). According to recommendations, trucks must be washed, disinfected and dried after each animal delivery to the slaughterhouse before going back in operation. However, the washing and disinfection steps after animal delivery do not seem to be performed systematically as the quality and the availability of the washing and disinfection equipment may affect the operation.

In addition, cold temperature conditions in winter appear to sometimes interfere with the systematic washing and disinfection procedure at the end of the animal delivery to the slaughterhouse. It would be advantageous for the industry to strengthen the procedures and maintain a systematic and effective washing and disinfection procedure for transporter trucks passing through the slaughterhouse yard, in order to prevent the dissemination of pathogenic and potentially zoonotic agents in the network and to avoid animal disease outbreaks.

The *stx<sub>1</sub>* STEC associated virulence gene was sporadically detected in samples taken from the slaughterhouse yard. Interestingly, this gene is usually associated with STEC strains found in cattle (Beutin *et al.*, 1993). As the slaughterhouse in our study is processing only swine, it would be interesting to investigate possible explanations for the presence of cattle associated STEC genes in the slaughterhouse environment. It is possible that the swine transporters carry other animal species in other production networks outside of our study. Whatever the case may be, this situation reinforces the importance of applying efficient truck cleaning and disinfection procedures to reduce this risk of contamination.

The temporal distribution of the ETEC/F4 contamination marker permitted the demonstration of a peak of contamination, from September 2011 to January 2012, at the farms and the slaughterhouse. Multiple elements could explain this peak of contamination. The fluctuation of temperature at this period of year is known to influence the excretion levels of ETEC: F4 by contaminated pigs. Also, ambient temperature of less than 25°C or excessive air current may result in a buildup of pathogenic *E. coli* in the environment (Laine et al., 2008). Pigs originating from the same nursery farms may have encountered an ETEC associated diarrheic episode and their delivery to other finishing establishments would probably contribute to the dissemination of pathogenic *E. coli* throughout the network. In accordance with this possible explanation, the environments of farms A, B and J and their associated departure visits to the slaughterhouse were positive for ETEC/F4 contamination marker and had received piglets from the same nursery farm.

From a zoonotic perspective, ETEC-associated foodborne illness is the 14<sup>th</sup> most important among 30 foodborne illnesses, according to Canadian data (Thomas *et al.*, 2013). Even if ETEC: F4 strains are not presently reported to be zoonotic, the acquisition of genetic material from other virulent *E. coli* isolates present in the environment could promote the emergence of zoonotic strains. For instance, the acquisition of *stx2A* gene encoding the shiga toxin 2 by a competent *E. coli* isolate has the potential to induce diseases such as Hemolytic-uremic syndrome in humans (Persson et al., 2007). A similar situation was reported in an outbreak in Europe from May to July 2011 (Grad *et al.*, 2013). Furthermore, the occurrence of ESBL-positive (Extended Spectrum Beta Lactamase) *E. coli* infection is increasing in the human population throughout the world and is often associated with the consumption of contaminated food products of different animal origins, such as chicken meat (Wu *et al.*, 2013; Blaak *et al.*,

2014). A better understanding of the pathogenic *E. coli* distribution in a defined production network can promote the control of the dissemination of pathogenic and potentially zoonotic *E. coli* strains in the food chain.

### **Conclusion:**

This study describes the distribution of the most common pathogenic *E. coli* virulence genes in a defined swine production network over a 12 month period. The detection of the most common *E. coli* virulence genes in the slaughterhouse yard suggests this environment to be frequently contaminated with potentially pathogenic and zoonotic *E. coli* isolates. Pathogenic isolates may persist in the environment and be transmitted back to the farms by mechanical vectors such as transporter trucks. The spatial and temporal distribution of *E. coli* virulence genes permitted to identify an ETEC/F4 contamination marker that may be used as a tool to gather information on potential modes of dissemination of pathogenic and potentially zoonotic *E. coli* strains. The ETEC/F4 contamination marker used in a temporal perspective permits the identification of time periods of higher contamination levels in the network. This demonstrates the utility of such a tool to monitor the contamination level in several establishments simultaneously. This ETEC/F4 contamination marker may also be suitable to illustrate ways of potential dissemination of other pathogens or zoonotic agents with a similar resistance to the environment such as STEC and has to be considered in viral dissemination in the context of the PEDv epidemic. A better knowledge of the environmental contamination sources can lead to the application of improved biosecurity measures and can help to prevent transmission of contaminants in every step of production.

## Tables and Figures

**TABLE 1** Distribution of pathogenic *E. coli* virulence genes<sup>a</sup> in a swine production network in Quebec

| Location                     | Total No. of samples | No. of samples (%) positive for virulence gene: |                        |                       |                       |                         |                       |                      |                       |                         |                          |                        |                           |
|------------------------------|----------------------|---|------------------------|-----------------------|-----------------------|-------------------------|-----------------------|----------------------|-----------------------|-------------------------|--------------------------|------------------------|---------------------------|
|                              |                      | ETEC  |                        |                       |                       | ExPEC                   |                       |                      |                       | STEC                    |                          |                        | EPEC <sup>c</sup>         |
|                              |                      | STb<br>( <i>estB</i> )                          | STa<br>( <i>estA</i> ) | LT<br>( <i>eltB</i> ) | F4<br>( <i>faeG</i> ) | Aero<br>( <i>iucD</i> ) | Tsh<br>( <i>tsh</i> ) | P<br>( <i>papC</i> ) | CNF<br>( <i>cnf</i> ) | Stx1<br>( <i>stxA</i> ) | Stx2<br>( <i>stx2A</i> ) | F18<br>( <i>fedA</i> ) | Intimin<br>( <i>eae</i> ) |
| Farms <sup>b</sup>           | 388                  | 73<br>(19)                                      | 81<br>(21)             | 32<br>(8)             | 46<br>(12)            | 50<br>(13)              | 156<br>(42)           | 80<br>(21)           | 25<br>(6)             | 12<br>(3)               | 65<br>(18)               | 6<br>(2)               | 16<br>(4)                 |
| Slaughter house <sup>c</sup> | 272                  | 51<br>(19)                                      | 22<br>(8)              | 29<br>(11)            | 64<br>(24)            | 72<br>(26)              | 168<br>(62)           | 98<br>(36)           | 39<br>(14)            | 26<br>(10)              | 38<br>(14)               | 1<br>(0,4)             | 17<br>(6)                 |
| Total                        | 660                  | 124<br>(19)                                     | 103<br>(16)            | 61<br>(9)             | 110<br>(17)           | 122<br>(18)             | 324<br>(49)           | 178<br>(27)          | 64<br>(10)            | 38<br>(6)               | 103<br>(16)              | 7<br>(1)               | 33<br>(5)                 |

<sup>a</sup> Virulence genes identifying the Enterotoxigenic *E. coli* (ETEC), Extraintestinal *E. coli* (ExPEC), Shiga toxin-producing *E. coli* (STEC), and Enteropathogenic *E. coli* (EPEC) pathotypes.

<sup>b</sup> Samples were taken on 3 herd visits for each of the 10 farms and represent the environment inside the animal building (pooled feces, working desk, door knob, out of reach objects, mobile tools and loading deck), the truck tracks outside the animal building used by the stakeholders (loading dock, feed, rendering) and the feed silo base.

<sup>c</sup> Samples were taken on 2 departure visits for 9 of the 10 farms and represent the truck tracks on the slaughterhouse yard in different areas (viscera, rendering, loading dock, and the main track) and the truck mud guards at different times during the delivery procedure.

**TABLE 2** Distribution of ETEC virulence genes<sup>a</sup> on the farms in a swine production network in Quebec

| Farm <sup>b</sup> | Total<br>No. of<br>samples | No. of samples (%) positive for virulence factor (gene): |                        |                       |                       |
|-------------------|----------------------------|--|------------------------|-----------------------|-----------------------|
|                   |                            | STb<br>( <i>estB</i> )                                   | STa<br>( <i>estA</i> ) | LT<br>( <i>eltB</i> ) | F4<br>( <i>faeG</i> ) |
| A                 | 41                         | 14 (34)  | 18 (44)                | 6 (15)                | 10 (24)               |
| B                 | 40                         | 15 (38)  | 9 (23)                 | 12 (30)               | 8 (20)                |
| C                 | 38                         | 6 (16)   | 5 (13)                 | 2 (5)                 | 4 (11)                |
| D                 | 38                         | 11 (29)  | 14 (37)                | 4 (11)                | 2 (5)                 |
| E                 | 38                         | 6 (16)   | 3 (8)                  | 1 (3)                 | 1 (3)                 |
| F                 | 38                         | 3 (8)  | 1 (3)                  | 0 (0)                 | 0 (0)                 |
| G                 | 38                         | 10 (27)  | 8 (21)                 | 2 (5)                 | 0 (0)                 |
| H                 | 39                         | 2 (5)  | 7 (18)                 | 2 (5)                 | 11 (28)               |
| I                 | 40                         | 3 (8)  | 7 (18)                 | 0 (0)                 | 7 (18)                |
| J                 | 38                         | 3 (8)  | 9 (23)                 | 3 (8)                 | 3 (3)                 |
| Total             | 388                        | 73 (19)  | 81 (21)                | 32 (8)                | 46 (12)               |

<sup>a</sup> Virulence genes associated with enterotoxigenic *E. coli* (ETEC); *estB*, *estA*, *eltB* and *faeG*.

<sup>b</sup> Samples were taken on 3 herd visits on the 10 farms and represent the environment inside the animal building (pooled feces, working desk, door knob, out of reach objects, mobile tools and loading deck), the truck tracks outside the animal building used by the stakeholders (loading dock, feed, rendering) and the feed silo base.

**TABLE 3** Spatial distribution of ETEC/F4 in samples<sup>a</sup> on the farms of the network

| Farm <sup>b</sup> | Total<br>No. of<br>samples | No. of samples (%) positive for ETEC/F4 |                      |                     |         |
|-------------------|----------------------------|---|----------------------|---------------------|---------|
|                   |                            | Feces <sup>c</sup>                      | Objects <sup>c</sup> | Tracks <sup>c</sup> | All     |
| A                 | 41                         | 4 (10)                                  | 5 (12)               | 1 (2)               | 10 (24) |
| B                 | 40                         | 2 (5)                                   | 2 (5)                | 2 (5)               | 6 (15)  |
| C                 | 38                         | 0 (0)                                   | 1 (3)                | 1 (3)               | 2 (5)   |
| D                 | 38                         | 0 (0)                                   | 1 (3)                | 0 (0)               | 1 (3)   |
| H                 | 39                         | 3 (8)                                   | 3 (8)                | 1 (3)               | 7 (18)  |
| I                 | 40                         | 0 (0)                                   | 1 (3)                | 0 (0)               | 1 (3)   |
| J                 | 38                         | 0 (0)                                   | 0 (0)                | 1 (3)               | 1 (3)   |
| Total             | 388 <sup>d</sup>           | 9 (2)                                   | 13 (3)               | 6 (2)               | 28 (7)  |

<sup>a</sup> ETEC/F4 marker positive samples were defined as those positive for at least one enterotoxin gene (*estB*, *estA* or *eltB*) in combination with the fimbriae encoding *faeG* gene.

<sup>b</sup> Samples were taken on 3 herd visits for each of the 10 farms inside and outside the animal building, only results for ETEC/F4 positive farms were presented.

<sup>c</sup> Fecal samples consist of pools of 5 fresh feces taken in the pen of healthy and diseased pigs. Objects samples were taken on tools used in the daily working and the loading deck area (working desk, door knob, out of reach objects and mobile tools) inside the animal building. Track samples consist of dust taken at the surface of the tracks used by stakeholder outside the farm (loading dock, feed, rendering) and the feed silo base.

<sup>d</sup> Including farms E, F and G for which no ETEC/F4 marker positive samples were observed during all the sampling period.

**TABLE 4** Spatial distribution of ETEC/F4 marker positive samples<sup>a</sup> at the slaughterhouse

| Farm departure visits <sup>b</sup> | Total No. of samples | No. of samples (%) positive for ETEC/F4: |                     |         |
|------------------------------------|----------------------|--|---------------------|---------|
|                                    |                      | Objects <sup>c</sup>                     | Tracks <sup>c</sup> | All     |
| A                                  | 26                   | 4 (15)                                   | 3 (12)              | 7 (27)  |
| B                                  | 27                   | 3 (11)                                   | 0 (0)               | 3 (11)  |
| C                                  | 31                   | 2 (6)                                    | 1 (3)               | 3 (10)  |
| D                                  | 30                   | 1 (3)                                    | 0 (0)               | 1 (3)   |
| G                                  | 30                   | 0 (0)                                    | 5 (17)              | 5 (17)  |
| H                                  | 29                   | 0 (0)                                    | 2 (7)               | 2 (7)   |
| I                                  | 34                   | 0 (0)                                    | 1 (3)               | 1 (3)   |
| J                                  | 32                   | 3 (9)                                    | 3 (9)               | 6 (19)  |
| Total                              | 272 <sup>d</sup>     | 13 (5)                                   | 15 (6)              | 28 (11) |

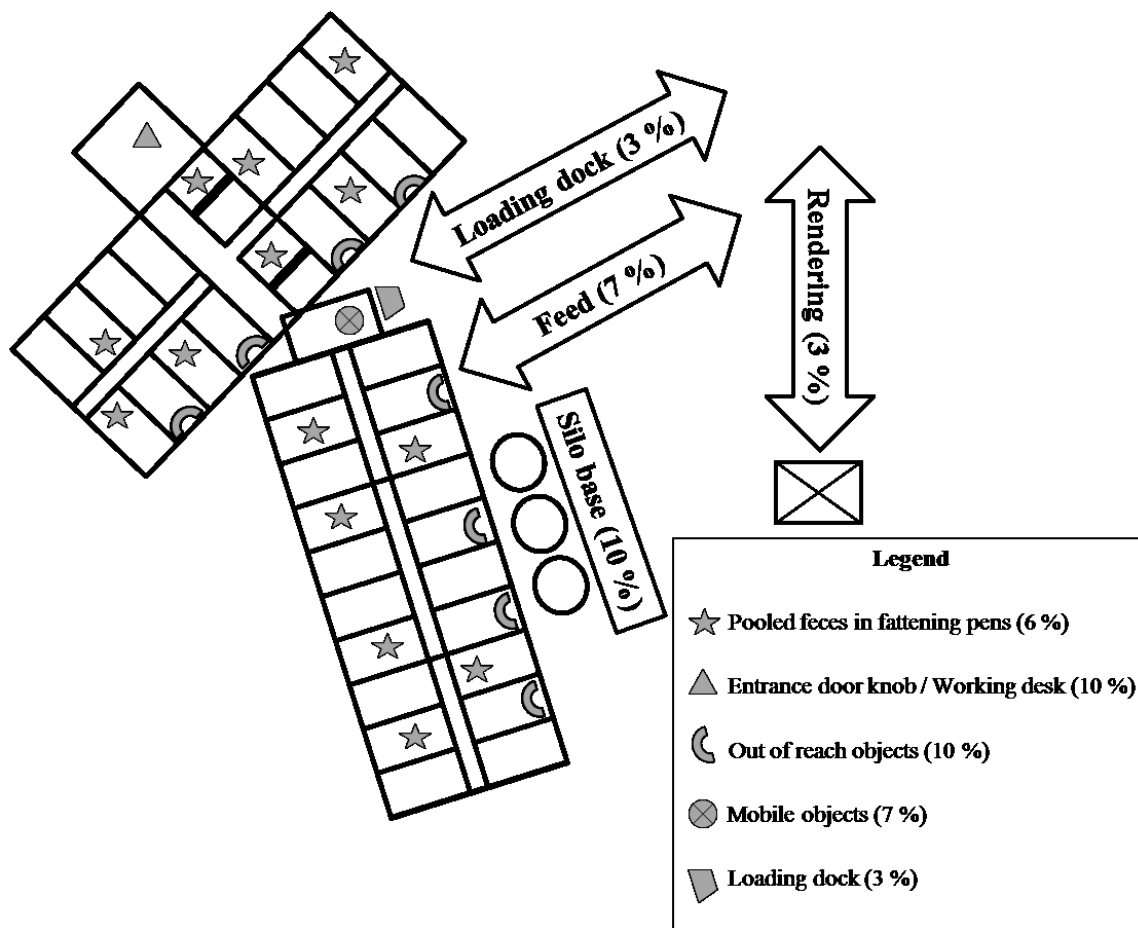
<sup>a</sup> ETEC/F4 marker positive samples were defined as those positive for at least one enterotoxin gene (*estB*, *estA* or *eltB*) in combination with the fimbriae encoding *faeG* gene.

<sup>b</sup> Samples were taken in the yard of the slaughterhouse on 2 departure visits of all farms except for farm F for which shipping to the slaughterhouse was not scheduled.

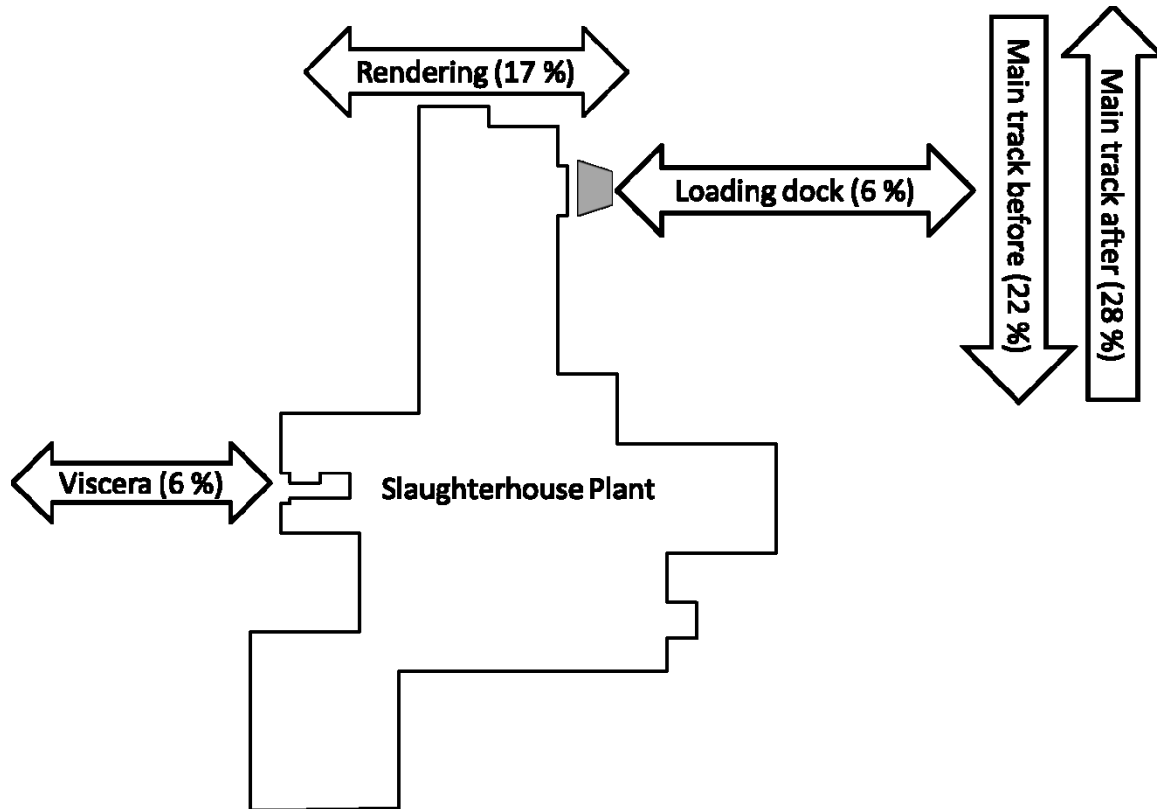
<sup>c</sup> Objects samples were taken in the clean trailer of the truck prior to the animal shipping, the mud guards at different steps of the delivery procedure (at farm, at the entry of the slaughterhouse and at the end of the delivery), inside the truck cabin at the end of the delivery (pedals and carpets). Track samples were taken in the slaughterhouse yard in different areas (viscera, rendering, loading dock, and the main track).

<sup>d</sup> Including the departure visits associated with farm E for which no ETEC/F4 positive samples were observed.





**FIG 1** Spatial distribution and proportion of ETEC/F4 positive samples in a typical schematic representation of the 10 fattening farms after 3 visits. ETEC/F4 was detected in feces of healthy and sick animals but also throughout the inside of the animal building suggesting the spreading of contamination. ETEC/F4 was detected in all the truck tracks of the farm yard. This suggests contamination between the herds and the outside environment of the farm. The tracks are possibly contaminated by pathogenic microorganisms and may act as sources of contamination. There is no significant difference in the level of ETEC/F4 positive samples between the inside and outside environment of the animal building ( $P > 0.05$ ).



**FIG 2** Spatial distribution and proportion of ETEC/F4 positive samples in a typical schematic representation of the yard of the slaughterhouse during 18 visits before and after the passage of the delivery truck in the main track.

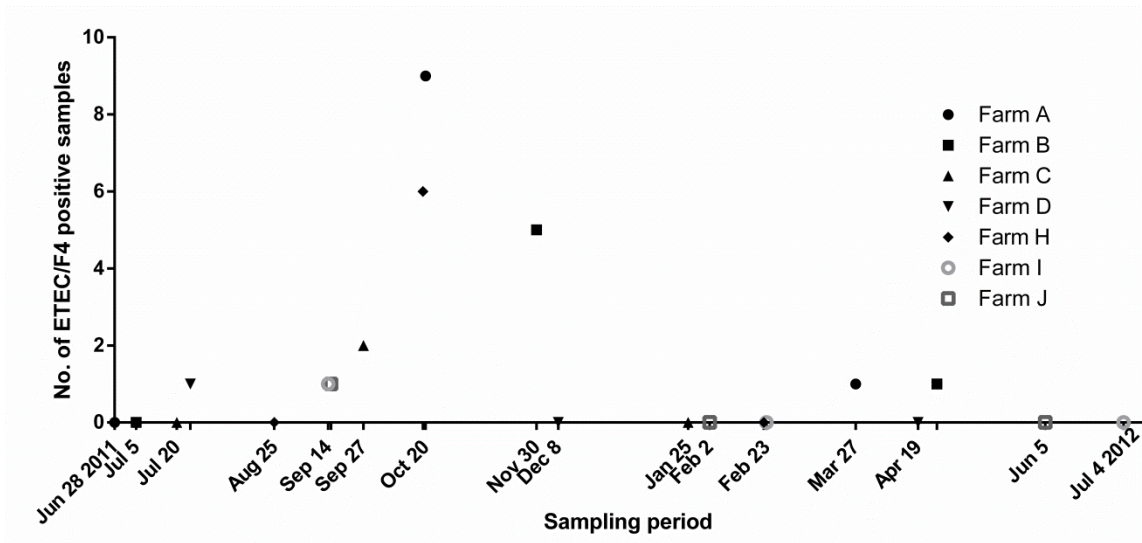
The slaughterhouse yard is likely to be contaminated by ETEC/F4 and may act as a reservoir of contamination at the last steps of animal production. Improper transportation procedures may lead to the transmission of contamination inside the slaughterhouse plant but also outside in the network via contaminated trucks.

**TABLE 5** Distribution of ETEC/F4 positive samples<sup>a</sup> on truck-associated objects

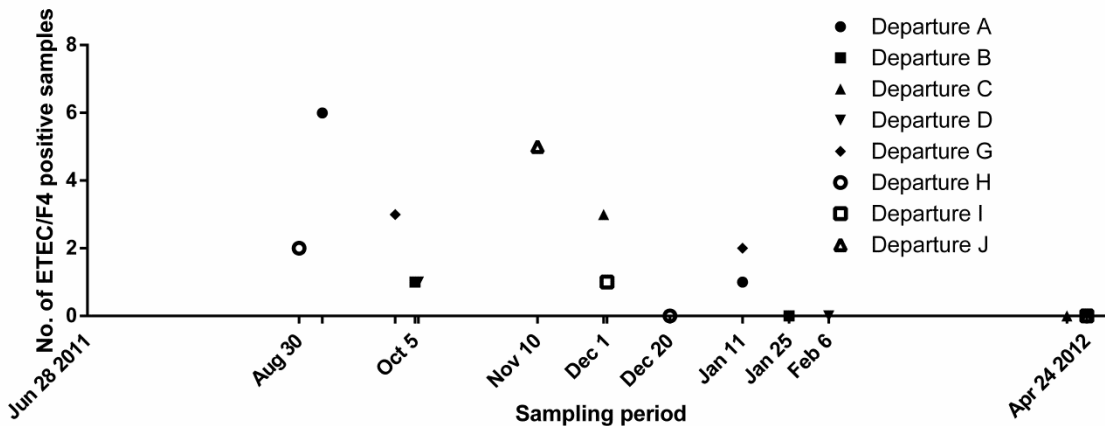
| Origin of sample <sup>b</sup>                 | No. of samples | No. of samples positive for ETEC/F4 (%) |
|---|----------------|---|
| Clean trailer <sup>b</sup>                    | 18             | 2 (11)                                  |
| Mud guard at farm <sup>b</sup>                | 18             | 1 (6)                                   |
| Mud guard at slaughterhouse exit <sup>b</sup> | 18             | 5 (28)                                  |
| Truck cabin <sup>b</sup>                      | 18             | 3 (17)                                  |
| Total   | 72             | 11 (15)                                 |

<sup>a</sup> ETEC/F4 positive samples were defined as those positive for at least one enterotoxin gene (*estB*, *estA* or *eltB*) in combination with the fimbriae encoding *faeG* gene.

<sup>b</sup> The clean trailer samples were taken at the arrival of the delivery truck to the farm the day of departure before the pigs boarding. The mud guard samples at farm and at the slaughterhouse exit were taken on the truck mud guards just before the departure and at the end of the delivery to the slaughterhouse. The truck cabin samples were taken at the end of the delivery to the slaughterhouse on the pedals and carpet inside the driver cabin.



**FIG 3** The temporal distribution of ETEC/F4 positive samples in the farm environment throughout the sampling period suggesting a higher level of contamination for a majority of farms in the network from September 2011 to January 2012. Farms E, F and G are not included on this graph as ETEC/F4 was not found on these farms.



**FIG 4** The temporal distribution of ETEC/F4 positive samples in the slaughterhouse yard throughout the sampling period suggesting a higher level of ETEC/F4 contamination in the same time period as in the farm environment, from September 2011 to January 2012. ETEC/F4 contamination associated with delivery visit G, for which no contamination was found in the farm environment, suggests that the slaughterhouse environment may reflect overall contamination from farms.

## References

- Amass SF, S. J., 2005: Evaluation of the efficacy of a truck-mounted tire sanitizer system during winter weather. *J Swine Health Prod.* 2006;14(2):101-104.
- Beutin, L., D. Geier, H. Steinruck, S. Zimmermann and F. Scheutz, 1993: Prevalence and some properties of verotoxin (Shiga-like toxin)-producing *Escherichia coli* in seven different species of healthy domestic animals. *J Clin Microbiol*, **31**, 2483-2488.
- Blaak, H., R. A. Hamidjaja, A. H. van Hoek, L. de Heer, A. M. de Roda Husman and F. M. Schets, 2014: Detection of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing *Escherichia coli* on flies at poultry farms. *Applied and environmental microbiology*, **80**, 239-246.
- Byun, J. W., B. Y. Jung, H. Y. Kim, J. M. Fairbrother, M. H. Lee and W. K. Lee, 2013: Real-time PCR for differentiation of F18 variants among enterotoxigenic and Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from piglets with diarrhoea and oedema disease. *Veterinary journal*, **198**, 538-540.
- Fairbrother, J. M., É. Nadeau and C. L. Gyles, 2007: *Escherichia coli* in postweaning diarrhea in pigs: an update on bacterial types, pathogenesis, and prevention strategies. *Animal Health Research Reviews*, **6**, 17-39.
- Grad, Y. H., P. Godfrey, G. C. Cerquiera, P. Mariani-Kurkdjian, M. Gouali, E. Bingen, T. P. Shea, B. J. Haas, A. Griggs, S. Young, Q. Zeng, M. Lipsitch, M. K. Waldor, F. X. Weill, J. R. Wortman and W. P. Hanage, 2013: Comparative genomics of recent Shiga

- toxin-producing *Escherichia coli* O104:H4: short-term evolution of an emerging pathogen. *mBio*, **4**, e00452-00412.
- Hernandez, M., J. Gomez-Laguna, I. Luque, S. Herrera-Leon, A. Maldonado, L. Reguillo and R. J. Astorga, 2013: Salmonella prevalence and characterization in a free-range pig processing plant: tracking in trucks, lairage, slaughter line and quartering. *International journal of food microbiology*, **162**, 48-54.
- Hiramatsu, R., M. Matsumoto, K. Sakae and Y. Miyazaki, 2005: Ability of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* and *Salmonella* spp. to survive in a desiccation model system and in dry foods. *Applied and environmental microbiology*, **71**, 6657-6663.
- Jakobsen, L., P. Garneau, G. Bruant, J. Harel, S. S. Olsen, L. J. Porsbo, A. M. Hammerum and N. Frimodt-Moller, 2012: Is *Escherichia coli* urinary tract infection a zoonosis? Proof of direct link with production animals and meat. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases : official publication of the European Society of Clinical Microbiology*, **31**, 1121-1129.
- Keelara, S., H. M. Scott, W. M. Morrow, W. A. Gebreyes, M. Correa, R. Nayak, R. Stefanova and S. Thakur, 2013: Longitudinal study of distributions of similar antimicrobial-resistant salmonella serovars in pigs and their environment in two distinct Swine production systems. *Applied and environmental microbiology*, **79**, 5167-5178.
- Laine, T. M., T. Lyytikainen, M. Yliaho and M. Anttila, 2008: Risk factors for post-weaning diarrhoea on piglet producing farms in Finland. *Acta veterinaria Scandinavica*, **50**, 21.
- Lowe, J., P. Gauger, K. Harmon, J. Zhang, J. Connor, P. Yeske, T. Loula, I. Levis, L. Dufresne and R. Main, 2014: Role of transportation in spread of porcine epidemic diarrhea virus infection, United States. *Emerging infectious diseases*, **20**, 872-874.
- Maluta, R. P., J. M. Fairbrother, A. E. Stella, E. C. Rigobelo, R. Martinez and F. A. de Avila, 2014: Potentially pathogenic *Escherichia coli* in healthy, pasture-raised sheep on farms and at the abattoir in Brazil. *Vet Microbiol*, **169**, 89-95.
- Persson, S., K. E. Olsen, S. Ethelberg and F. Scheutz, 2007: Subtyping method for *Escherichia coli* shiga toxin (verocytotoxin) 2 variants and correlations to clinical manifestations. *J Clin Microbiol*, **45**, 2020-2024.
- Thomas, M. K., R. Murray, L. Flockhart, K. Pintar, F. Pollari, A. Fazil, A. Nesbitt and B. Marshall, 2013: Estimates of the burden of foodborne illness in Canada for 30 specified pathogens and unspecified agents, circa 2006. *Foodborne pathogens and disease*, **10**, 639-648.
- van Elsas, J. D., A. V. Semenov, R. Costa and J. T. Trevors, 2011: Survival of *Escherichia coli* in the environment: fundamental and public health aspects. *The ISME journal*, **5**, 173-183.
- Voets, G. M., A. C. Fluit, J. Scharringa, C. Schapendonk, T. van den Munckhof, M. A. Leverstein-van Hall and J. C. Stuart, 2013: Identical plasmid AmpC beta-lactamase genes and plasmid types in *E. coli* isolates from patients and poultry meat in the Netherlands. *International journal of food microbiology*.
- Vogeleer, P., Y. D. Tremblay, A. A. Mafu, M. Jacques and J. Harel, 2014: Life on the outside: role of biofilms in environmental persistence of Shiga-toxin producing *Escherichia coli*. *Frontiers in microbiology*, **5**, 317.
- Wu, G., M. J. Day, M. T. Mafura, J. Nunez-Garcia, J. J. Fenner, M. Sharma, A. van Essen-Zandbergen, I. Rodriguez, C. Dierikx, K. Kadlec, A. K. Schink, J. Wain, R. Helmuth, B. Guerra, S. Schwarz, J. Threlfall, M. J. Woodward, N. Woodford, N. Coldham and

D. Mevius, 2013: Comparative analysis of ESBL-positive *Escherichia coli* isolates from animals and humans from the UK, The Netherlands and Germany. *PloS one*, **8**, e75392.

**Acknowledgements:** The research was supported by the Swine Innovation Porc, CRIPA, CRSV, GRESA and Université de Montréal.

## **Discussion générale**

Ce projet avait pour objectif d'identifier un marqueur de contamination *E. coli* dans le réseau de production permettant de suggérer certaines sources de contamination et de documenter les modes potentiels de transmission des *E. coli* pathogènes et potentiellement zoonotiques présents dans un réseau défini de production. La présence de ces microorganismes dans les élevages porcins du Québec est documentée depuis plusieurs décennies en raison du fait que ces derniers sont souvent associés à des épisodes de maladies au sein des troupeaux et engendre chaque année un manque à gagner considérable en industrie (Fairbrother et al., 2007). En effet, la prévalence des souches *E. coli* pathogènes isolées lors d'épisodes de maladie fait l'objet d'une étude constante afin de suivre l'évolution de la population bactérienne en élevage (Amezcuca et al., 2008). Par la caractérisation moléculaire et le génotypage des isolats, il est possible d'étudier les variations et l'évolution des gènes de virulence dans la population des *E. coli* pathogènes. Ces pratiques aident à maintenir les connaissances relatives à l'identité des souches pathogènes présentes sur le terrain. D'autre part, une meilleure compréhension des sources et des potentiels modes de diffusion des microorganismes pathogènes peut aider à accroître le contrôle de la transmission de contaminants entre les élevages. Ces alternatives peu coûteuses pourraient permettre de limiter les éclosions de maladies en élevage et minimiser la transmission de microorganismes pathogènes et potentiellement zoonotiques jusqu'à l'abattoir.

La filière porcine est une industrie en expansion qui requiert l'étroite collaboration des producteurs afin d'obtenir un produit de qualité et de haute valeur commerciale. La coopération entre les éleveurs implique la participation d'intervenants mécaniques comme les transporteurs d'animaux, de moulée et le service d'équarrisseur, mais aussi des intervenants



humains comme les vétérinaires et les techniciens. Ceux-ci sont appelés à visiter fréquemment les élevages et peuvent malgré eux être vecteurs de contaminants entre les élevages.

Cependant, le rôle des intervenants en tant que vecteur de contaminants œuvrant au sein d'un réseau de production porcine n'est pas bien caractérisé. Les mesures de biosécurité mises en place sur les lieux d'élevage permettent de contrôler en partie l'introduction de microorganismes pathogènes dans les bâtiments. Contrairement à la croyance populaire, l'hygiène à l'intérieur de la porcherie est une préoccupation des plus importantes. Une attention particulière est apportée au lavage et à la désinfection entre chaque lot de production afin de favoriser un environnement sain aux nouveaux résidents qui sont plus susceptibles aux infections en début d'engraissement (Laine et al., 2008). Cependant, il peut être difficile d'éliminer totalement la présence d'*E. coli* potentiellement pathogène en élevage. En effet, certaines pièces d'équipements plus complexes à nettoyer comme les panneaux, les ventilateurs et les convoyeurs de moulée, peuvent demeurer contaminées sur une longue période de temps. Cet aspect démontre l'importance de la décontamination adéquate de ces sources potentielles de contamination en élevage. Les objets en hauteur, comme les convoyeurs et les ventilateurs peuvent être difficiles à nettoyer et accumulent facilement la poussière et la matière organique en suspension dans les bâtiments. Ces environnements sont propices d'héberger des microorganismes pathogènes et potentiellement zoonotiques comme *E. coli*, *Salmonella* et des virus entériques. Des efforts supplémentaires devraient être apportés à ces endroits difficiles d'accès afin de limiter la transmission de contaminants à l'intérieur de l'élevage. La présence d'une flore de contamination dans ces endroits difficiles à laver et désinfecter témoigne d'une problématique qui pourrait être retrouvée dans plusieurs élevages. De plus, il est possible que certains microorganismes contaminants et persistants dans ces

environnements soient résistants aux désinfectants utilisés de routine. Il serait pertinent de documenter dans une étude future l'efficacité de plusieurs désinfectants dans ces environnements afin d'assurer une utilisation optimale de ceux-ci.

La détection et l'étude de la distribution des gènes de virulence *E. coli* présents dans différents types d'échantillons comme les «pools» de matières fécales et les échantillons environnementaux représentant une partie considérable de l'environnement intérieur et extérieur de la ferme ont permis d'identifier le marqueur de contamination ETEC/F4. De plus, cette étude suggère pour la première fois un marqueur de contamination *E. coli* sur la base de la détection de gènes de virulence spécifiques aux *E. coli* pathogènes. Ce marqueur unique possède un profil de distribution particulier. Plus spécifiquement, le marqueur ETEC/F4 n'est pas retrouvé de façon homogène dans le réseau de production ce qui renforce son potentiel comme marqueur de contamination. L'étude de sa distribution révèle que la présence du marqueur peut être bien implantée dans un élevage et transitoire dans d'autres et que certaines fermes en ont été exemptes pendant toute la durée de l'étude. Ces particularités suggèrent que le marqueur ETEC/F4 serait en mesure d'identifier certaines sources de contamination d'*E. coli* pathogènes et être un outil potentiel à la description d'événement de contamination.

Aussi, la détection du marqueur ETEC/F4 en contexte hors clinique dans les échantillons de fèces d'animaux sains en engraissement suggère la présence de ces isolats pathogènes en élevage sans qu'il n'y ait de signes cliniques. Il est donc primordial de documenter les sources de contamination en élevage afin d'éviter l'éclosion de maladie chez les animaux plus susceptibles. Un échantillonnage périodique des installations ainsi que le prélèvement de «pools» de fèces pourraient permettre de connaître le statut sanitaire face à ce pathogène et ainsi prévenir la transmission et l'éclosion de maladie.

La détection des principaux gènes de virulence *E. coli* a aussi permis de dresser un portrait de la distribution des pathotypes dans le réseau. En effet, les gènes associés aux différents pathotypes ne sont pas nécessairement retrouvés de façon homogène dans le réseau. Un exemple de ceci est la faible représentation des gènes de virulence STEC et EPEC dans les échantillons à travers le réseau, et ce pendant toute la période d'échantillonnage. Tandis que les gènes de virulence associés aux ExPEC sont retrouvés de façon homogène dans tous les types d'échantillons à travers le temps. La distribution homogène à travers le réseau des gènes de virulence associés aux pathotypes ExPEC, STEC et EPEC suggère que ces derniers ne peuvent être considérés comme marqueurs afin de documenter la transmission des *E. coli* pathogènes. De façon intéressante les gènes ExPEC ont souvent été détectés dans les échantillons de matières fécales des porcs sains en engraissement. La détection de ces gènes dans les fèces suggère la présence potentielle d'*E. coli* possédant un certain profil ExPEC dans la flore intestinale des animaux. La signification de la représentation potentielle des ExPEC dans les matières fécales des porcs en engraissement fait l'objet de réflexions. Les *E. coli* possédant le profil ExPEC sont caractérisés par la présence de gènes de virulence qui leur procurent un avantage compétitif favorisant la colonisation des sites extra- intestinaux. Ces gènes peuvent entre autres promouvoir l'invasion des tissus, l'acquisition du fer et la résistance aux antimicrobiens (Caza et al., 2011). Il n'existe que très peu d'études sur la colonisation des isolats ExPEC dans l'intestin des porcs (Schierack et al., 2008). Conséquemment, il serait intéressant dans une étude future de documenter cette présence ExPEC dans l'intestin des animaux en engraissement ainsi que l'impact de la colonisation sur l'incidence de maladies potentiellement causées par ces isolats en élevage.

Particulièrement, les ExPEC ne sont pas caractérisés par la présence de gènes de virulence spécifiques comme la shigatoxine chez les isolats STEC. D'autant plus que la distribution de ces gènes entre les isolats est variable dans la population bactérienne. La présence des ExPEC dans les élevages engendre un intérêt grandissant en raison du fait qu'ils sont reconnus pour être à l'origine d'infections urinaires chez l'humain (Jakobsen et al., 2012). La consommation de viande contaminée est suspectée d'être une voie de transmission vers les humains (Aslam et al., 2014). Plusieurs isolats sont résistants à une vaste gamme d'antimicrobiens utilisées en élevage comme les céphalosporines et les fluoroquinolones (Johnson et al., 2005). Ceci a un impact considérable sur les possibilités d'échec de traitements lors d'infections bactériennes. Aussi, les *E. coli* possédant ces gènes peuvent agir comme réservoir de gènes de résistance dans l'environnement et fournir un apport au transfert génétique horizontal. D'un autre côté, cette étude documente pour la première fois la distribution des gènes de virulence de plusieurs pathotypes d'*E. coli* pathogènes en production porcine. Ces informations sont pertinentes et permettront d'en connaître davantage sur la distribution globale des pathogènes à caractère potentiellement zoonotique comme certains virus entériques et *Salmonella* (Molla et al., 2006).

Le suivi de la distribution d'un marqueur de contamination potentiel ETEC/F4 peut permettre d'en savoir plus sur la dynamique par laquelle certains microorganismes diffusent à travers le réseau. Les souches *E. coli* ETEC :F4 sont responsables de la diarrhée postsevrage (DPS) des porcelets et engendre un impact économique non négligeable. La prévention de la transmission de ce pathogène entre les élevages peut permettre de réduire l'éclosion de maladies améliorant ainsi le statut sanitaire de l'élevage et le bien-être animal. Le pathotype ETEC : F4 n'est pas décrit comme un agent zoonotique. Par contre, il est possible que certains

isolats puissent acquérir des gènes de virulence présents dans l'environnement ce qui peut leur procurer un pouvoir pathogène chez l'humain. Un cas de transfert horizontal de gènes de virulence chez les *E. coli* pathogènes avait fait les manchettes en 2011 où près de 4000 individus européens avaient été contaminés par une souche *E. coli* O104:H4 entéroagrégatives (EAEC) qui avait intégré le matériel génétique lui permettant d'exprimer la shigatoxine (Mora et al., 2011). Le marqueur de contamination ETEC /F4 pourrait être utile afin de documenter la distribution des *E. coli* pathogènes dans un réseau de production. La distribution temporelle et spatiale des critères de sélection génétique ETEC /F4 a permis d'identifier des sources potentielles de contamination à l'intérieur des élevages et à l'extérieur de la ferme sur les différents trajets empruntés par les intervenants comme les vétérinaires, techniciens et transporteurs de moulée. De plus, la détection du profil génétique ETEC/F4 dans les échantillons prélevés dans la cour de l'abattoir ainsi que sur les gardes boues et dans la cabine du transporteur peut permettre de documenter la présence potentielle d'*E. coli* pathogènes. Les transporteurs sont reconnus comme vecteurs potentiels de la transmission de microorganismes pathogènes comme *Salmonella* et certains virus entériques entre les élevages et l'abattoir (Dorr et al., 2009; Hernandez et al., 2013). Pour prévenir la transmission des contaminants des mesures de biosécurité comme le lavage et la désinfection des camions sont pratiquées de routine. Cependant, la détection de contaminants juste avant le départ des transporteurs a été décrite dans ce projet et soulève des interrogations sur l'efficacité de la procédure de lavage et de désinfection. Plusieurs facteurs peuvent expliquer le manque d'efficacité de la procédure. Par exemple, les conditions climatiques hivernales et le gel peuvent altérer l'étape de séchage suite au lavage et désinfection des camions. En effet, les contaminants pathogènes peuvent survivre dans la glace accumulée et être transmis à travers le

réseau par les camions. Aussi, la résistance aux désinfectants des *E. coli* pathogènes, comme la résistance aux sels d'ammonium quaternaires, est un phénomène existant (Zhang et al., 2015). Il est possible qu'une sous-population résistante aux désinfectants utilisés de routine soit en mesure de subsister suite aux étapes de lavage et de désinfection. La sous-population *E. coli* résistante pourrait alors être disséminée dans le réseau par les camions de transport. Il serait intéressant de documenter cette résistance aux désinfectants des isolats *E. coli* pathogènes retrouvés en production porcine afin d'assurer une utilisation efficace de ces produits. Un échantillonnage périodique de la remorque, des gardes-boues et de la cabine du camion de transport pourrait permettre de valider l'efficacité de la procédure de lavage et de désinfection et ainsi limiter la transmission de contaminants dans le réseau de production

Depuis l'arrivée du virus épidémique porcin aux États-Unis en mai 2013 et au Canada en janvier 2014, les intervenants tentent de limiter au maximum la transmission du contaminant entre les élevages. L'introduction de ce virus dans les élevages a coûté la vie de millions de bêtes à travers les États-Unis engendrant de lourdes pertes économiques. Les transporteurs ont dû redoubler d'ardeur afin d'éviter la propagation de la maladie entre les foyers d'infection. Dans ce contexte, tout le réseau de production doit être assujéti au même niveau de biosécurité que ce soit à la ferme, sur les trajets empruntés ou à l'abattoir. En effet, l'amélioration des mesures de biosécurité en production de masse passe par une meilleure compréhension du rôle que la cour de l'abattoir joue comme source de contamination dans le réseau. La cour de l'abattoir doit être considéré comme une extension des lieux d'élevage et non pas une finalité unidirectionnelle puisque les contaminants peuvent être transférés du lieu de l'abattoir vers les élevages par les transporteurs, diffuseurs potentiels. Cette étude démontre pour la première fois la cour de l'abattoir comme une source potentielle de contamination

pouvant participer à la transmission potentielle d'isolats *E. coli* pathogènes dans un réseau de production. Il est dans l'intérêt de la santé animale et de la santé publique d'en savoir plus sur la distribution des microorganismes pathogènes à caractère potentiellement zoonotique afin de mieux contrôler les risques de transmission à travers la chaîne de production. Aussi, la réalité climatique à laquelle l'industrie québécoise est confrontée peut influencer la charge de contaminants dans l'environnement. L'étude de la distribution des gènes de virulence sur une longue période de temps peut permettre de documenter la prévalence des *E. coli* pathogènes. La distribution temporelle de ces gènes a permis d'identifier une période où la charge potentielle en pathotype *E. coli* ETEC :F4 est plus élevée dans le réseau. Cette observation doit être considérée pour limiter la transmission des contaminants dans le réseau. La documentation de l'effet saisonnier sur la prévalence des microorganismes pathogènes pourrait permettre d'instaurer des mesures afin de limiter la transmission de pathogènes dans le réseau pendant ces périodes plus critiques. De plus, ces informations sont importantes dans la notion de diffusion d'agents zoonotiques de l'élevage à l'humain à travers la chaîne de production.

L'étape subséquente à l'identification du marqueur de contamination ETEC/F4 a été de tenter d'isoler le pathogène bactérien *E. coli* ETEC : F4 potentiellement présent dans les échantillons positifs. La détection des isolats ETEC:F4 pourrait permettre de documenter des événements de contamination et de décrire certains liens épidémiologiques témoignant de la transmission du pathogène entre les environnements contaminés. De plus, la détection des isolats ETEC : F4 pourrait devenir un indicateur de contamination témoignant de la potentielle transmission d'autres microorganismes pathogènes en élevage comme *Salmonella* ou autres virus entériques comme les rotavirus. La recherche des isolats positifs est passée par l'enrichissement des échantillons en bouillon TSB supplémenté en sels biliaires et additionné

des antimicrobiens vancomycine et cefsulodin (Gill et al., 2012). Par la suite, l'intégration d'une technique d'immunoséparation impliquant des billes magnétiques anti-F4 et la recherche en bactériologie des isolats hémolytiques *E. coli* ETEC:F4 ont été réalisées afin d'isoler les ETEC : F4 présents dans les échantillons positifs.

Pour le futur, il serait pertinent de détecter la concentration du marqueur de contamination ETEC/F4 à l'aide d'une technique quantitative comme la PCR en temps réel. Cette approche permettrait de documenter le niveau de contamination de différentes sources à travers le réseau et d'étudier s'il existe un lien avec la présence d'autres microorganismes pathogènes.

De plus, il serait intéressant de produire une banque d'isolats ETEC : F4 et de réaliser une caractérisation plus approfondie de ceux-ci. Le virotypage étendu des isolats ETEC : F4 par la détection d'autres gènes de virulence et de résistance aux antimicrobiens aiderait à en connaître davantage sur leur pouvoir pathogène et de persistance dans l'environnement. Par la suite, une technique de discrimination moléculaire, comme le MLST ou le PFGE, pourrait être réalisée afin d'étudier le phénomène de transmission des souches et pourrait faire l'objet d'une étude épidémiologique.



## **Conclusion**

Cette étude a permis de décrire et de mesurer le niveau de contamination dans un réseau de production porcine défini sur une période d'un an (représentant trois lots de production consécutifs) par la détection des gènes d'*E. coli* pathogènes. De plus, l'analyse de la distribution des principaux gènes de virulence des *E. coli* pathogènes a permis de suivre leur évolution en temps réel entre les élevages, mais aussi chez les intervenants associés à la production comme les transporteurs, les vétérinaires et les techniciens. La distribution des gènes de virulence au sein des élevages a permis de suggérer l'étendue des sources de contamination potentielles à l'intérieur de la ferme comme les objets, les outils de production et les convoyeurs à moulée, mais aussi à l'extérieur de l'établissement comme les trajets empruntés par les véhicules des intervenants. L'identification des sources de contamination sur le site d'élevage peut permettre de mieux comprendre la dynamique de propagation des pathogènes entre les lots d'un même site de production, mais aussi entre les élevages sur d'autres sites de production. L'identification du marqueur de contamination ETEC/F4 a permis de suivre la dynamique de la dispersion de manière temporelle à travers le réseau de production jusqu'à l'abattoir et a permis d'observer les périodes où le niveau de contamination a été le plus élevé. La détection du marqueur de contamination ETEC/F4 ainsi que les gènes de virulence des *E. coli* pathogènes sur le site de l'abattoir suggèrent pour la première fois que la cour de l'abattoir pourrait agir comme une source de contamination potentielle en contact direct avec les transporteurs. Les transporteurs pourraient donc agir en tant que vecteurs de contamination en propageant les microorganismes pathogènes à travers le réseau lorsque les mesures de lavage et de désinfection des unités de transport ne sont pas adéquates.

Une meilleure gestion des transports ainsi que le lavage et la désinfection des surfaces en contact avec les trajets potentiellement contaminés, comme les pneus et les gardes boues, entre

chaque transport pourrait améliorer le statut sanitaire des élevages et permettre de mieux contrôler la transmission des microorganismes pathogènes et potentiellement zoonotiques jusqu'au processus d'abattage.

## **Bibliographie**

- Abraham, E.P., Chain, E., 1988. An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. 1940. *Reviews of infectious diseases* 10, 677-678.
- Ahmed, S.T., Hwang, J.A., Hoon, J., Mun, H.S., Yang, C.J., 2014. Comparison of single and blend acidifiers as alternative to antibiotics on growth performance, fecal microflora, and humoral immunity in weaned piglets. *Asian-Australas J Anim Sci* 27, 93-100.
- Amass, S.F., Pacheco, J.M., Mason, P.W., Schneider, J.L., Alvarez, R.M., Clark, L.K., Ragland, D., 2003. Procedures for preventing the transmission of foot-and-mouth disease virus to pigs and sheep by personnel in contact with infected pigs. *The Veterinary record* 153, 137-140.
- Amass SF, S.J., 2005. Evaluation of the efficacy of a truck-mounted tire sanitizer system during winter weather. *J Swine Health Prod.* 2006;14(2):101-104.
- Amezcuca, R., Friendship, R.M., Dewey, C.E., 2008. An investigation of the presence of *Escherichia coli* O149:K91:F4 on pig farms in southern Ontario and the use of antimicrobials and risk factors associated with the presence of this serogroup. *The Canadian Veterinary Journal* 49, 39-45.
- Amezcuca, R., Friendship, R.M., Dewey, C.E., Gyles, C., Fairbrother, J.M., 2002. Presentation of postweaning *Escherichia coli* diarrhea in southern Ontario, prevalence of hemolytic *E. coli* serogroups involved, and their antimicrobial resistance patterns. *Canadian journal of veterinary research = Revue canadienne de recherche veterinaire* 66, 73-78.
- Anderson, M.A., Whitlock, J.E., Harwood, V.J., 2006. Diversity and distribution of *Escherichia coli* genotypes and antibiotic resistance phenotypes in feces of humans, cattle, and horses. *Applied and environmental microbiology* 72, 6914-6922.
- Andersson, D.I., 2003. Persistence of antibiotic resistant bacteria. *Current opinion in microbiology* 6, 452-456.
- Andres-Barranco, S., Vico, J.P., Garrido, V., Samper, S., Herrera-Leon, S., de Frutos, C., Mainar-Jaime, R.C., 2014. Role of wild bird and rodents in the epidemiology of subclinical salmonellosis in finishing pigs. *Foodborne pathogens and disease* 11, 689-697.
- Arnold, M.E., Cook, A., Davies, R., 2005. A modelling approach to estimate the sensitivity of pooled faecal samples for isolation of *Salmonella* in pigs. *Journal of the Royal Society, Interface / the Royal Society* 2, 365-372.
- Arnold, M.E., Cook, A.J., 2009. Estimation of sample sizes for pooled faecal sampling for detection of *Salmonella* in pigs. *Epidemiology and infection* 137, 1734-1741.
- Arthur, T.M., Brichta-Harhay, D.M., Bosilevac, J.M., Kalchayanand, N., Shackelford, S.D., Wheeler, T.L., Koohmaraie, M., 2010. Super shedding of *Escherichia coli* O157:H7 by cattle and the impact on beef carcass contamination. *Meat science* 86, 32-37.
- Aslam, M., Toufeer, M., Narvaez Bravo, C., Lai, V., Rempel, H., Manges, A., Diarra, M.S., 2014. Characterization of Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli* isolated from retail poultry meats from Alberta, Canada. *International journal of food microbiology* 177C, 49-56.
- Bakker, D., Willemsen, P.T., Simons, L.H., van Zijderveld, F.G., de Graaf, F.K., 1992. Characterization of the antigenic and adhesive properties of FaeG, the major subunit of K88 fimbriae. *Molecular microbiology* 6, 247-255.
- Bekal, S., Brousseau, R., Masson, L., Prefontaine, G., Fairbrother, J., Harel, J., 2003. Rapid Identification of *Escherichia coli* Pathotypes by Virulence Gene Detection with DNA Microarrays. *Journal of Clinical Microbiology* 41, 2113-2125.

- Belanger, L., Garenaux, A., Harel, J., Boulianne, M., Nadeau, E., Dozois, C.M., 2011. *Escherichia coli* from animal reservoirs as a potential source of human extraintestinal pathogenic *E. coli*. *FEMS immunology and medical microbiology* 62, 1-10.
- Bentley, R., Meganathan, R., 1982. Biosynthesis of vitamin K (menaquinone) in bacteria. *Microbiological reviews* 46, 241-280.
- Benz, I., Schmidt, M.A., 1989. Cloning and expression of an adhesin (AIDA-I) involved in diffuse adherence of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infection and immunity* 57, 1506-1511.
- Blanco, M., Blanco, J.E., Mora, A., Dahbi, G., Alonso, M.P., Gonzalez, E.A., Bernardez, M.I., Blanco, J., 2004. Serotypes, virulence genes, and intimin types of Shiga toxin (verotoxin)-producing *Escherichia coli* isolates from cattle in Spain and identification of a new intimin variant gene (*eae-xi*). *J Clin Microbiol* 42, 645-651.
- Bozic, F., Lackovic, G., Kovsca-Janjatovic, A., Smolec, O., Valpotic, I., 2006. Levamisole synergizes experimental F4ac+ *Escherichia coli* oral vaccine in stimulating ileal Peyer's patch T cells in weaned pigs. *Journal of veterinary pharmacology and therapeutics* 29, 199-204.
- Brooks, J.T., Sowers, E.G., Wells, J.G., Greene, K.D., Griffin, P.M., Hoekstra, R.M., Strockbine, N.A., 2005. Non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections in the United States, 1983-2002. *The Journal of infectious diseases* 192, 1422-1429.
- Brown, M.D., Bry, L., Li, Z., Sacks, D.B., 2008. Actin pedestal formation by enteropathogenic *Escherichia coli* is regulated by IQGAP1, calcium, and calmodulin. *The Journal of biological chemistry* 283, 35212-35222.
- Carlos, C., Pires, M.M., Stoppe, N.C., Hachich, E.M., Sato, M.I., Gomes, T.A., Amaral, L.A., Ottoboni, L.M., 2010. *Escherichia coli* phylogenetic group determination and its application in the identification of the major animal source of fecal contamination. *BMC microbiology* 10, 161.
- Casewell, M., Friis, C., Marco, E., McMullin, P., Phillips, I., 2003. The European ban on growth-promoting antibiotics and emerging consequences for human and animal health. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 52, 159-161.
- Caza, M., Lepine, F., Dozois, C.M., 2011. Secretion, but not overall synthesis, of catecholate siderophores contributes to virulence of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. *Molecular microbiology* 80, 266-282.
- Clermont, O., Bonacorsi, S., Bingen, E., 2000. Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. *Applied and environmental microbiology* 66, 4555-4558.
- Coddens, A., Verdonck, F., Tiels, P., Rasschaert, K., Goddeeris, B.M., Cox, E., 2007. The age-dependent expression of the F18+ *E. coli* receptor on porcine gut epithelial cells is positively correlated with the presence of histo-blood group antigens. *Vet Microbiol* 122, 332-341.
- Cornick, N.A., Vukhac, H., 2008. Indirect transmission of *Escherichia coli* O157:H7 occurs readily among swine but not among sheep. *Applied and environmental microbiology* 74, 2488-2491.
- Cote, J.P., Charbonneau, M.E., Mourez, M., 2013. Glycosylation of the *Escherichia coli* TibA Self-Associating Autotransporter Influences the Conformation and the Functionality of the Protein. *PLoS one* 8, e80739.
- Cote, J.P., Mourez, M., 2011. Structure-function analysis of the TibA self-associating

- autotransporter reveals a modular organization. *Infection and immunity* 79, 1826-1832.
- Davis, M.A., Hancock, D.D., Rice, D.H., Call, D.R., DiGiacomo, R., Samadpour, M., Besser, T.E., 2003. Feedstuffs as a vehicle of cattle exposure to *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella enterica*. *Vet Microbiol* 95, 199-210.
- De Graaf, F.K., Mooi, F.R., 1986. The fimbrial adhesins of *Escherichia coli*. *Advances in microbial physiology* 28, 65-143.
- de la Fe Rodriguez, P.Y., Martin, L.O., Munoz, E.C., Imberechts, H., Butaye, P., Goddeeris, B.M., Cox, E., 2013. Several enteropathogens are circulating in suckling and newly weaned piglets suffering from diarrhea in the province of Villa Clara, Cuba. *Tropical animal health and production* 45, 435-440.
- DebRoy, C., Roberts, E., Scheuchenzuber, W., Kariyawasam, S., Jayarao, B.M., 2009. Comparison of genotypes of *Escherichia coli* strains carrying F18ab and F18ac fimbriae from pigs. *Journal of veterinary diagnostic investigation : official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc* 21, 359-364.
- Dee, S., Deen, J., Burns, D., Douthit, G., Pijoan, C., 2004. An assessment of sanitation protocols for commercial transport vehicles contaminated with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Canadian journal of veterinary research = Revue canadienne de recherche veterinaire* 68, 208-214.
- Delannoy, S., Beutin, L., Fach, P., 2013. Towards a molecular definition of enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC): detection of genes located on O island 57 as markers to distinguish EHEC from closely related enteropathogenic *E. coli* strains. *J Clin Microbiol* 51, 1083-1088.
- Delisle, B., Calinescu, C., Mateescu, M.A., Fairbrother, J.M., Nadeau, E., 2012. Oral immunization with F4 fimbriae and CpG formulated with carboxymethyl starch enhances F4-specific mucosal immune response and modulates Th1 and Th2 cytokines in weaned pigs. *Journal of pharmacy & pharmaceutical sciences : a publication of the Canadian Society for Pharmaceutical Sciences, Societe canadienne des sciences pharmaceutiques* 15, 642-656.
- Deng, W., Li, Y., Hardwidge, P.R., Frey, E.A., Pfuetzner, R.A., Lee, S., Gruenheid, S., Strynakda, N.C., Puente, J.L., Finlay, B.B., 2005. Regulation of type III secretion hierarchy of translocators and effectors in attaching and effacing bacterial pathogens. *Infection and immunity* 73, 2135-2146.
- Do, N.T., Cu, H.P., Nguyen, N.N., Nguyen, X.H., Au, X.T., Van, T.H., Vu, N.Q., Trott, D.J., 2006. Antimicrobial resistance phenotypes of ETEC isolates from piglets with diarrhea in North Vietnam. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1081, 543-545.
- Doane, C.A., Pangloli, P., Richards, H.A., Mount, J.R., Golden, D.A., Draughon, F.A., 2007. Occurrence of *Escherichia coli* O157:H7 in diverse farm environments. *Journal of food protection* 70, 6-10.
- Dorr, P.M., Tadesse, D.A., Zewde, B.M., Fry, P., Thakur, S., Gebreyes, W.A., 2009. Longitudinal study of *Salmonella* dispersion and the role of environmental contamination in commercial swine production systems. *Applied and environmental microbiology* 75, 1478-1486.
- Drawz, S.M., Bonomo, R.A., 2010. Three decades of beta-lactamase inhibitors. *Clinical microbiology reviews* 23, 160-201.
- Dubreuil, J.D., 1997. *Escherichia coli* STb enterotoxin. *Microbiology (Reading, England)* 143 ( Pt 6), 1783-1795.

- Dubreuil, J.D., 2012. The whole Shebang: the gastrointestinal tract, Escherichia coli enterotoxins and secretion. *Current issues in molecular biology* 14, 71-82.
- Eblen, D.R., Annous, B.A., Sapers, G.M., 2005. Studies to select appropriate nonpathogenic surrogate Escherichia coli strains for potential use in place of Escherichia coli O157:H7 and salmonella in pilot plant studies. *Journal of food protection* 68, 282-291.
- Fairbrother, J.M., Nadeau, E., 2006. Escherichia coli: on-farm contamination of animals. *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)* 25, 555-569.
- Fairbrother, J.M., Nadeau, É., Gyles, C.L., 2007. Escherichia coli in postweaning diarrhea in pigs: an update on bacterial types, pathogenesis, and prevention strategies. *Animal Health Research Reviews* 6, 17-39.
- Fekete, P.Z., Gerardin, J., Jacquemin, E., Mainil, J.G., Nagy, B., 2002. Replicon typing of F18 fimbriae encoding plasmids of enterotoxigenic and verotoxigenic Escherichia coli strains from porcine postweaning diarrhoea and oedema disease. *Vet Microbiol* 85, 275-284.
- Fernandez-Romero, N., Romero-Gomez, M.P., Mora-Rillo, M., Rodriguez-Bano, J., Lopez-Cerero, L., Pascual, A., Mingorance, J., 2015. Uncoupling between core genome and virulome in extraintestinal pathogenic Escherichia coli. *Canadian journal of microbiology* 61, 647-652.
- Frydendahl, K., 2002. Prevalence of serogroups and virulence genes in Escherichia coli associated with postweaning diarrhoea and edema disease in pigs and a comparison of diagnostic approaches. *Vet Microbiol* 85, 169-182.
- Frydendahl, K., Kare Jensen, T., Strodl Andersen, J., Fredholm, M., Evans, G., 2003. Association between the porcine Escherichia coli F18 receptor genotype and phenotype and susceptibility to colonisation and postweaning diarrhoea caused by E. coli O138:F18. *Vet Microbiol* 93, 39-51.
- Fu, W.X., Liu, Y., Lu, X., Niu, X.Y., Ding, X.D., Liu, J.F., Zhang, Q., 2012. A genome-wide association study identifies two novel promising candidate genes affecting Escherichia coli F4ab/F4ac susceptibility in swine. *PloS one* 7, e32127.
- Gerrish, R.S., Lee, J.E., Reed, J., Williams, J., Farrell, L.D., Spiegel, K.M., Sheridan, P.P., Shields, M.S., 2007. PCR versus hybridization for detecting virulence genes of enterohemorrhagic Escherichia coli. *Emerging infectious diseases* 13, 1253-1255.
- Gill, A., Martinez-Perez, A., McIlwham, S., Blais, B., 2012. Development of a method for the detection of verotoxin-producing Escherichia coli in food. *Journal of food protection* 75, 827-837.
- Gordon, D.M., Cowling, A., 2003. The distribution and genetic structure of Escherichia coli in Australian vertebrates: host and geographic effects. *Microbiology (Reading, England)* 149, 3575-3586.
- Goswami, P.S., Friendship, R.M., Gyles, C.L., Poppe, C., Boerlin, P., 2011. Preliminary investigations of the distribution of Escherichia coli O149 in sows, piglets, and their environment. *Canadian journal of veterinary research = Revue canadienne de recherche veterinaire* 75, 57-60.
- Gyles, C.L., Fairbrother, J.M. 2010. Escherichia Coli, In: *Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals*. Wiley-Blackwell, 267-308.
- Hartman, B.J., Tomasz, A., 1984. Low-affinity penicillin-binding protein associated with beta-lactam resistance in Staphylococcus aureus. *Journal of bacteriology* 158, 513-516.
- Heikkilä, J., 2011. Economics of biosecurity across levels of decision-making: a review.



- Agronomy Sust. Developm. 31, 119-138.
- Henderson, I.R., Nataro, J.P., 2001. Virulence functions of autotransporter proteins. *Infection and immunity* 69, 1231-1243.
- Herbert, U., Albrecht, A., Kreyenschmidt, J., 2015. Definition of predictor variables for MAP poultry filets stored under different temperature conditions. *Poultry science* 94, 424-432.
- Hernandez, M., Gomez-Laguna, J., Luque, I., Herrera-Leon, S., Maldonado, A., Reguillo, L., Astorga, R.J., 2013. Salmonella prevalence and characterization in a free-range pig processing plant: tracking in trucks, lairage, slaughter line and quartering. *International journal of food microbiology* 162, 48-54.
- Hurd, H.S., McKean, J.D., Griffith, R.W., Wesley, I.V., Rostagno, M.H., 2002. Salmonella enterica infections in market swine with and without transport and holding. *Applied and environmental microbiology* 68, 2376-2381.
- Imberechts, H., Bertschinger, H.U., Nagy, B., Deprez, P., Pohl, P., 1997. Fimbrial colonisation factors F18ab and F18ac of *Escherichia coli* isolated from pigs with postweaning diarrhea and edema disease. *Advances in experimental medicine and biology* 412, 175-183.
- Jakobsen, L., Garneau, P., Bruant, G., Harel, J., Olsen, S.S., Porsbo, L.J., Hammerum, A.M., Frimodt-Moller, N., 2012. Is *Escherichia coli* urinary tract infection a zoonosis? Proof of direct link with production animals and meat. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases* : official publication of the European Society of Clinical Microbiology 31, 1121-1129.
- Jakobsen, L., Spangholm, D.J., Pedersen, K., Jensen, L.B., Emborg, H.D., Agerso, Y., Aarestrup, F.M., Hammerum, A.M., Frimodt-Moller, N., 2010. Broiler chickens, broiler chicken meat, pigs and pork as sources of ExPEC related virulence genes and resistance in *Escherichia coli* isolates from community-dwelling humans and UTI patients. *International journal of food microbiology* 142, 264-272.
- Ji, H., Ren, J., Yan, X., Huang, X., Zhang, B., Zhang, Z., Huang, L., 2011. The porcine MUC20 gene: molecular characterization and its association with susceptibility to enterotoxigenic *Escherichia coli* F4ab/ac. *Molecular biology reports* 38, 1593-1601.
- Johnson, J.R., Delavari, P., O'Bryan, T.T., Smith, K.E., Tatini, S., 2005. Contamination of retail foods, particularly turkey, from community markets (Minnesota, 1999-2000) with antimicrobial-resistant and extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. *Foodborne pathogens and disease* 2, 38-49.
- Johnson, J.R., Kuskowski, M.A., Owens, K., Gajewski, A., Winokur, P.L., 2003. Phylogenetic origin and virulence genotype in relation to resistance to fluoroquinolones and/or extended-spectrum cephalosporins and cephamycins among *Escherichia coli* isolates from animals and humans. *The Journal of infectious diseases* 188, 759-768.
- Johnson, J.R., Russo, T.A., 2002. Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: "The other bad *E coli*". *Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 139, 155-162.
- Johnson, T.J., Shepard, S.M., Rivet, B., Danzeisen, J.L., Carattoli, A., 2011. Comparative genomics and phylogeny of the IncII plasmids: a common plasmid type among porcine enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Plasmid* 66, 144-151.
- Johnson, T.J., Wannemuehler, Y., Johnson, S.J., Stell, A.L., Doetkott, C., Johnson, J.R., Kim, K.S., Spanjaard, L., Nolan, L.K., 2008. Comparison of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strains from human and avian sources reveals a mixed subset

- representing potential zoonotic pathogens. *Applied and environmental microbiology* 74, 7043-7050.
- Jokinen, C.C., Koot, J., Cole, L., Desruisseau, A., Edge, T.A., Khan, I.U., Koning, W., Lapen, D.R., Pintar, K.D., Reid-Smith, R., Thomas, J.L., Topp, E., Wang, L.Y., Wilkes, G., Ziebell, K., van Bochove, E., Gannon, V.P., 2015. The distribution of *Salmonella enterica* serovars and subtypes in surface water from five agricultural regions across Canada. *Water research* 76, 120-131.
- Juhas, M., 2015. Horizontal gene transfer in human pathogens. *Critical reviews in microbiology* 41, 101-108.
- Jurado-Rabadan, S., de la Fuente, R., Ruiz-Santa-Quiteria, J.A., Orden, J.A., de Vries, L.E., Agerso, Y., 2014. Detection and linkage to mobile genetic elements of tetracycline resistance gene tet(M) in *Escherichia coli* isolates from pigs. *BMC veterinary research* 10, 155.
- Kaper, J.B., McDaniel, T.K., Jarvis, K.G., Gomez-Duarte, O., 1997. Genetics of virulence of enteropathogenic *E. coli*. *Advances in experimental medicine and biology* 412, 279-287.
- Kaper, J.B., Nataro, J.P., Mobley, H.L., 2004. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature reviews. Microbiology* 2, 123-140.
- Keelara, S., Scott, H.M., Morrow, W.M., Gebreyes, W.A., Correa, M., Nayak, R., Stefanova, R., Thakur, S., 2013. Longitudinal study of distributions of similar antimicrobial-resistant *Salmonella* serovars in pigs and their environment in two distinct swine production systems. *Applied and environmental microbiology* 79, 5167-5178.
- Klemm, P., Vejborg, R.M., Sherlock, O., 2006. Self-associating autotransporters, SAATs: functional and structural similarities. *International journal of medical microbiology : IJMM* 296, 187-195.
- Kohler, C.D., Dobrindt, U., 2011. What defines extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*? *International journal of medical microbiology : IJMM* 301, 642-647.
- Koonin, E.V., Makarova, K.S., Aravind, L., 2001. Horizontal gene transfer in prokaryotes: quantification and classification. *Annual review of microbiology* 55, 709-742.
- Krometis, L.A., Characklis, G.W., Drummey, P.N., Sobsey, M.D., 2010. Comparison of the presence and partitioning behavior of indicator organisms and *Salmonella* spp. in an urban watershed. *Journal of water and health* 8, 44-59.
- Laine, T.M., Lyytikäinen, T., Yliaho, M., Anttila, M., 2008. Risk factors for post-weaning diarrhoea on piglet producing farms in Finland. *Acta veterinaria Scandinavica* 50, 21.
- Lambert, P.A., 2005. Bacterial resistance to antibiotics: modified target sites. *Advanced drug delivery reviews* 57, 1471-1485.
- Letellier, A., Beauchamp, G., Guevremont, E., D'Allaire, S., Hurnik, D., Quessy, S., 2009. Risk factors at slaughter associated with presence of *Salmonella* on hog carcasses in Canada. *Journal of food protection* 72, 2326-2331.
- Liu, L., Wang, J., Zhao, Q., Zi, C., Wu, Z., Su, X., Huo, Y., Zhu, G., Wu, S., Bao, W., 2013. Genetic variation in exon 10 of the BPI gene is associated with *Escherichia coli* F18 susceptibility in Suta piglets. *Gene* 523, 70-75.
- Lowe, J., Gauger, P., Harmon, K., Zhang, J., Connor, J., Yeske, P., Loula, T., Levis, I., Dufresne, L., Main, R., 2014. Role of transportation in spread of porcine epidemic diarrhoea virus infection, United States. *Emerging infectious diseases* 20, 872-874.
- Luedtke, B.E., Bono, J.L., Bosilevac, J.M., 2014. Evaluation of real time PCR assays for the

- detection and enumeration of enterohemorrhagic *Escherichia coli* directly from cattle feces. *Journal of microbiological methods* 105C, 72-79.
- Magistrali, C., Dionisi, A.M., De Curtis, P., Cucco, L., Vischi, O., Scuota, S., Zicavo, A., Pezzotti, G., 2008. Contamination of *Salmonella* spp. in a pig finishing herd, from the arrival of the animals to the slaughterhouse. *Research in veterinary science* 85, 204-207.
- Mainil, J.G., Jacquemin, E., Pohl, P., Kaeckenbeeck, A., Benz, I., 2002. DNA sequences coding for the F18 fimbriae and AIDA adhesin are localised on the same plasmid in *Escherichia coli* isolates from piglets. *Vet Microbiol* 86, 303-311.
- Makaya, P.V., Matope, G., Pfukenyi, D.M., 2012. Distribution of *Salmonella* serovars and antimicrobial susceptibility of *Salmonella* Enteritidis from poultry in Zimbabwe. *Avian pathology : journal of the W.V.P.A* 41, 221-226.
- Marder, E.P., Garman, K.N., Ingram, L.A., Dunn, J.R., 2014. Multistate outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 associated with bagged salad. *Foodborne pathogens and disease* 11, 593-595.
- Martinez, M.B., Flickinger, M., Higgins, L., Krick, T., Nelsestuen, G.L., 2001. Reduced outer membrane permeability of *Escherichia coli* O157:H7: suggested role of modified outer membrane porins and theoretical function in resistance to antimicrobial agents. *Biochemistry* 40, 11965-11974.
- Martins, F.H., Guth, B.E., Piazza, R.M., Leao, S.C., Ludovico, A., Ludovico, M.S., Dahbi, G., Marzoa, J., Mora, A., Blanco, J., Pelayo, J.S., 2015. Diversity of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in sheep flocks of Parana State, southern Brazil. *Vet Microbiol* 175, 150-156.
- McEwen, S.A., Fedorka-Cray, P.J., 2002. Antimicrobial use and resistance in animals. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 34 Suppl 3, S93-S106.
- McLamb, B.L., Gibson, A.J., Overman, E.L., Stahl, C., Moeser, A.J., 2013. Early weaning stress in pigs impairs innate mucosal immune responses to enterotoxigenic *E. coli* challenge and exacerbates intestinal injury and clinical disease. *PloS one* 8, e59838.
- McQuaig, S., Griffith, J., Harwood, V.J., 2012. Association of fecal indicator bacteria with human viruses and microbial source tracking markers at coastal beaches impacted by nonpoint source pollution. *Applied and environmental microbiology* 78, 6423-6432.
- Meijerink, E., Neuenschwander, S., Fries, R., Dinter, A., Bertschinger, H.U., Stranzinger, G., Vogeli, P., 2000. A DNA polymorphism influencing alpha(1,2)fucosyltransferase activity of the pig FUT1 enzyme determines susceptibility of small intestinal epithelium to *Escherichia coli* F18 adhesion. *Immunogenetics* 52, 129-136.
- Melkebeek, V., Goddeeris, B.M., Cox, E., 2013. ETEC vaccination in pigs. *Veterinary immunology and immunopathology* 152, 37-42.
- Mizan, S., Lee, M.D., Harmon, B.G., Tkalcic, S., Maurer, J.J., 2002. Acquisition of antibiotic resistance plasmids by enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 within rumen fluid. *Journal of food protection* 65, 1038-1040.
- Molla, B., Berhanu, A., Muckle, A., Cole, L., Wilkie, E., Kler, J., Hildebrandt, G., 2006. Multidrug resistance and distribution of *Salmonella* serovars in slaughtered pigs. *Journal of veterinary medicine. B, Infectious diseases and veterinary public health* 53, 28-33.
- Mora, A., Herrera, A., Lopez, C., Dahbi, G., Mamani, R., Pita, J.M., Alonso, M.P., Llovo, J.,

- Bernardez, M.I., Blanco, J.E., Blanco, M., Blanco, J., 2011. Characteristics of the Shiga-toxin-producing enteroaggregative *Escherichia coli* O104:H4 German outbreak strain and of STEC strains isolated in Spain. *International microbiology : the official journal of the Spanish Society for Microbiology* 14, 121-141.
- Moxley, R.A., 2000. Edema disease. *The Veterinary clinics of North America. Food animal practice* 16, 175-185.
- Muller, A., Stephan, R., Nuesch-Inderbinen, M., 2016. Distribution of virulence factors in ESBL-producing *Escherichia coli* isolated from the environment, livestock, food and humans. *The Science of the total environment* 541, 667-672.
- Nagy, B., Fekete, P.Z., 2005. Enterotoxigenic *Escherichia coli* in veterinary medicine. *International journal of medical microbiology : IJMM* 295, 443-454.
- Nagy, L.K., Mackenzie, T., Pickard, D.J., Dougan, G., 1986. Effects of immune colostrum on the expression of a K88 plasmid encoded determinant: role of plasmid stability and influence of phenotypic expression of K88 fimbriae. *Journal of general microbiology* 132, 2497-2503.
- Nakao, H., Takeda, T., 2000. *Escherichia coli* Shiga toxin. *Journal of natural toxins* 9, 299-313.
- Nataro, J.P., Kaper, J.B., 1998. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clinical microbiology reviews* 11, 142-201.
- Newell, D.G., Fearnley, C., 2003. Sources of *Campylobacter* colonization in broiler chickens. *Applied and environmental microbiology* 69, 4343-4351.
- Niewerth, U., Frey, A., Voss, T., Le Bouguenec, C., Baljer, G., Franke, S., Schmidt, M.A., 2001. The AIDA autotransporter system is associated with F18 and *stx2e* in *Escherichia coli* isolates from pigs diagnosed with edema disease and postweaning diarrhea. *Clinical and diagnostic laboratory immunology* 8, 143-149.
- Nishino, K., Nikaido, E., Yamaguchi, A., 2009. Regulation and physiological function of multidrug efflux pumps in *Escherichia coli* and *Salmonella*. *Biochimica et biophysica acta* 1794, 834-843.
- Noamani, B.N., Fairbrother, J.M., Gyles, C.L., 2003. Virulence genes of O149 enterotoxigenic *Escherichia coli* from outbreaks of postweaning diarrhea in pigs. *Veterinary Microbiology* 97, 87-101.
- Ogura, Y., Ooka, T., Asadulghani, Terajima, J., Nougayrede, J.P., Kurokawa, K., Tashiro, K., Tobe, T., Nakayama, K., Kuhara, S., Oswald, E., Watanabe, H., Hayashi, T., 2007. Extensive genomic diversity and selective conservation of virulence-determinants in enterohemorrhagic *Escherichia coli* strains of O157 and non-O157 serotypes. *Genome biology* 8, R138.
- Oteo, J., Perez-Vazquez, M., Campos, J., 2010. Extended-spectrum [beta]-lactamase producing *Escherichia coli*: changing epidemiology and clinical impact. *Current opinion in infectious diseases* 23, 320-326.
- Partridge, S.R., Hall, R.M., 2005. Correctly identifying the streptothricin resistance gene cassette. *J Clin Microbiol* 43, 4298-4300.
- Perichon, B., Courvalin, P., Galimand, M., 2007. Transferable resistance to aminoglycosides by methylation of G1405 in 16S rRNA and to hydrophilic fluoroquinolones by QepA-mediated efflux in *Escherichia coli*. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 51, 2464-2469.
- Persson, S., Olsen, K.E., Ethelberg, S., Scheutz, F., 2007. Subtyping method for *Escherichia*

- coli shiga toxin (verocytotoxin) 2 variants and correlations to clinical manifestations. *J Clin Microbiol* 45, 2020-2024.
- Poirel, L., Naas, T., Nordmann, P., 2008. Genetic support of extended-spectrum beta-lactamases. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 14 Suppl 1, 75-81.
- Quesada, A., Porrero, M.C., Tellez, S., Palomo, G., Garcia, M., Dominguez, L., 2015. Polymorphism of genes encoding PmrAB in colistin-resistant strains of *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* isolated from poultry and swine. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 70, 71-74.
- Rajkowski, K.T., Eblen, S., Laubauch, C., 1998. Efficacy of washing and sanitizing trailers used for swine transport in reduction of *Salmonella* and *Escherichia coli*. *Journal of food protection* 61, 31-35.
- Rowe, P.C., 1995. *Escherichia coli* O157:H7, other verotoxin-producing *E coli* and the hemolytic uremic syndrome in childhood. *The Canadian journal of infectious diseases = Journal canadien des maladies infectieuses* 6, 105-110.
- Sabate, M., Moreno, E., Perez, T., Andreu, A., Prats, G., 2006. Pathogenicity island markers in commensal and uropathogenic *Escherichia coli* isolates. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 12, 880-886.
- Sarkar, S., Ulett, G.C., Totsika, M., Phan, M.D., Schembri, M.A., 2014. Role of capsule and O antigen in the virulence of uropathogenic *Escherichia coli*. *PloS one* 9, e94786.
- Schierack, P., Kadlec, K., Guenther, S., Filter, M., Schwarz, S., Ewers, C., Wieler, L.H., 2009. Antimicrobial resistances do not affect colonization parameters of intestinal *E. coli* in a small piglet group. *Gut pathogens* 1, 18.
- Schierack, P., Walk, N., Ewers, C., Wilking, H., Steinruck, H., Filter, M., Wieler, L.H., 2008. ExPEC-typical virulence-associated genes correlate with successful colonization by intestinal *E. coli* in a small piglet group. *Environmental microbiology* 10, 1742-1751.
- Schmidt, M.A., 2010. LEEways: tales of EPEC, ATEC and EHEC. *Cellular microbiology* 12, 1544-1552.
- Schroyen, M., Stinckens, A., Verhelst, R., Niewold, T., Buys, N., 2012. The search for the gene mutations underlying enterotoxigenic *Escherichia coli* F4ab/ac susceptibility in pigs: a review. *Veterinary research* 43, 70.
- Shepard, S.M., Danzeisen, J.L., Isaacson, R.E., Seemann, T., Achtman, M., Johnson, T.J., 2012. Genome sequences and phylogenetic analysis of K88- and F18-positive porcine enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology* 194, 395-405.
- Sherlock, O., Schembri, M.A., Reisner, A., Klemm, P., 2004. Novel roles for the AIDA adhesin from diarrheagenic *Escherichia coli*: cell aggregation and biofilm formation. *Journal of bacteriology* 186, 8058-8065.
- Sinha, S., Redfield, R.J., 2012. Natural DNA uptake by *Escherichia coli*. *PloS one* 7, e35620.
- Smeds, A., Hemmann, K., Jakava-Viljanen, M., Pelkonen, S., Imberechts, H., Palva, A., 2001. Characterization of the adhesin of *Escherichia coli* F18 fimbriae. *Infection and immunity* 69, 7941-7945.
- Snoeck, V., Cox, E., Verdonck, F., Joensuu, J.J., Goddeeris, B.M., 2004. Influence of porcine intestinal pH and gastric digestion on antigenicity of F4 fimbriae for oral immunisation. *Vet Microbiol* 98, 45-53.
- Stahl, C.H., Callaway, T.R., Lincoln, L.M., Lonergan, S.M., Genovese, K.J., 2004. Inhibitory

- activities of colicins against *Escherichia coli* strains responsible for postweaning diarrhea and edema disease in swine. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 48, 3119-3121.
- Sugiharto, S., Hedemann, M.S., Jensen, B.B., Lauridsen, C., 2012. Diarrhea-like condition and intestinal mucosal responses in susceptible homozygous and heterozygous F4R+ pigs challenged with enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Journal of animal science* 90 Suppl 4, 281-283.
- Svensmark, B., Nielsen, K., Willeberg, P., Jorsal, S.E., 1989. Epidemiological studies of piglet diarrhoea in intensively managed Danish sow herds. II. Post-weaning diarrhoea. *Acta veterinaria Scandinavica* 30, 55-62.
- Tenaillon, O., Skurnik, D., Picard, B., Denamur, E., 2010. The population genetics of commensal *Escherichia coli*. *Nature reviews. Microbiology* 8, 207-217.
- Tenover, F.C., 2006. Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. *The American journal of medicine* 119, S3-10; discussion S62-70.
- Trotz-Williams, L.A., Mercer, N.J., Walters, J.M., Maki, A.M., Johnson, R.P., 2012. Pork implicated in a Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 outbreak in Ontario, Canada. *Canadian journal of public health = Revue canadienne de sante publique* 103, e322-326.
- Tserenpuntsag, B., Chang, H.G., Smith, P.F., Morse, D.L., 2005. Hemolytic uremic syndrome risk and *Escherichia coli* O157:H7. *Emerging infectious diseases* 11, 1955-1957.
- Tuttle, J., Gomez, T., Doyle, M.P., Wells, J.G., Zhao, T., Tauxe, R.V., Griffin, P.M., 1999. Lessons from a large outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections: insights into the infectious dose and method of widespread contamination of hamburger patties. *Epidemiology and infection* 122, 185-192.
- van Beers-Schreurs, H.M., Vellenga, L., Wensing, T., Breukink, H.J., 1992. The pathogenesis of the post-weaning syndrome in weaned piglets: a review. *The Veterinary quarterly* 14, 29-34.
- Van den Broeck, W., Cox, E., Goddeeris, B.M., 1999. Induction of immune responses in pigs following oral administration of purified F4 fimbriae. *Vaccine* 17, 2020-2029.
- Van den Broeck, W., Cox, E., Oudega, B., Goddeeris, B.M., 2000. The F4 fimbrial antigen of *Escherichia coli* and its receptors. *Vet Microbiol* 71, 223-244.
- van Hoek, A.H., Mevius, D., Guerra, B., Mullany, P., Roberts, A.P., Aarts, H.J., 2011. Acquired antibiotic resistance genes: an overview. *Frontiers in microbiology* 2, 203.
- von Mentzer, A., Connor, T.R., Wieler, L.H., Semmler, T., Iguchi, A., Thomson, N.R., Rasko, D.A., Joffre, E., Corander, J., Pickard, D., Wiklund, G., Svennerholm, A.M., Sjoling, A., Dougan, G., 2014. Identification of enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) clades with long-term global distribution. *Nature genetics* 46, 1321-1326.
- Wang, L., Rothmund, D., Curd, H., Reeves, P.R., 2003. Species-wide variation in the *Escherichia coli* flagellin (H-antigen) gene. *Journal of bacteriology* 185, 2936-2943.
- Wang, X.M., Jiang, H.X., Liao, X.P., Liu, J.H., Zhang, W.J., Zhang, H., Jiang, Z.G., Lu, D.H., Xiang, R., Liu, Y.H., 2010. Antimicrobial resistance, virulence genes, and phylogenetic background in *Escherichia coli* isolates from diseased pigs. *FEMS microbiology letters* 306, 15-21.
- Williams, P.H., Hinson, G., 1987. Temperature-dependent transcriptional regulation of expression of fimbriae in an *Escherichia coli* strain isolated from a child with severe enteritis. *Infection and immunity* 55, 1734-1736.

- Willis, L.M., Whitfield, C., 2013. Structure, biosynthesis, and function of bacterial capsular polysaccharides synthesized by ABC transporter-dependent pathways. *Carbohydrate research* 378, 35-44.
- Wittig, W., Klie, H., Gallien, P., Lehmann, S., Timm, M., Tschape, H., 1995. Prevalence of the fimbrial antigens F18 and K88 and of enterotoxins and verotoxins among *Escherichia coli* isolated from weaned pigs. *Zentralblatt für Bakteriologie : international journal of medical microbiology* 283, 95-104.
- Wolf, M.K., 1997. Occurrence, distribution, and associations of O and H serogroups, colonization factor antigens, and toxins of enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Clinical microbiology reviews* 10, 569-584.
- Wright, G.D., 2005. Bacterial resistance to antibiotics: enzymatic degradation and modification. *Advanced drug delivery reviews* 57, 1451-1470.
- Zajacova, Z.S., Faldyna, M., Kulich, P., Kummer, V., Maskova, J., Alexa, P., 2013. Experimental infection of gnotobiotic piglets with *Escherichia coli* strains positive for EAST1 and AIDA. *Veterinary immunology and immunopathology* 152, 176-182.
- Zeighami, H., Haghi, F., Hajiahmadi, F., Kashefieh, M., Memariani, M., 2014. Multi-drug-resistant enterotoxigenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* isolated from children with diarrhea. *Journal of chemotherapy (Florence, Italy)*, 1973947813Y0000000161.
- Zhang, A., He, X., Meng, Y., Guo, L., Long, M., Yu, H., Li, B., Fan, L., Liu, S., Wang, H., Zou, L., 2015. Antibiotic and Disinfectant Resistance of *Escherichia coli* Isolated from Retail Meats in Sichuan, China. *Microbial drug resistance*.
- Zhou, C., Liu, Z., Jiang, J., Yu, Y., Zhang, Q., 2012. Differential gene expression profiling of porcine epithelial cells infected with three enterotoxigenic *Escherichia coli* strains. *BMC genomics* 13, 330.
- Zhou, M., Duan, Q., Zhu, X., Guo, Z., Li, Y., Hardwidge, P.R., Zhu, G., 2013. Both flagella and F4 fimbriae from F4ac+ enterotoxigenic *Escherichia coli* contribute to attachment to IPEC-J2 cells in vitro. *Veterinary research* 44, 30.
- Zhu, C., Menard, S., Dubreuil, J.D., Fairbrother, J.M., 1996. Detection and localization of the EaeA protein of attaching and effacing *Escherichia coli* O45 from pigs using a monoclonal antibody. *Microbial pathogenesis* 21, 205-213.