

# Identification par réaction en chaîne par polymérase (PCR) des *Escherichia coli* pathogènes chez les animaux et zoonotiques ECL-PON-002

## Table des matières

1. Objectif .....	1
2. Principe .....	1
3. Méthodologie .....	2
3.1. Préparation de l'échantillon .....	2
3.2. Préparation de l'ADN .....	2
3.3 Mise au point de la réaction en PCR .....	2
3.4. Électrophorèse sur gel d'agarose .....	2
4. Équipement et matériel .....	3
5. Réactifs et milieux .....	3
6. Dispositifs de sécurité et de protection .....	3
7. Souches de référence .....	4
8. Interprétation des résultats .....	4

## Annexes

Annexe 1. Amorces utilisées au Laboratoire Ecl pour la détection des pathotypes ETEC, EPEC, STEC et ExPEC .....	i
Annexe 2. Préparation du mélange pour les réactions en PCR .....	iii
Annexe 3. Solutions .....	vi
Annexe 4. Fiches signalétiques pour les souches d' <i>Escherichia coli</i> .....	vii

### 1. Objectif

Les *E. coli* pathogènes chez les animaux et zoonotiques (APZEC) sont porteurs de gènes codant pour des facteurs de virulence pouvant causer des maladies chez les animaux ou les humains. Les APZEC sont divisés selon différents pathotypes : ETEC, EPEC, STEC/VTEC et ExPEC. Les ETEC sont porteurs d'un ou plusieurs gènes codant pour les entérotoxines LT, STa et STb. Chez le porc, les ETEC affichent principalement les gènes codant pour le fimbriae F4 ou F18. Pour leur part, les EPEC possèdent le gène *eae* codant pour Eae ou Intimine. Les STEC/VTEC sont quant à eux porteurs des gènes codant pour VT1/Stx1 et/ou VT2/Stx2 et les STEC/VTEC potentiellement pathogènes pour l'homme et portent fréquemment le gène *eae*. La plupart des ExPEC détiennent les gènes codant pour aéro bactéine, et en général, ont les gènes codant pour Tsh, CNF ou le fimbriae P.

L'objectif de cette procédure est de détecter par PCR multiplex la présence de gènes dans des cultures d'*E. coli* afin de déterminer leur pathotype (ETEC, EPEC, STEC ou ExPEC). De plus, la confirmation de la présence de gènes codant F4 ou F18 chez les ETEC permettra une identification comme agent causant la diarrhée chez le porc. Cette procédure peut être appliquée pour l'identification des APZEC à partir de culture d'enrichissement en bouillon LB provenant d'échantillons cliniques ou de colonies isolées sur milieu solide MacConkey ou autre.

### 2. Principe

La méthode est fondée sur l'amplification par PCR de gènes d'ADN spécifiques par des oligonucléotides déclenchant le début de la réaction PCR. La réaction PCR est réalisée en utilisant des amorces spécifiques (Annexe 1).

Laboratoire de référence de l'OIE pour *Escherichia coli* (Ecl) · [www.ecl-lab.ca](http://www.ecl-lab.ca)

#### Abréviations

EtBr: Bromure d'éthidium  
ETEC: *Escherichia coli* entérotoxinogène  
EPEC: *Escherichia coli* entéro pathogène  
ExPEC: *Escherichia coli* extraintestinal  
STEC/VTEC: *Escherichia coli* producteur de toxine Shiga  
LB: Bouillon Luria-Bertani  
PCR: Réaction en chaîne par polymérase (Polymerase Chain Reaction)

### 3. Méthodologie

#### 3.1. Préparation de l'échantillon

Les cultures ensemencées sur milieu solide (ex. TSA, gélose sang ou gélose MacConkey) sont traitées selon les étapes suivantes :

- Prendre une strie dans le premier quadrant avec une anse ou un coton-tige et ensemencer dans un tube de 5 ml de bouillon LB.
- Les écouvillons provenant de fèces ou de tissus sont ensemencés directement dans un tube de 5 ml de bouillon LB.
- Incuber toute la nuit à  $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ .

#### 3.2. Préparation de l'ADN

(Méthode adaptée de la méthode utilisée par le Laboratoire de lutte contre les zoonoses d'origine alimentaire MFLP-86)

- Identifier l'échantillon par un code sur le dessus d'un tube de 1,5 ml, centrifuger 1 ml de la culture LB incubée toute la nuit à  $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ , à 12 000 RPM pour 2 minutes.
- Jeter le surnageant dans une bouteille en verre Corning réservée à cet usage.
- Ajouter 1 ml PBS ou FA buffer (Difco) au culot, bien mélanger (*vortexer* ou mélanger avec une pipette avec des mouvements allant de haut en bas).
- Centrifuger à 12 000 RPM pour 2 minutes, enlever le surnageant et resuspendre le culot dans 0,5 ml d'eau stérile Milli-Q (*vortexer* ou mélanger avec une pipette avec des mouvements allant de haut en bas).
- Chauffer à  $100^{\circ}\text{C}$  pendant 10 minutes, centrifuger à 12 000 RPM pour 2 minutes. Transférer le surnageant dans un autre tube, et identifier le tube. Si un grand nombre de tubes est préparé, s'assurer que les tubes contenant de l'ADN, soient gardés sur glace ou au froid.
- Conserver l'échantillon ADN à  $-20^{\circ}\text{C}$ , jusqu'à son utilisation.

#### 3.3 Mise au point de la réaction en PCR

Pour chaque échantillon, prévoir un mélange de réaction de 25  $\mu\text{l}$  PCR (Annexe 2). Le volume des réactifs peut varier en fonction du volume final de la réaction. L'eau stérile Milli-Q est employée pour les réactions PCR. Pour chaque essai en PCR, un contrôle positif et deux contrôles négatifs doivent être inclus. Le contrôle positif est composé d'ADN obtenu à partir de souches d'*E. coli* possédant les gènes de virulence testés. Le premier contrôle négatif est fait à partir d'ADN d'une souche d'*E. coli* non-pathogène. L'autre contrôle négatif est quant à lui constitué en ajoutant de l'eau stérile Milli-Q. Les mélanges de réaction PCR sont incubés dans un thermocycleur programmé selon le profil thermique décrit (Annexe 2).

#### 3.4. Électrophorèse sur gel d'agarose

Préparer un gel d'agarose de 1,8 % (w/v) avec une solution 1X Tris/EDTA (Annexe 3). À chaque puits du gel nous ajoutons 15  $\mu\text{l}$  du produit de la réaction PCR auquel nous avons ajouté un colorant à une concentration finale 1X. Faire migrer les échantillons dans un tampon 1X (Tris/EDTA) à un voltage constant (96V). Employer un standard de poids moléculaire approprié pour les différents poids correspondants aux différents amplicons. (Annexe 1). Prendre en considération que l'évaluation de la présence des gènes de virulence se fait selon une bande correspondant au poids moléculaire.

#### Abréviations

EtBr: Bromure d'éthidium  
ETEC: *Escherichia coli* entérotoxigène  
EPEC: *Escherichia coli* entérotoxigène  
ExPEC: *Escherichia coli* extraintestinal  
STEC/VTEC: *Escherichia coli* producteur de toxine Shiga  
LB: Bouillon Luria-Bertani  
PCR: Réaction en chaîne par polymérase (Polymerase Chain Reaction)

Le bromure d'éthidium doit être ajouté au gel d'agarose pour permettre la visualisation de l'ADN. Ce réactif est un agent intercalant de l'ADN, il est couramment utilisé comme colorant en biologie moléculaire. Ce colorant exposé aux rayons ultraviolets donnera une fluorescence avec une couleur rouge-orange. EtBr doit être ajouté à une concentration finale de 0,5 µg/ml dans le gel avant que celui-ci soit versé dans le moule. Alternativement, le gel d'agarose peut être coloré après électrophorèse dans une solution de bromure d'éthidium 0,5 µg/ml.

#### 4. Équipement et matériel

- › Hotte laminaire pour PCR
- › Anse pour ensemencement
- › Bouteilles en verre 100 ml Corning
- › Incubateur à 37°C±1°C
- › Micropipettes
- › Pointes universelles avec filtre DNase/RNase free
- › Microtubes 1,5 ml
- › Tubes pour PCR 0,2 ou 0,5 ml
- › Thermocycleur
- › H<sub>2</sub>O déionisée Milli-Q
- › Appareil pour électrophorèse
- › Transilluminateur pour ultraviolets
- › Micro-onde

#### 5. Réactifs et milieux

- › Gélose sang et gélose MacConkey
- › Bouillon Luria-Bertani
- › Tampon FA ou PBS
- › Mélange pour la réaction PCR (Annexe 2)
  - dNTP mélange dNTP en solution mère (GE Healthcare)
  - 10X PCR tampon (BIOTOOLS ou l'équivalent)
  - MgCl<sub>2</sub> solution mère 50 mM (BIOTOOLS ou l'équivalent)
  - Taq DNA polymérase (BIOTOOLS ou l'équivalent)
- › Oligonucléotides synthétisés (amorces)
- › Tampon pour électrophorèse
- › Marqueur de masse moléculaire (In Vitrogen)
- › Agarose
- › Colorant
- › Solution d'EtBr

#### 6. Dispositifs de sécurité et de protection

Certaines souches STEC/VTEC peuvent infecter l'homme à une dose infectieuse très faible et peuvent provoquer des maladies graves. Des infections contractées en laboratoire ont déjà été signalées. Par conséquent, travailler avec des souches STEC/VTEC requiert de bonnes pratiques de laboratoires et l'utilisation de dispositifs de sécurité. EtBr est un agent mutagène et toxique. Lors de sa manipulation, il doit donc être utilisé en conformité avec la fiche de sécurité fournie et avec le matériel de protection recommandé (gants en nitrile, sarrau et contenant bien identifié). La lumière U.V (ultraviolets) peut causer des dommages aux yeux; l'utilisation d'écran en plexiglass et de lunettes de protection est donc obligatoire.

#### Abréviations

EtBr: Bromure d'éthidium  
ETEC: *Escherichia coli* entérotoxigène  
EPEC: *Escherichia coli* entérotoxigène  
ExPEC: *Escherichia coli* extraintestinal  
STEC/VTEC: *Escherichia coli* producteur de toxine Shiga  
LB: Bouillon Luria-Bertani  
PCR: Réaction en chaîne par polymérase (Polymerase Chain Reaction)

## 7. Souches de référence

Les souches de référence peuvent être préparées à l'avance et conservées à  $-20^{\circ}\text{C}$  en aliquots de 50  $\mu\text{l}$  pour une période de 8 mois. Les fiches signalétiques pour les souches de référence se trouvent à l'Annexe 4.

## 8. Interprétation des résultats

Les échantillons présentant des fragments d'amplification de la taille désirée (Annexe 1) sont considérés comme positifs pour les gènes ciblés. Les contrôles positifs et négatifs doivent être inclus dans chaque réaction et donner des résultats positifs et négatifs, respectivement.

---

## Abréviations

EtBr: Bromure d'éthidium  
ETEC: *Escherichia coli* entérotoxigène  
EPEC: *Escherichia coli* entérotoxigène  
ExPEC: *Escherichia coli* extraintestinal  
STEC/VTEC: *Escherichia coli* producteur de toxine Shiga  
LB: Bouillon Luria-Bertani  
PCR: Réaction en chaîne par polymérase (Polymerase Chain Reaction)

### Annexe 1. Amorces utilisées au Laboratoire ECL pour la détection des pathotypes ETEC, EPEC, STEC et ExPEC

Facteur de virulence	Gène	No Accession	Séquence de l'amorce	Taille de l'amplicon (pb)	TM	Souche contrôle	Référence
LT	<i>eltB</i>	J01646	s 5' TTA CGG CGT TAC TAT CCT CTC TA	275	60°	ECL 7805	Furrer et al., 1990. <i>Lett. Appl. Microbiol.</i> 10: 31-34.
LT	<i>eltB</i>	J01646	as 5' GGT CTC GGT CAG ATA TGT GAT TC	275	60°	ECL 7805	Furrer et al., 1990. <i>Lett. Appl. Microbiol.</i> 10: 31-34.
STa	<i>estA</i>	M58746	s 5' TCC CCT CTT TTA GTC AGT CAA CTG	163	60°	ECL 7805	Ngeleka et al., 2003. <i>J. Vet. Invest.</i> 15: 242-252.
STa	<i>estA</i>	M58746	as 5' GCA CAG GCA GGA TTA CAA CAA AGT	163	60°	ECL 7805	Ngeleka et al., 2003. <i>J. Vet. Invest.</i> 15: 242-252.
STb	<i>estB</i>	M35586	s 5' GCA ATA AGG TTG AGG TGA T	368	60°	ECL 7805	Lortie et al., 1991. <i>J. Clin. Micro.</i> 29: 656-659.
STb	<i>estB</i>	M35586	as 5' GCC TGC AGT GAG AAA TGG AC	368	60°	ECL 7805	Lortie et al., 1991. <i>J. Clin. Micro.</i> 29: 656-659.
F4 K88ab1 and K88ab2	<i>faeG</i>	M29374	s 5' ATC GGT GGT AGT ATC ACT GC	601	60°	ECL 7805	Ojeniyi et al., 1994. <i>Zentralbl. Veterinarmed.</i> 41: 49-59.
F4 K88ab1 and K88ab2	<i>faeG</i>	M29374	as 5' AAC CTG CGA CGT CAA CAA GA	601	60°	ECL 7805	Ojeniyi et al., 1994. <i>Zentralbl. Veterinarmed.</i> 41: 49-59.
Stx1	<i>stxA</i>	M19437	s 5' TTA GAC TTC TCG ACT GCA AAG	531	60°	ECL 6611	Woodward et al., 1992. <i>Vet. Micro.</i> 31: 251-261.
Stx1	<i>stxA</i>	M19437	as 5' TGT TGT ACG AAA TCC CCT CTG	531	60°	ECL 6611	Woodward et al., 1992. <i>Vet. Micro.</i> 31: 251-261.
Stx2all Shiga-like toxin typell subunit A and B	<i>stx2A</i>	X07865	s 5' TTA TAT CTG CGC CGG GTC TG	327	60°	ECL 6611	Woodward et al., 1992. <i>Vet. Micro.</i> 31: 251-261.
Stx2all Shiga-like toxin typell subunit A and B	<i>stx2A</i>	X07865	as 5' AGA CGA AGA TGG TCA AAA CG	327	60°	ECL 6611	Woodward et al., 1992. <i>Vet. Micro.</i> 31: 251-261.
EAE (Intimin)	<i>eae</i>	U66102	s 5' CAT TAT GGA ACG GCA GAG GT	791	60°	ECL 6611	Beaudry et al., 1996. <i>J. Clin. Microbiol.</i> 34: 144-148.
EAE (Intimin)	<i>eae</i>	U66102	as 5' ATC TTC TGC GTA CTG CGT TCA	791	60°	ECL 6611	Beaudry et al., 1996. <i>J. Clin. Microbiol.</i> 34: 144-148.

Facteur de virulence	Gène	No Accession	Séquence de l'amorce	Taille de l'amplicon (bp)	TM	Souche contrôle	Référence
CNF(multiplex)	<i>cnf</i>	U01097	s 5' TTA TAT AGT CGT CAA GAT GGA	634	60°	ECL 13421	Toth et al., 2003. <i>J. Clin. Microbiol.</i> 41: 4285-4291.
CNF(multiplex)	<i>cnf</i>	U01097	as 5' CAC TAA GCT TTA CAA TAT TGA C	634	60°	ECL 13421	Toth et al., 2003. <i>J. Clin. Microbiol.</i> 41: 4285-4291.
P (PapC)	<i>papC</i>	X61239 Y00529	s 5' GAC GGC TGT ACT GCA GGG TGT GGCG	328	60°	ECL 13421	Daigle et al., 1994. <i>Can. J. Microbiol.</i> 40: 286-291.
P (PapC)	<i>papC</i>	X61239 Y00529	as 5' ATA TCC TTT CTG CAG GGA TGC AAT A	328	60°	ECL 13421	Daigle et al., 1994. <i>Can. J. Microbiol.</i> 40: 286-291.
Aérobactine	<i>iucD</i>	M18968	s 5' AAG TGT CGA TTT TAT TGG TGT A	778	60°	ECL 3110	Herrero et al., 1988. <i>J. Bacteriol.</i> 170: 56-64.
Aérobactine	<i>iucD</i>	M18968	as 5' CCA TCC GAT GTC AGT TTT CTG	778	60°	ECL 3110	Herrero et al., 1988. <i>J. Bacteriol.</i> 170: 56-64.
Tsh	<i>tsh</i>	AF218073 L27423	s 5' GGT GGT GCA CTG GAG TGG	640	55°	ECL 3110	Dozois et al., 2000. <i>Infect. Immun.</i> 68: 4145-4154.
Tsh	<i>tsh</i>	AF218073 L27423	as 5' AGT CCA GCG TGA TAG TGG	640	55°	ECL 3110	Dozois et al., 2000. <i>Infect. Immun.</i> 68: 4145-4154.

September 2009

## Annexe 2. Préparation du mélange pour les réactions en PCR

### 1. Procédure générale (<http://fermentas.com/techinfo/pcr/dnaamplprotocol.htm>)

Réactif	Concentration finale	Quantité pour 25 µl d'un mélange PCR
Eau distillée stérile		Variable
Tampon 10X PCR	1X	2,5 µl
Mélange 2 mM dNTP	0,2 mM de chacun	2,5 µl
Amorce <sub>s</sub>	0,1-1 µM	Variable
Amorce <sub>as</sub>	0,1-1 µM	Variable
Taq DNA Polymérase	2 U/50 µl	Variable
50 mM MgCl <sub>2</sub>	2 mM	1 µl
Échantillon ADN	10 pg-1 µg	Variable

### 2. Procédure pour le PCR Multiplex LT:STa:STb:F4

Formule pour préparer une solution mère de 10 réactions

Volume final : 200 µl

Tampon 10X PCR	25 µl
2 mM MgCl <sub>2</sub>	10 µl
Mélange 2 mM dNTP	25 µl
Solution de 10 µM amorce LT <sub>s</sub>	10 µl
Solution de 10 µM amorce LT <sub>as</sub>	10 µl
Solution de 5 µM amorce STa <sub>s</sub>	10 µl
Solution de 5 µM amorce STa <sub>as</sub>	10 µl
Solution de 10 µM amorce STb <sub>s</sub>	12,5 µl
Solution de 10 µM amorce STb <sub>as</sub>	12,5 µl
Solution de 10 µM amorce F4 <sub>s</sub>	12,5 µl
Solution de 10 µM amorce F4 <sub>as</sub>	12,5 µl
H <sub>2</sub> O Milli-Q, stérile, gardée à température pièce	48 µl
2 U Taq DNA Polymérase (5 U/µl)	2 µl
<b>Total</b>	<b>200 µl</b>

- Centrifuger quelques secondes dans la micro centrifugeuse.
- Préparer les tubes avec ce mélange, pour un volume de 20 µl par tube PCR. Un certain nombre de tubes peuvent être préparés à l'avance et conservés à -20°C pour une période de 2 mois.
- Agiter le tube d'ADN, ajouter 5 µl d'ADN de l'échantillon dans un tube de PCR contenant 20 µl du mélange.
- Centrifuger quelques secondes.
- Mettre les tubes dans le thermocycleur et faire le cycle 60.
- Le contrôle positif est la souche d'*E. coli* ECL7805. Le contrôle négatif est la souche d'*E. coli* ECL3463. Voir l'Annexe 4 pour la fiche signalétique des souches.

### 3. Procédure pour le PCR Multiplex Stx1:Stx2

Formule pour préparer une solution mère de 10 réactions

Volume final : 200 µl

Tampon 10X PCR	25 µl
2 mM MgCl <sub>2</sub>	10 µl
Mélange 2 mM dNTP	25 µl
Solution de 10 µM amorce Stx1 <sub>s</sub>	12,5 µl
Solution de 10 µM amorce Stx1 <sub>as</sub>	12,5 µl
Solution de 10 µM amorce Stx2 <sub>s</sub>	12,5 µl
Solution de 10 µM amorce Stx2 <sub>as</sub>	12,5 µl
H <sub>2</sub> O Milli-Q, stérile, gardée à température pièce	88 µl
2 U Taq DNA Polymérase (5 U/µl)	2 µl
<b>Total</b>	<b>200 µl</b>

- › Centrifuger quelques secondes dans la micro centrifugeuse.
- › Préparer les tubes avec ce mélange, pour un volume de 20 µl par tube PCR. Un certain nombre de tubes peuvent être préparés à l'avance et conservés à -20°C pour une période de 2 mois.
- › Agiter le tube d'ADN, ajouter 5 µl d'ADN de l'échantillon dans un tube de PCR contenant 20 µl du mélange.
- › Centrifuger quelques secondes.
- › Mettre les tubes dans le thermocycleur et faire le cycle 60.

Le contrôle positif est la souche d'*E. coli* ECL6611. Le contrôle négatif est la souche d'*E. coli* ECL3463. Voir l'Annexe 4 pour la fiche signalétique des souches.

### 4. Procédure pour la détection d'un seul gène de virulence par PCR

Tous les gènes de virulence peuvent être amplifiés de cette manière, prendre en considération la température de réaction pour les différents gènes (Annexe 1).

Formule pour préparer une solution mère de 10 réactions

Volume final : 200 µl

Tampon 10X PCR	25 µl
2 mM MgCl <sub>2</sub>	10 µl
Mélange 2 mM dNTP	25 µl
Solution de 10 µM amorce <sub>s</sub>	12,5 µl
Solution de 10 µM amorce <sub>as</sub>	12,5 µl
H <sub>2</sub> O Milli-Q, stérile, gardée à température pièce	113 µl
2 U Taq DNA Polymérase (5 U/µl)	2 µl
<b>Total</b>	<b>200 µl</b>

- › Centrifuger quelques secondes dans la micro centrifugeuse.
- › Préparer les tubes avec ce mélange, pour un volume de 20 µl par tube PCR. Un certain nombre de tubes peuvent être préparés à l'avance et conservés à -20°C pour une période de 2 mois.
- › Agiter le tube d'ADN, ajouter 5 µl d'ADN de l'échantillon dans un tube de PCR contenant 20 µl du mélange.
- › Centrifuger quelques secondes.
- › Mettre les tubes dans le thermocycleur et faire le cycle correspondant au gène.

Le contrôle positif est une souche d'*E. coli* exprimant le gène de virulence recherché. Le contrôle négatif est une souche d'*E. coli* non-pathogène (aucun gène de virulence). Voir l'Annexe 4 pour la fiche signalétique des souches.

## 5. Programme des différents cycles de température

- Cycle 60 Laboratoire ECL
  1. 95°C pour 2 minutes
  2. 94°C pour 30 secondes
  3. 60°C pour 30 secondes
  4. 72°C pour 30 secondes
  5. Répéter de 2 à 24 pour 24 autres cycles
  6. 4°C jusqu'à la fin
  
- Cycle 55 Laboratoire ECL
  1. 95°C pour 2 minutes
  2. 94°C pour 30 secondes
  3. 55°C pour 30 secondes
  4. 72°C pour 30 secondes
  5. Répéter de 2 à 24 pour 24 autres cycles
  6. 4°C jusqu'à la fin

### Annexe 3. Solutions

Toutes les solutions ainsi que le matériel utilisé dans les différentes réactions du PCR doivent être stériles, à moins d'indication contraire.

#### 1. Solution 50XE Tris/EDTA

Recette pour 1000 ml

2 M Tris	242 g Tris base
Acide acétique glacial	57,1 ml
0,05 M EDTA	100 ml EDTA 0,5 M pH 8
H <sub>2</sub> O Milli-Q	Compléter à 1000 ml

- › Autoclaver à 121°C pendant 15 minutes.

Solution de travail **1XE**

- › 50 ml de solution 50XE
- › 2450 ml H<sub>2</sub>O Milli-Q

#### 2. Colorant

Recette pour 10 ml

0,25 % bleu de bromophénol	0,025 g
0,25 % xylène cyanole	0,025 g
40 % (w/v) sucrose	4 g
H <sub>2</sub> O Milli-Q	10 ml

- › Filtrer la solution avec un filtre de 0,45 µm.

**Note.** Si vous désirez une solution sans ligne de fond, n'ajoutez pas le bleu de bromophénol dans la préparation (à utiliser pour la détection d'amplicon autour de 100pb).

#### 3. Tampon Phosphate pH 7,2

- › Solution A : NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O (0,2 M) 27,6 g/litre d'H<sub>2</sub>O Milli-Q
- › Solution B : Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (0,2 M) 53,6 g/litre d'H<sub>2</sub>O Milli-Q
  - 140 ml solution A + 360 ml solution B
  - Ajouter 500 ml d' H<sub>2</sub>O Milli-Q
  - Ajouter 8,5 g NaCl
  - Ajuster le pH à 7,2
  - Mettre dans des bouteilles de 100 ml ou dans des tubes en verre
  - Autoclaver à 121°C pendant 15 minutes

#### Annexe 4. Fiches signalétiques pour les souches d'*Escherichia coli*

### Fiche signalétique pour souche d'*Escherichia coli*

<b>Numéro ECL</b>	ECL3110
<b>Autre désignation</b>	89-7098-92-143
<b>Sérotype</b>	O78
<b>Virotype</b>	Aérobactine;Tsh <sup>1</sup>
<b>Isolement</b> (espèce, âge, origine, anamnèse)	Poulet, inconnu, inconnu, colibacillose
<b>Origine géographique</b> (pays, province)	Canada, Québec
<b>Historique</b>	1989, Laboratoire ECL
<b>Conditions de croissance</b>	Bouillon Trypticase soja
<b>Références</b>	

<sup>1</sup> Souche testée par hybridation sur colonies pour les facteurs de virulence suivants : LT, STa, STb, Stx1, Stx2, Eae, P, CNF, Aérobactine, EAST1, AFA, Paa, Aida, Tsh, F4, F18, F5, F6, F41

## Fiche signalétique pour souche d'*Escherichia coli*

<b>Numéro ECL</b>	ECL3463
<b>Autre désignation</b>	82-862B2
<b>Sérotype</b>	O115
<b>Virotype</b>	Négatif <sup>1</sup>
<b>Isolement</b> (espèce, âge, origine, anamnèse)	Porc, deux semaines, iléon, diarrhée
<b>Origine géographique</b> (pays, province)	Canada, Québec
<b>Historique</b>	1982, Laboratoire ECL
<b>Conditions de croissance</b>	Bouillon Trypticase soja
<b>Références</b>	Ngeleka M, Jacques M, Martineau-Doize B, Daigle F, Harel J and Fairbrother JM (1993). Pathogenicity of an <i>Escherichia coli</i> O115:K"V165" mutant negative for F165(1) fimbriae in septicemia of gnotobiotic pigs. <i>Infection and Immunity</i> 61:836-843.

<sup>1</sup> Souche testée par hybridation sur colonies pour les facteurs de virulence suivants : LT, STa, STb, Stx1, Stx2, Eae, P, CNF, Aérobactine, EAST1, AFA, Paa, Aida, Tsh, F4, F18, F5, F6, F41

## Fiche signalétique pour souche d'*Escherichia coli*

<b>Numéro ECL</b>	ECL6611
<b>Autre désignation</b>	94-2127-175
<b>Sérotype</b>	O111
<b>Virotype</b>	EAST1:Stx1:Stx2:Eae:Paa:EhxA:EFA-1 <sup>1</sup>
<b>Isolement</b> (espèce, âge, origine, anamnèse)	Bovin, inconnu, iléon, inconnu
<b>Origine géographique</b> (pays, province)	Canada, Québec
<b>Historique</b>	1994, Laboratoire Ecl
<b>Conditions de croissance</b>	Bouillon Trypticase soja
<b>Références</b>	

<sup>1</sup> Souche testée par hybridation sur colonies ou par PCR pour les facteurs de virulence suivants : LT, STa, STb, Stx1, Stx2, Eae, P, CNF, Aéro bactéine, EAST1, AFA, Paa, Aida, Tsh, F4, F18, F5, F6, F41, Ehxa, EFA-1

## Fiche signalétique pour souche d'*Escherichia coli*

<b>Numéro ECL</b>	ECL7805
<b>Autre désignation</b>	97-2554B1
<b>Sérotype</b>	O149:H10
<b>Virotype</b>	LT:STa:STb:EAST1:F4(K88):Paa <sup>1</sup>
<b>Isolement</b> (espèce, âge, origine, anamnèse)	Porc, six semaines, iléon, diarrhée
<b>Origine géographique</b> (pays, province)	Canada, Québec
<b>Historique</b>	1997, Laboratoire ECL
<b>Conditions de croissance</b>	Bouillon Trypticase soja
<b>Références</b>	Bekal S, Brousseau R, Masson L, Préfontaine G, Fairbrother J and Harel J (2003). Rapid identification of <i>Escherichia coli</i> pathotypes by virulence gene detection with DNA microarrays. <i>Journal of Clinical Microbiology</i> 41: 2113-2125. Ngeleka M, Pritchard J, Appleyard G, Middleton DM and Fairbrother JM (2003). Isolation and association of <i>Escherichia coli</i> AIDA-I/STb, rather than EAST1 pathotype, with diarrhea in piglets and antibiotic sensitivity of isolates. <i>Journal of Veterinary Diagnostic Investigation</i> 15: 242-252.

<sup>1</sup> Souche testée par hybridation sur colonies pour les facteurs de virulence suivants : LT, STa, STb, Stx1, Stx2, Eae, P, CNF, Aéro bactéine, EAST1, AFA, Paa, Aida, Tsh, F4, F18, F5, F6, F41

## Fiche signalétique pour souche d'*Escherichia coli*

<b>Numéro ECL</b>	ECL13421
<b>Autre désignation</b>	2005-B089-1
<b>Sérotype</b>	
<b>Virotype</b>	P:CNF <sup>1</sup>
<b>Isolement</b> (espèce, âge, origine, anamnèse)	Porc, 4 semaines, inconnu, inconnu
<b>Origine géographique</b> (pays, province)	Canada, Québec
<b>Historique</b>	2005, Laboratoire ECL
<b>Conditions de croissance</b>	Bouillon Trypticase soja
<b>Références</b>	

<sup>1</sup> Souche testée par hybridation sur colonies pour les facteurs de virulence suivants : LT, STa, STb, Stx1, Stx2, Eae, P, CNF, Aéro bactéine, EAST1, AFA, Paa, Aida, Tsh, F4, F18, F5, F6, F41