

*Bull. Acad. Vét. de France*, 1986, 59, 465-473

## COMMUNICATIONS

---

### **Etude de colibacilles isolés lors de septicémies bovines**

#### **1. AVEC SYMPTOMES MENINGES**

#### **2. AVEC SYNDROME IMMUNODEPRESSIF ET PURPURA HEMORRAGIQUE**

par M. CONTREPOIS et Y. RIBOT

---

#### **RÉSUMÉ**

On a étudié les caractères de virulence des colibacilles isolés chez des bovins atteints de septicémies. Dans le cas où les veaux présentaient une septicémie avec symptômes méningés, on a retrouvé dans différents organes un même colibacille pathogène (DL 50 % chez la souris voisine de 2,10<sup>7</sup>) non hémolytique, ColV<sup>+</sup>, produisant un sidérophore de type hydroxamate et l'antigène de surface 31a. Dans l'autre cas où des jeunes bovins à l'engrais étaient atteints de septicémie avec purpura hémorragique et syndrome immunodépressif, il s'agissait de colibacilles *hémolytiques* très pathogènes (DL 50 % chez la souris voisine de 10<sup>6</sup>) ColV<sup>-</sup> et 31 a<sup>-</sup> mais produisant un sidérophore de type hydroxamate.

*Mots clés* : *Escherichia coli* - Septicémie - Bovin - Veau - Virulence.

#### **SUMMARY**

#### **STUDY OF COLON BACILLI ISOLATED FROM BOVINE SEPTICAEMIA :**

- 1. ASSOCIATED WITH MENINGEAL SYMPTOMS**
- 2. ASSOCIATED WITH IMMUNE DEPRESSIVE SYNDROME  
AND HAEMORRHAGIC PURPURA**

We have studied virulence factors of colon bacilli isolated from bovine septicaemia. In the first case of septicaemia with meningeal symptoms a

---

I.N.R.A., Laboratoire de Microbiologie, Centre de Recherches de Clermont-Ferrand-Theix, Saint-Genes-Champagnelle, 63122 Ceyrat.

same pathogenic *E. coli* (LD 50 % in mice about  $2 \times 10^7$ ) non hemolytic, ColV<sup>+</sup>, producing hydroxamate siderophore and surface antigen 31 a was isolated. In a second case of septicaemia among young cattle with immune depressive syndrome and haemorrhagic purpura, were isolated highly pathogenic *E. coli* (LD 50 % in mice about  $10^6$ ) which produced hemolysin, hydroxamate siderophore but no V colicine nor surface antigen 31 a.

**Key words :** *Escherichia coli* - Septicaemia - Cattle - Calf - Virulence.

Il existe au moins deux grands syndromes de la pathologie colibacillaire chez les bovins : l'entérototoxicose colibacillaire et la septicémie colibacillaire [2]. Dans le premier cas, le pouvoir pathogène des colibacilles est dû à la production d'une entérotoxine et à des pili (K99, F41, FY) qui permettent l'adhérence des bactéries aux entérocytes. Les caractéristiques du pouvoir pathogène des colibacilles septicémiques sont plus difficiles à préciser. On peut cependant avancer deux notions générales :

1. Ce sont des pathogènes *opportunistes* qui n'infectent que des animaux prédisposés (déficience en colostrum, autres formes d'immuno-dépression ? stress ?...).

2. Les caractères de la virulence sont multifactoriels (résistance à la phagocytose, au pouvoir bactéricide du sérum, à la carence en fer, etc.). En raison du caractère opportuniste des infections à colibacilles septicémiques il est difficile de situer clairement l'impact de cette pathologie. Même si la septicémie colibacillaire ne correspond pas à l'étiologie primaire, les animaux en meurent et cette composante doit être prise en compte.

Dans une étude récente [3, 10] nous avons recherché les caractères dominants des colibacilles septicémiques bovins. Nous avons montré en particulier que la production d'hydroxamates (sidérophore aérobactine) discrimine de façon satisfaisante les colibacilles saprophytes banals (hydroxamates<sup>-</sup>) des variétés potentiellement pathogènes (hydroxamates<sup>+</sup>). Ceci offre une possibilité nouvelle pour le Laboratoire de diagnostic qui pourra identifier les colibacilles entérotoxinogènes (K99) et, maintenant, les colibacilles hydroxamates<sup>+</sup> à potentialités invasives. Sur ces nouvelles bases, il est intéressant d'étudier les colibacilles isolés dans des cas particuliers afin de voir si on peut effectivement établir une corrélation entre les observations cliniques et les résultats du Laboratoire. Les deux descriptions cliniques concernant les pathologies avec symptômes méningés [12] et purpura hémorragique [13] sont les supports d'une étude plus approfondie des colibacilles qui ont alors été isolés et d'une discussion concernant ces bactéries et la pathologie observée.

## MATERIEL ET METHODES

1. *Souches bactériennes*

Seize souches *E. coli* ont été isolées à partir de différents organes chez trois animaux lors d'examen nécropsiques pratiqués au Laboratoire Départemental d'Analyses Vétérinaires de Vendée. Les observations cliniques et nécropsiques sont décrites par ailleurs par RAMISSE *et al.* [12, 13].

2. *Mesure du pouvoir pathogène*

Des souris de race OF1 ont été inoculées par voie intrapéritonéale avec des dilutions au quart des cultures en phase stationnaire obtenues en bouillon de Luria-Bertani agité. Six souris par dilution ont été utilisées et la dose létale 50 % a été calculée selon la méthode de KUHENE [8].

3. *Antibiogramme*

Les antibiogrammes ont été réalisés selon la méthode des disques (Institut Pasteur Production) sur milieu Mueller Hinton gélosé.

4. *Biotype*

Le biotype qui a été établi repose uniquement sur l'utilisation de quelques sucres. La croissance bactérienne est appréciée par culture sur milieu minimum additionné d'une solution du sucre étudié (5 g/l en concentration finale). Le milieu de base est le milieu Minca [7] où le « casamino acids » (Difco) est remplacé par 2 g/l de  $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$  comme source d'azote. Le milieu gélosé en boîtes de Pétri estensemencé sous forme de croix et on observe la croissance bactérienne après 24 à 48 h d'incubation à 37° C.

5. *Production d'hydroxamates*

La méthode de CSAKY [6] modifiée par DER VARTANIAN (publication en cours) permet de mettre en évidence l'hydroxylamine produite par hydrolyse acide des hydroxamates libérés dans le milieu de culture. Les bactéries sont cultivées sur bouillon M9 agité. Le surnageant de la culture en phase plateau est hydrolysé en milieu  $\text{H}_2\text{SO}_4$  1,5 M pendant 4 h à 120° C.

6. *Production de colicines*

Elle est appréciée par la méthode de la double couche. Les colibacilles,ensemencés en « spot » à la surface d'un milieu de Luria gélosé, sont lysés par les vapeurs de chloroforme. La production d'une colicine

est mise en évidence dans une deuxième couche de gélose molle de milieu Luria ensemencé avec *E. coli* K12 sensible à un grand nombre de colicines. Un halo d'inhibition de la croissance autour du « spot » indique la production d'une colicine.

La colicine V est identifiée de la même façon mais en utilisant un mutant de la souche *E. coli* K12 résistant à la colicine V. Les souches colicinogènes qui n'inhibent pas la croissance de *E. coli* K12 ColV<sup>r</sup> sont considérées ColV.

#### 7. Identification des antigènes de surface « vir » et « 31a »

Elle est effectuée par des méthodes biochimique et immunologique. Les extraits aqueux obtenus par agitation des bactéries pendant 20 mn à 60° C selon STIRM et ORSKOV [15] puis concentrés par ultracentrifugation sont soumis à une électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de SDS [9]. Les antigènes « 31a » et « vir » possèdent des sous-unités constitutives respectivement de 29 Kdal et 20 Kdal qui sont visualisées après coloration à l'argent [11]. L'identité des protéines « 31a » et « vir » est confirmée par double immunodiffusion en gel d'agarose en utilisant les extraits aqueux concentrés par lyophilisation et des sérums spécifiques anti-« 31a » et anti-« vir ».

#### 8. Production d'hémolysines

La production d'une alpha-hémolysine est recherchée par ensemencement en surface d'un milieu gélosé (blood agar base de Difco) additionné de 5 % d'hématies lavées obtenues à partir d'un sang de mouton.

## RESULTATS

Les résultats sont rassemblés dans le tableau I. On peut observer que les colibacilles isolés au cours de ces deux épisodes de pathologie colibacillaire ont dans chaque cas des caractéristiques assez homogènes. A la colibacillose avec symptômes méningés sont associés des colibacilles dont le pouvoir pathogène mesuré par la DL 50 % est d'environ  $2 \times 10^7$ . Les colibacilles produisent des hydroxamates et la colicine V. Ils ne sont pas hémolytiques. Ils possèdent l'antigène de surface « 31a ». Les profils du LPS observés dans les gels SDS-PAGE permettent de dire que tous ces colibacilles, excepté 627 CI, appartiennent au même séro-groupe O (photo 1).

Dans la colibacillose associée à un syndrome immunodépresseur avec purpura hémorragique, les colibacilles qui ont été isolés sont très pathogènes par voie intrapéritonéale chez la souris, puisque la DL 50 est de  $5 \times 10^5$  à  $2 \times 10^6$ . Ils ne produisent pas les antigènes de surface « 31a » et « vir ». Les profils du LPS observés dans les gels SDS-PAGE permettent d'affirmer qu'ils appartiennent au même séro-groupe O (photo 2). Enfin ces colibacilles sont fortement hémolytiques.

Tableau 1. — Caractéristiques des colibacilles

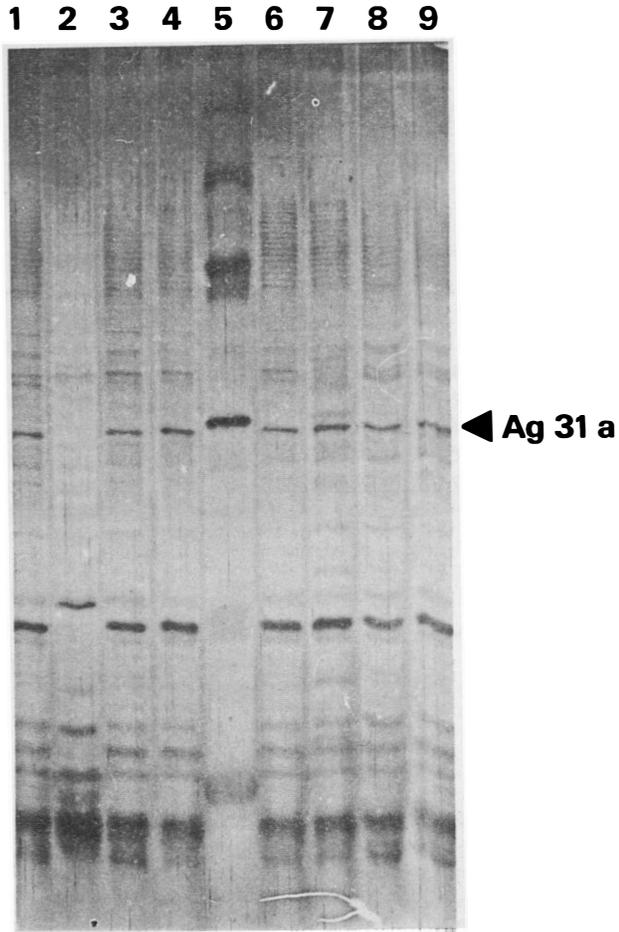
Organe	Dose létale 50 %	Hydroxamate	Production		Antibiotype	Biotype (3)	Antigène de surface		Hémolyse
			Colicine	Colicine V			31a	Vir	
(1) CI (4) Os	1,9 × 10 <sup>7</sup>	+	+	—	Amp <sup>r</sup> Str <sup>r</sup> Kan <sup>r</sup> Cmp <sup>r</sup> tet <sup>r</sup> suf <sup>r</sup>	Ino+ Dul+ Rham+	—	—	—
	1,8 × 10 <sup>7</sup>	+	+	+	Amp <sup>r</sup> Str <sup>r</sup> Kan <sup>r</sup> Cmp <sup>r</sup> tet <sup>r</sup> suf <sup>r</sup>	d°	+	—	—
	Rate	10 <sup>8</sup>	+	+	Tmp <sup>r</sup>	d°	+	—	—
	Cœur	1,8 × 10 <sup>7</sup>	+	+	d°	d°	+	—	—
	Cerveau	NF	+	+	d°	d°	+	—	—
	LCR	1,9 × 10 <sup>7</sup>	+	+	d°	d°	+	—	—
	Rein	3,4 × 10 <sup>7</sup>	+	+	d°	d°	+	—	—
	Foie	2,5 × 10 <sup>7</sup>	+	+	d°	d°	+	—	—
	Poumon	2,2 × 10 <sup>7</sup>	+	+	d°	Ino+ Dul+ Rham+ Sacch+ Raf+ Sorb+	+	—	—
	(2) 678 CI	1,9 × 10 <sup>6</sup>	+	—	—	Amp <sup>r</sup> Str <sup>r</sup> Kan <sup>r</sup> Cmp <sup>r</sup> Tet <sup>r</sup> Suf <sup>r</sup>	Dul+ Sorb+ Sacch+ Raf+ Rham+	—	—
678 Rein		NF	+	—	Tmp <sup>r</sup>	d°	—	—	+
678 Foie		5,6 × 10 <sup>5</sup>	+	—	d°	d°	—	—	++
678 Os		1,2 × 10 <sup>6</sup>	+	—	d°	d°	—	—	++
586 Cœur		9,5 × 10 <sup>5</sup>	+	—	d°	d°	—	—	++
586 Poumon		10 <sup>6</sup>	+	—	d°	d°	—	—	++
586 LCR		1,8 × 10 <sup>6</sup>	NF	—	—	d°	d°	—	+

(1) Colibacillose avec symptômes méningés.

(2) Colibacillose et syndrome immunodépressif avec purpura hémorragique.

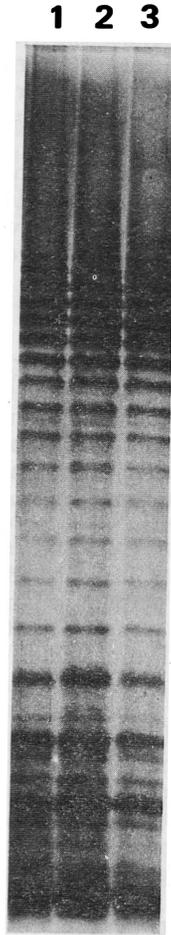
(3) Ino = inositol, Dul = Dulcitol, Rham = Rhamnose, Sorb = Sorbose, Sacch = Saccharose, Raf = Raffinose.

(4) CI = Contenu intestinal.



*Photo 1*

- 1 = 627 Rate
- 2 = 627 CI
- 3 = 627 Cœur
- 4 = 627 Cerveau
- 5 = Kit calibration poids moléculaire
- 6 = 627 LCR
- 7 = 627 Poumon
- 8 = 627 Rein
- 9 = 627 Foie



*Photo 2*

1 = 586 Cœur

2 = 678 Foie

3 = 678 Rein

## DISCUSSION

L'ensemble des résultats concernant la colibacillose associée à des symptômes méningés est conforme à divers résultats publiés à ce jour. Ainsi, dès 1967, COTTEREAU *et al.* [5] distinguaient les colibacilloses

suraiguë, aiguë et subaiguë avec, dans certains cas, des complications de type méningo-encéphalite. Dans une étude plus récente portant sur des colibacilles possédant l'antigène de surface « 31a », nous avons pu reproduire la septicémie sous sa forme suraiguë par administration des colibacilles par voie orale chez des veaux ne recevant pas de colostrum et sous sa forme subaiguë par inoculation intraveineuse chez des veaux ayant reçu leur colostrum [4]. Dans ces expériences, l'infection méningée était systématique chez les veaux privés de colostrum. Les colibacilles identifiés au cours de cette colibacillose avec symptômes méningés ont des caractéristiques très comparables à celles des colibacilles « 31a » de référence utilisés au cours de nos travaux expérimentaux (DL 50 chez la souris voisine de  $2 \times 10^7$ , colibacilles produisant des sidérophores de type hydroxamate et possédant l'antigène de surface « 31a »). L'antigène de surface « 31a » a été identifié chez 35 % des colibacilles impliqués dans des septicémies du veau au cours d'une enquête plus large [10]. Les informations qui ont été rassemblées ne permettent pas de préciser les conditions prédisposantes qui ont permis le développement de cette pathologie. Il aurait été intéressant de connaître le taux d'immunoglobulines sériques chez ces animaux pour savoir si une déficience dans l'apport du colostrum était en cause dans cet élevage.

Dans le deuxième cas où la colibacillose était associée à un syndrome immunodépressif avec purpura hémorragique, les colibacilles isolés sont très pathogènes chez la souris (DL 50 voisine de  $10^6$ ) et ont des caractères très homogènes (hydroxamate<sup>+</sup>, même biotype, même séro-groupe O et *production d'une alpha-hémolysine*). Ce caractère semble assez inhabituel chez les colibacilles septicémiques bovins [10]. Les principales colibacillooses où sont isolées des variétés hémolytiques sont des pathologies humaines (pyélonéphrites) ou surtout la maladie de l'œdème chez le porc. Toutefois, selon les connaissances actuelles, il ne semble pas que l'alpha-hémolysine soit importante dans la maladie de l'œdème [1]. Toutefois, de nombreux résultats au cours de ces dernières années conduisent à penser que l'alpha-hémolysine doit être considérée comme une toxine [1]. Ainsi, chez la souris, des extraits acellulaires d'alpha-hémolysine injectés par voie IV sont toxiques et létaux. A l'examen nécropsique, on observe chez ces souris un œdème du poumon et une hémoglobinurie de la vessie. Récemment, H.W. SMITH et HUGGINS [14] ont montré que les colibacilles Hly<sup>+</sup>, comparativement à leurs variants isogéniques Hly<sup>-</sup>, étaient plus pathogènes pour la souris et entraînaient une mort rapide des animaux en 5 à 6 h après l'inoculation IP. Nous avons fait cette même observation avec les souches Hly<sup>+</sup> décrites dans ce travail alors qu'avec les autres colibacilles septicémiques, la mort des premières souris survient seulement après 12 à 18 h. Enfin divers effets cytotoxiques directs de l'alpha-hémolysine ont été décrits [1]. Dans l'état actuel des connaissances, il nous est difficile d'établir une relation directe de cause à effet entre le purpura hémorragique observé dans cet élevage et l'infection à *E. coli* hémolytique, mais la question mérite d'être posée. Il convient aussi de remarquer que cette infection colibacillaire est sur-

venue chez des animaux présentant diverses caractéristiques d'immuno-dépression. Les colibacilles Hly<sup>+</sup> paraissent donc bien être également des germes opportunistes chez ces bovins.

*En conclusion*, ces deux observations nous paraissent intéressantes dans la mesure où elles soulignent l'existence d'une pathologie colibacillaire dont l'importance exacte sur le terrain est difficile à préciser mais qui n'est sans doute pas négligeable.

## BIBLIOGRAPHIE

- [1] CAVALIERI (S.J.), BOHACH (G.A.), SNYDER (I.S.). — *Escherichia coli* alpha Hemolysin : characteristics and probable role in pathogenicity. *Microbiol. Rev.*, 1984, 48 (4), 326-343.
- [2] CONTREPOIS (M.), GOUET (Ph.). — Etiologie des colibacillooses chez les bovins. *Rec. Méd. Vét.*, 1983, 159 (3), 159-166.
- [3] CONTREPOIS (M.), MOHAMED OU SAID (A.), DER VARTANIAN (M.), GIRARDEAU (J.P.). — Facteurs impliqués dans la virulence des colibacilles responsables de septicémies chez le veau. *Rev. Inst. Past. Lyon*, 1986, 1-2, 141-148.
- [4] CONTREPOIS (M.), DUBOURGUIER (H.C.), PARODI (A.L.), GIRARDEAU (J.P.), OLLIER (J.L.). — Septicaemic *Escherichia coli* and experimental infection of calves. *Vet. Microbiol.*, 1986 (à paraître).
- [5] COTTEREAU (Ph.), BUSSIÈRE (J.), DE SAINT-AUBERT (G.). — La colibacilliose du veau. *Soc. Sci. Vét. Lyon*, 1967, 6, 501-532.
- [6] CSÁKY (T.Z.). — On the estimation of bound hydroxylamine in biological materials. *Acta Chem. Scand.*, 1948, 2, 450-454.
- [7] GUINEE (P.A.M.), VELDKEP (J.), JANSEN (W.H.). — Improved Minca medium for the detection of K99 antigen in calf enterotoxigenic strains of *Escherichia coli*. *Infect Immun.*, 1977, 15, 676-678.
- [8] KUEHENE (R.W.). — Rapid determination of log<sub>10</sub> 50 % lethal doses or 50 % infection doses. *J. Clin. Microbiol.*, 1983, 17, 702-703.
- [9] LAEMMLI (U.K.). — Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 1970, 227, 680-685.
- [10] MOHAMED OU SAID (A.). — Caractérisation des *Escherichia coli* septicémiques d'origine bovine. Thèse de 3<sup>e</sup> Cycle, Université Claude-Bernard, Lyon I, et Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon, 30 septembre 1985.
- [11] OAKLEY (B.R.), KIRSCH (D.R.), MORRIS (N.R.). — A simplified ultrasensitive silver stain for detecting proteins in polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.*, 1980, 105, 361-363.
- [12] RAMISSE (J.), CHAUVIN (P.), LEPAREUR (J.). — Note sur un cas de colibacilliose septicémique avec symptômes méningés chez le veau. *Le Point Vét.*, 1986 (à paraître).
- [13] RAMISSE (J.), REIX (G.), LEPAREUR (F.). — Syndrome immunodépressif avec purpura hémorragique sur des jeunes bovins à l'engrais. *Le Point Vét.*, 1986 (à paraître).
- [14] SMITH (H.W.), HUGGINS (M.B.). — The toxic role of alpha-haemolysine in the pathogenesis of experimental *Escherichia coli* infection in mice. *J. Gen. Microbiol.*, 1985, 131, 395-403.
- [15] STIRM (S.), ORSKOV (F.). — Episome carried surface antigen K88 of *E. coli*. *J. Bacteriol.*, 1967, 93, 740-748.