

**PREVALENZA DEI FATTORI DI VIRULENZA ASSOCIATI A  
*E. COLI* ISOLATI DA SUINI CON DIARREA POST SVEZZAMENTO  
(PWD) IN ITALIA**

***PREVALENCE OF VIRULENCE FACTORS ASSOCIATED WITH  
POST WEANING DIARRHOEA (PWD) IN PIGS IN ITALY***

GIBELLINI M.<sup>2</sup>, BONILAURI P.<sup>1</sup>, GHERPELLI Y.<sup>1</sup>, GIOVANARDI D.<sup>3</sup>,  
MARZANI K.<sup>1</sup>, TORRI D.<sup>1</sup>, DOTTORI M.<sup>1</sup>, FERRO P.<sup>2</sup>, SCANDURRA S.<sup>2</sup>,  
MAIOLI G.<sup>1</sup>, HIDALGO A.<sup>4</sup>, LUPPIA A.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Istituto Zooprofilattico Sperimentale Lombardia ed Emilia Romagna (IZSLER)*

<sup>2</sup>*Elanco Animal Health, Firenze, Italia.*

<sup>3</sup>*Laboratorio Tre Valli, Gruppo Veronesi, Italia.*

<sup>4</sup>*Elanco Animal Health, Basingstoke, UK.*

**Parole chiave:** PWD, ETEC, diarrea, F4, F18

**Key words:** PWD, ETEC, diarrhoea, F4, F18

**Abstract**

From 2012 to 2014, 159 *E. coli* isolates were obtained from diagnostic samples (rectal swabs, faeces and small intestine) collected from pigs with post weaning diarrhoea (PWD), belonging to 84 herds located in Northern Italy, using standardized bacteriological methods. To evaluate the prevalence of virulence factors, a multiplex PCR (Casey and Bosworth, 2009) for F4 (K88), F5 (K99), F6 (987P), F18, F41, STa, STb, LT and Stx2e genes was performed on *E. coli* isolates. The prevalence of fimbriae genes was: F4 (54,8%), F18 (33,3%) and F6 (1,2%). In 5 cases, the strains isolated harboured more than one fimbrial gene: F4+F18 (4,8%) and F5+F41 (1,2%). The prevalence of toxin genes was: LT (55,9%), STa (63,1%), STb (71,4%) and STx2e (9,5%). ETEC isolates were detected in 68 of the herds (80,9%), with 98,8% of them being haemolytic. ETEC-F4 were isolated in 57,6% of the outbreaks (39 out of 68), whilst 36,8% (25 out of 68) were classified as ETEC-F18. The two most common ETEC virotypes were F4, STb, LT (25%) and F4, STa, STb, LT (22,1%).

This study confirms that ETEC-F4 is most commonly associated with PWD in Italy and the most prevalent virotype was F4, STb, LT.

Information about the prevalence of ETEC in cases of PWD is relevant when measures of control of the disease such as vaccination must be taken. Alternative approaches to antibiotic therapy are needed, since very high rates of antimicrobial resistance are reported in ETEC isolated from cases of PWD.

**Riassunto**

Nel periodo 2012 – 2014 159 ceppi di *E. coli* sono stati isolati da 84 allevamenti di suini localizzati nel nord Italia con patologia enterica riferibile a PWD. I ceppi isolati sono stati tipizzati utilizzando una metodica multiplex PCR (Casey and Bosworth, 2009) per i geni codificanti le fimbrie F4, F5, F6, F18, F41 e le tossine termostabili STa, STb, la tossina termolabile LT e la tossina cosiddetta shiga-like Stx2. In 68 focolai (80,9%) i ceppi di *E. coli* isolati sono stati classificati come ETEC e nel 99% dei casi un solo

ceppo era coinvolto nel focolaio di PWD. In generale la prevalenza dei geni codificanti per antigeni fimbriali nei ceppi di *E.coli* isolati è stata: F4 (54,8%), F18 (33,3%) and F6 (1,2%). In 5 casi, i ceppi isolati hanno presentato più di un gene codificante per diversi antigeni fimbriali: F4+F18 (4,8%) e F5+F41 (1,2%). La prevalenza dei geni codificanti per le tossine è risultata essere: LT (55,9%), STa (63,1%), STb (71,4%) e STx2e (9,5%). Il 57,6% degli ETEC isolati (39 focolai su 68) sono stati identificati come F4, mentre nel 36,8% dei casi (25 focolai su 68) gli ETEC isolati sono risultati essere F18. I due virotipi più frequenti sono risultati essere F4, STb, LT (25%) and F4, STa, STb, LT (22,1%). Conoscere le cause della diarrea nel periodo del post-svezzamento è indispensabile per un corretto approccio nella scelta delle misure di controllo da adottare.

## INTRODUZIONE

La diarrea post-svezzamento sostenuta da *E.coli* (PWD) è una delle principali patologie dell'allevamento suino per le forti perdite economiche che ne derivano, causate dall'elevata mortalità all'interno dei gruppi colpiti e da ritardi di crescita nei soggetti che superano la fase acuta della malattia (Van Beers-Schreurs et al., 1992; Fairbrother et al., 2005). La stima delle perdite annuali dovute a PWD varierebbero da 40 a 314 euro/scrofa a seconda dalla gravità della malattia (Sjölund et al., 2014).

I focolai di PWD generalmente insorgono nella seconda settimana dallo svezzamento, dove la comparsa della diarrea può essere preceduta da mortalità improvvisa. I suini colpiti presentano generalmente anoressia o disoressia, feci diarroiche acquose giallastre, marcata disidratazione, perdita delle performance produttive e mortalità. La mortalità è variabile, può essere elevata raggiungendo talvolta percentuali del 25%.

La PWD è causata da ceppi di *E.coli* enterotossigeni (ETEC), che possiedono fattori di adesività che permettono l'aderenza del batterio alle cellule dell'intestino tenue e la capacità di produrre enterotossine che agiscono alterando l'omeostasi enterocitaria, causano un'ipersecrezione di fluidi ed elettroliti nel lume determinando la caratteristica diarrea descritta nella PWD (Fairbrother et al., 2012).

I fattori di adesività, comunemente chiamati antigeni fimbriali, associati agli ETEC isolati da suini colpiti da PWD sono comunemente F4 (precedentemente chiamato K88) e F18, mentre molto meno frequentemente sono coinvolte altre adesine fimbriali, F5 (K99), F6 (987P) e F7 (F41) (Kwon et al., 2002; Frydendahl, 2002; Chen et al., 2004; Vu Khac et al., 2006). Le fimbrie F4 si suddividono in F4ab, F4ac, la variante maggiormente diffusa, e F4ad (Fairbrother et al., 2012) mentre le F18 possiedono due varianti antigeniche: F18ab associata, salvo rare eccezioni, alla malattia degli edemi e la variante F18ac agente della diarrea in post-svezzamento (Rippinger et al., 1995).

La patogenesi della diarrea è legata alla produzione di tossine termolabili (LT), termostabili (STa, STb) e enteroaggregative (EAST-1) che, attraverso il meccanismo patogenetico precedentemente descritto causano un aumento di acqua nel lume intestinale e conseguente diarrea nei suinetti colpiti (Fairbrother et al., 2005). La combinazione dei diversi fattori di virulenza va a determinare il virotipo.

La diagnosi di PWD inizia con la valutazione della diarrea e delle lesioni anatomopatologiche intestinali, passa dall'isolamento del patogeno attraverso metodiche batteriologiche standardizzate e si conclude con la sua tipizzazione. La maggior parte degli ETEC responsabili della PWD, se coltivati su agar sangue, determinano una evidente emolisi e pertanto questo fenomeno viene spesso utilizzato come criterio per una diagnosi preliminare. Nella routine diagnostica, tuttavia, sia i ceppi emolitici, sia

quelli non emolitici (soprattutto quando questi ultimi vengono isolati da conclamate forme cliniche o lesioni intestinali compatibili con PWD), dovrebbero essere sottoposti a conferma e tipizzazione.

L'agglutinazione su vetrino è un metodo rapido ed economico utilizzato in molti laboratori per l'identificazione di ETEC F4. Attualmente la genotipizzazione dei ceppi isolati, impiegando metodiche PCR per l'evidenziazione di geni codificanti diversi fattori di virulenza come le fimbrie (F4, F5, F6, F18, F41) e le tossine (St<sub>a</sub>, St<sub>b</sub>, LT, EAST1), è utilizzata sempre più frequentemente per una completa tipizzazione degli ETEC.

I dati relativi alla prevalenza dei fattori di virulenza (fimbrie e adesine) dei ceppi di ETEC responsabili di focolai di PWD nei diversi paesi produttori di suini sono scarsi, generalmente non differenziano tra casi di diarrea pre e post-svezzamento o non fanno distinzione tra ceppi causa di PWD o malattia degli edemi.

L'obiettivo di questo studio è stato quello di determinare la prevalenza dei diversi antigeni fimbriali di ceppi enterotossigenici di *E.coli* responsabili di focolai di PWD negli anni 2012-2014.

## **MATERIALI E METODI**

### ***Campionamento***

Nel periodo 2012 - 2014 84 allevamenti di suini localizzati nel nord Italia con patologia enterica riferibile a PWD sono stati campionati e sottoposti a conferma di laboratorio. A questo scopo da ogni allevamento sono stati campionati almeno tre suini con sintomatologia acuta compatibile con PWD (diarrea entro 2-3 settimane dallo svezzamento) e il materiale patologico prelevato (feci, tamponi rettali, intestini o carcasse di suini deceduti) è stato conferito presso l'IZSLER per indagini di laboratorio.

### ***Metodiche di laboratorio***

I campioni conferiti al laboratorio, in caso si trattasse di carcasse di suini deceduti o intestini sono stati sottoposti ad esame anatomopatologico seguendo metodiche standardizzate e a prelievo di materiale patologico. Quest'ultimo, le feci e i tamponi rettali conferiti sono stati routinariamente seminati su terreno Agar sangue al 5% e Gassner agar. Le piastre sono state incubate per 12-18 ore a 37±1°C. Per ogni piastra è stata identificata una colonia di *E.coli*, attraverso una valutazione della morfologia, seguita da conferma attraverso metodi biochimici standardizzati. Dopo la conferma il ceppo isolato è stato testato utilizzando una metodica multiplex PCR (Casey and Bosworth, 2009) per i geni codificati le fimbrie F4, F5, F6, F18, F41, le tossine termostabili St<sub>a</sub>, St<sub>b</sub>, la tossina termolabile LT e la tossina cosiddetta shiga-like Stx<sub>2</sub>, responsabile delle tipiche lesioni anatomopatologiche osservate nella malattia degli edemi (Tabella 1).

**Tabella 1.** Sequenze dei primers utilizzati per l'identificazione dei geni codificanti per le tossine e fimbrie.

**Table 1.** DNA Sequence of PCR primers for fimbrial and toxin genes.

Fattore di virulenza	Primer	Dimensioni del prodotto PCR
STb	TGCCTATGCATCTACACAAT CTCCAGCAGTACCATCTCTA	113
STa	A ACTGA ATCACTTGACTCTT TTAATAACATCCAGCACAGG	158
F5	AATACTT'GTTTCAGGGAGAAA AACTTTGTGGTTAACTTCCT	230
LT	GGCGTACTATCCTCTCTAT TGGTCTCGGTCAG ATATGT	272
F18	TGGTAACGTATCAGCAACTA ACTTACAGTGCTATTTCGACG	313
F6	AAGTACTGCCAGTCTATGC GTAACCTCCACC'GTTTGTATC	409
F4	GTTGGTACAGGTCTTAATGG GAATCTGTCCGAGAATATCA	499
F41	AGTATCTGGTTCAGTGATGG CCACTATAAGAGGTTGAAGC	612
Stx2	AATAGTATACGGACAGCGAT TCTGACATTCTGGTTGACTC	733

Sessantaquattro ceppi di *E.coli* isolati in questo studio e classificati come ETEC sono stati testati per valutare la loro sensibilità nei confronti di un pannello di 10 antibiotici: apramicina (15 µg), cefquinome (30 µg), enrofloxacin (5 µg), eritromicina (15 µg), florfenicolo (30 µg), tiamfenicolo (30 µg), flumequina (30 µg), gentamicina (10 µg), tetraciclina (30 µg) e trimethoprim-sulfametossazolo (1,25/23,75 µg). L'antibiogramma secondo Kirby Bauer è stato eseguito seguendo un metodo di prova interno basato su standards noti forniti dal Clinical Laboratory Standard Institute (CLSI, 2002 e 2008) e l'interpretazione ha utilizzato le chiavi interpretative internazionalmente riconosciute fornite dal CLSI (2002 e 2008) e dal Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CASFM, 2010). Gli antibiogrammi hanno fornito pertanto, per ogni antibiotico impiegato, un risultato qualitativo espresso come "S, R o I" a seconda che il ceppo batterico in esame abbia mostrato rispettivamente sensibilità, resistenza o una condizione intermedia tra le prime due, ad una determinata molecola antibiotica.

#### **Valutazione dei risultati della genotipizzazione dei ceppi di *E.coli***

I risultati ottenuti dalla genotipizzazione dei ceppi di *E.coli* isolati da ogni focolaio sono stati utilizzati per il calcolo della prevalenza dei fattori di virulenza e del virotipo. Quando all'interno dello stesso focolaio sono stati ottenuti più isolati appartenenti allo stesso virotipo, questo è stato conteggiato come unico ceppo nel calcolo della prevalenza. Ai fini del presente

lavoro sono stati considerati come ETEC i ceppi presentanti i geni codificanti sia per le fimbrie, sia per le tossine.

## RISULTATI

Nel periodo 2012-2014 sono stati isolati 159 ceppi di *E.coli* da 84 focolai di diarrea post svezzamento con caratteri clinici compatibili con PWD, occorsi in altrettanti allevamenti suini. In 68 focolai (80.9%) i ceppi di *E.coli* isolati sono stati classificati come ETEC e di questi il 98.8% presentava attività emolitica quando coltivati su agar sangue. Nel 99% un solo ceppo era coinvolto nel focolaio di PWD. In 16 allevamenti (19%) i ceppi di *E.coli* isolati erano negativi per la presenza di geni codificanti gli antigeni fimbriali o le tossine indagati con la metodica sopraccitata.

In generale la prevalenza dei geni codificanti per antigeni fimbriali nei ceppi di *E.coli* isolati è stata: F4 (54.8%), F18 (33.3%) and F6 (1.2%). In 5 casi, i ceppi isolati hanno presentato più di un gene codificante per diversi antigeni fimbriali: F4+F18 (4.8%) e F5+F41 (1.19%). La prevalenza dei geni codificanti per le tossine è risultata essere: LT (55.9%), STa (63.1%), STb (71.4%) e STx2e (9.5%).

Il 57.6% degli ETEC isolati (39 focolai su 68) sono stati identificati come F4, mentre nel 36.8% dei casi (25 focolai su 68) gli ETEC isolati sono risultati essere F18. In 4 casi (5.9%) sono stati identificati ETEC presentanti sia geni codificanti per le fimbrie F4 sia F18. I due virotipi più frequenti sono risultati essere F4, STb, LT (25%) and F4, STa, STb, LT (22.1%) (Tabella 2).

**Tabella 2.** Elenco e frequenza dei virotipi di ETEC isolati.

**Table 2.** Frequency of ETEC virotipes isolated.

<b>VIROTIPI ETEC</b>	<b>N</b>	<b>%</b>
F4 Sta	2	2,9
F4 Sta Stb	3	4,4
F4 Sta Stb LT	15	22,1
F4 Stb	2	2,9
F4 Stb LT	17	25
F4 F18 Sta	1	1,5
F4 F18 Sta LT	1	1,5
F4 F18 Sta Stb LT	2	2,9
F18 Sta	5	7,3
F18 Sta LT	2	2,9
F18 Sta Stb	3	4,4
F18 Sta Stb LT	7	10,3
F18 Sta Stb Stx2e	8	11,8
<b>TOTALE</b>	<b>68</b>	<b>100</b>

Il tasso di sensibilità agli antibiotici testati nei confronti dei 64 ceppi identificati come ETEC sono riportati in tabella 3.

**Tabella 3:** Sensibilità antibiotica di 64 ceppi di *E.coli* classificati come ETEC.

**Table 3:** Susceptibility of 64 strains of *E.coli* classified as ETEC to selected antimicrobials.

Antibiotico	% di ceppi resistenti	% di ceppi intermedi	% di ceppi sensibili
Apramicina	62,5	26,6	10,9
Cefquinome	18,8	28,1	53,1
Enrofloxacin	9,4	42,2	48,4
Eritromicina	98,4	1,6	0,0
Florfenicolo	34,4	23,4	42,2
Flumequina	10,9	54,7	34,4
Gentamicina	64,1	6,3	29,6
Tetraciclina	92,2	0,0	7,8
Tiamfenicolo	78,1	20,3	1,6
Trimetoprim + Sulfonamidi	73,4	6,3	20,3

## DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Il primo punto che merita un breve approfondimento riguarda l'importanza della conferma di laboratorio dei casi presunti di PWD da ETEC. Questa costituisce un passaggio fondamentale nella diagnosi di colibacillosi ed è resa piuttosto semplice dalla facilità con cui *E.coli* può essere coltivato *in vitro* e dal fatto che in caso di patologia conclamata il patogeno raggiunge concentrazioni molto elevate sovrastando la flora batterica commensale. Quello che si verifica è una sorta di proliferazione clonale del ceppo patogeno coinvolto, come confermato dai risultati poc'anzi esposti, dove nel 99% dei focolai di PWD indagati, un solo ceppo di *E.coli* enterotossigeno era coinvolto. La semina da materiale patologico direttamente su agar sangue permette una prima valutazione sulle caratteristiche di patogenicità del ceppo isolato, essendo la maggior parte dei ceppi ETEC emolitici, come dimostrato anche nel presente lavoro dove questo è stato confermato nel 98.8% dei casi. La successiva valutazione dei fattori di adesività e delle tossine attraverso metodi sierologici o biomolecolari risulta conclusiva nel confermare l'appartenenza del ceppo in esame ad un determinato patotipo (ETEC, EDEC ecc.) e virotipo.

I risultati ottenuti nel presente studio confermano l'importanza degli ETEC F4 ed F18 come causa di PWD nel suino. Il dato di prevalenza ottenuto, per quanto riguarda i diversi fattori di virulenza valutati, apporta nuove informazioni sui ceppi di *E.coli* causa

di focolai di colibacillosi enterica nel suino in Italia e fornisce la possibilità di eseguire valutazioni comparative con i risultati ottenuti da altri autori in Europa e in altri paesi non europei importanti produttori di suini (Tabella 4).

**Tabella 4.** Prevalenza dei fattori di virulenza riportata in studi condotti in diversi Paesi su ceppi di *E.coli* isolati da casi di PWD.

**Table 4.** Prevalence of virulence factors of *E.coli* isolated in different countries from cases of PWD.

Paese	F4 %	F18 %	STa %	STb %	LT %	Bibliografia
Danimarca	48.3	34.5	28.6	83.7	66.5	Frydendahl, 2002
Polonia	46.8	22.6	93.5	67.7	33.9	Osek, 2000
Ungheria	61	-	-	-	-	Nagy et al., 1990
Slovacchia	19	35	26	46	20	Vu Khac et al., 2006
USA	64.6	34.3	27.4	72.6	57.7	Zhang et al., 2006
Brasile	43.5	39.1	80.4	82.6	54.3	Moreno et al., 2014
Australia	37.5	46.9	68.8	81.3	37.5	Chapman et al., 2006
Korea	20.1	50.7	28.5	35.4	37.5	Byun et al., 2008
Italia	54.8	33.3	63.1	71.4	55.9	Questo studio

I risultati ottenuti nel presente studio confermano l'elevata prevalenza di *E.coli* F4 in casi di PWD nel suino in Italia in accordo con quanto descritto da Luppi et al. nel 2012. Questo risultato si trova in accordo con quanto osservato in diversi studi condotti sull'argomento in Danimarca, Polonia, Ungheria, USA e Brasile. In altri paesi, tuttavia è stata segnalata una maggior incidenza di ceppi F18 in casi di PWD come ad esempio in Slovacchia, Australia e Korea.

Il virotipo prevalente è risultato essere F4 STb LT, in linea con quanto riportato da altri autori, facendo presupporre che a diverse combinazioni dei fattori di virulenza sia associata una diversa patogenicità, giustificando l'associazione e la prevalenza di questo virotipo con casi di PWD.

In 8 casi (11.8%) il virotipo è risultato essere F18 STa STb Stx2e, caratterizzato quindi da tossine tipiche degli ETEC (STa e STb) ma anche di ceppi EDEC (Stx2e) responsabili della malattia degli edemi. Nei casi specifici, tuttavia, il quadro clinico osservato era tipicamente di colibacillosi enterica, mentre mancavano completamente segni compatibili

con la malattia degli edemi. Ceppi che presentano un profilo che potremmo definire misto, come nel caso sopraindicato, si comportano generalmente come ETEC, come confermato dalla letteratura scientifica sull'argomento (Fairbrother et al., 2012).

Come descritto nei risultati, in 16 allevamenti (19%) i ceppi di *E.coli* isolati sono risultati negativi per la presenza di geni codificanti gli antigeni fimbriali o le tossine, indagati con la metodica sopraccitata. Se da una parte è corretto non considerare questi ceppi come ETEC, l'isolamento da casi di PWD di ceppi di *E.coli* che possiedono geni codificanti per le fimbrie in assenza di geni codificanti per le tossine e viceversa, richiede ulteriori approfondimenti per una corretta comprensione del ruolo che questi ceppi possono avere nell'insorgenza della diarrea.

La valutazione dei risultati ottenuti dagli antibiotici impiegati ha permesso di evidenziare scarsa attività antibiotica di molecole come la tetraciclina, il tiamfenicolo, l'apramicina. Nessun ceppo è risultato essere sensibile nei confronti dell'eritromicina, molecola prototipo per i macrolidi (Tabella 3). La maggior percentuale di ceppi sensibili è stata evidenziata nei confronti del cefquinome (53,1%), cefalosporina di quarta generazione e dell'enrofloxacin (48,4%). Occorre sottolineare, a questo proposito, le misure intraprese da numerosi stati Europei per preservare queste molecole che sono considerate tra i cosiddetti *critical important antibiotics* per la loro importanza terapeutica nell'uomo. In diversi paesi, tra cui la Danimarca, la Francia, la Svezia e la Germania, per citarne alcuni, queste molecole sono state bandite o considerate farmaci antibiotici di terza scelta, da utilizzare solo ed esclusivamente quando non sussistono alternative terapeutiche al problema sanitario.

Il 42,2% dei ceppi è risultato sensibile al florfenicolo, molecola di relativa recente introduzione, mentre percentuali di sensibilità di poco superiori e di poco inferiori al 30% sono state registrate rispettivamente per flumequina e gentamicina.

Conoscere le cause della diarrea nel periodo del post-svezzamento è indispensabile per un corretto approccio nella scelta delle misure di controllo da adottare. In particolare, il fenomeno dell'antibiotico resistenza descritto in ceppi di *E.coli* causa di PWD nel suino e il richiamo ad un uso razionale del farmaco antibiotico, riportano all'urgenza di strumenti di controllo alternativi all'utilizzo dell'antibioticoterapia, come ad esempio la vaccinazione.

## **BIBLIOGRAFIA**

Byun, J.W., Kim, H.Y., Jeon, B.Y., Lee, W.K., Lee, O.S., and Jung, B.Y. (2012). O-serogroup and virulence genes of *Escherichia coli* from the pigs suffered from pre- and post-weaning diarrhea. *Proceedings of the 22<sup>nd</sup> IPVS Congress, Jeju, Korea*, Volume 1, p 82.

Casey and Bosworth, (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. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigations* 21, 25-30.

Chapman T.A., Wu X.Y., Barchia I., Bettelheim K.A., Driesen S., Trott D., Wilson M., Chin J.J. (2006). Comparison of virulence gene profiles of *Escherichia coli* strains isolated from healthy and diarrheic swine. *Appl Environ Microbiol.* 72(7), 4782-95.

Chen, X., Gao, S., Jiao, X., and Liu, X.F. (2004). Prevalence of serogroups and virulence factors of *Escherichia coli* strains isolated from pigs with postweaning diarrhoea in Eastern China. *Veterinary Microbiology* 103, 13-20.

Cheng, D., Sun, H., Xu, J., and Gao, S. (2006). PCR detection of virulence factor genes in *Escherichia coli* isolates from weaned piglets with edema disease and/or diarrhea in China. *Veterinary Microbiology* 115, 320-328.

Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from animals. Approved standard, 3<sup>rd</sup> ed. CLSI document M31-A3. Wayne, Pennsylvania: CLSI, 2008.

Fairbrother, J.M., et al.,(2012). Colibacillosis. In: Disease of swine 10<sup>th</sup> Edition, 2012, p. 723-747.

Fairbrother, J.M., Nadeau, É., and Gyles, C.L. (2005). *Escherichia coli* in postweaning diarrhea in pigs: an update on bacterial types, pathogenesis, and prevention strategies. *Animal Health Research Reviews* 6(1), 17-39.

Frydendahl, K. (2002). Prevalence of serogroups and virulence genes in *Escherichia coli* associated with postweaning diarrhea and edema disease in pigs and a comparison of diagnostic approaches. *Veterinary Microbiology* 85, 169-182.

Kwon, D., Choi, C., Jung, T., Chung, H.K., Kim, J.P., Bae, S.S., Cho, W.S., Kim, J., and 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 diarrhea or edema disease in Korea. *The Veterinary Record* 150, 35-37.

Luppi, A., Bonilauri, P., Dottori, M., Gherpelli, Y., Biasi, G., Merialdi, G., Maioli, G., and Martelli, P. (2013). Antimicrobial resistance of F4+ *Escherichia coli* isolated from swine in Italy. *Transboundary and Emerging Diseases* <http://dx.doi.org/10.1111/tbed.12081>.

Moreno M., Eckhardt O., Nadeau E., Ferreira Neto J.S., Felizardo M.R., Gomes V.T.M., Moreno A.M. (2014). Frequency of *E.coli* ETEC positive for K88 fimbriae (F4) in farms with post-weaning diarrhea in Brazil. *Proceedings of the 23<sup>rd</sup> IPVS Congress, Cancun, Mexico*, Poster, p 16.

Nagy B., Casey T.A., Moon H.W. (1990). Phenotype and genotype of *Escherichia coli* isolated from pigs with postweaning diarrhea in Hungary. *J Clin Microbiol.* 28(4), 651-3.

Osek J. (2000). Clonal analysis of *Escherichia coli* strains isolated from pigs with post-weaning diarrhoea by pulsed-field gel electrophoresis. *FEMS Microbiology Letters* 186, 327-331.

Rippinger P., Bertschinger HU, Imberechts H., Nagy B., Sorg I., Stamm M., Wild P., Witting W., (1995). Designations F18ab and F18ac for the related fimbrial types F107, 2134P and 8813 of *Escherichia coli* isolated from porcine postweaning diarrhea and from oedema disease. *Vet. Microbiol* 45: 281-295.

Sjölund M., Zoric M., Wallgren P. (2014). Financial impact on pig production: gastrointestinal disorders. Proceedings of 6<sup>th</sup> European Symposium of Porcine Health and management (ESPHM), Sorrento, Italy, 7<sup>th</sup>-9<sup>th</sup> May 2014. P111.

Van Beers-Schreurs, H.M.G., Vellenga, L., Wensing, Th., and Breukink, H.J. (1992). The pathogenesis of the post-weaning syndrome in weaned piglets: A review. *Veterinary Quarterly* 14(1), 29-34.

Vu Khac, H., Holoda, E., Pilipinec, E., Blanco, M., Blanco, J.E., Mora, A., Dahbi, G., López, C., González, E.A., and Blanco, J. (2006). Serotypes, virulence genes, and PFGE profiles of *Escherichia coli* isolated from pigs with postweaning diarrhea in Slovakia. *BMC Veterinary Research* 2, 10.

Zhang W., Zhao M., Ruesch L., Omot A., Francis D. 2007. Prevalence of virulence genes in *Escherichia coli* strains recently isolated from young pigs with diarrhea in the US. *Veterinary Microbiology* 123 145–152.