

2m11.2819.3

Université de Montréal

Caractérisation phénotypique et
génotypique des isolats d'*Escherichia coli*
producteurs de vérotoxines
chez le porc et l'humain

Par

Annie DesRosiers

Département de pathologie et microbiologie

Faculté de médecine vétérinaire

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade
Maître ès sciences (M.Sc.)
en sciences vétérinaires
option microbiologie

Juillet, 2000

©Annie DesRosiers, 2000



5.12.11.11.11

Université de Montréal

Chaque année, nous sommes

présentés par les étudiants

de la faculté de

sciences humaines

SF

607

1154

2000

11.011

Le présent document est

la propriété de l'Université

de Montréal et ne doit

pas être répliqué

ou diffusé sans

autorisation

de la bibliothèque



Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé

Caractérisation phénotypique et
génotypique des isolats d'*Escherichia coli*
producteurs de vérotoxines
chez le porc et l'humain

Présenté par
Annie DesRosiers

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes

Serge Messier,	président du jury
Sylvain Quessy,	directeur de recherche
John M. Fairbrother,	codirecteur de recherche
Khyali R. Mittal,	membre du jury

Mémoire accepté le ... 2000-09-20

SOMMAIRE

Les isolats d'*Escherichia coli* producteurs de vérotoxines (VTEC) sont associés à la diarrhée, la colite hémorragique et au syndrome urémique et hémolytique chez l'humain. Le sérotype le plus prévalent et le plus souvent recherché, est O157:H7. D'autres sérotypes ont également été associés à ces maladies. La présence de VTEC dans les fèces chez le porc peut soulever des questions quant à une infection possible chez l'humain suite à la consommation de viande contaminée ou à un contact direct avec l'animal. Une meilleure caractérisation de ces isolats était nécessaire afin d'évaluer le danger pour l'homme associé à la présence des VTEC dans le contenu intestinal des porcs et dans les produits de viande.

Le but de cette étude était de caractériser les VTEC isolées d'humains et de porcs dans une même région géographique et pour la même période afin de vérifier si les VTEC d'origine porcine peuvent être reliées génétiquement aux infections chez l'humain. Nous voulions aussi vérifier la présence de différents facteurs de virulence chez ces isolats.

Nous avons d'abord observé que les profils de résistance aux antimicrobiens des isolats humains et porcins étaient différents. De façon générale, les sérotypes isolés des deux groupes étaient différents. Aucun isolat porcine n'appartenait au sérotype O157:H7. Cependant, un isolat appartenait au sérotype O91:NM, un sérotype qui a été associé à des colites hémorragiques chez l'humain. Seulement un sérotype (O8:H19) a été retrouvé chez les deux espèces. Toutefois, les facteurs de virulence chez ces isolats n'étaient pas les mêmes. Les pathotypes étaient également différents pour les isolats humains et porcins, à l'exception des isolats positifs pour le facteur de virulence VT2vx. Les sérotypes de ceux-ci étaient toutefois différents. L'analyse en électrophorèse sur gel en champs pulsés a démontré qu'il n'y avait pas de relation génétique entre les isolats humains et porcins.

Nos résultats suggèrent que les isolats porcins et humains que nous avons comparés et qui provenaient d'une même région géographique et d'une même période d'échantillonnage ne sont pas reliés génétiquement. De plus, les isolats porcins ne possédaient pas les facteurs de virulence requis pour infecter l'humain. Cependant, certains isolats porcins non-O157 (O91:NM, O163:NM et O163:H19) pourraient potentiellement infecter l'homme, bien qu'aucun lien n'ait été trouvé dans cette étude.

TABLE DES MATIÈRES

IDENTIFICATION DU JURY	ii
SOMMAIRE	iii
TABLE DES MATIÈRES	v
LISTE DES TABLEAUX	vii
LISTE DES FIGURES.....	viii
LISTE DES SIGLES ET ABBRÉVIATIONS	ix
DÉDICACE	xi
REMERCIEMENTS.....	xii
I- INTRODUCTION.....	1
II- REVUE DE LITTÉRATURE.....	3
1. <i>Escherichia coli</i>	4
2. Sérotypie.....	4
3. Catégories de <i>Escherichia coli</i> pathogènes	5
3.1 <i>Escherichia coli</i> responsable d'infections intestinales.....	5
3.1.1 <i>Escherichia coli</i> entérotoxigène (EPEC).....	5
3.1.2 <i>Escherichia coli</i> entéro-aggrégante (EAaggEC).....	6
3.1.3 <i>Escherichia coli</i> entéro-invasive (EIEC).....	7
3.1.4 <i>Escherichia coli</i> entéro-pathogène (EPEC)	7
3.1.4.1 Développement des lésions attachantes et effaçantes (AEEC)	8
3.1.5 <i>Escherichia coli</i> entéro-hémorragique (EHEC).....	9
3.2 <i>Escherichia coli</i> responsable d'infections extra-intestinales	10
3.2.1 <i>Escherichia coli</i> responsable de méningites (MENECC).....	10
3.2.2 <i>Escherichia coli</i> septicémique (SEPEC)	10
3.2.3 <i>Escherichia coli</i> uropathogènes (UPEC)	11
4. Toxines	11
4.1 Vérotoxines.....	11
4.1.1 Nomenclature	11
4.1.2 Structure et génétique	12

	vi
4.1.3 Activité biologique.....	13
4.1.4 Mécanisme d'action.....	13
4.2 VT produite par <i>E. coli</i> d'origine porcine (VTe)	14
4.3 Autres cytotoxines	14
4.3.1 Cytotoxine vir.....	14
4.3.2 Facteur cytotoxique nécrosant (CNF).....	15
4.3.3 Toxine distendante cyto-létale (CLDT)	15
4.4 Hémolysines	15
5. Autre facteur de virulence	17
5.1 Le locus Paa (porcine AE associated gene)	17
6. VTEC chez le porc	17
7. VTEC chez l'humain.....	17
7.1 Détection de <i>E. coli</i> O157:H7 et importance des autres sérotypes.....	18
7.2 Réservoir	18
III- MATÉRIEL, MÉTHODES ET RÉSULTATS	20
Article: Phenotypic and genotypic characterization of <i>Escherichia coli</i> verotoxin-producing isolates from humans and pigs.	21
IV- DISCUSSION ET CONCLUSIONS	53
V- BIBLIOGRAPHIE	63
VI- ANNEXES	xiii
Annexe 1: Tableau complémentaire	xiv

LISTE DES TABLEAUX**REVUE DE LITTÉRATURE**

TABLEAU I. Nomenclature et gènes des différents types de vérotoxines rapportés dans la littérature.....	12
---	----

MATÉRIEL, MÉTHODES ET RÉSULTATS

TABLE 1. Antimicrobial resistance of human and porcine VT-positive <i>E. coli</i> isolates.....	48
---	----

TABLE 2. Antimicrobial resistance patterns in human and porcine VT-positive <i>E. coli</i> isolates.....	49
--	----

TABLE 3. Serotypes and pathotypes of human and porcine VT-positive <i>E. coli</i> isolates.....	50
---	----

ANNEXES

TABLEAU I. Pathotypes des isolats humains et porcins positifs pour la Vérotoxine	xv
--	----

LISTE DES FIGURES**REVUE DE LITTÉRATURE**

FIGURE 1. Schéma des différents facteurs de virulence d'*E. coli*.....5

MATÉRIEL, MÉTHODES ET RÉSULTATS

FIGURE 1. Pulsed-field gel electrophoresis of representative isolates. 51

FIGURE 2. Dendogram showing the relatedness between representative human and porcine *E. coli* isolates.....52

LISTE DES SIGLES ET ABBRÉVIATIONS

AE	Attaching and effacing (Attachantes et effaçantes)
AEEC	Attaching and effacing <i>E. coli</i> (<i>E. coli</i> attachantes et effaçantes)
AMPc	Adénosine monophosphate cyclique
ARN	Acide ribonucléique
BFP	Bundle-forming pili (Pili formant un paquet)
CFA	Colonizing factor antigen (Antigène-facteur de colonisation)
CLDT, CDT	Cyto-lethal distending toxin (Toxine distendante cyto-létale)
CNF	Cytotoxic necrotizing factor (Facteur cytotoxique nécrosant)
DNA	Desoxyribonucleic acid (Acide désoxyribonucléique)
Eae	Intimin (Intimine)
EAF	EPEC adherence factor (Facteur d'adhérence des souches EPEC)
EaggEC	Enteraggregative <i>E. coli</i> (<i>E. coli</i> entéro-aggrégantes)
EAST	Enteraggregative ST-like (Toxine ST des EaggEC)
Ehly	Enterohemolysin (Enterohémolysine)
EHEC	Enterohemorrhagic <i>E. coli</i> (<i>E. coli</i> entérohémorragiques)
EIEC	Enteroinvasive <i>E. coli</i> (<i>E. coli</i> entéro-invasives)
EPEC	Enteropathogenic <i>E. coli</i> (<i>E. coli</i> entéro-pathogènes)
ETEC	Enterotoxigenic <i>E. coli</i> (<i>E. coli</i> entérotoxinogènes)
F	Fimbrial antigen (Antigène fimbriaire)
Gb3	Globotriosyl ceramide
Gb4	Globotetraosyl ceramide
H	Flagellar antigen (Antigène flagellaire)
HC	Hemorrhagic colitis (Colite hémorragique)
Hly	alpha-hemolysin (Hémolysine alpha)

Hly-EHEC	EHEC hemolysin (Hémolysine EHEC)
HUS	Hemolytic uremic syndrome (Syndrome hémolytique et urémique)
K	Capsular antigen (Antigène capsulaire)
KDa	Kilodaltons
LEE	Locus of enterocyte effacement (Locus de l'effacement des entérocytes)
LPS	Lipopolysaccharides
LT	Heat-labile toxin (Toxine Thermolabile)
MDa	Megadaltons
MENEC	Meningitis <i>E. coli</i> (<i>E. coli</i> causant des méningites)
O	Polysaccharidic antigen of LPS (Antigène polysaccharidique des LPS)
Paa	Porcine AE associated gene (Gène porcin associé aux lésions AE)
PCR	Polymerase chain reaction (Réaction d'amplification en chaîne par la polymérase)
PFGE	Pulsed-field gel electrophoresis (Électrophorèse en champs pulsés)
RTX	Repeats in toxin (Répétitions dans une toxine)
SEPEC	Septicemic <i>E. coli</i> (<i>E. coli</i> causant des septicémies)
SLT, Stx	Shiga-like toxin (Toxine « shiga-like »)
ST	Heat-stable toxin (Toxine thermostable)
UPEC	Uropathogenic <i>E. coli</i> (<i>E. coli</i> uropathogènes)
UTI	Urinary tract infection (Infections du tractus urinaire)
VCA	Vero cell assay (Épreuve avec les cellules Véro)
VT	Verotoxins (Vérottoxines)
VTEC	Verotoxigenic <i>E. coli</i> (<i>E. coli</i> vérotoxino-gènes)

DÉDICACE

**À Justin,
À Pascal, à Lucie,
... et à Louis, que j'admire énormément.**

«Face à la roche, le ruisseau l'emporte toujours,
non pas par la force mais par la persévérance».

H. Jackson Brown

REMERCIEMENTS

Ce projet n'aurait pu se réaliser sans l'aide de plusieurs personnes à qui je voudrais adresser mes plus sincères remerciements.

- ❖ Tout d'abord, à Dr Sylvain Quesy, pour sa supervision et surtout, pour la confiance qu'il m'a témoignée, pour ses nombreux encouragements et pour m'avoir accueillie dans son laboratoire;
- ❖ Dr John M. Fairbrother, pour ses judicieux conseils et sa supervision;
- ❖ Drs Roger Johnson et Susan Reed ainsi que Leslie MacDonald et Kim Ziebell, pour leur aide avec les techniques de détection à l'aide des cellules Véro, l'immunobuvardage et la sérotypie des isolats;
- ❖ Ann Letellier, pour sa collaboration et pour ses conseils;
- ❖ Louise Lessard, pour son aide inestimable, sa disponibilité et son extrême gentillesse;
- ❖ Le personnel des hôpitaux qui ont collaboré à l'étude pour leur aide précieuse;
- ❖ Clarisse Desautels, pour son aide pour la technique de PCR, Lisette Beaudoin, pour la technique d'hybridation sur colonies et Annette Deschênes, pour la sérotypie des isolats;
- ❖ Drs Robert Higgins et Serge Larivière, pour leur aide au niveau des épreuves de sensibilité aux antimicrobiens;
- ❖ Laure Dudet, pour ses encouragements dès les débuts de ce projet et pour son écoute qui fût appréciée;
- ❖ La Formation des Chercheurs et l'Aide à la Recherche du Québec (FCAR) et le Comité d'Étude et D'Administration de la Recherche (CÉDAR) pour l'aide financière;
- ❖ Les étudiants et le personnel du Laboratoire d'Hygiène Vétérinaire et Alimentaire qui ont contribué à rendre l'atmosphère de travail agréable;
- ❖ Le personnel et les étudiants du GREMIP pour les rencontres amicales ainsi que le personnel de la Faculté de médecine vétérinaire;
- ❖ Tous ceux que j'ai oublié mais qui ont contribué, ne serait-ce que par un simple sourire à la réalisation de ce projet;
- ❖ Ma famille, mes amis, Justin, pour leur appui et leur amour.

INTRODUCTION

Les souches d'*Escherichia coli* productrices de vérotoxines (VTEC) ont été impliquées dans divers épisodes d'infections alimentaires causant la diarrhée, le syndrome urémique hémolytique et la colite hémorragique. Il est bien connu que les bovins sont un réservoir important de VTEC et des évidences directes d'infections humaines ont été rapportées.

En ce qui concerne les souches d'origines porcines, aucun cas d'infection chez l'humain n'a été rapporté jusqu'à maintenant. Le sérotype le plus prévalent et le plus recherché chez l'humain est O157:H7 mais d'autres sérotypes ont également été observés dans des cas d'infections humaines. Chez le porc, les VTEC de ce sérotype n'ont pas été rapportés, à notre connaissance, en Amérique du Nord.

Cependant, des souches productrices de VTe, un facteur normalement associé aux souches porcines, ont été isolées chez l'humain, bien qu'aucune évidence directe d'infection n'a pu être déterminée. La présence de VTEC dans le contenu intestinal de porcs en fin de période d'engraissement ainsi que dans les produits de porcs peut soulever des inquiétudes quant à la contamination possible chez l'humain suite à la consommation de viande de porc contaminée ou par contact direct avec l'animal.

Étant donné que la source des infections humaines causées par les VTEC de sérotypes autres que O157:H7 demeure largement inconnue, il devient donc nécessaire de mieux caractériser les souches porcines et humaines afin de définir s'il existe un risque pour l'humain lors de la consommation de viande de porc contaminée au moment de l'abattage ou lors de contacts directs ou indirects avec l'animal ou son produit.

L'objectif de cette étude est de caractériser les VTEC chez le porc et chez l'humain afin de déterminer si les souches porcines sont reliées génétiquement à

celles retrouvées lors de pathogénies chez l'homme pour une période et une région géographique donnée et aussi de déterminer si les souches porcines possèdent les gènes codant pour les facteurs de virulence requis afin de coloniser l'homme.

II- REVUE DE LITTÉRATURE

1. *Escherichia coli*

Escherichia coli est une bactérie à Gram négatif, non-sporulante, en forme de bâtonnet et anaérobie facultative faisant partie de la famille des *Enterobacteriaceae* (8). Elle est l'une des 5 espèces reconnues faisant partie du genre *Escherichia*. Celui-ci a été nommé d'après Theodor Escherich qui a isolé la bactérie pour la première fois en 1885 (69). Depuis ce temps, *E. coli* a fait l'objet d'intenses recherches en laboratoire, ce qui en fait l'un des organismes les plus connus et documentés (96).

Bien que ce soit un micro-organisme important de la flore normale intestinale des humains et des animaux, certaines souches de *E. coli* peuvent être pathogènes et causer des maladies intestinales et extra-intestinales lorsqu'elles possèdent des facteurs de virulence (8).

2. Sérotypie

Les souches d'*E. coli* peuvent être classées selon leurs caractéristiques antigéniques (Figure 1). La sérotypie est basée sur la présence d'antigènes de surface dont l'antigène somatique 'O', l'antigène capsulaire 'K', l'antigène flagellaire 'H' et l'antigène 'F' (fimbriae ou pili). À ce jour, il existe 167 antigènes somatiques, 74 antigènes capsulaires, 53 antigènes flagellaires et plus d'une vingtaine d'antigènes de type pili (69). L'antigène 'O' désigne le séro groupe d'une souche et l'antigène 'H' identifie le sérotype (Ex.: O157:H7) (93).

L'antigène somatique 'O' d'*E. coli* est composé des lipopolysaccharides (LPS) complexes de la membrane externe. L'antigène capsulaire est principalement constitué de polysaccharides acides et interfère avec le 'pouvoir agglutinant' de l'antigène 'O'. Pour sa part, la diversité antigénique de l'antigène 'H' est basée sur les différents types de flagelline, protéine constitutive des flagelles des organismes mobiles. Quant à l'antigène 'F', il s'agit d'une structure filamenteuse également d'origine protéique qui joue un rôle dans l'adhérence de la bactérie aux surfaces des cellules épithéliales de l'hôte (69).

3. Catégories de *Escherichia coli* pathogènes

En étudiant de plus près les mécanismes de virulence ainsi que les manifestations cliniques des souches pathogènes d'*E. coli*, il a été possible d'établir différentes catégories (pathotypes) pour les isolats responsables d'infections intestinales ou extra-intestinales (systémiques). Ces catégories ont été établies d'abord pour les souches humaines d'*E. coli* mais elles s'appliquent également aux souches animales (69).

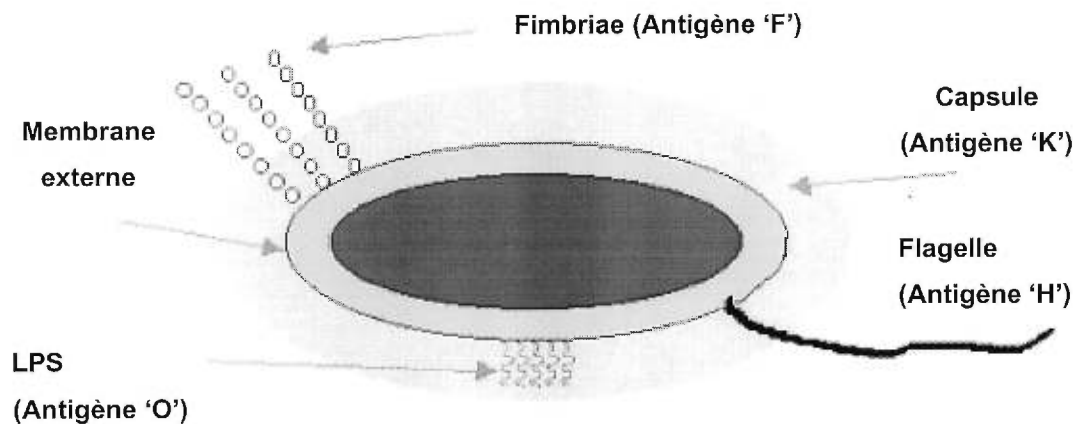


FIGURE 1. Schéma des différents facteurs de virulence d'*E. coli*
(D'après Nataro and Levine, 1994)

3.1 *Escherichia coli* responsable d'infections intestinales

Il existe cinq catégories de souches responsables d'infections intestinales. Ces catégories sont : entérotoxigènes (ETEC), entéro-invasives (EIEC), entéro-pathogènes (EPEC), entéro-hémorragiques (EHEC) et finalement, entéro-aggrégantes (EaggEC).

3.1.1 *Escherichia coli* entérotoxigène (ETEC)

Les souches entérotoxigènes sont retrouvées principalement dans la nourriture ou l'eau contaminée par des fèces d'origine humaine ou animale et sont la principale cause de diarrhée à *E. coli* chez l'humain aux États-Unis et en

Europe (96). Les jeunes enfants et les touristes (diarrhée aqueuse du touriste) qui voyagent dans les pays moins industrialisés sont les plus affectés. Les ETEC sont également une cause majeure de diarrhée chez les animaux, notamment chez le veau, l'agneau et le porcelet (24). Les entérotoxines et les fimbriae sont les facteurs de virulence majeurs chez les ETEC. Deux familles d'entérotoxines sont rencontrées, une étant thermostable (ST) et une autre thermolabile (LT). L'entérotoxine ST peut être divisée en STa et STb (recontrée plutôt chez le porcelet) et LT est divisée en LT-I et LT-II. Ces toxines agissent en changeant l'activité du transport net des fluides de l'intestin de l'absorption à la sécrétion (LT active le cycle adénylate-cyclase-AMPc tandis que ST agit sur le cycle guanylate cyclase) (50). Les adhésines fimbriaires des ETEC chez l'humain sont connues sous le nom de facteur antigénique de colonisation (Colonization factor antigens : CFA), et présentement trois types sont reconnus, soit CFA/I, CFA/II et CFA/IV (73). Ceux-ci sont distincts des adhésines fimbriaires des ETEC retrouvées chez les animaux. Les adhésines fimbriaires F4 (K88), F5 (K99), F6 (987P) et F41 sont associées principalement aux souches ETEC causant la diarrhée chez le porcelet tandis que les adhésines F5 (K99) et F41 sont retrouvées surtout chez les souches ETEC du veau (24). Les adhésines fimbriaires jouent un rôle dans la colonisation de l'intestin. Les sérogroupes les plus communs chez l'humain dans cette catégorie sont : O6, O8, O11, O15, O16, O20, O25, O27, O63, O78, O128, O148, O149, O159 et O173 (69). Chez le porc, on retrouve le plus souvent les sérogroupes O8, O45, O138, O141, O147, O149 et O157 (43).

3.1.2 *Escherichia coli* entéro-aggrégante (EAggEC)

Ce pathotype a été décrit récemment et est associé aux diarrhées persistantes principalement chez les enfants (93). Les souches EAggEC ressemblent aux souches ETEC car elles s'attachent aux cellules intestinales, ne sont pas invasives et ne causent pas de changements histologiques chez les cellules auxquelles elles adhèrent. Cependant, elles diffèrent au niveau de l'adhésion. Les souches ETEC démontrent une adhésion uniforme tandis que les souches EAggEC tendent à former des agrégats (d'où le nom de ce pathotype). Ce phénomène a été observé avec des cellules Hep-2 *in vitro*. (69). Le fait que les

souches EAggEc causent la diarrhée sans envahir les cellules suggère qu'une toxine est produite tout comme dans le cas des souches ETEC (4,93). Il a été démontré que les souches EAggEc produisent une toxine ST-like nommée EAST (pour enteroaggregative ST) mais son importance comme facteur de virulence reste à déterminer. Une exotoxine de 120 kDa, semblable à l'hémolysine produite par les souches d'*E. coli* responsables des infections du tractus urinaire, a également été observée chez les souches EaggEC. Cependant, son mécanisme d'action n'est pas encore bien compris. Les sérogroupes rencontrés dans les souches humaines de cette catégorie sont O7, O77, O86, O126 et O127 (69)

3.1.3 *Escherichia coli* entéro-invasive (EIEC)

Les souches entéro-invasives d'*E. coli*, provoquent chez les humains des symptômes de dysenterie semblables à ceux causés par *Shigella* spp. (73, 93). Elles sont retrouvées tant dans les pays industrialisés que dans les pays en voie de développement. La plupart des cas dans les pays industrialisés sont associés à des épidémies suite à la consommation d'un aliment contaminé. Le mécanisme d'invasion est également semblable. Comme les souches de *Shigella* spp., les EIEC possèdent un plasmide de 140 Mda qui contient les gènes requis pour l'invasion. Les souches envahissent activement les cellules épithéliales du côlon et s'étendent ensuite latéralement aux cellules adjacentes au moyen de filaments d'actine. Il s'en suit une lyse de la vacuole et une multiplication des bactéries dans le cytoplasme qui provoque alors la destruction de la cellule (73). Les EIEC peuvent être identifiés par sérotypie car ils appartiennent à un nombre restreint de sérogroupes qui diffère des sérogroupes retrouvés pour les souches ETEC et EPEC. Les sérogroupes les plus fréquents sont O28, O124, O136, O144 et O173 (69).

3.1.4 *Escherichia coli* entéropathogène (EPEC)

Les souches entéropathogènes d'*E. coli* (EPEC) causent des diarrhées aqueuses accompagnées de fièvre, douleurs abdominales et de vomissements chez les jeunes enfants (69, 93). Les souches de ce pathotype font également partie des AEEC (attaching and effacing *E. coli*) car elles provoquent chez l'hôte

des lésions attachantes et effaçantes (39, 121). Dans ces lésions, la bactérie adhère intimement à la membrane des cellules épithéliales de l'intestin et induit la destruction des microvillosités de l'épithélium. Les souches EPEC sont plus invasives que les souches ETEC ou EaggEC et entraînent une réponse inflammatoire (93). Le facteur impliqué dans l'adhérence initiale est un pilus (BFP pour bundle-forming pilus) et les gènes *eae* et *espB* codent pour des protéines, dont l'intimine, qui vont intervenir directement dans le développement des lésions (33, 73). Les sérogroupes communs à cette catégorie de *E. coli* chez l'humain sont O44, O55, O86, O111, O114, O119, O125, O126, O127, O128, O142 et O158 (69). Chez le porc, ces souches appartiennent aux sérogroupes O45 et O108 (41).

3.1.4.1 Développement des lésions attachantes et effaçantes (AEEC)

Un modèle en trois étapes a été proposé pour le développement des lésions attachantes et effaçantes chez les souches AEEC (32). Dans ce modèle, il y a premièrement la colonisation de la bactérie au niveau des cellules épithéliales de l'intestin qui se fait par l'intermédiaire du pilus BFP encodé par le locus *bfpA* situé sur le plasmide EAF (EPEC Adherence Factor). Par la suite, différents signaux vont amener la sécrétion de produits bactériens incluant ceux du gène *eaeB* (*espB*) conduisant à la phosphorylation du cytosquelette, à l'augmentation du calcium intracellulaire, à l'effacement des microvillosités et à une sécrétion de fluides (32, 44). Enfin, une protéine de 94 kDa (55), l'intimine, codée par le gène *eae* et régulée par l'opéron *per* (48, 58) sur le plasmide aidera à l'attachement intime de la bactérie à la bordure en brosse de l'intestin (34). Il est à noter que les gènes *eae* et *esp* sont situés sur un locus de 35kbp, le locus LEE (pour Locus of Enterocyte Effacement) qui comprend 4 régions nommées A, B, C et D (72). Étant donné l'intime proximité entre la bactérie et la cellule épithéliale, les effets sur cette dernière sont alors amplifiés avec l'accumulation d'actine et de protéines du cytosquelette ce qui amène une formation en piédestal sur laquelle repose la bactérie (32). De plus, il existe un récepteur (Tir) pour l'intimine, qui est également situé sur le locus LEE et qui interagit avec l'intimine pour activer la polymérisation et la formation en piédestal (66).

3.1.5 *Escherichia coli* entéro-hémorragique (EHEC)

Escherichia coli entérohémorragique (EHEC) est un pathogène en émergence qui a été impliqué dans plusieurs épidémies où l'on a observé des colites hémorragiques suite à la consommation de nourriture contaminée. Une première épidémie a été rapportée en 1982 à la suite de l'ingestion de bœuf dans une chaîne de restauration rapide en Oregon et au Michigan (90). L'organisme causant cette épidémie appartenait au sérotype O157:H7. Celui-ci n'avait pas été reconnu, jusqu'à ce moment, comme agent causal de diarrhée chez les humains. Par la suite, plusieurs autres épidémies associées à ce sérotype sont survenues dans différents endroits, notamment au Japon et en Amérique du Nord (6, 61,123). Les souches de EHEC causent des colites hémorragiques ainsi que le syndrome urémique et hémolytique (HUS) chez l'homme dans les pays industrialisés (59). Les plus susceptibles sont les jeunes enfants ainsi que les personnes âgées. Chez les animaux, les EHEC sont également responsables de gastro-entérite hémorragique chez le veau (20).

La pathogénie des infections par les souches EHEC n'est pas très bien connue. Trois facteurs de virulence ont été détectés chez ces souches. Premièrement, une toxine appelée shiga-like toxin (SLT) de type I et II (SLTI et SLTII) connues aussi sous le nom de vérotoxines (VT1 et VT2) (67, 103, 110). Les souches d'*E. coli* qui produisent la toxine sont également appelées *E. coli* vérotoxino-gènes (VTEC). Deuxièmement, un plasmide de 60 MDa serait impliqué dans l'expression d'un fimbriae (119). Les souches EHEC ne possèdent pas le plasmide EAF ni le BFP (68). Troisièmement, tout comme les souches EPEC, une grande proportion de souches EHEC produisent l'intimine codée par le gène *eae* et contribuent fortement à formation des lésions attachantes et effaçantes. Il y a une homologie de 86% entre la séquence de nucléotides du gène *eae* des souches EPEC et EHEC (131). Les souches EHEC font donc partie également des AEEC.

De tous les sérotypes rencontrés chez les souches EHEC en Amérique du Nord, le sérotype O157:H7 est celui qui est le plus fréquemment associé aux maladies humaines (108). Le sérotype O26:H11 est également retrouvé chez les souches EHEC humaines et est habituellement un producteur de vérotoxine (68). Il y a aussi d'autres sérogroupes qui ont été rencontrés parmi les souches EHEC

notamment O111, O113, O117, O128 et O172 (69). Chez le porc, les souches VTEC sont associées aux sérogroupes O137, O139 et O141 (46).

3.2 *Escherichia coli* responsable d'infections extra-intestinales

Les trois infections extra-intestinales fréquentes causées par *E. coli* sont la méningite néonatale, les infections du tractus urinaire (UTI) ainsi que les septicémies et bactériémies (75)

3.2.1 *Escherichia coli* responsable de méningites (MENEK)

Les souches d'*E. coli* sont fréquemment impliquées dans les cas de méningite néonatale chez l'humain. Une capsule de type K1 est retrouvée chez plus de 80% des souches américaines et européennes responsables de cette maladie (76). Les sérogroupes observés le plus souvent parmi les souches qui possèdent l'antigène K1 sont O1, O6, O7, O18 et O83 (75). Cet antigène et des facteurs d'adhérence (Ex.: fimbriae S) permettraient la colonisation et l'infection du système nerveux central. L'antigène capsulaire K1 masque les structures antigéniques de la bactérie par sa ressemblance avec les cellules hôtes et empêche le développement d'une réponse immunitaire ainsi que l'activation de la voie alterne du complément (73). Comme autre mécanisme de virulence, il a également été démontré que les souches MENEK ont une plus grande résistance à l'activité bactéricide du sérum (28).

3.2.2 *Escherichia coli* septicémique (SEPEC)

Les souches causant des septicémies et des bactériémies sont rencontrées non seulement chez les humains mais également chez les veaux et les agneaux (76). Le sérotype O78:K80 domine et il est souvent non-capsulé. Ce sérotype est également présent dans des cas de septicémie et d'aérosacculite chez la volaille. Les souches SEPEC causent des colibacillooses systémiques chez le porc (41, 42). Les facteurs de virulence associés à ces souches sont notamment la capsule polysaccharidique, l'hémolysine, des adhésines, la production de sidérophores (aérobactine), le LPS et la résistance à l'effet bactéricide du sérum. Ces facteurs

permettent aux bactéries d'envahir et de persister dans l'organisme causant des infections généralisées (41, 73, 76).

3.2.3 *Escherichia coli* uropathogènes (UPEC)

Les souches uropathogènes d'*E. coli* causent des infections du système urinaire (UTI) chez les humains (76). Les formes les plus courantes de ces infections sont la bactériurie asymptomatique, la pyélonéphrite ainsi que la cystite. Ces souches sont présentes chez les animaux, notamment chez le porc, où elles causent des infections urinaires chez les sujets adultes. Les principaux facteurs de virulence associés à ces souches sont la présence d'adhésines comme les fimbriae P qui sont responsables de l'adhérence aux cellules uroépithéliales, l'hémolysine, l'aérobactine et le facteur cytotoxique nécrosant (CNF1) (42). Ces souches appartiennent plus fréquemment aux sérogroupes O1, O4, O6, O16 et O18. (76).

4. Toxines

4.1 Vérotoxines

En 1977, Konowalchuk et ses collaborateurs ont observé que des filtrats de culture d'*E. coli* produisaient un effet cytoxique lorsque mis en contact avec une lignée cellulaire de cellules Véro (cellules rénales de Singe vert africain). Cet effet était différent de l'effet produit par l'entérotoxine LT d'*E. coli* (67). Ces effets ont par la suite été associés à l'action d'une cytotoxine appelée vérotoxine (VT). Cette toxine est également appelée Shiga-like toxin (SLT) et plus récemment Stx, car elle ressemble fortement à la Shiga toxin de *Shigella dysenteriae* type 1 (14). Elle inhibe la synthèse des protéines dans des cultures de cellules HeLa, elle est létale pour la souris et cause des accumulations de fluides dans les anses intestinales ligaturées de lapin (74).

4.1.1 Nomenclature

Il existe deux groupes de vérotoxines, VT1 (SLT-I) et VT2 (SLT-II) (63, 103, 110). Différents sous-types de VT2 ont été également identifiés, dont SLT-IIv (71), VT2vh (53) et SLT-IIva (47). Le tableau 1 montre la nomenclature utilisée pour les

vérotoxines ainsi que le nom des gènes qui les encodent. Grâce à différentes études de neutralisation, deux groupes antigéniques de vérotoxines ont été identifiés. Le premier groupe (Groupe I) comprend une toxine neutralisée par un antisérum contre la shiga-toxin et se nomme VT1 ou SLT-I (74). Le second groupe (Groupe II) comprend toutes les autres vérotoxines qui sont apparentées antigéniquement avec SLT mais qui ne sont pas neutralisées par un antisérum anti-SLT-I ou anti-Shiga (50).

TABLEAU I. Nomenclature et gènes des différents types de vérotoxines rapportés dans la littérature.

Terminologie «SLT»	Terminologie «VT»	Gène encodant la toxine	
SLT-I	VT1	<i>slt-I</i>	Groupe I
SLT-II	VT2	<i>slt-II</i>	
SLT-IIv	VT _e ou VT2 _e	<i>slt-v</i>	Groupe II
SLT-IIvha	VT2v-a	<i>vtx2ha</i>	
SLT-IIvhb	VT2v-b	<i>vtx2hb</i>	
SLT-IIva	VT _e v	<i>slt-IIva</i>	

(D'après Gyles, 1992)

4.1.2 Structure et génétique

Les gènes pour VT1 et VT2 sont codés par des bactériophages tempérés (102, 127, 128). L'opéron VT1 contient deux cadres de lecture qui codent pour une sous-unité A et une autre sous-unité, plus petite, la sous-unité B (111). La séquence d'acides aminés de VT1 est très semblable à celle rencontrée pour la shiga-toxin, ne différant que par un acide aminé dans la sous-unité B. Takao *et al.* (115) n'ont trouvé aucune différence avec la shiga-toxin dans la séquence d'acides aminés de SLT-I pour une souche d'*E. coli* O157:H7. En ce qui concerne la comparaison entre SLT-I et SLT-II, Jackson *et al.* (54) ont trouvé qu'il y avait 57% d'homologie avec la sous-unité A et 60% avec la sous-unité B; la sous-unité A de

SLT-II étant légèrement plus grosse que celle de SLT-I. Par ailleurs, l'opéron VT1 est sous le contrôle du système de régulation *fur* et les plus grands rendements sont obtenus quand la bactérie croît dans un milieu contenant une faible concentration de fer ce qui ne semble pas être le cas pour VT2 (50).

La sous-unité A a une taille approximative de 33 kDa et est impliquée dans l'activité biologique de la toxine (51). Une protéolyse ainsi qu'une réduction d'un pont disulfure convertit la sous-unité A de la toxine en un large fragment A₁ N-terminal qui possède une activité enzymatique et un petit fragment A₂ C-terminal. Les VT possèdent plusieurs sous-unités B d'environ 7,5 kDa chacune. En ce qui concerne la sous-unité B, elle joue un rôle dans l'attachement de la toxine avec le récepteur glycolipidique qui est le globotriosyl céramide (Gb3) pour SLT-I et SLT-II.

4.1.3 Activité biologique

En ce qui concerne l'activité biologique, les vérotoxines VT1 et VT2 partagent des points en commun. En effet, ces deux toxines sont cytotoxiques pour les cellules Véro, létales pour la souris et entérotoxiques pour l'intestin de lapin (50). Les cellules Véro en présence de vérotoxines prennent une apparence ridée environ 24 heures après le premier contact avec la toxine (67). Cette propriété est très utile dans le diagnostic des infections causées par les souches d'*E. coli* productrices de vérotoxines et se révèle comme étant une méthode efficace de détection (64). De plus, VT1 a une activité 1000 fois plus grande que VT2 sur les cellules Véro (65). D'autre part, VT1 et VT2 sont également cytotoxiques pour la lignée cellulaire HeLa (71).

4.1.4 Mécanisme d'action

Les vérotoxines inhibent la synthèse des protéines des cellules eucaryotes à la suite d'une activité ARN-N-glycosidase (51, 52). Ceci se fait en clivant un lien spécifique N-glycosidique de l'ARN ribosomal 28S de la sous-unité 60S ce qui cause le relâchement d'un résidu adénine empêchant alors l'attachement de l'aminoacyl-ARNt aux ribosomes, qui dépend du facteur d'élongation 1.

4.2 VT produite par *E. coli* d'origine porcine (VTe)

Les souches d'origine porcine produisent une variante (VTe ou SLT-IIv) de la toxine SLT-II qui est responsable de la maladie de l'oedème (127). Cette toxine a été classée dans le groupe antigénique VT2 car sa cytotoxicité peut être neutralisée par un antisérum dirigé contre VT2. Cependant, contrairement à VT2, elle est inactive ou faiblement active sur la lignée de cellules HeLa (47, 50). Par ailleurs, au niveau génétique, la toxine VTe ne serait pas associée à un bactériophage comme c'est le cas pour VT1 et VT2 (71, 127). Cette toxine serait plutôt associée à un plasmide tel qu'observé pour une souche de sérotype O113 (65). De plus, il y a une similarité de 91% dans la séquence des nucléotides de VT2 et VTe, les sous-unités A démontrant une plus grande similarité que les sous-unités B (49, 125). En ce qui concerne la structure de VTe, le récepteur serait le globotetraosyl ceramide (Gb4) plutôt que le Gb3 qui est le récepteur pour VT1 et VT2. Les différences dans la distribution des récepteurs au niveau des cellules endothéliales dans divers tissus et chez divers animaux peut être responsable pour la différence des organes cibles et de la variabilité des symptômes cliniques associés aux différents sous-types de VT (50).

4.3 Autres cytotoxines

Mis à part les vérotoxines, d'autres cytotoxines produites par des souches d'*E. coli* causant des diarrhées ont été rapportées au courant des dernières années. Parmi celles-ci, il y a la cytotoxine vir, le facteur cytotoxique nécrosant (CNF) ainsi que la toxine distendante cyto-létale (CLDT).

4.3.1 Cytotoxine vir

La cytotoxine vir a été observée chez des souches d'*E. coli* septicémiques isolées chez le bœuf et le mouton (51). La synthèse de cette toxine est contrôlée par un plasmide et est associée à la présence d'un antigène de surface. Elle a pour effet de causer la multinucléation des cellules HeLa et elle est létale pour la souris, le lapin et le poulet.

4.3.2 Facteur cytotoxique nécrosant (CNF)

Le facteur cytotoxique nécrosant (CNF) induit la formation de cellules géantes polynucléées chez les cellules Véro et HeLa (21, 29, 51). Il est présent chez les souches responsables de diarrhées chez les humains, les porcs et les veaux, de septicémies ainsi que d'infections du tractus urinaire chez les humains. Le CNF est très apparenté immunologiquement à la cytotoxine vir et c'est pourquoi ils ont été appelés récemment CNF1 et CNF2 respectivement (31, 77). De plus, la toxicité de chacune des deux toxines n'est neutralisée que partiellement par les anticorps de l'autre type. Le CNF1 est une protéine de 115 kDa qui est létale pour la souris et qui induit de la nécrose dermique chez le lapin lorsqu'elle est injectée de façon intradermique (30). Elle est souvent associée avec la présence d'un des fimbriae de la famille P et à la production de l'hémolysine alpha (13). Pour ce qui est du fimbriae P, il est codé par les gènes *pap* (pyelonephritis associated pili) et il est associé régulièrement avec les souches d'*E. coli* causant les infections urinaires (42, 107). En ce qui concerne l'hémolysine, une étude a démontré que 60% des souches exprimant la toxine CNF1 étaient productrices d'hémolysine alpha (82).

4.3.3 Toxine distendante cyto-létale (CLDT)

La toxine cyto-létale distendante (CLDT ou CDT) est une toxine thermolabile qui a été observée dans des filtrats d'*E. coli* isolés de cas de diarrhée et d'autres maladies humaines (56). Elle induit de l'érythème (sans nécrose) sur la peau du lapin. Au niveau de l'activité cytotoxique, CDT cause la distension progressive de la cellule suivie de cytotoxicité chez les cellules Véro, HeLa, HEP-2 et CHO. Étant donné que plusieurs de ces souches produisent aussi la vérotoxine, les cellules CHO sont utilisées dans le diagnostic puisqu'elles ne répondent pas à la vérotoxine (51). Le rôle de cette toxine n'est pas encore bien connu.

4.4 Hémolysines

Il existe chez *E. coli* plusieurs types d'hémolysines. Les quatre principaux types sont l'hémolysine alpha, l'hémolysine bêta, l'hémolysine gamma ainsi que l'entérohémolysine. L'hémolysine bêta n'est pas très bien caractérisée et est

associée à la cellule bactérienne (69). L'hémolysine gamma est active sur les érythrocytes de plusieurs espèces, excepté ceux d'humain et de lapin (25).

L'hémolysine-alpha est thermolabile et extracellulaire. Les gènes *Hly* codant pour ce facteur peuvent être localisés sur le chromosome, ce qui est le cas dans la plupart des souches humaines. Ils peuvent également être situés sur un plasmide, ce qui est souvent observé chez les souches porcines (25, 51). L'hémolysine alpha fait partie de la famille des cytotoxines « pore-forming » (RTX toxins) (98). Chez le porc, elle est retrouvée chez les souches causant la maladie de l'oedème mais également chez des isolats provenant de porcelets sains lors du sevrage et chez les isolats de porcs diarrhéiques (69). Chez les humains, l'hémolysine alpha est fréquemment associée aux infections des voies urinaires. Près de la moitié des souches humaines impliquées dans des infections urinaires possèdent l'hémolysine alpha (25). L'hémolysine alpha jouerait un rôle dans le pouvoir pathogène d'*E. coli* en fournissant le fer nécessaire à la croissance de la bactérie, en tuant les cellules de défense de l'hôte et en étant cytotoxique pour les cellules rénales (69).

Plus récemment, une activité hémolytique qui n'était pas associée à l'hémolysine alpha a été observée chez les souches VTEC et certaines souches EPEC (9, 95). Cette activité est causée par une entérohémolysine. Près de 90% des souches VTEC produiraient cette hémolysine mais il semblerait que les isolats VTEC porcins ne produiraient pas souvent cette toxine (9, 51). L'entérohémolysine est thermolabile et a une activité qui ne peut être observée que sur des érythrocytes lavés de mouton (51, 95). Différents types génétiquement différents d'hémolysines ont par la suite été identifiés comme étant des entérohémolysines, soit Ehly1 et Ehly2 qui sont encodées par un phage et non reliées à l'hémolysine alpha (11, 113). Aussi, l'hémolysine EHEC, encodée par un large plasmide, fait partie des entérohémolysines (10, 99). L'hémolysine EHEC est apparentée à l'hémolysine alpha et fait partie de la famille de toxines RTX mais dont le phénotype est dû à un mécanisme de sécrétion déficient.

5. Autre facteur de virulence

5.1 Le locus Paa (porcine AE associated gene)

Récemment, un nouveau locus Paa (porcine attaching and effacing associated gene) a été mis en évidence par An *et al.* (2) chez un mutant *TnphoA* ayant perdu la capacité de produire des lésions d'attachement et d'effacement. La séquence de nucléotides et d'acides aminés de Paa a par la suite été déterminée. Le locus Paa pourrait être impliqué dans le développement des lésions attachantes et effaçantes de souches EPEC et est souvent présent dans les souches humaines et animales qui possèdent le gène *eae*.

6. VTEC chez le porc

Tel que mentionné précédemment, *E. coli* est responsable de la maladie de l'oedème chez le porc (43, 65). Cette maladie est caractérisée par de l'anorexie, de l'oedème aux paupières et des anomalies au niveau neurologique qui causent de l'incoordination et peuvent même conduire à la paralysie chez le porcelet en période de sevrage. Les souches prolifèrent dans le petit intestin et produisent la toxine VTe qui entre dans la circulation et cause des lésions suite à un dommage aux cellules endothéliales. De plus, une adhésine fimbriale a été récemment décrite chez des souches VTEC du porc. Il s'agit du fimbriae F18 (ou F107) et il serait impliqué dans l'adhérence des bactéries aux cellules épithéliales de l'intestin (41, 101). Aussi, la plupart des souches associées à la maladie de l'oedème chez le porc possèdent une hémolysine alpha (41). En ce qui concerne les sérotypes, le nombre est restreint et il s'agit essentiellement des sérogroupes O138, O139 et O141. Il est à noter que ces sérogroupes sont retrouvés autant chez les porcelets atteints de la maladie que ceux qui sont normaux (10, 46, 105).

7. VTEC chez l'humain

Plusieurs épidémies de diarrhées ont été reliées à l'ingestion d'aliments contaminés par des souches O157:H7 d'*E. coli* au Canada et un peu partout dans le monde (6, 19, 61, 78, 90, 92, 123, 129). Les symptômes cliniques se présentaient sous forme de diarrhée pouvant mener à la colite hémorragique (HC) et le syndrome urémique hémolytique (HUS). Ce dernier est une entité

clinique grave souvent précédée de diarrhée hémorragique qui se traduit par une défaillance rénale, une anémie hémolytique angiopathique et le purpura thrombotique thrombocytopénique. Les jeunes enfants sont les plus atteints. La présence de vérotoxine chez ces souches a été démontrée à plusieurs occasions (50).

7.1 Détection de *E. coli* O157:H7 et importance des autres sérotypes

Bien que le sérotype O157:H7 est le plus souvent rapporté dans les cas de colites hémorragiques et de HUS, les souches productrices de vérotoxines de d'autres sérotypes, incluant O111, O117 et O121, se sont aussi révélées responsables de ces maladies (15, 16, 23, 65, 120). Environ 20 à 25 % des cas de HUS au Canada seraient dû à des infections par des VTEC appartenant à un sérotype autre que O157:H7 (57). La prédominance de O157:H7 s'explique vraisemblablement par l'utilisation du milieu sorbitol-MacConkey qui facilite l'isolement de ce sérotype (70). Des méthodes plus sophistiquées sont nécessaires pour l'identification des autres sérotypes car la plupart des laboratoires de diagnostic ne recherchent que les *E. coli* du sérotype O157:H7, malgré la prévalence tout de même notable des autres sérotypes (116).

7.2 Réservoir

Les épidémies causées par les souches d'*E. coli* O157:H7 sont reliées principalement à la consommation de bœuf bien que d'autres aliments contaminés via un produit d'origine animale ont également été impliqués. Ces aliments incluent le lait cru, les produits laitiers tels que le yogourt ou le fromage, le cidre de pomme, les légumes crus et la salade (27). Borczyk *et al.* (17) ont démontré que les bovins constituent le réservoir primaire de bactéries causant le HUS chez des jeunes enfants ayant consommé du lait non pasteurisé. La production de vérotoxines a également été observée dans ce type d'échantillons. Renwick *et al.* (88) ont démontré clairement la transmission directe de *E. coli* O157:H7 d'un veau à un jeune enfant en Ontario. D'autres cas impliquant la viande de bœuf comme source de contamination ont également été rapportés (87,94).

En ce qui concerne les produits dérivés du porc, des souches O157:H7 productrices de vérotoxines ont été isolées chez 1,5% des échantillons examinés comparativement à 3,7% pour la viande de bœuf (36). Une étude similaire en Ontario a démontré que 3,8% des échantillons de viande de porc haché examinés étaient contaminés par les VTEC, comparativement à 10,6% pour la viande de bœuf haché (87). D'autres études ont également montré la présence de ces souches O157:H7 dans des produits alimentaires d'origine animale (94).

Les produits de porc n'étaient pas considérés comme une source d'infections chez l'humain jusqu'à la découverte en 1991 chez un humain d'une souche productrice de VTE, un facteur normalement associé à la maladie de l'œdème. Cette souche est du sérotype O101:H9, un sérotype qui n'est habituellement pas associé à la maladie de l'œdème (80). Par la suite, d'autres souches de ce sérotype ont été isolées de porcs à l'abattoir (22). D'autres cas semblables ont aussi été rapportés (81, 109, 118).

De façon générale, les VTEC chez le porc ne sont pas considérés comme une source fréquente d'infection chez l'homme et le sérotype O157:H7 n'a pas encore été rapporté chez le porc en Amérique du Nord (46, 63, 65, 69, 128). Ce sérotype ne semble pas commun chez les animaux (35).

III- MATÉRIEL, MÉTHODES ET RÉSULTATS

PHENOTYPIC AND GENOTYPIC CHARACTERIZATION OF *ESCHERICHIA COLI* VEROTOXIN-PRODUCING ISOLATES FROM HUMANS AND PIGS

Annie DesRosiers¹, John M. Fairbrother¹, Roger P. Johnson², Clarisse Desautels¹,
Ann Letellier¹, and Sylvain Quessy^{1*}

¹Département de pathologie et de microbiologie, Faculté de médecine vétérinaire,
Université de Montréal, C.P. 5000, St-Hyacinthe, Québec J2S 7C6

²Laboratory for Foodborne Zoonoses, Health Canada, 110 Stone Road West,
Guelph, Ontario N1G 3W4

Manuscrit soumis à Journal of Clinical Microbiology

ABSTRACT

The aim of this study was to characterize Verotoxigenic *Escherichia coli* (VTEC) isolates obtained from humans and pigs in the same geographic areas and during the same period of time in order to determine whether porcine VTEC isolates could be related to human cases of diarrhea and also to detect the presence of virulence factors in these isolates. From 1352 human and 620 porcine fecal samples, 11 human and 18 porcine verotoxin-positive isolates were obtained by the VT-immunoblot or the individual colony testing technique. In addition, 52 porcine VTEC strains isolated from diseased pigs at the Faculté de médecine vétérinaire during the same period or from fecal samples collected previously at slaughterhouse were characterized in this study. Antimicrobial resistance profiles were different between human and porcine isolates. In general, the serotypes observed in the two groups were different. No porcine isolate was of serotype O157:H7, however, one isolate was O91:NM, a serotype that has been associated with hemorrhagic colitis in humans. Also, one serotype (O8:H19) was found in isolates from both species; however, the O8:H19 isolates of the two groups were of different pathotypes. The pathotypes observed in the human and porcine isolates were different with the exception of VT2vx positive isolates; the serotypes of these isolates from the two groups were nevertheless different. Pulsed-field gel electrophoresis analysis indicated that there was no relatedness between the human and porcine isolates. In conclusion, these results suggest that the porcine and human isolates of the present study were not genetically related. Most porcine VTEC isolates did not seem to possess the virulence factors required to infect humans. However, certain non-O157:H7 porcine VTEC may potentially infect humans.

INTRODUCTION

Escherichia coli is an important member of the normal intestinal flora of animals and humans. However, some strains possess virulence factors and can cause intestinal and extra-intestinal infections in humans and animals (8,49). *E. coli* strains that produce verotoxins (VT; also known as shiga-like toxins or Stx) have been implicated in hemorrhagic colitis (HC) and hemolytic uremic syndrome (HUS) in humans (27,47). These strains produce two antigenically different types of toxins: VT1 and VT2 (28). There are many variants of VT2 such as VT2vp1 (VTe) (63), VT2vp2 (VTev) (21), VT2vha and VT2vhb (23), VT2c (54) and several others (29, 34, 39). Verotoxigenic *E. coli* (VTEC) can also infect pigs and cause edema disease (7). These isolates produce a particular toxin that is genetically similar to VT2, called VTe or VT2e (28). Recently, a new locus called Paa (for porcine attaching and effacing associated) that seems to be implicated in the development of attaching and effacing lesions, was found in high proportion of human O157:H7 and pig *eae*-positive *E. coli* isolates (3).

Many outbreaks of HC and HUS associated with O157:H7 VTEC strains have been reported worldwide in humans following the ingestion of contaminated food or water (6, 38, 47, 62). It is known that cattle constitute an important reservoir for VTEC and there is direct evidence of infections in humans caused by consumption of foods of bovine origin and by contact with infected cattle (13, 46). In pigs, verotoxins have been reported to be present in certain *E. coli* isolates from meat products and from the intestine (15, 45, 48). However, to date, there has been no direct evidence of human infections originating from pigs in North America. In most clinical laboratories, only VTEC of the O157:H7 serotype are detected due to the use of a rapid and convenient technique involving bacterial growth on sorbitol MacConkey agar (31). However, VTEC of other serotypes, in addition to O157:H7, have been associated with diarrhea, HC and HUS (12, 28). Since the source of human non-O157 VTEC infections remains largely unknown, further characterization of human and porcine isolates was needed in order to evaluate

the public health risk associated with the presence of VTEC in pig intestines and meat products (36).

The aim of this study was to characterize phenotypically and genotypically *E. coli* VT-producing isolates from humans and pigs to determine if the porcine isolates are related to those found in human cases of diarrhea during the same period of time and in the same geographic area. In addition, we wanted to determine whether the porcine VTEC isolates possess virulence factors, which would allow them to infect humans.

MATERIALS AND METHODS

Sampling. Fecal specimens were collected from finisher pigs between February and September 1998 at a slaughterhouse located near St-Hyacinthe, Québec, Canada. A 1 g sample of intestinal content was taken aseptically with sterile swabs by making an incision with a disinfected scalpel in the caecum. A total of 620 samples were taken from different carcasses over the course of 14 visits to the slaughterhouse. During the same period of time, 1 g of fecal material was obtained from human patients with diarrhea in five hospitals, located in a 90 Km radius from the slaughterhouse. A total of 1352 samples were collected.

Culture and detection of verotoxins. Porcine and human fecal samples were incubated in 9 ml of Nutrient broth (NB) (Difco Laboratories, Detroit, Michigan) overnight at 37°C. In order to detect VT-positive cultures, 1 ml of the overnight NB culture was added to 9 ml of MacConkey broth (MACB)(BBL, Becton Dickinson Microbiology Systems, Cockeysville, Maryland) and incubated overnight at 37°C. A volume of 100 µl of the MACB culture was then inoculated in 1 ml of Brain Heart Infusion Broth (BHI)(Quelab, Montreal, Québec) and incubated overnight at 37°C. A portion of the MACB was also stored at -70°C in 15% glycerol (Fisher Scientific, Nepean, Ontario). BHI cultures were then centrifuged (10 000 x g for 3 minutes) and filtered using a 0,22 µm filter. The filtrate was tested for the presence of verotoxins using the Vero cell (ATCC CCL 81) cytotoxicity assay (VCA) as described by Mann (30). When it was not possible to perform the assay immediately, filtrates were stored at -70°C in 15% glycerol until use (for periods not exceeding 2 weeks). VT1-positive *E.coli* strains H19 and VT2-positive B2F1 *E.coli* strains provided by the Laboratory for Foodborne Zoonoses as well as VT-negative *E. coli* strain ATCC 25922 were used as controls.

Detection of VT-positive isolates by VT-immunoblot. A VT-immunoblot assay (25) was also performed on the MACB cultures of the VT-positive broth samples. Briefly, dilutions of tested cultures were made in peptone water (Difco) and 100 µl

of the diluted broth was spread on a cellulose acetate/nitro-cellulose membrane of 82 mm diameter (Millipore, Bedford, Massachusetts) that was placed on a nitro-cellulose membrane of 82 mm diameter (Schleicher & Schuell, Keene, New Hampshire) on a Tryptic Soy Agar plate (BBL). The nitro-cellulose membrane was previously coated with capture antibodies against the verotoxins. After overnight incubation of the plates, VT-positive colonies on the upper membrane were identified by probing the lower membrane with monoclonal antibodies to VT's, followed by alkaline phosphatase-conjugated rabbit antibody specific for the Fc fragment of mouse IgG (Jackson ImmunoResearch, West Grove, Pennsylvania) and the substrate of 5-Bromo 4-chloro-3-indolyl phosphate (Sigma, St-Louis, Missouri) and Nitro Blue Tetrazolium (Sigma). Positive colonies corresponding to VT-positive dots on the VT-immunoblot were easily located on the upper membrane. The same control strains as for the Vero cell cytotoxicity assay were used.

VT-positive colonies were inoculated in 400 μ l of MACB and incubated at 37°C for 4 hours or more. Then, 100 μ l of the MACB culture was added to 1 ml of BHI and incubated overnight at 37°C. Blood agar base (Difco) supplemented with 5% bovine blood was streaked with the BHI culture and incubated overnight at 37°C for conservation of the VT-positive isolates. The remaining BHI culture was centrifuged, filtered and the presence of verotoxin confirmed by the Vero cell cytotoxicity assay developed by Mann (30). Positive cultures were stored at -70 °C in a freezing medium.

Individual colony testing technique. Colonies on MacConkey agar plates seeded from VT-positive broths were tested using the Vero cell cytotoxicity assay (30). For each agar plate, approximately 10 to 12 colonies and one streak were tested. These were each incubated in 1 ml of BHI, and examined as described above for the Vero cell cytotoxicity assay. This technique was used to confirm whether the broths were positive for verotoxin, and if so, to obtain additional VT-positive isolates.

Other VTEC isolates. Additional porcine strains (n=18) isolated during the same period from the intestines of sick pigs were also provided by the *Escherichia coli* laboratory, Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal. Also, porcine VT-positive isolates (n=36) from fecal samples collected previously at slaughterhouses (1995-1996) were added to this study for characterization purposes.

Biochemical tests. Biochemical tests were performed on all *E. coli* isolates in order to confirm the identify the isolates. The tests used were: urea hydrolysis, Simmons citrate, indol spot, methyl red, Voges-Proskauer, triple sugar iron and lactose fermentation (MacConkey agar). Isolates giving ambiguous results were tested on API 20E (bioMérieux, Ville St-Laurent, Québec). Strains of *E. coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883 and *Yersinia enterocolitica* O:3 (provided by Dr Elroy Mann, Laboratory for Foodborne Zoonoses of Health Canada, Guelph, Ontario) were used as controls.

Serotyping. Porcine isolates were examined by slide agglutination to determine the O serogroup (18) at the *Escherichia coli* Laboratory of the Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal. The serotype of all the isolates was confirmed at the Laboratory for Foodborne Zoonoses.

Antimicrobial susceptibility. The disk-diffusion antimicrobial susceptibility test was performed using Mueller-Hinton agar (Quelab) for all isolates, according to the guidelines of the National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) (35). The following antimicrobials were tested: ampicillin (10 µg), apramycin (15 µg), ceftiofur (30µg), cephalothin (30 µg), chloramphenicol (30 µg), enrofloxacin (5 µg), gentamycin (10 µg), neomycin (30 µg), tetracycline (30µg), trimethoprim/sulfamethoxazole (25 µg) (Oxoid, Basingstoke, Hampshire) and amoxicillin/clavulanic acid (30µg) and ceftiofur (30 µg) (BBL Sensi-Disk). The interpretation was made according to the NCCLS charts (35), except for ceftiofur and neomycin (factory standards) and apramycin (The Provel Bulletin, Difco

Laboratories, Detroit, Michigan). Controls were done using *E. coli* strain ATCC 25922.

Gene probes. Virulence factors were detected by a colony hybridization method using gene probes as previously described (16). They were derived from recombinant plasmids for the LEE A, B, C and D loci (4) and alpha-hemolysin (Hly)(17) or by PCR for VT1, VT2 (66), Eae (intimin) (5), cytotoxic necrotising factor (CNF) (37), F18 (F107) fimbriae (22) and Paa (porcine attaching and effacing associated locus) (2).

PCR. A PCR technique was used for detection of EHEC hemolysin (HlyEHEC)(51). Briefly, 20 μ l of the MACB culture supernatant was boiled for 10 minutes in 500 μ l sterile water. All the amplifications were done using a PTC-200 Peltier thermal cycler (MJ Research, Whaltham, MA). Amplification reactions of 25 μ l included PCR buffer 1X, dNTP 0.2 mM, MgCl₂ 1.5 mM, 12.5 ppm for each primer, 1.25 units of Taq polymerase (Perkin-Elmer, Branchburg, New Jersey) and 5 μ l of DNA. Amplifications were done over 25 cycles as follows: 94°C for 30 seconds, 60°C for 30 seconds and 72°C for 30 seconds. Amplified DNA was detected on an electrophoresis gel followed by ethidium bromide staining (Sigma).

A PCR assay was also performed on isolates that were VT2 positive on colony hybridization, in order to distinguish the different VT2 variants. The following primers were used: VT2, VT2vp1 (VT2e), VT2vh (including VT2vha and VT2vhb) and VT common (65). When the isolates were negative for the tested variants but positive for VT common, they were considered to possess gene sequence for an as yet uncharacterized VT2 variant and were designated as being VT2vx.

Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE). This technique was done on all VT-positive isolates as described previously (16) with the modification that the optical densities of the suspensions ranged between 1.8 and 2.0. *E. coli* strain ATCC 25922 was used as a control on each gel.

Data analysis. Gels were analysed with Image Master 1D Elite software (Amersham Pharmacia Biotech) and the dendograms were established using Image Master 1D database software (Amersham Pharmacia Biotech). The Dice similarity coefficient was calculated and used to compare PFGE profiles.

RESULTS

Detection of VT-positive isolates. Among the 620 porcine samples collected during the sampling period, 105 (16.9 %) broth cultures were positive by the Vero cell cytotoxicity assay. From these, only 4 VT-positive isolates were obtained on VT-immunoblot. Fifty of the broth cultures that were highly positive for verotoxin production were tested by the individual colony testing technique. Fourteen additional VT-positive colonies were found. A total of 1352 human samples were obtained from which 34 (2.5 %) were positive on the Vero cell cytotoxicity assay. From these, 11 VT-positive isolates were obtained as determined by VT-immunoblot. No additional VT-positive isolates were obtained by the individual colony testing technique. Hence, a total of 18 porcine VT-positive isolates and 11 human VT-positive isolates were obtained.

Of the 18 VT-positive porcine isolates, 3 were found to be VT-negative by the colony hybridization method, thus 15 isolates were retained for the study. The 18 porcine isolates provided by the *E. coli* Laboratory, were all VT-positive by colony hybridization. Hence, a total of 33 porcine isolates possessing VT gene sequences were available for the period of the study. Of the 36 porcine isolates obtained previously in slaughterhouses and positive on the Vero cell cytotoxicity assay, 34 possessed VT gene sequences and were available for this study. Of the 11 human VT-positive isolates, 10 possessed VT gene sequences and were available for this study.

Antimicrobial susceptibility. All isolates were susceptible to cefoxitin, ceftiofur and enrofloxacin (Table 1). Up to one third of porcine isolates, but none of the human isolates were resistant to amoxicillin/clavulanic acid, apramycin, chloramphenicol, cephalothin and ampicillin. Also, porcine isolates from the current study period were more frequently resistant to ampicillin, cephalothin and chloramphenicol than the previously isolated porcine strains. Resistance to gentamicin, neomycin and trimethoprim/ sulfamethoxazole was observed to a similar extent in both human and porcine isolates. Interestingly, resistance to

tetracycline was more frequently observed in porcine isolates than in human isolates. Multiple resistance to two or more antimicrobial agents was also observed more frequently in porcine isolates (28/60) than in human isolates (2/10)(Table 2). No common pattern of antimicrobial resistance was observed between human and porcine isolates.

Serotyping. The serotypes of the human isolates were different from those of the porcine isolates except for a O8:H19 serotype that was found both in human and porcine isolates (Table 3). The most frequent serotypes for the porcine isolates were O8:H9, O100:NM (especially with the porcine isolates from the previous period), O138:NM, and O8:H19. For human isolates, the most frequent serotype was O157:H7, which was not found in porcine isolates.

Virulence factors. The pathotypes for the human and porcine isolates were different except for VT2vx which was found in isolates from both species (Table 3). The most frequent pathotypes were VT2e for the porcine isolates and VT1-LeeABCD-*eae-paa*-HlyEHEC for the human isolates. Among the verotoxins, VT2 was the most frequent, followed by VT1. Isolates that were both VT1- and VT2-positive were only found in humans. The gene region LeeABCD was found only in human isolates. The *eae* gene was found only in human isolates, mostly associated with *paa*. Alpha-hemolysin was found only in porcine isolates whereas HlyEHEC was found mostly in human isolates and in two porcine isolates (*E. coli* O91:NM and O91:H38). Finally, the F18 fimbriae was found only in porcine isolates and corresponded with isolates from diseased animals (Data not shown).

Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE). Various patterns, varying from 13 to 17 bands, were observed for the human and porcine isolates. The PFGE profiles of all porcine isolates were different from those of the human isolates (Figure 1). Use of the *E. coli* ATCC 25922 control strain demonstrated that the manipulations between gels were consistent. PFGE profiles were used to elaborate a dendrogram showing the relatedness between the isolates (Figure 2). According to the criteria of Tenover *et al.* (59), there are four categories of genetic and epidemiologic

relatedness as determined by PFGE. The first category comprises the indistinguishable isolates that have the same number of bands of the same apparent size and demonstrate a similarity coefficient of 100 % on the dendrogram. The second category includes closely related isolates that have a difference of 2 to 3 bands. Closely related isolates in our study had a similarity coefficient of 90 to 100 %. The third category includes the possibly related isolates that have a difference of 4 to 6 bands. A similarity coefficient of 83 to 90 % was obtained for these isolates on the dendrogram in our study. Isolates having a similarity coefficient of less than 83% were considered as unrelated. This category includes strains that have differences of more than 7 bands. None of the porcine isolates demonstrated relatedness (similarity coefficient of more than 83 %) to any of the human isolates. The human O8:H19 isolate, as well as having a different pathotype (VT1-VT2-HlyEHEC) to that of the porcine O8:H19 isolates (VT2e), was also unrelated to the porcine O8:H19 isolates as shown by PFGE. A close relatedness (similarity coefficient >90%) was only observed between certain of the porcine isolates belonging to the same serotype and pathotype, such as the O138:NM, O?:NM, O8:H9, O8:H19 and O142:NM isolates (Figure 2). Interestingly, most of the human isolates were in the same cluster and were positive for *eae* and *paa*. The other human isolates were positive for VT2vx (3 isolates) or VT1-VT2-HlyEHEC (1 isolate) and demonstrated less relatedness on the dendrogram.

DISCUSSION

It is thought that a significant proportion of VTEC-associated human diseases are caused by VTEC strains of serotypes other than O157:H7 (24, 41, 44). However, little is known about the source of human non-O157:H7 episodes (36). Since a significant proportion of pig and pork products have been found to be positive for the presence of verotoxin (15, 45, 48) we were particularly interested in examining the possibility that VTEC isolates from swine may be genotypically or phenotypically related to human VTEC isolates.

Different antimicrobial resistance, pathotype, serotype and PFGE profiles were observed for porcine and human isolates, suggesting that the porcine isolates were not phenotypically or genotypically related to the human pathogenic VTEC isolates, at least for this time period and geographical area. Although serotype O8:H19 was found in both human and porcine isolates, the pathotypes were not the same (VT1-VT2 for the human isolate and VT2e for the porcine isolates)(Table 3). Also, until now, serogroup O8 has only been reported occasionally in humans (41, 50, 56).

Generally, the most prevalent pathotypes for human and porcine isolates were not the same. The only pathotype found in both species was VT2vx, although it is not known whether these isolates produce the same or different as yet uncharacterized VT2 variants. The serotypes of the two human isolates with this pathotype (O7:H4 and O32:H45) were not the same as those of the porcine isolates (O9:NM, O100:NM, O138:NM and O159:NM)(Table 3) reinforcing the argument for the unrelatedness of the porcine and human VTEC. On the PFGE dendogram, no human isolate was closely related to any porcine isolate, confirming that porcine VTEC isolates were not genetically associated with human VTEC isolates sampled during the same period and in the same geographical region. This was also observed for the group of porcine strains isolated a few years ago. According to Tenover *et al.* (59), the PFGE technique is reliable when the number of distinct fragments is 10 or more. A total of 13 to 17 bands were observed for all isolates in this study, indicating the reliability of our PFGE results.

We were interested in determining whether the porcine isolates in our study constituted a possible source of human infection. The most frequent serotypes of porcine VTEC isolates in this study (O8:H9, O100:NM, O138:NM and O8:H19) have been rarely found in human VTEC isolates (11, 28). In addition, as observed in this study, to our knowledge O157:H7 VTEC have not been reported to date in pigs in North America, reinforcing the argument that pigs are not usually a source of *E. coli* O157:H7 infecting humans. On the other hand, serotype O18:NM, found in two porcine isolates in our study, has been also isolated from humans (56). However, the O18:NM isolates did not seem to be associated with disease in humans (24).

It has been observed that both VT1 and VT2 are generally involved in the pathogenesis of human disease, VT1 being produced less frequently (28). This observation was also noted in this study. The genes for VT2e were only found in porcine isolates in our study, suggesting a host specificity for this variant of VT2. This has also been observed in other studies (20, 32). However, some investigators have reported the presence of VT2e genes on a few occasions (19, 40, 60). Other pathotypes also seem to be associated with only one species. For instance, the fimbriae F18, usually associated with edema disease in pigs (7), was only found among porcine VTEC isolates which, interestingly, originated from diseased pigs and were mostly alpha-hemolysin positive. This observation is well documented (64). The *eae* gene was found only in human VTEC isolates in this study, agreeing with the results of other studies (10). In pig, the *eae* gene seems to be mostly present in enteropathogenic *E. coli* associated with post-weaning diarrhea (66). The *Lee*ABCD profile was observed only in *eae*-positive VTEC isolates, consistent with the finding that the genes for attaching and effacing in *E. coli* are located in this locus (33).

Little is known about the prevalence of the HlyEHEC gene in porcine VTEC. Our study showed that it is present in VTEC from both species. Indeed, two porcine isolates were positive whereas, according to Beutin *et al.* (9), HlyEHEC production

is associated with human, but not porcine VTEC isolates. The serotypes of these porcine isolates were O91:NM, a serotype that has been found in some human VTEC strains associated with HC (9, 55) and O91:H38. The pathotype of the porcine isolates was VT1-HlyEHEC. The pathotype of the human isolate was not available. Nevertheless, these porcine isolates lacked the *eae* gene and did not have a high similarity with human isolates of this study (Figure 2). Another porcine isolate was also O91:NM:VT1. Similarly, four other porcine isolates were of the serotypes O163:NM or O163:H19 and were only VT1-positive. These serotypes have also been found in human VTEC isolates (11, 56). Pradel *et al.* (42) reported that many VTEC that are associated with human disease do not carry the *eae* gene. Thus, one cannot rule out the possibility that such porcine VTEC might represent a potential source for human infection.

Human isolates positive for *eae* and the LEE locus (A,B,C,D) and for *paa* were in the same cluster (Figure 2) which would indicate that these isolates are related to each other. The *eae* gene of human isolates has mostly been associated with *paa*, as also observed by An *et al.* (3). Pupo *et al.* (43) studied the genetic relationship between different pathogenic strains of *E. coli* and found that the EHEC strains were closely related. Whereas most EHEC strains in that study belonged to the O157:H7 serotype, in the present study, relatedness was observed amongst human VTEC of different serotypes.

Beutin *et al.* (9), found that 9 out of 120 pigs (7.5%) were VTEC carriers, 25% of which were from a slaughterhouse. In the present study, 16.9 % of pig fecal samples originating from a slaughterhouse were VT-positive, agreeing with the previous study. Moreover, Ramotar *et al.* (44) found that 2.1% of human fecal specimens were positive for VTEC, consistent with the results observed in our study where we found 2.5%. However, this interpretation may be misleading because these proportions refer to positive broths and not to positive isolates. The number of verotoxin producing *E. coli* strains can be very low in stools (1) which may explain why so few positive isolates were found on VT-immunoblot and on the individual colony testing technique in our study. Moreover, the VT-immunoblot

assay was originally developed for examination of meat, and not stool samples. A limited number of the isolates which were phenotypically VT-positive in this study were VT-negative on the colony hybridization. A possible explanation may be that these isolates had lost the genes for verotoxin production. Indeed, the loss of VT genes upon subcultivation (26, 52) or storage (14) has been observed in other studies.

The high resistance for tetracycline observed in this study has also been reported for *E. coli* strains of the normal intestinal flora of pigs and humans (53, 57). This has also been observed for porcine *E. coli* isolates of the O groups 138, 139 and 141 (7). Use of antibiotics in animals may influence the prevalence of antimicrobial resistance in bacteria of the normal flora in animals, which may lead to an increase in the proportion of resistant strains among human pathogens, as seen in other studies (61).

Serotypes other than O157:H7 were found in the human VTEC isolates in this study, underlining the importance of such strains in human disease. One serotype in this study do not appear to have been previously isolated from humans (O32:H45) (11, 56). Nevertheless, currently, only the O157:H7 serotype is still sought in many hospital diagnostic laboratories, using a rapid technique with sorbitol MacConkey agar (31, 58). Unfortunately, other VTEC serotypes cannot be distinguished with this technique nor with any other method based on biochemical characteristics. More fastidious and expensive methods are needed for detection of non-O157 serotypes; consequently, their prevalence has often been overlooked (24). The recent availability of rapid molecular and immunological assays as alternatives to the VCA for detection of VTs will assist in determining the role of non-O157 VTEC in human illness.

In conclusion, VTEC isolates from humans were not associated with the porcine VTEC isolates found during the same period of time and in the same geographical area. In addition, most porcine VTEC isolates did not seem to possess the virulence factors required to infect humans. However, the possibility that certain

non-O157:H7 VTEC porcine isolates may represent a potential source of human infection cannot be neglected. Thus, it would be desirable that more emphasis be placed on isolation of VTEC serotypes other than O157:H7.

Acknowledgements

The authors wish to thank Louise Lessard, Lisette Beaudoin and Annette Deschenes for their technical help. We also thank Leslie Macdonald for the helpful assistance and Susan Read and Kim Ziebell for the serotyping. We are also indebted to the personnel of the following hospitals who participated to this study: Le Pavillon Honoré-Mercier de St-Hyacinthe, les Pavillons Ste-Marie and St-Joseph de Trois-Rivières, L'Hôtel-Dieu D'Arthabaska and L'Hôpital Ste-Croix de Drummondville.

Annie DesRosiers was supported financially by the Fonds pour la Formation des Chercheurs et l'Aide à la Recherche du Québec (FCAR) and from the Comité d'Étude et d'Administration de la Recherche (CÉDAR) funds, Université de Montréal.

REFERENCES

1. **Al-Jumaili, I., D.A. Burke, S.M. Scotland, J. Al-Mardini, and C.O. Record.** 1992. A method of enhancing verocytotoxin production by *Escherichia coli*. FEMS Microbiol. Lett. **93**:121-126.
2. **An, H.** 1998. Ph.D. thesis. Université de Montréal, Montréal. Genetic analysis of virulence determinants of attaching and effacing *Escherichia coli* strains isolated from pig and dog.
3. **An, H., J.M. Fairbrother, C. Desautels, and J. Harel.** 1999. Distribution of a novel locus called Paa (P_{orcine} A_{ttaching} and E_{ffacing} A_{ssociated}) among enteric *Escherichia coli*. Adv. Exp. Med. Biol. **473**:179-184.
4. **An, H., J.M. Fairbrother, C. Desautels, C., Mabrouk, T. Dugourd, H. Dezfulian, and J. Harel.** 2000. Presence of the LEE (locus of enterocyte effacement) in pig attaching and effacing *Escherichia coli* and characterization of *eae*, *espA*, *espB* and *espD* genes of PEPEC (pig EPEC) strain 1390. Microb. Pathog. **28**:291-300
5. **Beaudry, M., C. Zhu, J.M. Fairbrother, and J. Harel.** 1996. Genotypic and phenotypic characterization of *Escherichia coli* isolates from dogs manifesting attaching and effacing lesions. J. Clin. Microbiol. **34**:144-148.
6. **Bender, J.B., C.W. Hedberg, J.M. Besser, D.J. Boxrud, K.L. MacDonald, and M.T. Osterholm.** 1997. Surveillance for *Escherichia coli* O157:H7 infections in Minnesota by molecular subtyping. N. Engl. J. Med. **337**:388-394.
7. **Bertschinger, H.U., and C.L. Gyles.** 1994. Oedema disease of pigs, p. 193-219. In C.L. Gyles (ed.), *Escherichia coli* in domestic animals and humans. CAB International, Guelph, Canada.

8. **Bettelheim, K.A.** 1994. Biochemical characteristics of *Escherichia coli*, p. 3-30. In C.L. Gyles (ed.). *Escherichia coli* in Domestic Animals and Humans. CAB International, Guelph, Canada.
9. **Beutin, L., D. Geier, H. Steinrück, 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.
10. **Beutin, L., D. Geier, S. Zimmermann, and H. Karch.** 1995. Virulence markers of shiga-like toxin producing *Escherichia coli* strains originating from healthy domestic animals of different species. *J. Clin. Microbiol.* **33**:631-635.
11. **Boerlin, P., S. A. McEwen, F. Boerlin-Petzold, J.B. Wilson, R.P. Johnson, and C. Gyles.** 1999. Associations between virulence factors of shiga toxin-producing *Escherichia coli* and disease in humans. *J. Clin. Microbiol.* **37**:497-503.
12. **Bonnet, R., B. Souweine, G. Gauthier, C. Rich, V. Livrelli, J. Sirot, B. Joly, and C. Forestier.** 1998. Non-O157:H7 stx2-producing *Escherichia coli* strains associated with sporadic cases of hemolytic-uremic syndrome in adults. *J. Clin. Microbiol.* **36**:1777-1780.
13. **Borczyk, A.A., M.A. Karmali, H. Lior and, L.M.C Duncan.** 1987. Bovine reservoir for verotoxin-producing *Escherichia coli* O157:H7. *Lancet* **1**:98.
14. **Brooks, H.J.L., K.A. Bettelheim, B. Todd, and M.D. Holdaway.** 1997. Non-O157 Vero cytotoxin producing *Escherichia coli*: aetiological agents of diarrhoea in children in Dunedin, New Zealand. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* **20**:163-170.

15. **Caprioli, A., A. Nigrelli, R. Gatti, and M. Zavanella.** 1993. Isolation of verotoxin-producing *Escherichia coli* from slaughtered pigs. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **12**:227-228.
16. **Caya, F., J.M. Fairbrother, L. Lessard and, S. Quessy.** 1999. Characterization of the risk to human health of pathogenic *Escherichia coli* isolates from chicken carcasses. *J. Food. Protect.* **1**:741-746.
17. **Dozois C.M., J.M. Fairbrother, J. Harel, and M. Bossé.** 1992. pap- and pil-related DNA sequences and other virulence determinants associated with *Escherichia coli* isolated from septicemic chickens and turkeys. *Infect. Immun.* **60**:2648-2656.
18. **Edwards, P.R., and W.H. Ewing.** 1962. Identification of Enterobacteriaceae, 2nd Ed., Burgess Publishing Co., Minneapolis.
19. **Franke, S., D. Harmsen, A. Caprioli, D. Piérard, L. H. Wieler, and H. Karch.** 1995. Clonal relatedness of shiga-like toxin-producing *Escherichia coli* O101 strains of human and porcine origin. *J. Clin. Microbiol.* **33**:3174-3178.
20. **Gannon, V.P.J., C.L. Gyles, and R.W. Friendship.** 1988. Characteristics of verotoxigenic *Escherichia coli* from pigs. *Can. J. Vet. Res.* **52**:331-337.
21. **Gannon, V.P.J., C. Teerling, S.A. Masri, and C.L. Gyles.** 1990. Molecular cloning and nucleotide sequence of another variant of the *Escherichia coli* shiga-like toxin II family. *J. Gen. Microbiol.* **136**:1125-1135.
22. **Imberechts, H., H. De Greve, C. Schlicker, H. Bouchet, P. Pohl, G. Charlier, H. Bertschinger, P. Wild, J. Vandekerckhove, J. Van Damme, M. Van Montagu, and P. Lintermans.** 1992. Characterization of F107 fimbriae of *Escherichia coli* 107/86, which causes edema disease in pigs, and nucleotide

- sequence of the F107 major fimbrial subunit gene, *fedA*. *Infect. Immun.* **60**:1963-1971.
- 23. Ito, H., A. Terai, H. Kurazono, Y. Takeda, and M. Nishibuchi.** 1990. Cloning and nucleotide sequencing of vero toxin 2 variant genes from *Escherichia coli* O91:H21 isolated from a patient with the hemolytic uremic syndrome. *Microb. Pathogen.* **8**:47-60.
- 24. Johnson, R.P., R.C. Clarke, J.B. Wilson, S.C. Read, K. Rahn, S.A. Renwick, K.A. Sandhu, D. Alves, M.A. Karmali, H. Lior, S.A. McEwen, J.S. Spika, and C.L. Gyles.** 1996. Growing concerns and recent outbreaks involving non-O157:H7 serotypes of verotoxigenic *Escherichia coli*. *J. Food. Protect.* **59**:1112-1122.
- 25. Johnson, R. P.** 1998. Verotoxin immunoblot assay for the identification of verotoxin-producing *Escherichia coli* in meat, fecal and water samples. Health Canada, June 1998.
- 26. Karch, H., T. Meyer, H. Rüssmann, and J. Heesemann.** 1992. Frequent loss of shiga-like toxin genes in clinical isolates of *Escherichia coli* upon subcultivation. *Infect. Immun.* **60**:3464-3467.
- 27. Karmali, M.A., B.T. Steele, M. Petric, and C. Lim.** 1983. Sporadic cases of haemolytic-uraemic syndrome associated with faecal cytotoxin and cytotoxin-producing *Escherichia coli* in stools. *Lancet* **19**:619-620.
- 28. Karmali, M.A.** 1989. Infection by verocytotoxin-producing *Escherichia coli*. *Clin. Microbiol. Rev.* **2**:15-38.
- 29. Lin, Z., H. Kurazono, S. Yamasaki, and Y. Takeda.** 1993. Detection of various variants verotoxin genes in *Escherichia coli* by polymerase chain reaction. *Microbiol. Immunol.* **37**:543-548.

30. **Mann, E.** 1994. Méthode de détection d'*Escherichia coli* producteur de vérocytotoxine dans des échantillons de viandes crues ou cuites (version 2.0). Protocole officiel de la Direction de l'hygiène vétérinaire et de la défense des végétaux, Octobre 1994, Guelph, Canada.
31. **March, S.B., and S. Ratnam.** 1986. Sorbitol-MacConkey medium for detection of *Escherichia coli* O157:H7 associated with hemorrhagic colitis. J. Clin. Microbiol. **23**:869-872.
32. **Marques, L.R.M., J.S.M. Peiris, S.J. Cryz, and A.D. O'Brien.** 1987. *Escherichia coli* strains isolated from pigs with edema disease produce a variant of shiga-like toxin II. FEMS Microbiol. Lett. **44**:33-38.
33. **McDaniel, T.K., K.G. Jarvis, M.S. Donnenberg, and J.B. Kaper.** 1995. A genetic locus of enterocyte effacement conserved among diverse enterobacterial pathogens. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **92**:1664-1668.
34. **Meyer, T., H. Karch, J. Hacher, H. Bocklage, and J. Heesemann.** 1992. Cloning and sequencing of a shiga-like toxin II-related gene from *Escherichia coli* O157:H7 strain 7279. Zbl. Bakteriologie. **276**:176-188.
35. **National Committee for Clinical Laboratory Standards.** 1997. Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals; Tentative standard [Document M31-T] Vol. 17 No.11. NCCLS, Wayne.
36. **O'Brien, A.D., and J.B. Kaper.** 1998. Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: yesterday, today, and tomorrow, p.1-11. In O'Brien, A.D. and J.B. Kaper (ed.), *Escherichia coli* O157:H7 and other shiga toxin-producing *E. coli* strains. ASM Press, Washington, D.C.

- 37. Oswald, E., P. Pohl, E. Jacquemin, P. Lintermans, K. Van Muylem, A.D. O'Brien, and J. Mainil.** 1994. Specific DNA probes to detect *Escherichia coli* strains producing cytotoxic necrotising factor type 1 or type 2. *J. Med. Microbiol.* **40**:428-434.
- 38. Pai, C.H., N. Ahmed, H. Lior, W.M. Johnson, H.V. Sims, and D.E. Woods.** 1988. Epidemiology of sporadic diarrhea due to verocytotoxin-producing *Escherichia coli*: a two-year prospective study. *J. Infect. Dis.* **157**:1054-1057.
- 39. Paton, A.W., J.C. Paton, M.W. Heuzenroeder, P.N. Goldwater, and P.A. Manning.** 1992. Cloning and nucleotide sequence of a variant shiga-like toxin II gene from *Escherichia coli* OX3:H21 isolated from a case of sudden infant death syndrome. *Microb. Pathogen.* **13**:225-236.
- 40. Piérard, D., L. Huyghens, S. Lauwers, and H. Lior.** 1991. Diarrhoea associated with *Escherichia coli* producing porcine oedema disease verotoxin. *Lancet* **338**:762.
- 41. Piérard, D., D. Stevens, L. Moriau, H. Lior, and S. Lauwers.** 1997. Isolation and virulence factors of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* in human stool samples. *Clin. Microbiol. Infect.* **3**:531-540.
- 42. Pradel, N., V. Livrelli, C. De Champs, J.-B. Palcoux, A. Reynaud, F. Scheutz, J. Sirot, B. Joly and, C. Forestier.** 2000. Prevalence and characterization of shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from cattle, food, and children during a one-year prospective study in France. *J. Clin. Microbiol.* **38**:1023-1031.
- 43. Pupo, G.M, D.K.R Karaolis, R. Lan, and P.R. Reeves.** 1997. Evolutionary relationships among pathogenic and nonpathogenic *Escherichia coli* strains inferred from multilocus enzyme electrophoresis and *mdh* sequence studies. *Infect. Immun.* **65**: 2685-2692.

44. **Ramotar, K., E. Henderson, R. Szumski, and T.J. Louie.** 1995. Impact of free verotoxin testing on epidemiology of diarrhea caused by verotoxin-producing *Escherichia coli*. *J. Clin. Microbiol.* **33**:1114-1120.
45. **Read, S.C., C.L. Gyles, R.C. Clarke, H. Lior, and S. McEwen.** 1990. Prevalence of verocytotoxigenic *Escherichia coli* in ground beef, pork, and chicken in southwestern Ontario. *Epidemiol. Infect.* **105**:11-20.
46. **Renwick, S.A., J.B. Wilson, R.C. Clarke, H. Lior, A.A. Borczyk, J. Spika, K. Rahn, K. McFadden, A. Brouwer, A. Copps, N.G. Anderson, D. Alves, and M.A. Karmali.** 1994. Evidence of direct transmission of *Escherichia coli* O157:H7 infection between calves and a human. *J. Infect. Dis.* **168**:792-793.
47. **Riley, L.W., R.S. Remis, S.D. Helgerson, H.B. McGee, J.G. Wells, B.R. Davis, R.J. Hebert, E.S. Olcott, L.M. Johnson, N.T. Hargrett, P.A. Blake, and M.L. Cohen.** 1983. Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. *N. Engl. J. Med.* **308**:681-685.
48. **Rios, M., V. Prado, M. Trucksis, C. Arellano, C. Borie, M. Alexandre, A. Fica, and M. M. Levine.** 1999. Clonal diversity of Chilean isolates of enterohemorrhagic *Escherichia coli* from patients with hemolytic-uremic syndrome, asymptomatic subjects, animal reservoirs, and food products. *J. Clin. Microbiol.* **37**:778-781.
49. **Salyers, A.A., and D.D. Whitt.** 1994. *Escherichia coli* gastrointestinal infection, p. 190-204. In Salyers, A.A., and D.D. Whitt (ed.), *Bacterial pathogenesis : a molecular approach*. ASM Press, Washington, DC.
50. **Samadpour, M., J.E. Ongerth, J. Liston, N. Tran, D. Nguyen, T.S. Whittam, R.S. Wilson, and P.I. Tarr.** 1994. Occurrence of shiga-like toxin-producing *Escherichia coli* in retail fresh seafood, beef, lamb, pork and poultry from grocery stores in Seattle, Washington. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**:1038-1040.

- 51. Sandhu, K.S., R.C. Clarke, and C.L.Gyles.** 1997. Hemolysin phenotypes and genotypes of *eaeA*-positive and *eaeA*-negative bovine verotoxigenic *Escherichia coli*, p.295-302. In Paul P. S., D. H. Francis, and D. A. Benfield (ed.), Mechanisms in the pathogenesis of enteric disease. Plenum Press, New York.
- 52. Schmidt, H., M. Montag, J. Bockemühl, J. Heesemann, and H. Karch.** 1993. Shiga-like toxin II-related cytotoxins in *Citrobacter freundii* strains from humans and beef samples. *Infect. Immun.* **61**:534-543.
- 53. Schmidt, H., J. von Maldeghem, M. Frosch, and H. Karch.** 1998. Antibiotic susceptibilities of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 and non-O157 strains isolated from patients and healthy subjects in Germany during 1996. *J. Antimicrob. Chemother.* **42**:548-550.
- 54. Schmitt, C.K., M.L. McKee and, A.D. O'Brien.** 1991. Two copies of shiga-like toxin II-related genes common in enterohemorrhagic *Escherichia coli* strains are responsible for the antigenic heterogeneity of the O157:H- Strain E32511. *Infect. Immun.* **59**:1065-1073.
- 55. Smith, H.R., and S.M. Scotland.** 1988. Vero cytotoxin producing strains of *Escherichia coli*. *J. Med. Microbiol.* **26**:77-85.
- 56. Strockbine, N.A., J.G. Wells, C.A. Bopp, and T.J. Barrett.** 1998. Overview of detection and subtyping methods, p.331-356. In O'Brien, A.D., and J.B. Kaper (ed.), *Escherichia coli* O157:H7 and other shiga toxin-producing *E. coli* strains. ASM Press, Washington, D.C.
- 57. Sunde, M., K. Fossum, A. Solberg, and H. Sorum.** 1998. Antibiotic resistance in *Escherichia coli* of the normal intestinal flora of swine. *Microb. Drug Resist.* **4**:289-299.

58. **Tarr, P.I.** 1995. *Escherichia coli* O157:H7: clinical, diagnostic, and epidemiological aspects of human infection. *Clin. Infect. Dis.* **20**:1-10.
59. **Tenover, F.C., R.D. Arbeit, R.V. Goering, P.A. Mickelsen, B.E. Murray, D.H. Persing, and B. Swaminathan.** 1995. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J. Clin. Microbiol.* **33**: 2233-2239.
60. **Thomas, A., T. Cheasty, H. Chart, and B. Rowe.** 1994. Isolation of Vero cytotoxin-producing *Escherichia coli* serotypes O9ab:H⁻ and O101:H⁻ carrying VT2 variant gene sequences from a patient with haemolytic uraemic syndrome. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **13**:1074-1076.
61. **Van den Bogaard, A.E., and E.E. Stobberingh.** 1999. Antibiotic usage in animals: impact on bacterial resistance and public health. *Drugs* **58**:589-607.
62. **Watanabe H., A. Wada, Y. Inagaki, K. Itoh, and K. Tamura.** 1996. Outbreaks of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 infection by two different genotype strains in Japan. *Lancet* **348**:831-832.
63. **Weinstein, D.L., M.P. Jackson, J.E. Samuel, R.K Holmes, and A.D. O'Brien.** 1988. Cloning and sequencing of a shiga-like toxin II variant from an *Escherichia coli* strain responsible for edema disease of swine. *J. Bacteriol.* **170**:4223-4230.
64. **Welch, R.A.** 1994. Holistic perspective on the *Escherichia coli* hemolysin, p. 351-364. *In* Miller, V.L., J.B. Kaper, D.A. Portnoy, and R.R. Isberg (ed.), *Molecular genetics of bacterial pathogenesis*. ASM Press, Washington, DC.
65. **Yamasaki, S., Z. Lin, H. Shirai, A. Terai, Y. Oku, H. Ito, M. Ohmura, T. Karasawa, T. Tsukamoto, H. Kurazono, and Y. takeda.** 1996. Typing of verotoxins by DNA colony hybridization with poly- and oligonucleotide probes, a

bead-enzyme-linked immunosorbent assay, and polymerase chain reaction. *Microbio. Immunol.* **40**: 345-352.

- 66. Zhu, C., J. Harel, M. Jacques, C. Desautels, M.S. Donnenberg, M. Beaudry, and J.M. Fairbrother.** 1994. Virulence properties and attaching-effacing activity of *Escherichia coli* O45 from swine post-weaning diarrhea. *Infect. Immun.* **63**:4153-4159.

TABLE 1. Antimicrobial resistance of human and porcine VT-positive *E. coli* isolates.

Antimicrobial agent	Disk Concentration	Number of resistant isolates (%)		
		Human (n=10)	Porcine (n=33)	Porcine ^a (n=34)
Cefoxitin	30 µg	0	0	0
Ceftiofur	30 µg	0	0	0
Enrofloxacin	5 µg	0	0	0
Amoxicillin / clavulanic acid	30 µg	0	1 (3.0)	0
Apramycin	15 µg	0	3 (9.1)	1 (2.9)
Chloramphenicol	30 µg	0	6 (18.2)	0
Cephalothin	30 µg	0	6 (18.2)	1 (2.9)
Ampicillin	10 µg	0	12 (36.4)	2 (5.9)
Gentamicin	10 µg	1 (10.0)	4 (12.1)	3 (8.8)
Neomycin	30 µg	2 (20.0)	6 (18.2)	8 (23.5)
Tetracycline	30 µg	2 (20.0)	29 (87.9)	30 (88.2)
Trimethoprim/ Sulfamethoxazole	25 µg	2 (20.0)	2 (6.1)	3 (8.8)

^a Porcine isolates from a previous period than that of the study

TABLE 2. Antimicrobial resistance patterns in human and porcine VT-positive *E. coli* isolates.

Resistance pattern ^a	Number of isolates		
	Human (n=10)	Porcine (n=33)	Porcine ^b (n=34)
TET	0	15	16
NEO-TET	0	2	4
AMP-CEF-NEO-TET-SXT-CHL	0	2	0
AMP-CEF-TET	0	2	0
AMP-TET	0	2	0
TET-CHL	0	0	2
TET-SXT	0	0	2
AMP-CEF-TET-AMC	0	1	0
AMP-GEN-TET	0	1	0
AMP-NEO-TET	0	1	1
AMP-NEO-TET-CHL	0	1	0
AMP-NEO-TE-SXT	0	0	1
APR-GEN-NEO-TET-CHL	0	0	1
APR-GEN-TET	0	1	0
CEF	0	1	0
CEF-GEN-TET	0	1	0
CEF-TET	0	0	1
GEN-NEO-TET	0	0	1
GEN-NEO-TET-SXT	1	0	0
GEN-TET	0	0	1
NEO-TET-SXT	1	0	0
TOTAL:	2 (20.0%)	30 (90.9%)	30 (88.2%)

^a FOX, cefoxitin; XNL, ceftiofur; ENR, enrofloxacin; AMC, amoxicilin/clav. acid; APR, apramycin; CHL, chloramphenicol; CEF, cephalothin; AMP, ampicillin; GEN, gentamicin; NEO, neomycin; TET, tetracycline; SXT, trimethoprim/sulfamethoxazole

^b Porcine isolates from a previous period than that of the study

TABLE 3. Serotypes and pathotypes of human and porcine VT-positive *E. coli* isolates.

Serotype	Pathotype	Number of positive isolates (%)		
		Human (n=10)	Porcine (n=33)	Porcine ^a (n=34)
O7:H4	VT2vx	1 (10.0)	0	0
O8:H9	VT2	0	1 (3.0)	0
	VT2e	0	3 (9.1)	7 (20.6)
	VT2e- <i>paa</i>	0	0	1 (2.9)
O8:H19	VT1-VT2-HlyEHEC	1 (10.0)	0	0
	VT2e	0	2 (6.1)	3 (8.8)
O8:NM	VT2e	0	1 (3.0)	0
O9:NM	VT2vx	0	1 (3.0)	0
O18:NM	VT2e	0	0	2 (5.9)
O20:NM	VT2e	0	1 (3.0)	2 (5.9)
O26:H11	VT1-LeeABCD- <i>eae-paa</i> -HlyEHEC	1 (10.0)	0	0
O32:H45	VT2vx	1 (10.0)	0	0
O35:H1	VT2vx-F18-Hly	0	1 (3.0)	0
O36:NM	VT2vx-Hly	0	1 (3.0)	0
O45:H2	VT1-LeeABCD- <i>eae-paa</i> -HlyEHEC	1 (10.0)	0	0
O65:NM	VT2e-F18-Hly	0	1 (3.0)	0
O80:NM	VT2vx-LeeABCD- <i>eae</i>	1 (10.0)	0	0
O91:H38	VT1-HlyEHEC	0	1 (3.0)	0
	VT1	0	1 (3.0)	0
O91:NM	VT1-HlyEHEC	0	1 (3.0)	0
	VT2e	0	1 (3.0)	8 (23.5)
	VT2vx	0	0	1 (2.9)
O103:H2	VT1-LeeABCD- <i>eae-paa</i> -HlyEHEC	1 (10.0)	0	0
	VT2e-F18-Hly	0	1 (3.0)	0
O121:H10	VT2e-F18	0	1 (3.0)	0
	VT1-VT2-LeeABCD- <i>eae-paa</i>	1 (10.0)	0	0
	VT2-LeeABCD- <i>eae-paa</i>	1 (10.0)	0	0
O138:NM	VT2e	0	4 (12.1)	3 (8.8)
	VT2vx	0	1 (3.0)	0
O139:NM	VT2e-F18-Hly	0	2 (6.1)	0
O142:NM	VT2e-F18-Hly	0	2 (6.1)	0
	VT2vx-Hly	0	1 (3.0)	0
O159:NM	VT2vx	0	2 (6.1)	0
O163:NM	VT1	0	0	2 (5.9)
O163:H19	VT1	0	0	2 (5.9)
O165:NM	VT2vx-LeeABCD- <i>eae-paa</i>	1 (10.0)	0	0
O?:H42	VT2e-Hly	0	0	1 (2.9)
O?:NM	VT2e	0	3 (9.1)	2 (5.9)

* Porcine isolates from a previous period than that of the study

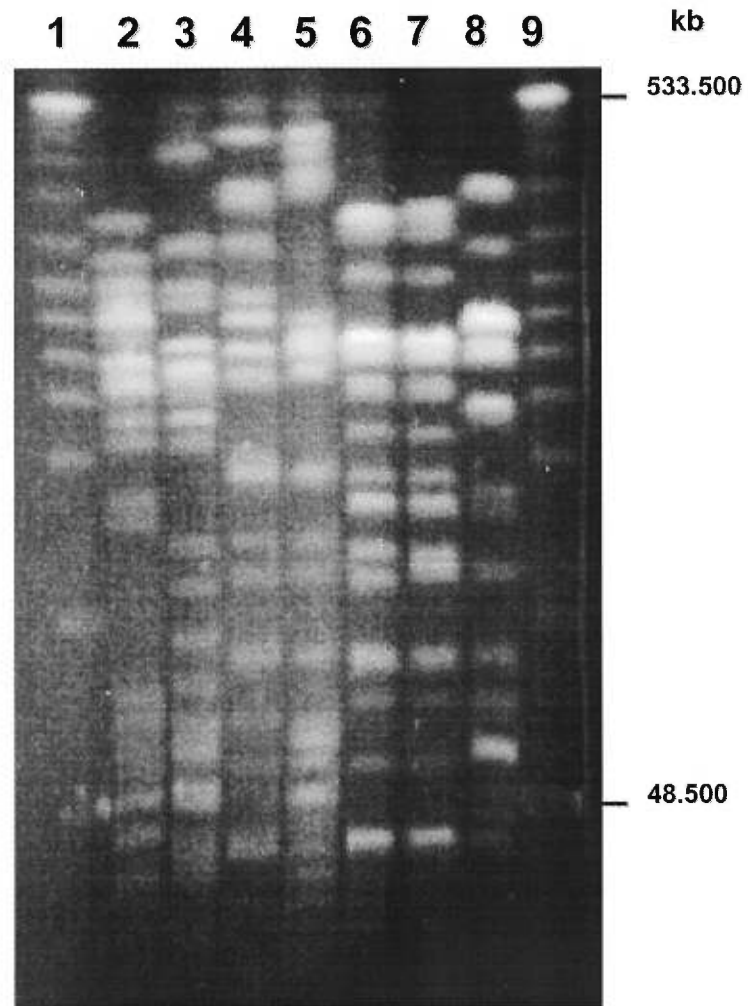


FIGURE 1. Pulsed-field gel electrophoresis of representative isolates. Lanes 1 and 9, molecular weight marker (lambda ladder); Lane 2, *E. coli* ATCC 25922 control strain; Lanes 3 to 5, human isolates; Lanes 6 to 8: porcine isolates.

Coefficient: Dice Algorithm: UPGMA

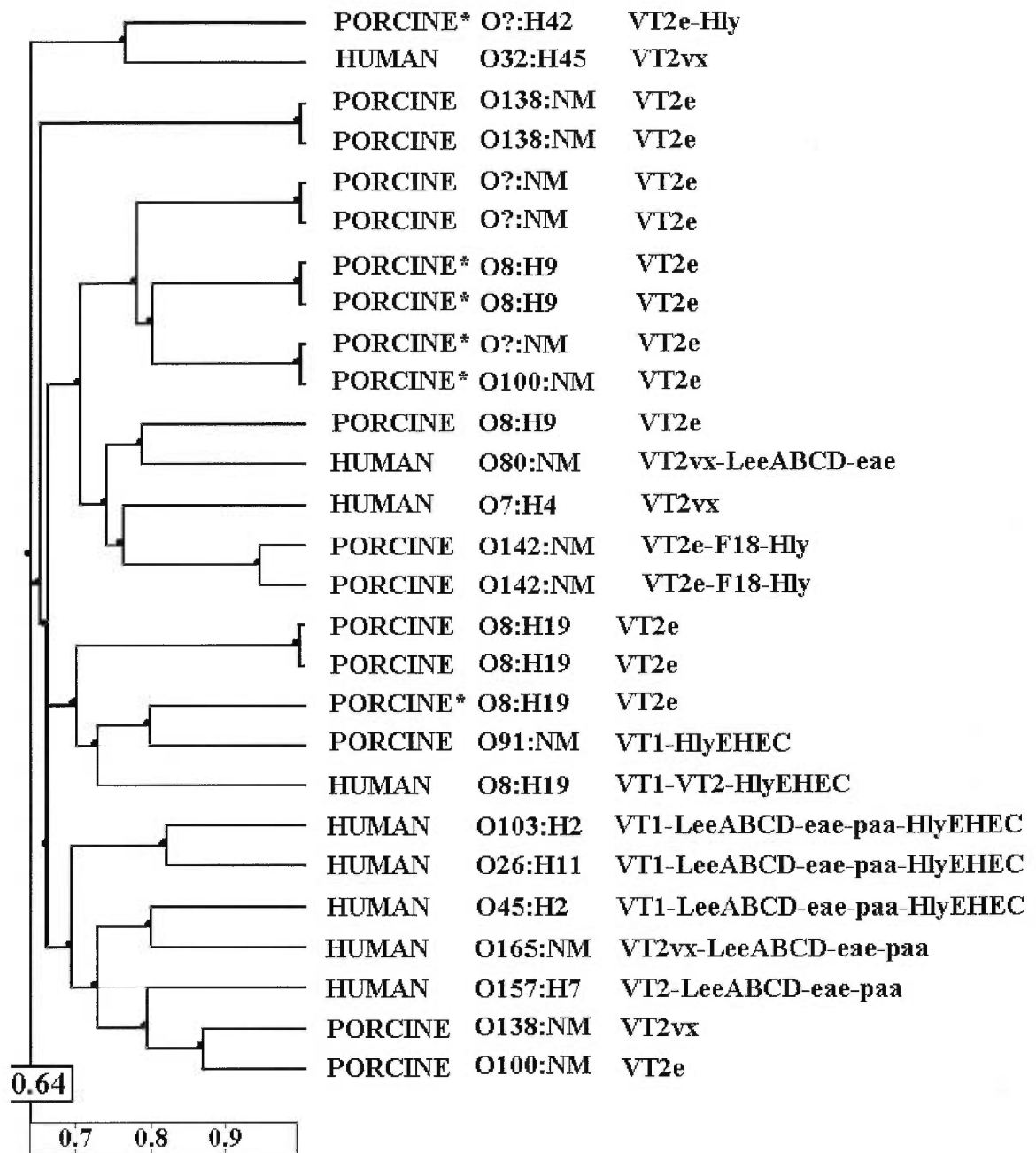


FIGURE 2. Dendrogram showing the relatedness between representative human and porcine *E. coli* isolates.

* Porcine isolates from a previous period than that of the study

IV- DISCUSSION ET CONCLUSIONS

Un des objectifs majeurs de cette étude était de déterminer l'importance des souches d'origine porcine dans la transmission possible à l'homme d'*Escherichia coli* productrices de vérotoxines (VTEC), en portant une attention particulière aux sérotypes autres que le O157:H7. En effet, ces dernières années, plusieurs cas de diarrhées, de syndromes urémiques hémolytiques (HUS) et de colites hémorragiques (HC) ont été associés à des souches VTEC (86, 90). Dans la grande majorité des cas, les cas rapportés ont été reliés à la consommation ou à l'exposition à des produits carnés d'origine bovine (17, 88, 90).

Or, de telles souches ont également été retrouvées dans les fèces et produits de porcs (22, 87, 91). Toutefois, aucune évidence de transmission directe à l'humain de VTEC porcins n'a été démontrée jusqu'à présent. Néanmoins, plusieurs questions demeurent quant à la contamination possible de l'humain par des souches porcines suite à la consommation de produits de porcs ou encore par contact direct ou indirect avec l'animal ou son produit.

Il est bien connu que le sérotype le plus souvent impliqué dans les cas de HC en Amérique du Nord chez l'humain est O157:H7 (108). Il y a également des isolats d'autres sérotypes qui ont été trouvés responsables de HUS et HC chez l'humain (15, 65). Ces sérotypes ne sont toutefois pas recherchés par tous les laboratoires des centres hospitaliers qui se limitent parfois seulement à la recherche des souches O157:H7 (70). À notre connaissance, le sérotype O157:H7 n'a pas encore été rapporté chez les porcs en Amérique du Nord. La source des infections humaines causées par des souches de sérotypes autres que O157:H7 étant plus ou moins connue, il nous apparaissait donc nécessaire de mieux caractériser les isolats de ces deux espèces afin d'évaluer le danger pour l'humain associé aux souches VTEC porcines.

Différentes méthodes de caractérisation des souches peuvent être utilisées afin d'établir ou non un lien entre différents isolats (26). Dans la présente étude, deux méthodes de caractérisation phénotypique ont été utilisées, soit la sensibilité aux antimicrobiens et la sérotypie. Deux méthodes génotypiques ont également

été utilisées (sondes génétiques et électrophorèse sur gel en champs pulsés) afin de mieux préciser la parenté génétique entre les isolats.

Des 620 échantillons de fèces porcines, 105 (16,9%) se sont révélés positifs pour la production de vérotoxine à l'aide du test des cellules Véro. En comparaison, une étude de Beutin et al. (10) où la même technique fut utilisée, a permis de détecter des VTEC chez 25% des porcs à l'abattoir. Parmi les échantillons de fèces humaines, 34 échantillons sur un total de 1352 (2,1%) étaient positifs pour la production de vérotoxines. Un pourcentage similaire a été trouvé par Ramotar *et al.* (86). Toutefois, cette évaluation de la prévalence des isolats positifs à la vérotoxine peut être biaisée car le pourcentage retrouvé dans notre étude représente le nombre de bouillons positifs et non d'isolats positifs.

Il a été observé que certains isolats qui étaient phénotypiquement positifs aux vérotoxines se sont révélés négatifs par la technique d'hybridation sur colonies. La perte des gènes codant pour les vérotoxines a déjà été rapportée suite à des ensemencements successifs (60, 97) ou encore suite à la conservation des souches (18, 109). Un tel phénomène pourrait s'être produit avec des isolats de cette étude. Les gènes pour la vérotoxine sont situés sur des bactériophages tempérés en ce qui concerne VT1 et VT2 (102, 127, 128) alors que les gènes pour VT2e sont situés sur un plasmide (65). Les gènes situés sur des plasmides ou transférés par l'intermédiaire d'un bactériophage sont plus susceptibles de se propager que les gènes présents sur le chromosome (3, 79). Cela pourrait expliquer en partie la perte des gènes pour les vérotoxines de certains isolats humains et porcins.

Les méthodes utilisées pour l'isolement des colonies positives étaient la méthode d'immunobuvardage et la méthode d'isolement des colonies individuelles à l'aide des cellules Véro. La première technique utilisée fut l'immunobuvardage et elle n'a permis d'isoler qu'un très faible nombre de colonies positives. Cette méthode a semblé par contre donner de meilleurs résultats avec les échantillons

humains où près du tiers des échantillons positifs pour la vérotoxine ont pu être isolés.

Par la suite, la méthode d'isolement des colonies individuelles à l'aide des cellules Véro a permis d'obtenir des isolats porcins supplémentaires. Selon Al-Jumaili *et al.* (1), le nombre de VTEC présents dans les fèces peut être très bas. Cela pourrait expliquer pourquoi les deux techniques n'ont pas permis l'isolement de beaucoup de colonies. Dans la technique d'immunobuvardage, une série de dilutions étaient effectuées afin de pouvoir appliquer sur la gélose à tester le bouillon contenant juste assez de colonies pour qu'elles puissent être retracées. La présence d'un faible pourcentage de VTEC dans un bouillon contenant une population mixte de *E. coli* a probablement contribué à ne pas faire ressortir les colonies positives pour la vérotoxine (18, 130). Dans le cas de l'isolement des colonies individuelles à l'aide de cellules Véro, seulement 10 à 12 colonies ainsi qu'une strie de colonies étaient testées. Il se pourrait donc que des colonies positives n'aient pas été testées. Aussi, seule une faible quantité de bouillon était appliquée sur la gélose à tester ce qui limite la possibilité de sélectionner une colonie positive. D'autre part, l'ajout d'une étape d'extraction à l'aide, par exemple, de la polymixine B ou de tout autre antibiotique utilisé à cet effet, aurait pu aider à augmenter la sécrétion de la toxine pour sa détection (1).

La sensibilité à divers antimicrobiens a été testée sur les isolats porcins et humains étant donné que l'augmentation de la résistance aux antibiotiques est un phénomène qui inquiète de plus en plus la communauté scientifique. Aucun isolat porcine ne possédait le même profil de résistance aux antimicrobiens que les isolats humains (Tableau 2). Il ne semble donc pas que les isolats porcins soient impliqués dans la transmission de la résistance aux antimicrobiens aux isolats humains.

L'utilisation d'antibiotiques en médecine vétérinaire, et plus particulièrement comme facteur de croissance, a été associée à une augmentation de la résistance chez les animaux et les humains (84, 122, 124). Il serait intéressant de vérifier si

les résistances observées dans cette étude sont le reflet d'un usage accru d'antibiotique pour l'espèce concernée. En médecine humaine, l'utilisation d'antibiotiques pour traiter les cas de diarrhées causées par les souches VTEC est controversé (65). Un traitement aux antibiotiques aurait même pour effet d'augmenter la production de vérotoxines (93). D'autres antimicrobiens tels la polymyxine B ou la mitomycine C ont également un effet sur la production de vérotoxines (1, 62).

Dans notre étude, la résistance à la tétracycline a été observée chez un grand nombre d'isolats porcins (Tableau 1). Une telle résistance a également été rapportée dans diverses études pour des isolats de la flore intestinale normale de l'humain et du porc (100, 114). Cela a également été rapporté pour des isolats porcins des sérogroupes O138, O139 et O141 (7). D'autre part, la présence de souches résistantes à la néomycine chez l'humain pourrait soulever des interrogations puisque l'utilisation parentérale de la néomycine n'est pas répandue étant donné sa très forte toxicité (89). Cependant, l'usage topique de préparations contenant de la néomycine pourrait avoir contribué à l'augmentation à travers le monde de la résistance à cet antibiotique, notamment par les souches de *E. coli* (89).

Il aurait été intéressant de pouvoir vérifier si la proportion des isolats résistants obtenue dans notre étude est la même que celle obtenue dans d'autres études. Dans la présente étude, il manquait cependant des données concernant les isolats humains pour les souches VTEC autres que O157:H7. De plus, pour les souches porcines, il n'y a aucune distinction pour les souches VTEC et la littérature traite plutôt de *E. coli* en général (36, 37, 104, 122).

Une technique d'agglutination sur lame (40) a été utilisée pour les isolats humains et porcins afin de déterminer les différents sérotypes et de vérifier si certains sérotypes sont retrouvés chez les deux espèces. Seul le sérotype O8:H19 fut retrouvé chez l'humain et le porc (Tableau 3). Cependant, le pathotype de l'isolat humain (VT1-VT2-HlyEHEC) n'était pas le même que celui des isolats

porcins (VT2e). De plus, jusqu'à présent, le sérotype O8 n'a pas été associé à des infections humaines (94).

Les sérotypes les plus fréquents chez le porc étaient O8:H9, O100:NM, O138:NM et O8:H19 (Tableau 3). Ces sérotypes ne sont habituellement pas associés aux souches humaines (65). De plus, aucun isolat n'appartenait au sérotype O157:H7, le sérotype le plus fréquemment associé aux infections humaines en Amérique du Nord (108).

Parmi les autres sérotypes présents chez les isolats porcins, certains sérotypes ont été observés également chez des souches humaines. Le sérotype O18:NM, présent chez deux isolats porcins dans cette étude, a également été isolé précédemment de souches humaines (112). Cependant, il ne semble pas associé à des maladies chez l'humain (57). D'autres isolats porcins appartenait au sérotype O91:NM, un sérotype qui a été associé à des cas de HC chez les humains (10, 106). Ces isolats possèdent le pathotype VT1-HlyEHEC et VT1. Ils ne possèdent toutefois pas le gène *eae* codant pour l'intimine et ne possèdent également pas une grande parenté avec les isolats humains sur le dendrogramme (Figure 2). Deux isolats porcins de sérotype O163:NM et deux autres de sérotype O163:H19 possédant le pathotype VT1 seulement, sont aussi d'un sérotype qui a déjà été isolé chez l'humain (14, 112). Il a été observé que ces isolats ne possèdent pas non plus le gène *eae* mais peuvent représenter un risque puisque Pradel *et al.* (83) ont décrit l'existence de VTEC associés à des cas d'infections chez l'humain et qui ne possédaient pas ce gène.

Le sérotype le plus souvent retrouvé chez les isolats humains était le sérotype O157:H7, avec deux isolats (Tableau 3). Cependant, la majorité des autres isolats étaient d'un sérotype autre que O157:H7 démontrant ainsi l'importance des autres sérotypes chez l'humain. De plus, un sérotype (O32:H45) ne semble pas avoir été isolé jusqu'à présent chez l'humain (14, 112).

Présentement, le sérotype O157:H7 est le seul recherché dans les laboratoires des hôpitaux, à l'aide d'une technique rapide et efficace avec une gélose MacConkey-Sorbitol (70, 78). Les autres sérotypes ne possèdent pas de caractéristiques biochimiques qui permettraient de les distinguer à l'aide de ce type de gélose. Des méthodes plus coûteuses et laborieuses sont nécessaires afin de distinguer les sérotypes autres que O157:H7.

Une technique d'hybridation sur colonie et de PCR ont été utilisées afin de détecter la présence de facteurs de virulence. Nous voulions vérifier si les mêmes facteurs de virulence étaient rencontrés chez les isolats humains et porcins. De façon générale, les isolats humains et porcins ne possédaient pas les mêmes pathotypes à l'exception de certains isolats qui étaient positifs pour VT2vx (Tableau 1, Annexe 1). Cependant, comme nous ne savons pas lequel des variants de VT2 ils produisent, il est donc impossible de savoir s'il s'agit d'isolats différents ou non. Les sérotypes des isolats humains ayant ce pathotype (O7:H4 et O32:H45) n'étaient cependant pas les mêmes que ceux des isolats porcins (O9:NM, O100:NM, O138:NM et O159:NM), ce qui laisse croire que les isolats humains et porcins ne sont pas reliés. D'autre part, il faut souligner qu'aucun des isolats de notre étude ne possédait les gènes pour CNF. La très grande majorité des souches porcines de notre étude provenant de porcs sains ou atteints de diarrhée, il est possible que ce facteur soit surtout associé aux souches septicémiques, bien que la présence ce facteur soit rapportée chez des souches non septicémiques (23, 42).

Les gènes codant pour VT1 et VT2 sont généralement impliqués dans la pathogénie des infections chez l'humain, VT1 étant produit moins fréquemment (65), ce qui a été observé aussi dans la présente étude (Tableau 1, Annexe 1). Aucun isolat humain ne possédait le gène VT2e. Cependant, sa présence parmi les isolats humains a été rapportée à plusieurs reprises dans la littérature (80, 81, 109, 118). Aussi, Franke *et al.* (45) ont observé une grande similarité entre les gènes VT2e d'un isolat humain (O101:H9) et ceux d'isolats porcins associés à la maladie de l'oedème.

Certains facteurs de virulence ont été retrouvés chez les isolats humains seulement (Tableau 1, Annexe 1). Le gène *eae* a été retrouvé surtout chez les isolats humains, ce qui corrobore les résultats d'autres études où le gène semblait exprimé chez les VTEC humains seulement (57). Ce gène peut être présent chez des isolats porcins mais il est présent plutôt chez les isolats d'*E. coli* entéropathogènes associés à la diarrhée post-sevrage (132). En ce qui concerne le profil *paa*, il semble que sa présence soit reliée à la présence du gène *eae* chez les isolats humains, tel que décrit par An *et al.* (2). Aussi, le profil LeeABCD a été retrouvé également chez les isolats humains seulement où il était associé fortement aux isolats positifs pour le gène *eae*. Cela est en accord avec les travaux de McDaniel *et al.* (72) qui ont trouvé que ces gènes sont situés dans le locus LEE. Enfin, le gène pour l'hémolysine EHEC semblait présent surtout chez les isolats humains positifs pour le gène *eae*. Cela a également été observé dans d'autres études (14, 83).

Les gènes pour VT2e ont été retrouvés seulement chez les isolats porcins (Tableau 1, Annexe 1). Ceci suggère une spécificité de l'hôte pour ce variant de VT2 (46, 71), à l'exception des rares cas discutés ci-haut qui ont été observés chez l'humain. La présence du fimbriae F18, habituellement associée aux cas de maladie de l'œdème chez le porc (7), a également été rapportée uniquement chez des isolats porcins. Ces isolats provenaient de porcs malades et étaient le plus souvent positifs pour l'hémolysine alpha, ce qui a été observé aussi dans d'autres études (126).

Il est intéressant de remarquer qu'on a observé la présence du gène HlyEHEC chez un isolat porcin (O91:NM VT1-HlyEHEC) (Tableau 1, Annexe 1). Ce gène est retrouvée habituellement chez les souches humaines et ne semble pas exprimé chez les souches provenant du porc (10, 12). Cependant, peu de choses sont connues à propos de cette hémolysine chez les isolats porcins. De plus, tel que décrit précédemment, cet isolat appartient à un sérotype qui a été observé dans les cas de HC chez l'humain et fait donc partie des isolats potentiellement responsables d'infection chez l'humain.

La méthode de PFGE a permis de caractériser les isolats humains et porcins afin d'étudier la relation génétique entre ces isolats. Cette méthode est sensible et a un très grand pouvoir discriminant en comparaison à d'autres méthodes de caractérisation génotypique (3, 5, 91). L'utilisation d'une souche de référence dans tous les gels analysés a permis de s'assurer de la reproductibilité de la technique entre les manipulations. Aussi, l'utilisation de l'enzyme de restriction Xba1 a permis d'obtenir entre 13 et 17 bandes, ce qui indique une bonne fiabilité de la technique. En effet, selon Tenover *et al.* (117), cette technique est considérée fiable lorsque le nombre de fragments de restriction distincts est supérieur à 10.

L'analyse des résultats du dendrogramme a démontré qu'aucun isolat humain n'était relié génotypiquement aux isolats porcins. Ceci laisse croire que les VTEC porcins ne sont pas apparentés aux isolats humains provenant de la même période et de la même région géographique. Ceci a également été observé pour les isolats précédemment obtenus des abattoirs. Les isolats porcins provenant de la même période, que ce soit la période de l'étude ou encore les isolats provenant d'une période antérieure, semblent être apparentés selon l'analyse du dendrogramme (Figure 2). Il est intéressant aussi de constater que les isolats porcins qui possédaient le même sérotype (O8:H19) qu'un isolat humain ne semblent pas être reliés génotypiquement, tel qu'observé sur le dendrogramme, en plus de ne pas posséder le même pathotype (Figure 2). De plus, une relation étroite a été observée entre certains isolats porcins appartenant aux mêmes sérotypes (O8:H9, O8:H19, O138:NM, O142:NM).

Pour ce qui est des isolats humains, les isolats positifs pour le locus LEE, le gène *eae* et pour *paa* sont tous situés dans le même groupe ce qui indique que ces isolats sont reliés entre eux (Figure 2). Une relation entre les souches pathogènes a été démontrée pour les souches EHEC qui appartenait au sérotype O157:H7 (85). Dans le cas présent, une telle relation a été observée entre des VTEC de sérotypes différents.

CONCLUSIONS

La caractérisation des VTEC d'origine humaine et porcine a permis de démontrer que les isolats humains ne sont pas reliés aux isolats porcins obtenus dans la même période et la même région géographique. Malgré la présence de quelques VTEC porcins non-O157 qui pourraient potentiellement être associés à des infections humaines (O91:NM, O163:NM et O163:H19), la plupart des isolats porcins ne semblent pas posséder les facteurs de virulence requis pour infecter les humains. La plus grande disponibilité pour les laboratoires de diagnostic de techniques moléculaires rapides et d'épreuves immunologiques pouvant être utilisées comme alternative aux méthodes standards de détections à l'aide des cellules Véro, peu accessible pour ces laboratoires, aidera à mettre l'emphase sur la détection des autres sérotypes, en plus du sérotype O157:H7. Ceci permettra de mieux déterminer le rôle de ces isolats pour les infections humaines.

V- BIBLIOGRAPHIE

1. **Al-Jumaili, I., D.A. Burke, S.M. Scotland, J. Al-Mardini, and C.O. Record.** 1992. A method of enhancing verocytotoxin production by *Escherichia coli*. FEMS Microbiol. Lett. **93**:121-126.
2. **An, H., J.M. Fairbrother, C. Desautels, and J. Harel.** 1999. Distribution of a novel locus called Paa (Porcine Attaching and Effacing Associated) among enteric *Escherichia coli*. Adv. Exp. Med. Biol. **473**:179-184.
3. **Arbeit, R.D.** 1995. Laboratory procedures for the epidemiologic analysis of microorganisms, p. 190-208. In Murray, P.R., E.J. Baron, M.A. Pfaller, F.C. Tenover, and R.H. Tenover (ed.), Manual of clinical microbiology. ASM Press, Washington, D.C.
4. **Baldwin, T.J., S. Knutton, L. Sellers, H.A. Manjarrez Hernandez, A. Aitken, and P.H. Williams.** 1992. Enteroaggregative *Escherichia coli* strains secrete a heat-labile toxin antigenically related to *E. coli* hemolysin. Infect. Immun. **60**:2092-2095.
5. **Barrett, T.J., H. Lior, J.H. Green, R. Khakhria, J.G. Wells, B.P. Bell, K.D. Greene, J.Lewis, and P.M. Griffin.** 1994. Laboratory investigation of a multistate food-borne outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 by using pulsed-field gel electrophoresis and phage typing. J. Clin. Microbiol. **32**:3013-3017.
6. **Bender, J.B., C.W. Hedberg, J.M. Besser, D.J. Boxrud, K.L. MacDonald, and M.T. Osterholm.** 1997. Surveillance for *Escherichia coli* O157:H7 infections in Minnesota by molecular subtyping. N. Engl. J. Med. **337**:388-394.
7. **Bertschinger, H.U., and C.L. Gyles.** 1994. Oedema disease of pigs, p. 193-219. In C.L. Gyles (ed.), *Escherichia coli* in domestic animals and humans. CAB International, Guelph, Canada.

8. **Bettelheim, K.A.** 1994. Biochemical characteristics of *Escherichia coli*, p. 3-30. In C.L. Gyles (ed.), *Escherichia coli* in domestic animals and humans. CAB International, Guelph, Canada.
9. **Beutin, L., M.A. Montenegro, I. Orskov, F. Orskov, J. Prada, S. Zimmerman and R Stephan.** 1989. Close association of verotoxin (Shiga-like toxin) production with enterohemolysin production in strains of *Escherichia coli*. *J. Clin. Microbiol.* **27**:2559-2564.
10. **Beutin, L., D. Geier, H. Steinrück, 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.
11. **Beutin, L., U.H. Stropher, and P.A. Manning.** 1993. Isolation of enterohemolysin (Ehly2)-associated sequences encoded on temperate phages of *Escherichia coli*. *Gene* **132**:95-99.
12. **Beutin, L., D. Geier, S. Zimmermann, and H. Karch.** 1995. Virulence markers of shiga-like toxin producing *Escherichia coli* strains originating from healthy domestic animals of different species. *J. Clin. Microbiol.* **33**:631-635.
13. **Blanco, J., M.P. Alonso, E.A. Gonzalez, M. Blanco, and J.I. Garabal.** 1990. Virulence factor of bacteraemic *Escherichia coli* with particular reference to production of cytotoxic necrotising factor (CNF) by P-fimbriate strains. *J. Med. Microbiol.* **31**:175-183.
14. **Boerlin, P., S. A. McEwen, F. Boerlin-Petzold, J.B. Wilson, R.P. Johnson, and C. Gyles.** 1999. Associations between virulence factors of shiga toxin-producing *Escherichia coli* and disease in humans. *J. Clin. Microbiol.* **37**:497-503.

15. **Bonnet, R., B. Souweine, G. Gauthier, C. Rich, V. Livrelli, J. Sirot, B. Joly, and C. Forestier.** 1998. Non-O157:H7 Stx2-producing *Escherichia coli* strains associated with sporadic cases of hemolytic-uremic syndrome in adults. *J. Clin. Microbiol.* **36**:1777-1780.
16. **Bopp, C.A., K.D. Greene, F. Pouch Downes, E.G. Sowers, J.G. Wells, and I.K. Wachsmuth.** 1987. Unusual verotoxin-producing *Escherichia coli* associated with Hemorrhagic colitis. *J. Clin. Microbiol.* **25**:1486-1489.
17. **Borczyk, A.A., M.A. Karmali, H. Lior, and L.M.C Duncan.** 1987. Bovine reservoir for verotoxin-producing *Escherichia coli* O157:H7. *Lancet* **1**:98.
18. **Brooks, H.J.L., K.A. Bettelheim, B. Todd, and M.D. Holdaway.** 1997. Non-O157 Vero cytotoxin producing *Escherichia coli*: Aetiological agents of diarrhoea in children in Dunedin, New Zealand. *Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis.* **20**:163-170.
19. **Bryant, H.E., M.A Athar, and C.H Pai.** 1989. Risk factor for *Escherichia coli* O157:H7 infection in a urban community. *J. Infect. Dis.* **160**:858-864.
20. **Butler D.G. and R.C. Clarke.** 1994. Diarrhoea and dysentery in calves, p. 91-116. *In* C.L. Gyles (ed.), *Escherichia coli* in domestic animals and humans. CAB International, Guelph, Canada.
21. **Caprioli, A., V. Falbo, F.M. Ruggeri, L. Baldassarri, R. Bisicchia, G. Ippolito, E. Romoli, and G. Donelli.** 1987. Cytotoxic necrotizing factor production by hemolytic strains of *Escherichia coli* causing extraintestinal infections. *J. Clin. Microbiol.* **25**:146-149.
22. **Caprioli, A., A. Nigrelli, R. Gatti, and M. Zavanella.** 1993. Isolation of verotoxin-producing *Escherichia coli* from slaughtered pigs. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **12**:227-228.

- 23. Caprioli, A., A.E. Tozzi,, G. Rizzoni, and H. Karch.** 1997. Non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections in Europe. *Emerg. Infect. Dis.* **3**(4) October-December. Available from URL: <http://www.cdc.gov/ncidod/eid/index.htm>
- 24. Carter, G.R., N.M. Chengappa, and A.W. Roberts.** 1995. Enterobacteriaceae, p. 151-163. *In* Carter, G.R., N.M. Chengappa, and A.W. Roberts (ed.), *Essentials of Veterinary Microbiology* 5th ed. Williams and Wilkins, Philadelphia.
- 25. Cavalieri, S.J., G.A. Bohach, and I.S. Snyder.** 1984. *Escherichia coli* α -hemolysin: characteristics and probable role in pathogenicity. *Microbiol. Rev.* **48**:326-343.
- 26. Caya, F., J.M. Fairbrother, L. Lessard, and S. Quessy.** 1999. Characterization of the risk to human health of pathogenic *Escherichia coli* isolates from chicken carcasses. *J. Food. Protect.* **1**:741-746.
- 27. Coia, J.E.** 1998. Clinical, microbiological and epidemiological aspects of *Escherichia coli* O157 infections. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **20**:1-9.
- 28. Cross, A.S., K.S. Kim, D.C. Wright, J.C. Sadoff, and P. Gemski.** 1986. Role of lipopolysaccharide and capsule in the serum resistance of bacteriemic strains of *Escherichia coli*. *J. Infect. Dis.* **154**:497-503.
- 29. De Rycke, J., J.F. Guillot, and R. Boivin.** 1987. Cytotoxins in non-enterotoxigenic strains of *Escherichia coli* isolated from feces of diarrheic calves. *Vet. Microbiol.* **15**:137-150.
- 30. De Rycke, J., L. Phan-Thanh, and S. Bernard.** 1989. Immunochemical identification and biological characterization of cytotoxic necrotizing factor from *Escherichia coli*. *J. Clin. Microbiol.* **27**:983-988.

- 31. De Rycke, J., E.A. Gonzalez, J. Blanco, E. Oswald, M. Blanco, and R. Boivin.** 1990. Evidence for two types of cytotoxic necrotizing factor in human and animal clinical isolates of *Escherichia coli*. *J. Clin. Microbiol.* **28**:694-699.
- 32. Donnenberg, M.S., and J.B. Kaper.** 1992. Enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* **60**:3953-3961.
- 33. Donnenberg, M.S., J. Yu, and J.B. Kaper.** 1993. A second chromosomal gene necessary for intimate attachment of enteropathogenic *Escherichia coli* to epithelial cells. *J. Bacteriol.* **175**:4670-4680.
- 34. Donnenberg, M.S., S. Tzipori, M.L. McKee, A.D. O'Brien, J. Alroy, and J.B. Kaper.** 1993. The role of the *eae* gene of enterohemorrhagic *Escherichia coli* in intimate attachment *in vitro* and in a porcine model. *J. Clin. Invest.* **92**:1418-1424.
- 35. Dorn, C.R., S.M. Scotland, H.R. Smith, G.A. Willshaw, and B. Rowe.** 1989. Properties of Vero cytotoxin-producing *Escherichia coli* of human and animal origin belonging to serotypes other than O157:H7. *Epidem. Inf.* **103**:83-95.
- 36. Doyle, M.P., and J.L. Schoeni.** 1987. Isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from retail fresh meats and poultry. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**:2394-2396.
- 37. Dunlop, R.H., S.A. McEwen, A.H. Meek, R.C. Clarke, W.D. Black, and R.M. Friendship.** 1998. Association among antimicrobial drug treatments and antimicrobial resistance of fecal *Escherichia coli* of swine on 34 farrow-to-finish farms in Ontario, Canada. *Prev. Vet. Med.* **34**:283-305.
- 38. Dunlop, R.H., S.A. McEwen, A.H. Meek, R.M. Friendship, W.D. Black, and R.C. Clarke.** 1999. Sampling considerations for herd-level measurement of faecal *Escherichia coli* antimicrobial resistance in finisher pigs. *Epidemiol. Infect.* **122**:485-496.

- 39. Edelman, R., and M.M. Levine.** 1983. Summary of a Workshop on Enteropathogenic *Escherichia coli*. J. Infect. Dis. **147**:1108-1118.
- 40. Edwards, P.R., and W.H. Ewing.** 1962. Identification of Enterobacteriaceae, 2nd Ed., Burgess Publishing Co., Minneapolis.
- 41. Fairbrother, J.M.** 1993. Les colibacilloses du porc. Ann. Méd. Vét. **137**:369-375.
- 42. Fairbrother, J.M., and M. Ngeleka.** 1994. Extraintestinal *Escherichia coli* infections in pigs, p. 221-236. In C.L. Gyles (ed.), *Escherichia coli* in domestic animals and humans. CAB International, Guelph, Canada.
- 43. Fairbrother, J.M.** 1999. *Escherichia coli* infections in farm animals; p. 328-330. In J.L. Howard and R.A. Smith. (ed.). Current veterinary therapy 4: Food animal practice. W.B. Saunders Co. Philadelphia, P.A.
- 44. Foubister, V., I. Rosenshine, M.S. Donnenberg, and B.B. Finlay.** 1994. The *eaeB* gene of enteropathogenic *Escherichia coli* is necessary for signal transduction in epithelial cells. Infect. Immun. **62**:3038-3040.
- 45. Franke, S., D. Harmsen, A. Caprioli, D. Piérard, L. H. Wieler, and H. Karch.** 1995. Clonal relatedness of shiga-like toxin-producing *Escherichia coli* O101 strains of human and porcine origin. J. Clin. Microbiol. **33**:3174-3178.
- 46. Gannon, V.P.J., C.L. Gyles, and R.W. Friendship.** 1988. Characteristics of verotoxigenic *Escherichia coli* from pigs. Can. J. Vet. Res. **52**:331-337.
- 47. Gannon, V.P.J., C. Teerling, S.A. Masri, and C.L Gyles.** 1990. Molecular cloning and nucleotide sequence of another variant of the *Escherichia coli* Shiga-like toxin II family. J. Gen. Microbiol. **136**:1125-1135.

- 48. Gomez-Duarte, O.G., and J.B. Kaper.** 1995. A plasmid-encoded regulatory region activates chromosomal *eaeA* expression in enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* **63**:1767-1776.
- 49. Gyles, C.L., S.A. De Grandis, C. MacKenzie, and J.L. Brunton.** 1988. Cloning and nucleotide sequence analysis of the genes determining verocytotoxin production in a porcine edema disease isolate of *Escherichia coli*. *Microbial Pathogenesis* **5**:419-426.
- 50. Gyles, C.L.** 1992. *Escherichia coli* cytotoxins and enterotoxins. *Can. J. Microbiol.* **38**:734-746.
- 51. Gyles, C.L.** 1994. *Escherichia coli* verotoxins and other cytotoxins, p. 365-398. *In* C.L. Gyles (ed.), *Escherichia coli* in domestic animals and humans. CAB International, Guelph, Canada.
- 52. Igarashi, K., T. Ogasawara, K. Ito, T. Yutsudo, and Y. Takeda.** 1987. Inhibition of elongation factor 1-dependant aminoacyl-tRNA binding to ribosomes by Shiga-like toxin I (VT1) from *Escherichia coli* O157:H7 and by Shiga toxin. *FEMS Microbiol. Letters* **44**:91-94.
- 53. Ito, H., A. Terai, H. Kurazono, Y. Takeda, and M. Nishibuchi.** 1990. Cloning and nucleotide sequencing of Vero toxin 2 variant genes from *Escherichia coli* O9:H21 isolated from a patient with the hemolytic uremic syndrome. *Microbial Pathogenesis* **8**:47-60.
- 54. Jackson, M.P., R.J. Neill, A.D. O'Brien, R.K. Holmes, and J.W. Newland.** 1987. Nucleotide sequence analysis and comparison of the structural genes for Shiga-like toxin I and Shiga-like toxin II encoded by bacteriophage from *Escherichia coli* 933. *FEMS Microbiol. Letters* **44**:109-114.

- 55. Jerse, A.E., and J.B. Kaper.** 1991 The *eae* gene of enteropathogenic *Escherichia coli* encodes a 94-Kilodalton membrane protein, the expression of which is influenced by the EAF plasmid. *Infect. Immun.* **59**:4302-4309.
- 56. Johnson, W.M., and H. Lior.** 1988. A new heat-labile cytolethal distending toxin (CLDT) produced by *Escherichia coli* isolates from clinical material. *Microbial Pathogenesis* **4**:103-113.
- 57. Johnson, R.P., R.C. Clarke, J.B. Wilson, S.C. Read, K. Rahn, S.A. Renwick, K.A. Sandhu, D. Alves, M.A. Karmali, H. Lior, S.A. McEwen, J.S. Spika, and C.L. Gyles.** 1996. Growing concerns and recent outbreaks involving non-O157:H7 serotypes of verotoxigenic *Escherichia coli*. *J. Food. Protect.* **59**:1112-1122.
- 58. Kaper, J.B., and O.G. Gomez-Duarte.** 1997. The *per* regulator of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **23**:179-181.
- 59. Kaper, J.B.** 1998. Enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Curr. Opin. Microbiol.* **1**:103-108.
- 60. Karch, H., T. Meyer, H. Rüssmann, and J. Heesemann.** 1992. Frequent loss of shiga-like toxin genes in clinical isolates of *Escherichia coli* upon subcultivation. *Infect. Immun.* **60**:3464-3467.
- 61. Karmali, M.A., B.T. Steele, M. Petric, and C. Lim.** 1983. Sporadic cases of haemolytic-uraemic syndrome associated with faecal cytotoxin and cytotoxin-producing *Escherichia Coli* in stools. *Lancet* **19**:619-620.
- 62. Karmali, M.A., M. Petric, C. Lim, R. Cheung, and G.S. Arbus.** 1985. Sensitive method for detecting low numbers of verotoxin producing *Escherichia coli* in mixed cultures by use of colony sweeps and polymyxin extraction of verotoxin. *J. Clin. Microbiol.* **22**:614-619.

- 63. Karmali, M.A., M. Petric, S. Louie, and R. Cheung.** 1986. Antigenic heterogeneity of *Escherichia coli* verotoxins. *Lancet* **1**:164-165.
- 64. Karmali, M.A.** 1987. Laboratory diagnosis of verotoxin-producing *Escherichia coli* infections. *Clin. Microbiol. Newsl.* **9**:65-72.
- 65. Karmali, M.A.** 1989. Infection by Verocytotoxin-Producing *Escherichia coli*. *Clin. Microbiol. Rev.* **2**:15-38.
- 66. Kenny, B., A. Abe, M. Stein, and B.B. Finlay.** 1997. Enteropathogenic *Escherichia coli* protein secretion is induced in response to conditions similar to those in the gastrointestinal tract. *Infect. Immun.* **65**:2606-2612.
- 67. Konowalchuk, J., J.I. Speirs, and S. Stavric.** 1977. Vero response to a cytotoxin of *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* **18**:775-779.
- 68. Levine, M.M.** 1987. *Escherichia coli* that cause diarrhea: Enterotoxigenic, enteropathogenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic, and enteroadherent. *J. Infect. Dis.* **155**:377-389.
- 69. Lior, H.** 1994. Classification of *Escherichia coli*, p. 31-72. *In* C.L. Gyles (ed.), *Escherichia coli* in domestic animals and humans. CAB International, Guelph, Canada.
- 70. March, S.B., and S. Ratnam.** 1986. Sorbitol-MacConkey medium for detection of *Escherichia coli* O157:H7 associated with hemorrhagic colitis. *J. Clin. Microbiol.* **23**:869-872.
- 71. Marques, L.R.M., J.S.M. Peiris, S.J. Cryz, and A.D. O'Brien.** 1987. *Escherichia coli* strains isolated from pigs with edema disease produce a variant of Shiga-like toxin II. *FEMS Microbiol. Letters* **44**:33-38.

- 72. McDaniel, T.K., K.G. Jarvis, M.S. Donnenberg, and J.B. Kaper.** 1995. A genetic Locus of Enterocyte Effacement conserved among diverse enterobacterial pathogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**:1664-1668.
- 73. Nataro J.P., and M.M. Levine.** 1994. *Escherichia coli* diseases in human, p. 285-333. In C.L. Gyles (ed.), *Escherichia coli* in domestic animals and humans. CAB International, Guelph, Canada.
- 74. O'Brien, A.D., G.D LaVeck, M.R. Thompson, and S.B Formal.** 1982. Production of *Shigella dysenteriae* type 1-like cytotoxin by *Escherichia coli*. *J. Inf. Dis.* **146**:763-769.
- 75. Orskov, F., and I. Orskov.** 1985. *Escherichia coli* in extra-intestinal infections. *J. Hyg. Camb.* **95**:551-575.
- 76. Orskov, F., and I. Orskov.** 1992. *Escherichia coli* serotyping and disease in man and animals. *Can. J. Microbiol.* **38**:699-704.
- 77. Oswald, E., J. De Rycke, J.F. Guillot, and R. Boivin.** 1989. Cytotoxic effect of multinucleation in HeLa cell culture associated with the presence of vir plasmid in *Escherichia coli* strains. *FEMS Microbiol. Lett.* **58**:95-100.
- 78. Pai, C.H., N. Ahmed, H. Lior, W.M. Johnson, H.V. Sims, and D.E. Woods.** 1988. Epidemiology of sporadic diarrhea due to verocytotoxin-producing *Escherichia coli*: A two-year prospective study. *J. Infect. Dis.* **157**:1054-1057.
- 79. Pelczar, M.J Jr., E.C.S. Chan, and N.R. Krieg.** 1993. Inheritance and variability (ch. 13), p. 350-379 In Pelczar, M.J. Jr., E.C.S. Chan, and N.R. Krieg (ed.), *Microbiology: Concepts and applications*. McGraw-Hill, Inc., New York.

- 80. Pierard, D., L. Huyghens, S. Lauwers, and H. Lior.** 1991. Diarrhoea associated with *Escherichia coli* producing porcine oedema disease verotoxin. *Lancet* **338**:762.
- 81. Piérard, D., D. Stevens, L. Moriau, H. Lior, and S. Lauwers.** 1997. Isolation and virulence factors of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* in human stool samples. *Clin. Microbiol. Infect.* **3**:531-540.
- 82. Pohl, P., G. Daube, J. Mainil, P. Lintermans, A. Kaeckenbeeck, and E. Oswald.** 1992. Facteurs de virulence et phénotypes de soixante et une souches d'*Escherichia coli* d'origine bovine, productrices de la toxine cytotoxique nécrosante de type 1 (CNF1). *Ann. Rech. Vét.* **23**:83-91.
- 83. Pradel, N., V. Livrelli, C. De Champs, J.-B. Palcoux, A. Reynaud, F. Scheutz, J. Sirot, B. Joly, and C. Forestier.** 2000. Prevalence and characterization of shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from cattle, food, and children during a one-year prospective study in France. *J. Clin. Microbiol.* **38**:1023-1031.
- 84. Prescott, J.F.** 1997. Antibiotics: Miracle drugs or pig food?. *Can. Vet. J.* **38**:763-766.
- 85. Pupo, G.M, D.K.R Karaolis, R. Lan, and P.R. Reeves.** 1997. Evolutionary relationships among pathogenic and nonpathogenic *Escherichia coli* strains inferred from multilocus enzyme electrophoresis and *mdh* sequence studies. *Infect. Immun.* **65**: 2685-2692.
- 86. Ramotar, K., E. Henderson, R. Szumski, and T.J. Louie.** 1995. Impact of free verotoxin testing on epidemiology of diarrhea caused by verotoxin-producing *Escherichia coli*. *J. Clin. Microbiol.* **33**:1114-1120.

- 87. Read, S.C., C.L. Gyles, R.C. Clarke, H. Lior, and S. McEwen.** 1990. Prevalence of verocytotoxigenic *Escherichia coli* in ground beef, pork, and chicken in Southwestern Ontario. *Epidemiol. Infect.* **105**:11-20.
- 88. Renwick, S.A., J.B. Wilson, R.C. Clarke, H. Lior, A.A. Borczyk, J. Spika, K. Rahn, K. McFadden, A. Brouwer, A. Copps, N.G. Anderson, D. Alves, and M.A. Karmali.** 1993. Evidence of direct transmission of *Escherichia coli* O157:H7 infection between calves and a human. *J. Infect. Dis.* **168**:792-793.
- 89. Reynolds J.E.F.** 1993. Martindale: The extra pharmacopeia. 13th ed. The Pharmaceutical Press. London.
- 90. Riley L.W., R.S. Remis, S.D. Helgerson, H.B. McGee, J.G. Wells, B.R. Davis, R.J. Hebert, E.S. Olcott, L.M. Johnson, N.T. Hargrett, P.A. Blake, and M.L. Cohen.** 1983. Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. *N. Engl. J. Med.* **308**:681-685.
- 91. Rios, M., V. Prado, M. Trucksis, C. Arellano, C. Borie, M. Alexandre, A. Fica, and M. M. Levine.** 1999. Clonal diversity of Chilean isolates of enterohemorrhagic *Escherichia coli* from patients with hemolytic-uremic syndrome, asymptomatic subjects, animal reservoirs, and food products. *J. Clin. Microbiol.* **37**:778-781.
- 92. Rowe, P.C., E. Orrbine, G.A. Wells, P.N. McLaine, and members of the Canadian Pediatric Kidney Disease Reference Center.** 1991. Epidemiology of hemolytic-uremic syndrome in Canadian children from 1986 to 1988. *J. Pediatr.* **119**:218-224.
- 93. Salyers, A.B., and D.D. Whitt.** 1994. *Escherichia coli* gastrointestinal infections, p. 190-203. In Salyers, A.B and D.D. Whitt (ed.), *Bacterial pathogenesis: A molecular approach*. ASM Press, Washington, D.C.

- 94. Samadpour, M., J.E. Ongerth, J. Liston, N. Tran, D. Nguyen, T.S. Whittam, R.S. Wilson, and P.I. Tarr.** 1994. Occurrence of Shiga-like toxin-producing *Escherichia coli* in retail fresh seafood, beef, lamb, pork, and poultry from grocery stores in Seattle, Washington. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**:1038-1040.
- 95. Sandhu, K.S., R.C. Clarke, and C.L. Gyles.** 1997. Hemolysin phenotypes and genotypes of *eaeA*-positive and *eaeA*-negative bovine verotoxigenic *Escherichia coli*, p.295-302. In Paul, P.S., D.H. Francis, and D.A. Benfield (ed.), *Mechanisms in the pathogenesis of enteric disease*. Plenum Press, New York.
- 96. Schaechter, M.** 1992. *Escherichia coli*: General biology, p. 115-124. In Lederberg, J. (ed.), *Encyclopedia of microbiology*. vol 2 D-L. Academic Press, San Diego.
- 97. Schmidt, H., M. Montag, J. Bockemühl, J. Heesemann, and H. Karch.** 1993. Shiga-like toxin II-related cytotoxins in *Citrobacter freundii* strains from humans and beef samples. *Infect. Immun.* **61**:534-543.
- 98. Schmidt, H., H. Karch, and L. Beutin.** 1994. The large-sized plasmids of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 strains encode hemolysins which are presumably members of the *E. coli* α -hemolysin family. *FEMS Microbiol. Lett.* **117**:189-196.
- 99. Schmidt, H., L. Beutin and H. Karch.** 1995. Molecular analysis of the plasmid-encoded hemolysin of *Escherichia coli* O157:H7 Strain EDL 933. *Infect. Immun.* **63**:1055-1061.
- 100. Schmidt, H., J. von Maldeghem, M. Frosch, and H. Karch.** 1998. Antibiotic susceptibilities of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 and non-O157 strains isolated from patients and healthy subjects in Germany during 1996. *J. Antimicrob. Chemother.* **42**:548-550.

101. **Schultz, L., W. Fales, C. Maddox, and J. Turk.** 1997. Detection of the fimbrial gene F18 (F107) from swine enteritis *Escherichia coli*, p. 95-97. In Paul, P.S., D.H. Francis, and D.A. Benfield (ed.), Mechanisms in the pathogenesis of enteric disease. Plenum Press, New York.
102. **Scotland, S.M., H.R. Smith, G.A. Willshaw, and B. Rowe.** 1983. Vero cytotoxin production in strain of *Escherichia coli* is determined by genes carried on bacteriophage. *Lancet* **2**:216
103. **Scotland, S.M., H.R. Smith, and B. Rowe.** 1985 Two distinct toxins active on Vero cells from *Escherichia coli* O157. 1985. *Lancet* **2**:885-886.
104. **Shah, P.M., V. Schäfer, and H. Knothe.** 1993. Medical and veterinary use of antimicrobial agents: implications for public health: A clinician's view on antimicrobial resistance. *Vet. Microbiol.* **35**:269-274.
105. **Sidjabat-Tambunan, H., and J.C. Bensink.** 1997. Verotoxin-producing *Escherichia coli* from the faeces of sheep, calves and pigs. *Aust. Vet. J.* **4**:292-293.
106. **Smith, H.R., and S.M. Scotland.** 1988. Vero cytotoxin producing strains of *Escherichia coli*. *J. Med. Microbiol.* **26**:77-85.
107. **Smyth, C.J., M. Marron, and S.G.J. Smith.** 1994. Fimbriae of *Escherichia coli*, p. 399-435. In C.L. Gyles (ed.), *Escherichia coli* in domestic animals and humans. CAB International, Guelph, Canada.
108. **Spika, J.S., R. Khakhria, P. Michel, D. Milley, J. Wilson, and J. Waters.** 1998. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections in Canada. In J.B. Kaper and A.D. O'Brien (ed.), *Escherichia coli* O157 :H7 and other Shiga toxin-producing *E.coli* strains. ASM Press, Washington, D.C.

109. **Stephan, R., S. Ragetti, and F. Untermann.** 2000. Prevalence and characteristics of verotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC) in stools samples from asymptomatic human carriers working in the meat processing industry in Switzerland. *J. Appl. Microbiol.* **88**:335-341.
110. **Strockbine, N.A., L.R.M. Marques, J.W. Newland, H. Williams Smith, R.K Holmes, and A.D. O'Brien.** 1986. Two toxin-converting phages from *Escherichia coli* O157:H7 strain 933 encode antigenically distinct toxins with similar biologic activities. *Infect. Immun.* **53**:135-140.
111. **Strockbine, N.A., M.P. Jackson, L.M. Sung, R.K. Holmes, and A.D. O'Brien.** 1988. Cloning and sequencing of the genes for Shiga toxin from *Shigella dysenteriae* Type 1. *J. Bacteriol.* **170**:1116-1122.
112. **Strockbine, N.A., J.G. Wells, C.A. Bopp, and T.J. Barrett.** 1998. Overview of detection and subtyping methods, p.331-356. *In* O'Brien, A.D., and J.B. Kaper (ed.), *Escherichia coli* O157:H7 and other shiga toxin-producing *E. coli* strains. ASM Press, Washington, D.C.
113. **Stroeher, U.H., L. Bode, L. Beutin, and P.A. Manning.** 1993. Characterization and sequence of 33-kDa enterohemolysin (Ehly1)-associated protein in *Escherichia coli*. *Gene* **132**:89-94.
114. **Sunde, M., K. Fossum, A. Solberg, and H. Sorum.** 1998. Antibiotic resistance in *Escherichia coli* of the normal intestinal flora of swine. *Microb. Drug Resist.* **4**:289-299.
115. **Takao, T., T. Tanabe, Y.-M. Hong, Y. Shimonishi, H. Kurazono, T. Yutsudo, C Sasakawa, M. Yoshikawa, and Y. Takeda.** 1988. Identity of molecular structure of Shiga-like toxin I (VT1) from *Escherichia coli* O157:H7 with that of Shiga toxin. *Microbial Pathogenesis* **5**:357-369.

116. Tarr, P.I. 1995. *Escherichia coli* O157:H7: Clinical, diagnostic, and epidemiological aspects of human infection. Clin. Infect. Dis. **20**:1-10.
117. Tenover, F.C., R.D. Arbeit, R.V. Goering, P.A. Mickelsen, B.E. Murray, D.H. Persing, and B. Swaminathan. 1995. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. J. Clin. Microbiol. **33**: 2233-2239.
118. Thomas, A., T. Cheasty, H. Chart, and B. Rowe. 1994. Isolation of Vero cytotoxin-producing *Escherichia coli* serotypes O9ab:H⁻ and O101:H⁻ carrying VT2 variant gene sequences from a patient with haemolytic uraemic syndrome. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. **13**:1074-1076.
119. Tzipori, S., H. Karch, K.I. Wachsmuth, R.M. Robins-Browne, A.D. O'Brien, H. Lior, M.L. Cohen, J. Smithers, and M.M. Levine. 1987. Role of a 60-Megadalton plasmid and Shiga-like toxins in the pathogenesis of infection caused by enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in gnotobiotic piglets. Infect. Immun. **55**:3117-3125.
120. Tzipori, S., K.I. Wachsmuth, J. Smithers, and C. Jackson. 1988. Studies in gnotobiotic piglets on non-O157:H7 *Escherichia coli* serotypes isolated from patients with hemorrhagic colitis. Gastroenterology **94**:590-597.
121. Tzipori, S., F. Gunzer, M.S. Donnenberg, L. de Montigny, J.B. Kaper, and A. Donohue-Rolfe. 1995. The role of *eaeA* gene in diarrhea and neurological complications in a gnotobiotic piglet model of enterohemorrhagic *Escherichia coli* infection. Infect. Immun. **63**:3621-3627.
122. van den Bogaard, A.E., and E.E. Stobberingh. 1999. Antibiotic usage in animals : impact on bacterial resistance and public health. Drugs **58**:589-607.

- 123. Watanabe H., A. Wada, Y. Inagaki, K. Itoh, and K. Tamura.** 1996. Outbreaks of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 infection by two different genotype strains in Japan, 1996. *Lancet* **348**:831-832.
- 124. Wegener, H.C., and N. Frimodt-Moller.** 2000. Reducing the use of antimicrobial agents in animals and man. *J. Med. Microbio.* **49**:111-113.
- 125. Weinstein, D.L., M.P. Jackson, J.E. Samuel, R.K. Holmes, and A.D. O'Brien.** 1988. Cloning and sequencing of a Shiga-like toxin type II variant from an *Escherichia coli* strain responsible for edema disease of swine. *J. Bacteriol.* **170**:4223-4230.
- 126. Welch, R.A.** 1994. Holistic perspective on the *Escherichia coli* hemolysin, p. 351-364. *In* Miller, V.L., J.B. Kaper, D.A. Portnoy, and R.R. Isberg (ed.), *Molecular genetics of bacterial pathogenesis*. ASM Press, Washington, D.C.
- 127. William Smith, H., P. Green, and Z. Parsell.** 1983. Vero cell toxins in *Escherichia coli* and related bacteria: Transfer by phage conjugation and toxic action in laboratory animals, chickens and pigs. *J. Gen. Microbiol.* **129**:3121-3137.
- 128. Willshaw, G.A., H.R. Smith, S.M. Scotland, and B. Rowe.** 1985. Cloning of genes determining the production of Vero cytotoxin by *Escherichia coli*. *J. Gen. Microbiol.* **131**:3047-3053.
- 129. Willshaw, G.A., H.R. Smith, T. Cheasty, P.G. Wall, and B. Rowe.** 1997. Vero cytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 outbreaks in England and Wales, 1995: Phenotypic methods and genotypic subtyping. *Emerg. Infect. Dis.* **3**(4) October-December.
- 130. Wray, C., and M.J. Woodward.** 1994. Laboratory diagnosis of *Escherichia coli* infections, p. 595-628. *In* C.L. Gyles (ed.), *Escherichia coli* in domestic animals and humans. CAB International, Guelph, Canada.

131. Yu, J., and J.B. Kaper. 1992. Cloning and characterization of the *eae* gene of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Mol. Microbiol.* **6**:411-417.
132. Zhu, C., J. Harel, M. Jacques, C. Desautels, M.S. Donnenberg, M. Beaudry, and J.M. Fairbrother. 1994. Virulence properties and attaching-effacing activity of *Escherichia coli* O45 from swine post-weaning diarrhea. *Infect. Immun.* **63**:4153-4159.

VI- ANNEXES

Annexe 1

Tableau complémentaire

Tableau I. Pathotypes des isolats humains et porcins positifs pour la vérotoxine

Pathotype	Nombre d'isolats positifs (%)		
	Humain (n=10)	Porcin (n=33)	Porcin* (n=34)
VT1	0	1 (3,0)	4 (11,8)
VT1-LeeABCD- <i>eae-paa</i> -HlyEHEC	3 (30,0)	0	0
VT1-VT2-LeeABCD- <i>eae-paa</i> -HlyEHEC	1 (10,0)	0	0
VT2e	0	16 (48,5)	27 (79,4)
VT2vx	2 (20,0)	5 (15,2)	1 (2,9)
VT2vx-F18-Hly	0	2 (6,1)	0
VT2e-Hly	0	1 (3,0)	1 (2,9)
VT2e-F18-Hly	0	4 (12,1)	0
Autres	4 (40,0) ^a	4 (12,1) ^b	1 (2,9) ^c

^a VT1-VT2-HlyEHEC; VT2vx-LeeABCD-*eae*; VT2-LeeABCD-*eae-paa*; VT2vx-LeeABCD-*eae-paa*

^b VT2vx-Hly; VT1-HlyEHEC; VT2e-F18; VT2e-F18-Hly-*paa*

^c VT2e-*paa*;

* Isolats porcins provenant d'une période antérieure à l'étude.