

# **ESCHERICHIA COLI ENTEROTOSSIGENI ISOLATI IN FOCOLAI DI PWD IN ITALIA, BELGIO-OLANDA E SPAGNA: PREVALENZA DEI FATTORI DI VIRULENZA**

## **ENTEROTOXIGENIC ESCHERICHIA COLI ISOLATED DURING PWD OUTBREAKS IN ITALY, BELGIUM-THE NETHERLANDS AND SPAIN: PREVALENCE OF VIRULENCE FACTORS**

DE LORENZI G., GHERPELLI Y., BONILAURI P., MARZANI K., DOTTORI M., TORRI D., PANGALLO G., LUPPIA.

*IZSLER, Sezione di Reggio Emilia*

**Parole chiave:** Fattori di virulenza, ETEC, Diarrea post svezzamento  
**Key words:** Virulence factors, ETEC, Post-weaning diarrhoea

### **Riassunto**

Nel presente studio sono stati inclusi 543 ceppi di *Escherichia coli* enterotossici (ETEC) isolati nel periodo compreso tra gennaio 2015 e dicembre 2016, da 495 focolai di diarrea post svezzamento (PWD) occorsi in aziende suinicole in Italia, Belgio-Olanda e Spagna. I ceppi sono stati genotipizzati impiegando una metodica multiplex PCR per i geni codificanti per le fimbrie F4, F5, F6, F18, F41 e per le tossine (tossine termostabili, STa e STb, tossina termolabile, LT e tossina Shiga-like, Stx2e).

La prevalenza delle principali fimbrie e tossine tra i ceppi inclusi nello studio è risultata essere: F4 (45,4%), F18 (44,8%), STa (37,9%), STb (35,4%), LT (25,4%), Stx2e (1,3%) in Italia; F4 (52,3%), F18 (40,3%), STa (37,7%), STb (38,9%), LT (22,2%), Stx2e (1,2%) in Belgio-Olanda; F4 (45,8%), F18 (44,2%), STa (34,1%), STb (34,5%), LT (31,1%), Stx2e (0,3%) in Spagna.

Nella maggior parte dei casi è stato isolato un solo virotipo per ogni focolaio, tuttavia nel 2,4%, nel 18,5% e nel 3,5% dei casi, rispettivamente in Italia, Belgio-Olanda e Spagna, più di un virotipo era coinvolto nello stesso focolaio.

Per gli allevamenti in cui è stato possibile seguire focolai ricorrenti di PWD da ETEC nel periodo considerato si rileva che in circa la metà di questi, sia in Italia, sia in Belgio sono stati isolati nella stessa azienda diversi virotipi di ETEC, in tutti i casi con un'alternanza di ceppi presentanti fimbrie F4 e F18.

### **Abstract**

This study investigated the prevalence of fimbrial (F4, F5, F6, F18 and F41) and toxin (LT, STa, STb and Stx2e) genes of 543 enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) by PCR among 495 outbreaks of enteric colibacillosis occurred in the post weaning period in Italy, Belgium-The Netherlands and Spain in a period of two years (from January 2015 to December 2016). The prevalence of the main fimbriae among ETEC isolated from the outbreaks occurred in the different countries included in the study were: F4 (45,4%), F18 (44,8%) in Italy; F4 (52,3%), F18 (40,3%) in Belgium-The Netherlands; F4 (45,8%), F18 (44,2%) in Spain. The prevalence of genes encoding for the toxins was: STa (37,9%), STb (35,4%), LT (25,4%), Stx2e (1,3%) in Italy; STa (37,7%), STb (38,9%), LT (22,2%), Stx2e (1,2%) in Belgium-The Netherlands; STa (34,1%), STb (34,5%), LT (31,1%), Stx2e (0,3%) in Spain.

In most of the cases one virotype have been isolated in each outbreak, but more than one virotype has been involved during the same outbreak in 2.4%, 18.5% and 3.5% of them in Italy, Belgium-The Netherlands and Spain respectively. In about half of the farms, where recurrent outbreaks of ETEC PWD occurred, both in Italy (6/13) and in Belgium-The Netherlands (10/17), different virotypes of ETEC in subsequent outbreaks have been isolated (in all cases with an alternation of strains presenting fimbriae F4 and F18).

## INTRODUZIONE

La diarrea post svezzamento (PWD) da *Escherichia coli* rappresenta una delle principali cause di perdite economiche nell'allevamento suino, determinando un aumento della mortalità e un peggioramento delle performance produttive nei soggetti che superano la fase acuta della malattia, oltre ad un aumento dei costi produttivi per l'acquisto di farmaci (Van Beers-Schreurs et al., 1992; Fairbrother et al., 2005). Nei gruppi di suini colpiti dalla malattia si osserva anoressia o disoressia con comparsa di diarrea acquosa pochi giorni dopo lo svezzamento e conseguente marcata disidratazione, diminuzione delle performance produttive e mortalità. A volte la comparsa di diarrea può essere preceduta da mortalità improvvisa. I ceppi classificati come *E. coli* enterotossici (ETEC) rappresentano la più importante causa di PWD nel suino e sono caratterizzati dalla presenza di adesine fimbriali che permettono l'attacco del batterio a recettori specifici localizzati sugli enterociti e dalla capacità di produrre enterotossine che alterano l'omeostasi dei fluidi del piccolo intestino, causando un'ipersecrezione di fluidi ed elettroliti nel lume e determinando la caratteristica diarrea descritta nella PWD (Fairbrother et al., 2012).

I fattori di adesività o antigeni fimbriali che si rinvencono più di frequente nei ceppi ETEC agenti di diarrea post svezzamento nel suino sono F4 (un tempo noto come K88) e F18. Altri antigeni fimbriali isolati meno frequentemente sono F5 (K99), F6 (987P) e F41 (Kwon et al., 2002; Frydendahl, 2002; Chen et al., 2004; ; Vu Khac et al., 2006) che sono invece regolarmente riscontrati in ETEC isolati nel periodo neonatale.

Le fimbrie F4 a loro volta si suddividono in F4ab, F4ace F4ad, sebbene la maggior parte dei casi di PWD sia causata da ceppi di *E.coli* F4ac. Le fimbrie F18 invece possiedono due varianti antigeniche ovvero F18ab, presente generalmente nella malattia degli edemi e la variante F18ac, associata a casi di PWD (Rippinger et al., 1995; Fairbrother et al., 2012).

Le principali enterotossine prodotte dagli ETEC del suino sono la tossina termolabile (LT) e due tossine termostabili (STa e STb). La combinazione dei diversi fattori di virulenza, rappresentati da fimbrie e tossine, va a determinare il virotipo. Una adesina cosiddetta non-fimbriale e denominata AIDA (*adhesin involved in diffuse adherence*) e una tossina termo stabile EAST1 (*enteroaggregative heat stable enterotoxin*) sono state descritte in ceppi di ETEC isolati da casi di diarrea nel suino. Per entrambi questi potenziali fattori di virulenza, tuttavia, il reale ruolo nell'insorgenza delle forme cliniche di colibacilloso non è ancora completamente chiarito.

Alcuni ceppi ETEC sono in grado di produrre sia le enterotossine sopracitate sia la tossina Shiga-like (Stx2e), quest'ultima generalmente associata ai ceppi STEC F18 Stx2e responsabili della malattia degli edemi. I ceppi ETEC che possiedono i geni sia per la produzione delle enterotossine, sia della tossina Stx2e si comportano come ceppi enterotossici, provocando la caratteristica colibacilloso enterica piuttosto che la forma clinica e le lesioni tipiche della malattia degli edemi (Fairbrother et al., 2012).

L'obiettivo di questo studio è quello di descrivere la prevalenza dei geni di virulenza in ceppi ETEC responsabili di focolai di PWD in Italia, Olanda-Belgio e Spagna nel periodo 2015-2016.

## **MATERIALI E METODI**

Nel presente studio sono stati inclusi ceppi di *E.coli* enterotossici (ETEC) isolati presso l'IZSLER (sezione diagnostica di Reggio Emilia) nel periodo compreso tra gennaio 2015 e dicembre 2016 da 495 focolai di PWD nel suino in Italia (164), Belgio-Olanda (216) e Spagna (115).

I ceppi sopraccitati sono stati isolati da materiale patologico (da 3 a 5 campioni conferiti per ogni focolaio) costituito da feci, tamponi rettali, intestini o carcasse di suini deceduti con quadri clinici riferibili a colibacillosi enterica, insorti 1-3 settimane post svezzamento. Le feci, i tamponi rettali o il contenuto degli intestini sono stati seminati su terreno Agar sangue al 5% e su Hektoen agar e incubati per 18-24 ore a 37°C in ambiente aerobio. Dopo il periodo di incubazione previsto è stata eseguita una valutazione morfologica delle colonie cresciute sui terreni colturali sopraccitati e in particolare è stata valutata la presenza di emolisi su agar sangue. A questo proposito occorre sottolineare come la maggior parte degli ETEC isolati da casi di diarrea post-svezzamento siano emolitici quando coltivati su terreni a base di sangue.

Per ogni focolaio sono stati scelti, dopo la valutazione morfologica e la conferma biochimica, da 2 a 3 ceppi di *E.coli*, isolati da altrettanti campioni patologici, da sottoporre a genotipizzazione impiegando una metodica multiplex PCR per i geni codificanti le fimbrie F4, F5, F6, F18, F41 e per le tossine Sta, STb, LT e Stx2e (Casey e Bosworth, 2009).

I ceppi sono stati classificati come ETEC se in possesso di almeno un gene codificante per le fimbrie ed uno per le tossine. I ceppi dotati di geni codificanti per le fimbrie F18, per una o più enterotossine e per la tossina Stx2e sono stati classificati come ETEC. Quando all'interno dello stesso focolaio sono stati ottenuti ceppi appartenenti allo stesso virotipo, questo è stato conteggiato come unico isolato nel calcolo della prevalenza.

In Italia e in Belgio-Olanda per 13 e 17 aziende rispettivamente, sono stati analizzati diversi conferimenti di materiale patologico prelevato da diversi focolai di colibacillosi (da un minimo di 2 ad un massimo di 6 per azienda) verificatisi nel periodo considerato. Sono stati pertanto valutati e messi a confronto i virotipi isolati in focolai successivi occorsi nella stessa azienda.

Le prevalenze di fimbrie, tossine e virotipi tra le differenti origini dei ceppi (Italia, Belgio-Olanda e Spagna) sono state comparate tramite test chi quadrato di Pearson, con livello di significatività  $p < 0.05$ .

## **RISULTATI**

Seguendo i criteri sopra riportati sono stati inclusi nello studio e nel calcolo della prevalenza dei fattori di virulenza 543 ceppi ETEC isolati in 495 focolai nel periodo compreso tra gennaio 2015 e dicembre 2016. La prevalenza dei geni codificanti per le fimbrie e le tossine dei ceppi ETEC inclusi nello studio è riportata nella tabella 1. Le prevalenze di fimbrie e tossine non sono risultate significativamente differenti rispetto all'origine dei ceppi (Pearson  $\chi^2(8) = 12.45$   $p > 0.05$  e Pearson  $\chi^2(4) = 3.47$   $p > 0.05$ , per fimbrie e tossine rispettivamente). In 48 casi sono stati isolati due ceppi ETEC nello stesso focolaio. In tutti i casi si trattava di ETEC con geni codificanti per antigeni fimbriali differenti e nel 75% dei casi i due ceppi isolati erano positivi rispettivamente per i geni codificanti per gli antigeni fimbriali F4 e F18.

**Tabella 1.** Prevalenza delle fimbrie e delle tossine di 543 ETEC isolati in focolai di PWD in Italia, Belgio-Olanda e Spagna tra gennaio 2015 e dicembre 2016

**Table 1.** Prevalence of examined genes for fimbriae and toxins of 543 ETEC strains isolated from PWD outbreaks in Italy, Belgium-The Netherlands and Spain from January 2015 to December 2016.

n° di ceppi	Fimbrie					Tossine			
	F4	F18	F5	F6	F41	LT	STa	STb	Stx2e
<b>Italia (n=168)</b>	45.4 %	44.8 %	4.6 %	0.6 %	4.6 %	25.4 %	37.9 %	35.4 %	1.3 %
<b>Belgio-Olanda (n=256)</b>	52.3 %	40.3 %	2.3 %	0.8 %	4.3 %	22.2 %	37.7 %	38.9 %	1.2 %
<b>Spagna (n=119)</b>	45.8 %	44.2 %	1.7 %	4.2 %	4.1 %	31.1 %	34.1 %	34.5 %	0.3 %

In 9 casi, di cui 6 in Italia, 2 in Belgio-Olanda e 1 in Spagna, lo stesso ceppo possedeva più di un gene codificante per diversi antigeni fimbriali. In Italia: F5+F41 (1,8%) e F4+F18 (1,8%); in Belgio: F4+F18 (0,8%); in Spagna: F4+F6 (0,8%).

Come accennato in precedenza con il termine virotipo si intende la combinazione dei diversi fattori di virulenza che caratterizzano un ceppo all'interno del patotipo. Dall'analisi dei risultati della genotipizzazione condotta nel presente studio risulta che tra i 543 ceppi di ETEC inclusi nello studio sono stati individuati diversi virotipi: 28 nei 164 focolai descritti in Italia, 31 nei 216 casi in Belgio-Olanda e 20 nei 115 focolai in Spagna. Nella maggior parte dei casi un solo virotipo è stato osservato per ogni focolaio, tuttavia nel 2,4%, nel 18,5% e nel 3,5% dei casi, rispettivamente in Italia, Belgio-Olanda e Spagna, più di un virotipo era coinvolto nello stesso focolaio.

In totale 12 ceppi di ETEC hanno presentato sia geni codificanti per almeno una enterotossina (STa, STb, LT) sia per la tossina Stx2e. In Italia il 2,5% dei focolai possedeva questo profilo "misto", in Belgio-Olanda il 2,4% e in Spagna lo 0,8%.

I 5 virotipi più frequenti riscontrati fra i ceppi ETEC isolati nei singoli paesi inclusi nello studio sono stati selezionati ed i dati ottenuti sono stati incrociati in tabella 2. Le prevalenze dei differenti virotipi sono risultate significativamente differenti tra le varie origini (Pearson  $\chi^2(12) = 76.64$   $p < 0.001$ ).

**Tabella 2.** Virotipi prevalenti tra i 543 ETEC isolati in focolai di PWD in Italia, Belgio-Olanda e Spagna tra Gennaio 2015 e Dicembre 2016.

**Table 2.** Prevalent virotypes among 543 ETEC strains isolated from PWD outbreaks in Italy, Belgium-The Netherlands and Spain from January 2015 to December 2016.

Virotipi	Italia	Belgio-Olanda	Spagna
F18 STa	8.90%	5.08%	3.36%
F18 STa STb	17.90%	19.90%	10.10%
F18 STa STb LT	5.95%	4.30%	27.70%
F4 LT	8.93%	5.90%	4.20%
F4 STb LT	7.10%	6.30%	14.30%
F4 STa STb LT	17.86%	21.10%	12.60%
F4 STa STb	5.95%	13.70%	6.70%

Per quanto riguarda l'analisi dei ceppi ETEC isolati da casi di colibacillosi enterica in Italia, risulta che 37 dei 164 focolai analizzati hanno interessato 13 aziende, coinvolte da focolai ricorrenti di malattia. In 6 di queste (46,1%) sono stati isolati, da conferimenti di materiale patologico prelevato nel corso di focolai successivi, ETEC presentanti virotipi diversi. Andando ad eseguire la stessa valutazione sui 215 focolai occorsi in Belgio-Olanda, 74 di questi avevano interessato 17 aziende e in 10 di queste (58,8%) sono stati isolati virotipi diversi in successivi focolai. In tutti i casi in cui è stata rilevata la presenza di ceppi ETEC presentanti virotipi diversi in focolai successivi occorsi nella stessa azienda è stata osservata un'alternanza di ceppi aventi fimbrie F4 e F18.

## **DISCUSSIONE E CONCLUSIONI**

Il presente lavoro fornisce una panoramica sulla prevalenza dei virotipi di ceppi ETEC isolati da focolai di colibacillosi enterica in Italia, Belgio-Olanda e Spagna. Il primo risultato che dev'essere discusso riguarda il dato di prevalenza dei ceppi F4 e F18 che come noto sono i principali responsabili delle forme di colibacillosi che si verificano nel post svezzamento. I risultati ottenuti confermano, nei paesi coinvolti nello studio, l'importanza dei ceppi ETEC F4, che risultano essere i maggiori responsabili, in termini di prevalenza, dei casi di colibacillosi enterica. Tuttavia, gli ETEC F18 presentano livelli di prevalenza solo leggermente inferiori a quelli descritti per gli ETEC F4, confermando il ruolo fondamentale che questi hanno nell'epidemiologia della PWD. Questi risultati si trovano in accordo con un recente studio condotto a livello Europeo (Italia, Francia, Belgio-Olanda e Germania) nel periodo 2012-2014, dove la prevalenza delle fimbrie di ceppi ETEC isolati da casi di PWD risultava essere del 45,1% per F4 e del 33,9% per F18 (Luppi et al., 2016). Risultati simili sono stati riportati in indagini meno recenti eseguite in Danimarca (Frydendahl, 2002), Polonia (Osek et al., 2000) e Ungheria (Zajacova et al., 2012). In altri paesi come la Slovacchia (Vu Khac et al., 2006), invece, è stata segnalata una maggiore incidenza di ceppi F18.

Al di fuori dell'Europa esistono situazioni epidemiologiche differenti, tuttavia, in diverse aree geografiche è riportata una maggiore prevalenza di ceppi F18, come in Australia e Cuba (Smith et al., 2010; Blanco et al., 2006).

Il secondo risultato che merita una valutazione critica è legato all'isolamento di più ceppi di ETEC all'interno dello stesso focolaio. Nella maggior parte dei focolai di PWD un solo ceppo di ETEC è responsabile della problematica enterica e questo viene regolarmente isolato dai campioni patologici conferiti al laboratorio. Tuttavia, non è infrequente avere l'isolamento di più virotipi. I risultati del presente studio confermano quanto appena descritto, dove nel 2,4%, nel 18,5% e nel 3,5% dei casi, rispettivamente in Italia, Belgio-Olanda e Spagna, più di un virotipo era coinvolto nello stesso focolaio. Questo porta ad alcune considerazioni relative al campionamento di materiale patologico prelevato durante i focolai di colibacillosi. Per una diagnosi corretta, infatti è sempre buona norma conferire non meno di 3-5 campioni (feci, tamponi rettali, intestini, carcasse di suini) da cui eseguire l'isolamento e la successiva genotipizzazione del ceppo di *E.coli* isolato.

Il terzo aspetto che merita un approfondimento è relativo ai risultati ottenuti in allevamenti presentanti focolai ricorrenti di PWD da ETEC. In circa la metà di questi, sia in Italia, sia in Belgio-Olanda sono stati isolati nella stessa azienda virotipi di ETEC differenti, in tutti i casi con un'alternanza di ceppi presentanti fimbrie F4 e F18. Questo è probabilmente da ricondurre alle dinamiche eziopatogenetiche a cui è soggetta la malattia, sottolineando come i ceppi di ETEC siano normali componenti della flora intestinale del suino in equilibrio con le altre specie batteriche presenti. Moredo et al. hanno dimostrato la presenza di ETEC dalle feci di suini in assenza di diarrea in diverse fasi del processo produttivo: in suinetti sottoscrofa (16,6% degli animali), nel post svezzamento (66% degli animali) e nel periodo d'ingrasso (17,3% degli animali). Nel periodo post svezzamento il modificarsi dell'ambiente intestinale, per lo più

dovuto al cambio di alimentazione, porta ad un'alterazione della flora intestinale presente nel periodo pre-svezzamento. La presenza di fattori predisponenti (temperatura, stress, immunità dell'ospite, presenza degli specifici recettori per le fimbrie a livello della mucosa intestinale del suino etc.) può portare alla proliferazione di un ceppo o, in alcuni casi, di più ceppi di ETEC che colonizzano il piccolo intestino. In queste condizioni è quindi probabile che in focolai successivi di colibacillosi, in presenza di fattori predisponenti, possano prendere il sopravvento ceppi diversi e che questo possa essere modulato dai fattori predisponenti soprariportati.

Conoscere l'epidemiologia dei ceppi ETEC responsabili dei focolai di colibacillosi enterica in un allevamento, regione o nazione fornisce importanti elementi per un corretto approccio nella prevenzione e nella gestione della problematica sanitaria in allevamento.

Come descritto in numerosi lavori scientifici, la resistenza antimicrobica dei ceppi ETEC responsabili di focolai di PWD è andata incrementandosi nel corso degli anni, in particolare nei confronti di numerose molecole antibiotiche come la colistina, l'apramicina, la neomicina, il trimethoprim+sulfametossazolo, fluorochinoloni e cefalosporine (Zhang et al., 2014; Luppi et al., 2015). Motivo di preoccupazione e fattore limitante da un punto di vista terapeutico è il dimostrato trend di incremento delle resistenze negli ETEC isolati da casi di PWD, nonché l'aumento di ceppi con resistenze antibiotiche multiple o multiresistenti. Questi aspetti, unitamente a misure che andranno a limitare nel prossimo futuro l'utilizzo di certe molecole chiave nel controllo della colibacillosi, come ad esempio la colistina o altri presidi come l'ossido di zinco, impongono un diverso approccio al problema che deve necessariamente passare da un'accurata diagnosi clinica, anatomopatologica e di laboratorio, comprendendo anche l'interpretazione dei risultati ottenuti in quest'ultimo. In questo contesto la valutazione della concentrazione di ETEC ottenuta in coltura e la successiva genotipizzazione per evidenziare i fattori di virulenza precedentemente descritti rivestono un ruolo diagnostico fondamentale. La conoscenza del virotipo responsabile di un focolaio di colibacillosi e l'eventuale variabilità dei ceppi isolati in corso di questi focolai in momenti diversi nella stessa azienda, come evidenziato in questo studio, permettono una corretta valutazione della problematica e forniscono informazioni per la scelta di appropriate misure di controllo e di prevenzione.

## **BIBLIOGRAFIA**

Blanco M, Lazo L, Blanco JE, Dahbi G, Mora A, López C, González EA, Blanco J. (2006) Serotypes, virulence genes, and PFGE patterns of enteropathogenic *Escherichia coli* isolated from Cuban pigs with diarrhea. *Int Microbiol.* 1:53–60.

Casey T.A., Bosworth B.T. (2009) “Design and evaluation of a multiplex polymerase chain reaction assay for the simultaneous identification of genes for nine different virulence factors associated with *Escherichia coli* that cause diarrhea and edema disease in swine”. *J Vet Diagn Invest.* (1):25-30.

Chen X., Gao S., Jiao X., Liu X.F. (2004) “Prevalence of serogroups and virulence factors of *Escherichia coli* strains isolated from pigs with postweaning diarrhoea in eastern China”. *Vet Microbiol.* 103(1-2):13-20.

Fairbrother J.M., Gyles C.L. (2012) Colibacillosis in: Ziemmerman J.J., Karriker L.A., Ramirez A., Schwartz K.J., Stevenson G.W., editors. *Disease of Swine.* 10 ed. UK: Wiley-Blackwell pag. 723-47.

Fairbrother J.M., Nadeau E., Gyles C.L. (2005) “*Escherichia coli* in postweaning diarrhea in pigs: an update on bacterial types, pathogenesis, and prevention strategies” *Anim Health Res Rev.* 6(1):17-39.

Frydendahl K. (2002) “Prevalence of serogroups and virulence genes in *Escherichia coli* associated with postweaning diarrhoea and edema disease in pigs and a comparison of diagnostic approaches”. *Vet Microbiol.* 85(2):169-82.

Garabal J.I., Vázquez F., Blanco J., Blanco M., González E.A. (1997) “Colonization antigens of enterotoxigenic *Escherichia coli* strains isolated from piglets in Spain” *Vet Microbiol.* 54(3-4):321-8.

Kwon D., Choi C., Jung T., Chung H.K., Kim J.P., Bae S.S., Cho W.S., Kim J., Chae C. (2002) “Genotypic prevalence of the fimbrial adhesins (F4, F5, F6, F41 and F18) and toxins (LT, STa, STb and Stx2e) in *Escherichia coli* isolated from postweaning pigs with diarrhoea or oedema disease in Korea”. *Vet Rec.* 150(2):35-7.

Luppi A., Bonilauri P., Dottori M., Gherpelli Y., Biasi G., Merialdi G., Maioli G., Martelli P. (2015) “Antimicrobial resistance of F4+ *Escherichia coli* isolated from Swine in Italy” *Transbound Emerg Dis.* 62(1):67-71.

Luppi A., Gibellini M.V., Gin T., Vangroenweghe F., Vandebroucke V., Bauerfeind R., Binilauri P., Labarque G. and Hidalgo A. (2016) Prevalence of virulence factors in enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated from pigs with post-weaning diarrhoea in Europe. *Porcine Health Management* 2:20. DOI 10.1186/s40813-016-0039-9

Osek J. (1999) Prevalence of virulence factors of *Escherichia coli* strains isolated from diarrheic and healthy piglets after weaning. *Vet Microbiol.* 68:209–17.

Rippinger P., Bertschinger H.U., Imberechts H., Nagy B., Sorg I., Stamm M., Wild P., Wittig W. (1995) “Designations F18ab and F18ac for the related fimbrial types F107, 2134P and 8813 of *Escherichia coli* isolated from porcine postweaning diarrhoea and from oedema disease”. *Vet Microbiol.* 45(4):281-95.

Smith MG, Jordan D, Chapman TA, Chin JJ, Barton MD, Do TN, Fahy VA, Fairbrother JM, Trott DJ. (2010) Antimicrobial resistance and virulence gene profiles in multi-drug resistant enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated from pigs with post-weaning diarrhoea. *Vet Microbiol.* 145:299–307.

Van Beers-Schreurs H.M., Vellenga L., Wensing T., Breukink H.J. (1992). “The pathogenesis of the post-weaning syndrome in weaned piglets: a review”. *Vet Q.* 14(1):29-34.

Vu Khac H., Holoda E., Pilipcinec E., Blanco M., Blanco J.E., Mora A., Dahbi G., López C., González E.A., Blanco J. (2006) “Serotypes, virulence genes, and PFGE profiles of *Escherichia coli* isolated from pigs with postweaning diarrhoea in Slovakia” *BMC Vet Res.* 2:10.

Zajacova ZS, Konstantinova L, Alexa P. (2012) Detection of virulence factors of *Escherichia coli* focused on prevalence of EAST1 toxin in stool of diarrheic and non-diarrheic piglets and presence of adhesion involving virulence factors in astA positive strains. *Vet Microbiol.* 154:369–75.

Zhang W. (2014) Progress and Challenges in Vaccine development against enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) – Associated porcine Post-weaning Diarrhea (PWD). *J. Vet. Med. Res.* 1 (2):1006.