

Université de Montréal

**Variabilité des souches de *Escherichia coli* provenant de
divers poulaillers au Québec**

par

Benoît Lanthier

Département de sciences cliniques

Faculté de médecine vétérinaire

Mémoire présenté à la Faculté de médecine vétérinaire
en vue de l'obtention du grade de maître ès sciences (M. Sc.)
en sciences vétérinaires
option Sciences cliniques

Avril, 2015

©, Benoît Lanthier, 2015

Résumé

La technique d’empreinte génétique par rep-PCR, qui utilise des séquences d’ADN répétitives, a été utilisée pour mettre en évidence la présence de groupes d’*Escherichia coli* signatures pour divers poulaillers et d’évaluer leur évolution suite au détassement. L’amorce (GTG)₅ a été utilisée pour générer des empreintes d’ADN de 522 isolats provenant de 7 poulaillers échantillonnés deux fois : juste avant et 5 jours après le détassement. Les empreintes d’ADN ont été analysées selon l’algorithme de correspondance de bandes de Jaccard. Les analyses de Jackknife des coefficients de similitude ont révélé qu’entre 73% et 93% des isolats ont pu être correctement regroupés selon leur poulailler d’origine. Un dendrogramme construit à partir des coefficients de similitude de Jaccard a groupé les isolats dans 42 grappes avec près de la moitié dans une seule grappe. Environ 80% des isolats ont été groupés dans les 6 plus grosses grappes. Quatre de ces grappes ont été constituées majoritairement d’isolats provenant d’un seul site. Ces grappes pourraient être des grappes signatures qui permettraient d’identifier des poulaillers en particulier. La comparaison des nombres de grappes présentes avant et après le détassement a révélé une variabilité de l’impact du détassement sur les populations fécales d’*E. coli*. Pour certains sites, il y avait peu d’agrégats présents tant avant qu’après le détassement alors que pour d’autres sites c’était le contraire. Quoique plus de recherches soient nécessaires afin de valider les conclusions, nos résultats suggèrent la présence de sous-populations signatures d’*E. coli* pour certains poulaillers et une réponse variable à l’effet du détassement.

Mots-clés : *Escherichia coli*, détassement, dépopulation partielle, rep-PCR, (GTG)₅-PCR

Abstract

Rep-PCR genomic fingerprinting, which uses repetitive intergenic DNA sequences, was investigated as a mean to identify signature pattern of chicken fecal *Escherichia coli* populations and evaluate their changes over time. The (GTG)₅ primer was used to generate DNA fingerprints from 522 isolates originating from 7 chicken houses just prior to, and five days after, thinning. The DNA fingerprints were analysed by using the Jaccard band-matching algorithm. Jackknife analysis of the resulting similarity coefficients revealed that between 73% and 93% of the isolates could correctly be grouped in their house of origin. A dendrogram constructed by using Jaccard similarity coefficients grouped the isolates in 42 clusters with approximately half of them in the same cluster. Out of the 6 largest clusters, containing 80% of all isolates, 4 consisted mostly of isolates coming from only 1 house. These clusters could represent signature clusters identifying specific houses. A comparison of the number of clusters present before and after thinning for each house revealed a substantial difference in the behaviour of the fecal *E. coli*. For some houses, there were few clusters represented both before and after thinning, with a high number of new clusters appearing after thinning whereas in other houses, the contrary was observed. Our results suggest the presence of a signature subpopulation in some chicken houses and a variable response of the *E. coli* population to the effect of thinning.

Keywords : *Escherichia coli*, thinning, partial depopulation, rep-PCR, (GTG)₅-PCR

Table des matières

Résumé.....	ii
Abstract.....	iii
Table des matières.....	iv
Liste des tableaux.....	vi
Liste des figures	vii
Liste des sigles et liste des abréviations.....	viii
Remerciements.....	ix
I. Introduction	1
II. Recension des écrits	3
1.1. Modification du statut sanitaire	3
1.1.1. Flore bactérienne du poussin d'un jour.....	3
1.1.2. Transmission horizontale d'agents infectieux	3
1.1.3. Transmission d'agent infectieux en lien avec le détassement	5
1.1.4. Modulation des populations intestinales de <i>Escherichia coli</i>	5
1.2. Biosécurité	6
1.2.1. Définition	6
1.2.2. Impacts de la biosécurité.....	6
1.2.3. Mesures courantes de biosécurité	7
1.2.4. Défi	10
1.3. <i>Escherichia coli</i>	11
1.3.1. La bactérie <i>Escherichia coli</i>	11
1.3.2. ExPEC (<u>Ex</u> traintestinal <u>P</u> athogenic <u>E</u> <i>scherichia coli</i>).....	12
1.3.3. APEC (Avian Pathogenic <i>E. coli</i>) et la colibacillose.....	14
1.3.4. ExPEC et santé humaine	15
1.3.5. ExPEC aviaire et ExPEC humain	16
1.3.6. Classification des <i>Escherichia coli</i>	17
1.4. Méthodologies moléculaires de différenciation de souches de <i>Escherichia coli</i>	19

1.4.1. Méthodes de restriction.....	19
1.4.2. Méthodes d'amplification.....	21
1.4.3. Méthodes de séquençage.....	22
1.5. Utilisations de l'empreinte génétique d'ADN par rep-PCR.....	23
1.6. Objectifs et hypothèses de travail.....	26
III. Matériel et méthodes.....	27
Article I : Differentiation of fecal <i>Escherichia coli</i> populations from chicken houses on different farms and evaluation of response to thinning by rep-PCR genomic fingerprinting.	27
IV. Discussion.....	49
V. Conclusion.....	54
Bibliographie.....	56
Annexe A : Questionnaire sur les mesures de biosécurité.....	x

Liste des tableaux

Tableau I: Assignment of isolates to house source groups by using (GTG) ₅ -PCR DNA fingerprints and Jackknife analysis	48
--	----

Liste des figures

Figure 1: Typical (GTG) ₅ -PCR DNA fingerprint patterns	42
Figure 2: Dendrogram showing the relatedness of <i>Escherichia coli</i> isolates	43
Figure 3: Number of clusters in relation to the number of isolates and of source houses per cluster	44
Figure 4: Breakdown of the 6 largest clusters by the house of origin of the isolates	45
Figure 5: Number of clusters containing isolates from each house based on their representation through time.	46
Figure 6: Supplementary data; Predicted number of clusters based on similarity cut-off value	47

Liste des sigles et liste des abréviations

Ap : Agrégat possédant, pour un site, seulement des isolats provenant de l'échantillonnage après le détassement

AFEC : Avian Fecal *Escherichia coli* (*Escherichia coli* fécal aviaire)

APEC : Avian Pathogenic *Escherichia coli* (*Escherichia coli* pathogène aviaire)

Av : Agrégat possédant, pour un site, seulement des isolats provenant de l'échantillonnage avant le détassement

Cm : Agrégat possédant, pour un site, des isolats provenant de avant et après le détassement

ExPEC : *Escherichia coli* pathogène extra-intestinal

MOS : mannan-oligo-saccharide

NMEC : Neonatal Meningitis *Escherichia coli* (*Escherichia coli* impliqué lors de méningite néonatale)

PFGE : Pulse-Field Gel Electrophoresis (Électrophorèse en gel par champs pulses)

UPEC : Uropathogenic *Escherichia coli* (*Escherichia coli* uropathogène)

Remerciements

J'aimerais commencer en remerciant Martine Boulianne. Elle m'a permis de débiter le programme DMV-MSc et par la suite de trouver ma place en tant que vétérinaire en industrie avicole tout en continuant la maîtrise à temps partiel.

Merci aussi à John Fairbrother, pour les multiples heures à son bureau à discuter de *Escherichia coli* sous toutes ses facettes.

La patience, le support et la compréhension de Martine et de John ont été très appréciés durant ces 4 années à faire une maîtrise totalement à temps partiel, au début avec le programme DMV-MSc et par la suite avec un emploi à temps plein.

Et finalement, merci à l'équipe du laboratoire EcL, Brigitte Lehoux, Ghyslaine Vanier et Clarisse Desautels pour leur appui technique indispensable lors des manipulations au laboratoire.

I. Introduction

Afin de maximiser l'espace en production avicole, le détasement est régulièrement pratiqué. Il consiste à retirer environ la moitié des oiseaux du poulailler à un poids donné afin de permettre au restant de poursuivre leur croissance jusqu'à un poids plus élevé en bénéficiant d'une densité d'élevage plus faible. Pour ce faire, une équipe de travailleurs doit entrer dans le bâtiment et attraper les poulets. Comme ces gens vont sur plusieurs sites de production à chaque jour, ils présentent un risque réel d'introduction de maladie dans le troupeau détassé. D'ailleurs, une épidémie de laryngotrachéite infectieuse survenue au Québec il y a quelques années a été exacerbée entre autre par les équipes d'attrapeurs de poulets.[44]

L'objectif initial du projet était de déterminer si des mesures de biosécurité de base, soit le lavage des mains, le port de couvre-botte de plastique et le port de survêtement, permettraient de réduire la contamination des poulaillers lors du détasement. Pour répondre à cette question, il était nécessaire de choisir un agent infectieux qui servirait de marqueur et pour lequel les variations seraient mesurables. Des agents tels que *Campylobacter* et *Salmonella* étaient des candidats potentiels. Pour plusieurs raisons, mais notamment pour son caractère ubiquitaire, *Escherichia coli* a été préféré. Nous croyions à ce moment que l'analyse des différences entre les patrons de gènes de virulence retrouvés dans les souches de *E. coli* présentes avant et après le détasement dans les troupeaux étudiés permettrait de conclure au sujet de l'efficacité des mesures de biosécurité prises par les attrapeurs. Ces gènes de virulence auraient également pu fournir de l'information sur l'origine des *E. coli* ayant contaminés le poulailler, notamment une contamination provenant de la volaille ou de l'humain.

Lors de l'échantillonnage et de la collecte d'information au travers du questionnaire rempli par l'éleveur, il a été constaté que la régie et le niveau de biosécurité à la ferme variait beaucoup d'un site à l'autre diminuant fortement la pertinence des mesures de biosécurité prises par les attrapeurs.

À ce moment, le projet s'est orienté vers l'identification d'une signature de la flore de *E. coli* pour chacun des sites et l'observation de l'effet du détasement sur cette signature. Suite à la lecture de nombreux articles traitant de la détermination de l'origine de souches de *E. coli* qui privilégiaient des techniques telles que le rep-PCR, la méthode retenue pour le projet a été

révisée pour finalement s'arrêter sur le (GTG)₅-PCR. Cette technique est peu coûteuse et rapide, permettant de tester un grand nombre de souches.

Le (GTG)₅-PCR ne donnant pas d'information qualitative sur la nature des isolats étudiés comme l'analyse des gènes de virulence, nous croyions qu'elle permettrait d'obtenir une meilleure différenciation des sites. La première hypothèse est que cette technique permettrait de mettre en évidence des différences au niveau de la flore de *E. coli* présente dans les poulaillers étudiés. La deuxième hypothèse est que la signature de *E. coli* obtenue par la technique varierait suite au détassement. Les objectifs du projet étaient d'utiliser une technique de laboratoire déjà existante dans le but de faire ressortir des variations chez les *E. coli* entre différents poulaillers et dans le temps, suite au détassement.

II. Recension des écrits

1.1. Modification du statut sanitaire

1.1.1. Flore bactérienne du poussin d'un jour

Les poussins arrivent en ferme avec une flore bactérienne déjà établie, variant en fonction de leur provenance. En effet, malgré la structure de l'industrie, les reproducteurs transmettent une partie de leur flore à leur descendance. Des isolats de *Escherichia coli* génétiquement identiques ont été identifiés chez des poussins reproducteurs, chez ces mêmes reproducteurs en ponte et éventuellement chez leurs poussins au niveau des élevages de poulet de chair.[21] Le couvoir est également un facteur important de modulation de la flore bactérienne du poussin. Malgré des efforts de nettoyage et de désinfection important, il persiste néanmoins une flore résidente non négligeable au niveau des couvoirs, tant au niveau aérosol[86] qu'au niveau des équipements[10, 25, 33]. Il est fort possible que la naïveté immunologique du poussin d'un jour le prédispose à être contaminé lors de son passage au couvoir.

1.1.2. Transmission horizontale d'agents infectieux

La flore bactérienne du poulet de chair en croissance est en constante évolution durant l'élevage. Un facteur affectant cette évolution est l'arrivée de nouveaux agents microbiens par le biais de différents vecteurs mécaniques et biologiques.

Par exemple, la nourriture a un rôle à jouer dans l'évolution de la flore intestinale du poulet. Des *E. coli* et des *Enterococcus* viables ont été détectés dans respectivement 50% et 100% des échantillons de nourriture et pour 31.8% et 65.9% des échantillons d'ingrédients bruts. Par la méthode FISH (Fluorescent in situ hybridisation), la présence d'*E. coli* et d'*Enterococcus* non viable a été détectée pour tous les échantillons de nourriture et pour environ 90% des échantillons d'ingrédients bruts.[34] Même si ces bactéries ne sont plus viables, une partie de leur matériel génétique pourrait être transférée à d'autres micro-organismes par transformation.

Les bactéries sans paroi ou celle ayant une paroi altérée (Par un bêta-lactame ou un glycopeptide) ont une plus grande capacité à acquérir du matériel génétique étranger[132].

La contamination de l'eau de boisson par des eaux usées traitées de provenance humaine ou animale est une voie d'entrée potentielle de micro-organismes au niveau du poulailler. Le traitement des eaux usées diminue la quantité de bactérie de seulement 1 à 4 log, laissant de $4,4 \times 10^5$ à $2,28 \times 10^7/100$ mL[87]. L'accumulation de biofilm et la non désinfection des lignes d'eau sont aussi source de bactéries alors que la chloration de l'eau diminue le niveau de contamination[118].

La transmission d'agents infectieux de l'extérieur vers l'intérieur du poulailler est également facilitée par une multitude de vecteurs mécaniques reliés directement aux activités des intervenants du milieu. L'environnement immédiat de la ferme d'élevage est un réservoir potentiel de contamination, notamment de *Campylobacter*[100]. Des mesures de biosécurité insuffisantes faciliteraient l'introduction dans les poulaillers. De plus, des fermes opérées par le même producteur, qui partagent des véhicules ou qui ont la même équipe d'attrapeurs ont tendance à être infectées par des souches identiques de *Campylobacter*, suggérant une transmission horizontale par le personnel et/ou l'équipement[2]. Les camions, les chariots élévateurs et les palettes ont été identifiés comme facteur de risque pour la contamination par *Campylobacter*[105]. Les bottes contaminées est un facteur de risque souvent cité[2, 100, 105, 106, 118]. Les vecteurs biologiques, tel les rongeurs et les mouches, ont également leur importance pour la transmission de micro-organisme au poulailler[118]. Une corrélation est établie entre la quantité de rongeur sur un élevage et la prévalence de *Salmonella*[75] et de *Campylobacter*[88]. Les ténébrions peuvent aussi contribuer à la persistance de contamination à *Salmonella*[60, 116], *Campylobacter*[60] et *Clostridium botulinum*[119].

La transmission d'agents infectieux d'un poulailler vers un autre par aérosol est une réalité pour plusieurs agents, notamment l'influenza aviaire[133] et la maladie de Newcastle[79]. Pour *E. coli*, *Campylobacter* et *Salmonella*, la transmission par aérosol est minimale[30]. Toutefois, l'environnement immédiat du poulailler, principalement du côté des sorties d'air, est à haut risque d'être contaminé par des *E. coli* originant du poulailler[42]. Des analyses d'empreintes

généétiques par PFGE ont démontré que des *E. coli* causant de la cellulite pouvaient persister jusqu'à plus de 6 mois dans l'environnement d'un poulailler[115].

1.1.3. Transmission d'agent infectieux en lien avec le détassement

Le détassement, processus par lequel seulement une portion des poulets d'un troupeau sont envoyés à l'abattoir afin de donner de l'espace aux autres poulets pour atteindre un poids plus élevé, constitue un facteur de contamination important des poulaillers. Le rôle de cette pratique dans la contamination d'un troupeau par un agent infectieux a particulièrement été mis en évidence lors d'études sur *Campylobacter*. Il a ainsi été démontré que les mesures de biosécurité en place lors de l'attrapage des oiseaux sont généralement insuffisantes pour éviter la contamination. En effet, le lavage des mains et des bottes diminuent la quantité de *Campylobacter*, mais ne l'élimine pas complètement et n'empêche pas la contamination des oiseaux. De plus, les cages de transport lavées par les procédés commerciaux sont souvent encore positives pour *Campylobacter* et constituent un facteur important de la transmission de ce pathogène aux oiseaux.[2, 100, 106] Dans la majorité des études, les élevages négatifs pour *Campylobacter* devenaient positifs de 2 à 6 jours post-détassement.[2, 100]

1.1.4. Modulation des populations intestinales de *Escherichia coli*

Plusieurs facteurs influencent la composition de la flore intestinale de *E. coli*, tant au niveau qualitatif que quantitatif.

Certains produits ajoutés à l'aliment, tel les mannan-oligosaccharides (MOS)[14, 15, 72], les fructo-oligosaccharide (FOS)[72], les parois de levures[51], la lignine purifiée[15], les acides organiques[18, 59] et les antibiotiques (Enramycine[59], bacitracine[14, 51], avilamycine[72], carbadox[81]) diminuent la quantité de *E. coli* de l'intestin.

Certains probiotiques, tel que *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* LC01[135] et *Enterococcus faecium* DSM 7134[136] diminuent également la quantité de *E. coli* de l'intestin chez l'humain.

Certains de ces produits modifient également la composition qualitative de la flore de *E. coli*. L'usage d'acide organique chez les porcelets diminue le nombre de *E. coli* possédant l'entérotoxine B.[134] Certains probiotiques et acides organiques diminuent l'expression de Stx2A (shiga toxine 2 A).[26]

1.2. Biosécurité

1.2.1. Définition

La définition Larousse du terme « biosécurité » est la suivante : « Ensemble de mesures visant à sécuriser l'exploitation des ressources biologiques, notamment en prévenant les risques de contamination, de pollution de l'environnement ou d'appauvrissement de la biodiversité. » Ce concept est relativement nouveau dans le vocabulaire commun et est né avec l'intensification de l'élevage. La biosécurité a comme objectif de diminuer le risque de contamination d'une population animale par des agents infectieux et de réduire les coûts associés à ceux-ci.[52] La prévention des maladies par la biosécurité s'effectue à plusieurs niveaux. Cela inclut la formation du personnel, le contrôle de l'accès à la ferme, les mesures d'hygiène lors de l'entrée sur une exploitation et dans un bâtiment, la gestion des intrants, les techniques de disposition des carcasses et les communications en cas d'éclosion de maladie contagieuse. Un bon protocole de biosécurité incluant une combinaison de ces différentes mesures est ce qui offre le plus de protection aux populations animales en question. Une mesure de biosécurité seule ne donnera pas nécessairement de bons résultats, c'est l'effet de synergie des différentes mesures mises ensemble qui permettront d'obtenir une protection optimale.[20]

1.2.2. Impacts de la biosécurité

Les mesures de biosécurité sont onéreuses, mais rentables à long terme par la réduction des impacts de certaines maladies[52] . Pour certaines maladies, la biosécurité peut être la seule solution pour réellement l'éradiquer ou la contrôler[44] .

Des mesures de biosécurité strictes ont permis, entre autres, de prévenir la contamination de troupeaux par *Gallibacterium* [20], le virus du SRRP [22], la fièvre aphteuse [4], *E. coli* entérotoxigène [3], la maladie de Marek [73], la tuberculose [11] et *Campylobacter jejuni* [9].

Certaines zoonoses peuvent aussi être prévenues, tel que *Bartonella quintana* [78], le virus syncytial respiratoire [127] et *Streptococcus pneumoniae* [127].

L'usage d'antimicrobien [29] et l'antibiorésistance [23] peuvent être diminués par la mise en place d'un bon protocole de biosécurité.

Un questionnaire auprès d'éleveurs de la péninsule du Delmarva, composé d'une partie du Delaware, du Maryland et de la Virginie, démontre qu'un lien étroit existe entre de bonnes pratiques de biosécurité et les performances des troupeaux [123]. Le bien-être animal, l'efficacité des vaccins et les profits s'en trouvent améliorés [23].

À un niveau plus global, la biosécurité inclut les mesures mises en place afin d'empêcher que certains agents utilisés en laboratoire tombent dans les mains d'organisations voulant s'en servir comme armes biologiques [122].

1.2.3. Mesures courantes de biosécurité

Les concepts de bio-exclusion et de bio-confinement sont au cœur des méthodes de biosécurité.

La bio-exclusion et le bio-confinement peuvent impliquer, à un niveau global, un système de traçabilité [107] et des contrôles à l'importation [107]. Ils font partie des mesures d'intervention nécessaires au contrôle d'éclairs d'influenza aviaire hautement pathogène [64]. À titre d'exemple, un épisode d'influenza aviaire en Tunisie a été relié à de mauvaises mesures de biosécurité [126].

Au niveau des élevages, cela implique entre autre le contrôle des visiteurs, l'exclusion des animaux sauvages et de basse-cour, le contrôle des liens entre les employés et des animaux à risque, les procédures de lavage et de désinfection et la vaccination. Par exemple, la seule méthode efficace pour se débarrasser du virus causant le syndrome entéritique du dindonneau est l'application de mesures de biosécurité stricte : c'est-à-dire lavage, désinfection et bio-exclusion[13]. Au Bangladesh, les principaux facteurs mis en cause pour un épisode d'Influenza A(H5N1) chez des poules commerciales étaient : le nombre d'employé, la fréquence de visites de vétérinaire, la présence d'oiseaux de basse-cour qui rôdent sur le territoire de la ferme et la participation des employés dans des activités d'échanges d'oiseaux[99]. En Éthiopie, le principal facteur de risque mis en évidence pour la séroprévalence de Brucellose chez les vaches croisés avec de la génétique exotique est la présence d'animaux de compagnie sur les fermes[8]. Lors d'un épisode d'influenza équine en Australie, l'hygiène des visiteurs (vêtements, lavage des mains et des souliers) et la fréquence de la manipulation des animaux ont été soulignés comme facteurs de risque principaux[49]. En ce qui concerne le circovirus porcine type 2, les points de biosécurité importants qui ont été notés sont : avoir des troupeaux fermés et avoir un contrôle des visiteurs – ceux-ci ne doivent pas avoir été en contact avec des porcs pour une période d'au moins 2 jours[1]. Le contrôle des visiteurs a aussi été noté comme étant un point important pour la transmission du virus en cause de la peste porcine africaine en Russie[98]. La quarantaine est un bon exemple de bio-confinement et est un procédé très utile dans des hôpitaux. Par exemple, des chiens infectés de *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline peuvent contaminer l'hôpital vétérinaire auquel ils sont admis et mettre en danger d'autres patients[128].

Les procédures de biosécurité ont tendance à être appliquées plus rigoureusement dans les régions à forte densité d'élevage[41]. Par exemple, en Espagne, les porcheries situées dans des régions éloignées avaient des cotes de biosécurité inférieures à celles situées dans des régions à forte densité[114]. Cette tendance est logique considérant que la densité et la pression d'infection[85] sont des facteurs très importants dans la transmission des maladies infectieuses. Par exemple, les chiens dans un refuge ou en pension avaient plus de chance d'avoir l'influenza

canin H3N8 que les autres[5]. La prévalence de *Brachyspira* chez des poules pondeuses en Ontario est plus élevée dans des fermes multi-âges[89].

La contamination d'un troupeau par *Campylobacter jejuni* peut être modulée par la mise en place d'un programme de biosécurité. Les mesures de biosécurité en Thaïlande se sont beaucoup resserrées suite à un épisode d'influenza aviaire et une diminution concomitante de la prévalence de *Campylobacter* dans les céca a été observée[31]. Elle a pu être prévenue ou ralentie par l'usage d'un pédiluve contenant un désinfectant phénolique[61], l'usage de bottes uniques par poulaillers[129], le lavage des mains[129], le changement de vêtement[129], le contrôle de la vermine[129], le lavage et désinfection du bâtiment[129], l'usage de moustiquaires[9].

Le contrôle de la vermine est également une mesure ayant un impact sur la séroprévalence à l'influenza aviaire[85], sur la présence de la trichinellose au Niger[95] et sur la transmission de *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline[102].

L'accessibilité des carcasses d'animaux morts est aussi un facteur important, comme pour les cas de la trichinellose au Niger[95] et d'influenza aviaire hautement pathogène en Égypte[96].

La mise en place de barrières physiques séparant les humains et les animaux domestiques des animaux sauvages permet de réduire la transmission de *Mycobacterium bovis* chez les bovins[11], *Bartonella quintana*[78], le virus syncytial respiratoire[127] et *Streptococcus pneumoniae*[127] chez l'humain. Le contact avec de la sauvagine est un facteur de risque de séroprévalence à l'influenza aviaire chez les oiseaux de basse-cour du Maryland[85].

À un niveau plus large, une prévention adéquate des maladies nécessite un plan qui inclut la surveillance[107, 127] et la communication des enjeux[127].

Par exemple, pour prévenir la transmission de maladie aux jeux équestres à Londres en 2012, 5 étapes ont été mis en place : la surveillance maladies aux lieux de départ des chevaux, un registre des mouvements avant le départ, un examen avant le départ, un examen à l'arrivée et le confinement lors des jeux. [65] Des efforts de détection chez les reproducteurs permettent aussi de contrôler la dermatose nodulaire contagieuse, qui peut être transmise par voie séminale. [6]

L'absence d'un programme officiel de surveillance du virus de la peste porcine africaine en Europe de l'Est a été noté comme étant un facteur de risque pour la propagation de ce virus.[111]

En Grande-Bretagne, il y avait, depuis les années 1980, une épidémie de cas de salmonellose chez les humains à *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Enteritidis. La vaccination et des efforts d'améliorations des mesures de biosécurité chez les poules pondeuses ont permis de faire graduellement diminuer le nombre de cas[32, 53, 57].

Certaines mesures, telles la dépopulation[107] ou la vaccination[1, 107], permettent de contrôler une maladie infectieuse pour une région donnée.

1.2.4. Défi

Le plus grand défi à relever lors de la mise en place de mesures de biosécurité est l'observance. Les mesures connues et applicables peuvent être très efficaces lorsque les utilisateurs les respectent de façon systématique. Malheureusement, le respect des mesures de biosécurité n'est pas toujours de mise[103]. Plusieurs raisons permettent d'expliquer ces observations.

Parfois, c'est au niveau des connaissances ou des croyances populaires qu'il y a des déficits. Par exemple, lors d'un questionnaire sur la perception des propriétaires de domaines équestres en Australie sur la biosécurité après une épidémie d'influenza, certains disaient croire aux mesures d'hygiène (véhicule, pédiluve, vêtement, etc.) ou aux mesures de contrôle de l'accès. Cependant, rares étaient les répondants qui croyaient aux deux[113]. Dans une étude de la biosécurité dans des porcheries en Espagne, les éleveurs avaient tendance à donner une meilleure cote de biosécurité que les vétérinaires, et ce, pour une même ferme[114].

Il se peut également que l'information ne se rendent pas au destinataire, ou que ceux-ci ne soit pas réceptif à cette information. Une étude sur les fermes laitières en croissance en Irlande a donné des résultats intéressants. Ainsi, 53% des répondants affirmaient manquer d'information. Les fermes en milieu dense avaient trois fois plus de probabilité de mettre des quarantaines en place. Les répondants nés entre 1960 et 1990 étaient deux fois plus enclins que ceux nés entre 1940 et 1960 à respecter des mesures de biosécurité. Finalement, les entreprises de grande taille avaient cinq fois plus de probabilité de participer à un programme de santé animale volontaire

et trois fois plus de probabilité de payer plus cher pour un animal avec un certificat de santé[112]. Globalement, les mesures de biosécurité ont tendance à viser les visiteurs plus que le personnel même si elles sont importantes peu importe le statut de la personne entrant en contact avec les animaux à risque[41].

Plusieurs caractéristiques propres aux individus ont un impact sur la mise en place des mesures de biosécurité, soit la perception de l'importance des diverses mesures de biosécurité, l'attitude envers le bien-être animal, les connaissances en lien avec la biosécurité et la perception de l'impact sur l'élevage des maladies infectieuses lors des cinq dernières années[125]. De la formation continue est nécessaire afin de faire évoluer les mentalités à ce sujet[107].

Dans certains cas, les mesures de biosécurité sont appliquées rigoureusement seulement lors d'épisode de crise sanitaire. Par exemple, dans un sondage sur les mesures de biosécurité aux États-Unis, il a été noté que la conformité était plus élevée dans une région aux prises avec une épidémie de laryngotrachéite infectieuse[41].

Typiquement, les humains aiment, et sont motivés par, les choses qui se mesurent. Ainsi, la mise en place aux États-Unis du National Health Security Preparedness Index (NHSPI) donnent aux preneurs de décision un point de référence afin d'évaluer les progrès et justifier les coûts associés aux mesures mises en place[82].

1.3. Escherichia coli

1.3.1. La bactérie Escherichia coli

E. coli a été isolé pour la première fois par Theodor Escherich en 1885 et fut nommée *Bacterium coli commune*. Initialement, on pensait que tous les *E. coli* étaient non pathogènes. Durant les années 1940, des associations ont commencé à être faites entre des *E. coli* et des pathologies, par exemple, lors de cas de dysenteries chez de très jeunes enfants.[63]

De l'ordre des *Enterobacteriales* et de la famille *Enterobacteriaceae*, *E. coli* est un bâtonnet droit Gram négatif anaérobie facultatif. Elle dégrade tous les sucres par la voie d'Embden-Meyerhof et clive l'acide pyruvique pour donner de l'acide formique dans des fermentations formiques. Lors de la fermentation des sucres, elle produit de grandes quantités de gaz par un complexe d'hydrogène-formiate lyase qui dégrade l'acide formique en H₂ et CO₂. Elle effectue une fermentation acide mixte et produit principalement, en plus des gaz, du lactate, de l'acétate, du succinate et de l'éthanol.

Lors de la culture sur agar, les colonies de *E. coli* auront un centre foncé avec un aspect vert métallique sur EMB (Eosin-Méthylène Blue), indiquant la fermentation du lactose et la production d'acide, rouge ou rose sur MC (MacConkey) et SS (*Salmonella-Shigella*), indiquant également la fermentation du lactose, et jaune rose sur HE (Hektoen Enteric), indiquant la production d'acide.

Les lipopolysaccharides à la surface des *E. coli* forment l'antigène O. Cet antigène est une cible importante autant pour l'immunité innée que acquise. Il est également responsable de la spécificité antigénique d'une souche et détermine son sérotype O. Ce sérotype est important dans la classification des *E. coli*; pour les études épidémiologiques et pour déterminer une source d'infection. Le sérotypage conventionnel se fait par agglutination avec des antisérums développés pour chacun des sérotypes O. [36]

Cette espèce bactérienne est particulièrement commune et répandue et est d'ailleurs la plus étudiée en microbiologie. *E. coli* est un habitant normal du tractus gastro-intestinal des homéothermes. Quatre grandes catégories permettent de classer les différentes souches, soit : commensale, intestinale non-pathogène, pathogène intestinal ou pathogène extra-intestinal.[66] Les prochaines sections traiteront des *E. coli* pathogènes, plus particulièrement ceux affectant la volaille et aux *E. coli* dits extra-intestinaux.

1.3.2. ExPEC (Extraintestinal Pathogenic Escherichia coli)

Les ExPEC forment une classe de *E. coli* spécialisées dans les infections des tissus autres que les intestins. Ils ont une plus grande capacité à coloniser la circulation sanguine, le liquide

céphalorachidien, les sacs aériens chez la volaille et le tractus urinaire chez les mammifères. Fréquemment, les ExPEC vont coloniser asymptomatiquement l'intestin de l'hôte avant d'infecter un autre organe.[68]

De nombreux pathogènes sont le fruit d'une coévolution avec l'hôte menant à la sélection de traits permettant l'infection. Dans le cas des ExPEC, il ne semble pas que ce soit le cas.

En raison du niveau de compétition élevée, la microflore intestinale doit constamment évoluer pour faire face aux différents stress physiques, chimiques et biologiques. L'acquisition de facteurs de virulences fait partie des méthodes évolutives employées par *E. coli*. Ces facteurs; pili, adhésines, systèmes d'acquisition du fer etc., aident à la survie dans l'intestin sans causer de pathologies. Par contre, ils permettent aussi à *E. coli* d'éventuellement coloniser d'autres tissus.

La plupart des gènes associés à la virulence sont situés sur des éléments génétiques mobiles, tel que des plasmides ou des îlots de pathogénicité (PAI ou Pathogenicity-Associated Islands)[58]. Dans une caractérisation phénotypique *in vitro*, il a été noté que la délétion de 7 PAI associés à des ExPEC n'empêchait pas la croissance en absence de stress, ni en présence de divers stress biologiques. Dans un modèle de mesure de la colonisation intestinale chez la souris, il a été déterminé que, lors d'un essai avec le modèle sans coliforme et traité à la streptomycine, les *E. coli* ne possédant pas de PAI avaient la même capacité à coloniser l'intestin que ceux qui avaient des PAI. Par contre, dans le modèle *in natura*, le mutant Δ PAI I-VII avait, 7 jours après l'inoculation, une perte d'index de compétitivité de 3 log par rapport à la souche ayant tous les PAI.[39] Des résultats semblables ont aussi été démontrés dans un modèle d'infection urinaire ascendante chez la souris.[24] Le développement des ExPEC serait donc relié à une amélioration de la compétitivité intra-intestinale (adhésines, systèmes de capture du fer) et sa capacité à coloniser les tissus extra-intestinaux serait une coïncidence. [76, 124] Les ExPEC humains sont définis selon Johnson et coll. comme ayant au moins deux gènes parmi les suivants : *papC/papA*, *sfa/foc*, *afa/dra*, *kpsM* et *iutA/iucD*.[67]

1.3.3. APEC (Avian Pathogenic *E. coli*) et la colibacillose

Les ExPEC sont les seuls *E. coli* pathogènes ayant de l'importance chez la volaille et les souches de ce sous-groupe s'appellent aussi les APEC. Lors d'un stress, d'une immunosuppression ou d'une co-infection, il peut y avoir translocation des *E. coli* de l'intestin vers d'autres organes, causant ainsi des problèmes de santé. Pour coloniser efficacement ces organes, il a besoin de certains facteurs de virulence, générés par des gènes de virulence. Entre autre, il y a les systèmes d'acquisition du fer, codés par des gènes tel que *iudA* et la résistance au sérum, tel que *traT* et *Iss*[43]. Des frimbriaes sont codées par des gènes tels que *papC* et des facteurs d'invasion le sont par des gènes tels que *ibeA*. [43] L'hémagglutinine sensible à la température, codé par le gène *tsh*, joue aussi un rôle quoique sa fonction n'est pas encore précise.[43] Les antigènes O et K ont également une activité anti-phagocytaire. [43] Chaque facteur apporte une fonction utile aux ExPEC, mais aucune définition claire et précise n'a pu être formulée jusqu'à ce jour en ce qui a trait aux combinaisons de facteurs nécessaires pour la pathogénicité.[74]

La colibacillose est parmi les maladies les plus rapportées lors de sondage sur la santé et les condamnations de la volaille et est une cause significative de pertes économiques[121]. Des lésions de polysérosite : péricardite, périhépatite et aérosacculite sont fréquemment observées lors de colibacillose. Par contre, il n'est pas rare que cette bactérie soit aussi associée à des lésions d'omphalite, de péritonite, de salpingite, de cellulite, d'arthrite et d'ostéomyélite. Les conséquences des infections à *E. coli* dans un élevage peuvent être très importantes : mortalités, condamnations à l'abattoir et perte de performance (gain de poids, conversion alimentaire), causant de sévères répercussions économiques.[121][43, 47]

Les ExPEC, contrairement aux autres catégories de *E. coli* pathogènes, ont une grande variabilité tant au niveau phénotypique que génotypique.[43]

Au niveau génotypique, il y a une grande variabilité entre les souches de APEC et ce, même à l'intérieur d'un sérotype O.[46] Un lien existe cependant entre la présence de certains gènes de virulence et la pathogénicité. Les souches provenant de poulets affectés de colibacillose ont été classifiés APEC si elles possédaient au moins quatre des gènes de virulence suivants : P-fimbriae (*papC*), aérobactine (*iucD*), iron-repressible protein (*irp2*), temperature-sensitive

hemagglutinin (*tsh*), vacuolating autotransporter toxin (*vat*), enteroaggregative toxin (*astA*), increased serum survival protein (*iss*) et colicin V plasmid operon genes (*cva/cvi*). Les souches non pathogènes possèdent quant à elles, trois gènes de virulence ou moins.[45]

Lors de comparaisons de souches de APEC et de AFEC (Avian Fecal *Escherichia coli*), ce sont les gènes *cvaC*, *ironN*, *iss*, *iutA*, *sitA*, *tsh*, *fyuA*, *irp2* et *ompT* qui ont été retrouvés principalement chez des APEC.[109] Une autre étude a démontré que Tsh et Iuc étaient des facteurs de virulence importants pour les APEC. [97] En effet, il y avait une prévalence élevée de ces facteurs pour les souches isolés de lésions dans les tissus. Par contre, ils étaient aussi retrouvés chez des *E. coli* provenant d'échantillons fécaux. Au Brésil, sept gènes de virulence ont été retrouvés plus fréquemment dans des lésions de colibacilloses que dans les fientes : *iutA*, *iss*, *cvaC*, *tsh*, *papC*, *papG* et *felA*. Par contre, aucun patron précis n'a à ce jour été mis en évidence pour décrire les APEC et plus du quart des isolats provenant de lésions de colibacillose ne possède aucun de ces sept gènes de virulence.[37] Même si les APEC ont plus tendance à posséder certains gènes de virulence que les AFEC, il est encore impossible de classifier de manière absolu un *E. coli* comme étant un APEC ou un AFEC.

Beaucoup de littérature existe sur le sujet et une grande conclusion peut en être tirée. Plusieurs traits phénotypiques et génotypiques ont un lien avec la pathogénicité d'une souche de *E. coli*, mais il n'y a pas un facteur ou une combinaison de facteurs qui identifient clairement une souche de *E. coli* comme étant ou n'étant pas pathogène. Plus de recherche est nécessaire afin d'avoir une définition claire des souches de *E. coli* aviaires pathogènes.

1.3.4. ExPEC et santé humaine

En médecine humaine, des ExPEC peuvent être responsables de cystites et pyélonéphrites (UPEC – Urinary Pathogenic *E. coli*)[131] et de méningites néonatales (NMEC – Neonatal Meningitis *E. coli*)[80].

Des travaux de pathotypage de UPEC provenant de patients atteints de cystite ou de pyélonéphrite dans un hôpital en Iran. Dix-neuf patrons de virulence ont été mis en évidence sur un total de 150 isolats. Les présences des gènes *pap*, *hly*, *aer*, *sfa*, *cnf*, *afa* et *traT* a été évaluée par PCR, de même que des marqueurs de PAI. Le patron de virulence le plus fréquent chez les patients atteints de cystites était *traT*-PAI alors que chez les patients atteints de pyélonéphrite, *pap*, *traT*, *aer*, *hly* et PAI étaient les gènes les plus fréquemment observés. Les gènes *sfa*, *afa* et *cnf* n'ont pas été retrouvés.[50] Lors d'un autre projet sur les UPEC en Iran, il a été constaté que les gènes *pap*, *afa* et *sfa* étaient retrouvés avec une prévalence de respectivement 20,5%, 8,3% et 21,5% pour 205 isolats.[91] Au Brésil, des PCR effectués sur 162 UPEC ont montré les prévalences suivantes pour certains gènes de virulence : *fimH* (97,5%), *kpsMTII* (53,1%), *papC/papEF/papG* (32,7%), *sfa* (27,8%), *iucD* (25.9%), *hly* (25.3%), *usp* (22.2%), *cnf-I*(18.5%) et *afa* (6.2%). Une évaluation de certains gènes de virulence pour des UPEC au Venezuela a révélé la présence des éléments suivants : *fimH*, *fyuA*, *kpsMTII*, *usp*, PAI et *papAH*. [90]

1.3.5. ExPEC aviaire et ExPEC humain

L'intestin sert de réservoir aux ExPEC, autant lors d'infections chez les humains que la volaille. Les défis auxquels font face ces deux catégories de ExPEC sont semblables. En effet, les APEC et les UPEC partagent un grand nombre de caractéristiques : gènes de virulence, séro groupe et groupe phylogénétique.[69, 108] Un pourcentage significatif de UPEC et de APEC ne peuvent pas être sérotypés selon la classification classique.

Dans une étude de comparaison des UPEC et des APEC, 86% des UPEC sérotypables faisaient partie d'un séro groupe contenant aussi des APEC. Des UPEC et des APEC étaient retrouvés dans tous les groupes phylogénétiques (A, B1, B2 et D), mais avaient une différence significative dans leur distribution : les UPEC étaient principalement dans le groupe B2 alors que les APEC étaient dans le groupe A. Plusieurs gènes de virulence associés aux APEC, entre autre *iron*, *iucC*, *iutA* et *tsh*, sont aussi fréquemment retrouvés chez les UPEC. Certains gènes fréquents chez les UPEC ne le sont pas chez les APEC (*kpsMT II*, *malX*, *papA*). L'analyse par

grappe basée sur le profil de virulence a permis d'obtenir des grappes contenant principalement des APEC et d'autres principalement des UPEC. Par contre, une grappe contenait un mélange de APEC et de UPEC, suggérant une origine commune pour les isolats de ce groupe[108].

Des résultats similaires ont été trouvés dans d'autres travaux de comparaisons de ExPEC humains et aviaires. La comparaison a été faite entre des APEC, NMEC et UPEC. L'analyse par grappe basée sur le profil de virulence classifiait dans des grappes différentes une grande proportion des souches. Par contre, une grappe possédait des isolats de APEC, de UPEC et de NMEC. Ces isolats étaient en général des sérogroupes O1, O2 et O18, du groupe phylogénétique B2 et possédaient une grande quantité de gènes de virulence associés à des plasmides.[69]

Dans un modèle de croissance dans de l'urine humaine, il a été démontré qu'une souche de APEC était similaire à une souche de UPEC. De plus, une souche de AFEC ayant reçu un plasmide APEC par conjugaison avait une croissance nettement supérieure à la souche sans le plasmide.[117]

Ces observations, ainsi que plusieurs autres travaux, supportent l'hypothèse que certains APEC, par leur profil de virulence, pourraient aussi causer des infections extra-intestinales chez les humains.[7, 16, 48] Par contre, une étude plus récente de de Been et coll. n'a pas réussi à démontrer la validité de cette hypothèse. L'étude se penchait sur la présence d'un plasmide de résistance aux céphalosporines de troisième génération. Les résultats ont démontré que les plasmides présents chez la volaille étaient différents de ceux présents chez les humains.[35] Ceci démontre qu'il faut interpréter avec prudence les résultats suggérant une association entre les animaux et les humains lors de cas de maladie.

1.3.6. Classification des *Escherichia coli*

Historiquement, le sérotypage était utilisé pour classer les diverses souches de *E. coli* et a été considéré comme étant la méthode de référence pour les enquêtes épidémiologiques[36]. Un pourcentage élevé des *E. coli* provenant de lésions de poulets malades fait partie des sérogroupes O1, O2 et O78[46, 47]. Certains APEC font aussi partie des sérogroupes O5, O8, O12, O14, O15, O18, O20, O53, O81, O83, O102, O103, O115, O116 et O132.[19] Des *E. coli* de tous

ces sérogroupes peuvent aussi être retrouvés dans les fientes de poulets en santé[43] quoique pour certains sérogroupes tel que O12, O14, O18, O53, O78, O81, O102, O115, O116 et O132, la prévalence au niveau des lésions est significativement plus élevée que celle au niveau des fientes.[19] Ceci nous permet de constater que bien que le sérotype O soit un indice permettant de savoir si un *E. coli* est pathogène il n'est cependant pas un critère absolu. De plus, il n'est pas rare que les APEC et les AFEC ne soient pas typables.[109]

Des critères de classification additionnels se sont ajoutés par la suite, dont les groupes phylogénétiques. Classiquement, ces groupes sont A, B1, B2 et D. Le test consiste en un PCR triplex où la présence / absence des éléments suivants est évaluée : gènes *chuA* et *yjaA* et le fragment d'ADN TSPE4.C2.[71] Le gène *chuA* est présent seulement pour les groupes B2 et D, le gène *yjaA* est présent pour le groupe B2, mais absent pour le groupe D et le fragment TSPE4.C2 est présent pour le groupe B1 mais absent pour le groupe A. [28] Tout comme pour le sérotype O, ce critère ne donne pas une information absolue sur la nature des souches étudiées. Par exemple, cinquante-deux APEC provenant du Brésil ont été distribués dans les groupes phylogénétiques de la façon suivante : groupe D (39%), groupe A (29%), groupe B1 (17%) et groupe B2 (15%).[12] Dans une autre étude sur 25 APEC en Iran, La distribution était la suivante : groupe D (20%), groupe A (36%), groupe B1 (16%) et groupe B2 (28%).[71] Vingt-cinq UPEC provenant du Venezuela ont été classifiés dans les groupes phylogénétiques suivants : Groupe A(32%), groupe B2 (40%), groupe D (28%) et groupe B1 (0%)[71] et une autre de la façon suivante : Groupe A (54%), groupe B2 (43%), groupe D (3%) et groupe B1 (0%).[90]

Afin d'améliorer l'efficacité des travaux de retraçage d'une source de contamination lors d'épidémie reliée à *E. coli*, de nombreuses techniques ont été mises au point. Elles se retrouvent dans trois grandes catégories, soit les techniques basées sur la restriction, l'amplification et le séquençage et seront discutées plus en détails dans la prochaine section. Ces techniques ont un point en commun; tenter d'effectuer une empreinte d'un *E. coli* et l'associer à une catégorie bien définie.

1.4. Méthodologies moléculaires de différenciation de souches de *Escherichia coli*

Dans le but de déterminer la source d'une épidémie, plusieurs techniques ont été mises au point afin de différencier des souches de *E. coli*. Il y a les traits phénotypiques, la résistance aux antimicrobiens, le sérotypage et le génotypage par la biologie moléculaire. Les trois grandes catégories de génotypage sont les méthodes de restriction, de séquençage et d'amplification.

1.4.1. Méthodes de restriction

1.4.1.1. Analyse des plasmides

Un plasmide se définit comme étant une molécule d'ADN circulaire extra-chromosonale présente au niveau du cytoplasme d'une bactérie. Plusieurs plasmides possèdent des gènes de virulence, d'antibiorésistance ou de résistance aux métaux lourds qui procurent un avantage à leur hôte. Lors de la division cellulaire, les plasmides sont transmis aux cellules filles. La méthode d'analyse consiste à isoler les plasmides du restant de la bactérie et de les faire migrer par électrophorèse sur gel d'agarose. Chaque plasmide, ayant un poids unique, fera apparaître une bande sur le gel. Chaque souche analysée aura son propre patron de bandes qui représente les plasmides qu'elle possède. Typiquement, deux souches ayant des patrons différents sont considérées distinctes et celles avec des patrons identiques sont considérées clonales. Il y a deux faiblesses à cette technique. Parfois, les plasmides peuvent s'entremêler sur eux-mêmes et présenter des défauts de migration qui feront apparaître de fausses bandes. De plus, les plasmides peuvent aussi être transmis d'une bactérie à l'autre, ce qui implique que deux souches ayant les mêmes plasmides ne sont pas nécessairement clonales. [120]

1.4.1.1. RFLP – Restriction Fragment Length Polymorphism

Cette méthode coupe l'ADN chromosomique bactérien à des endroits précis avec des endonucléases. Les fragments d'ADN obtenus sont ensuite séparés par électrophorèse sur gel. Un problème fréquemment rencontré avec cette technique est l'obtention d'un nombre très élevé de fragments (>100). Il y a deux façons de faire face à cette difficulté. La première consiste à utiliser une enzyme de restriction rare et une méthode spécialisée d'électrophorèse pour séparer

de larges fragments d'ADN. Cette méthode se nomme PFGE (Électrophorèse en gel par champs pulsés) et sera vue en détail plus loin. La seconde approche consiste à transférer les gros fragments d'ADN sur des membranes et à utiliser une sonde étiquetée qui se fixe sur des séquences spécifiques de l'ADN bactérien. Les cibles les plus communes incluent de l'ADN ribosomal et des séquences d'insertion. Cette méthode est moins discriminatoire que le PFGE et le RAPD-PCR (Random Amplified Polymorphic DNA-PCR) mais l'est plus que le ribotypage et le sérotypage[120].

1.4.1.2. Ribotypage

Cette technique est très semblable au RFLP. Des enzymes de restrictions clivent l'ADN cellulaire en de multiples fragments qui sont transférés sur une membrane. Ensuite, une sonde étiquetée se fixe sur une région hautement conservée de gènes d'ARNr. La variabilité génétique des régions autour des gènes d'ARNr et la différence du nombre de gènes d'ARNr permet de différencier les souches. Cette technique est moins discriminatoire que le RFLP[101].

1.4.1.3. Pulse-Field Gel Electrophoresis (PFGE)

Cette technique est une forme de RFLP où une enzyme de restriction rare est utilisée pour cliver l'ADN cellulaire en un nombre limité de fragment de taille considérablement variable. En utilisant des techniques d'électrophorèse sur gel spécialisées, les fragments sont séparés pour des profile de restrictions qui permettent de comparer la différence génétique entre des souches. Cette technique est actuellement la technique de référence pour son haut pouvoir discriminatoire, sa reproductibilité et sa facilité à être standardisé. Un avantage de cette technique est son efficacité à évaluer le génome en entier, alors que les techniques à base de PCR se concentrent seulement sur quelques gènes. Afin d'augmenter le pouvoir discriminatoire du PFGE, il est possible d'utiliser plus d'une enzyme de restriction pour générer un plus grand nombre de fragments et ainsi mettre en évidence de subtiles variabilités génétiques. Le PFGE a un haut pouvoir discriminatoire et une reproductibilité inter laboratoire élevée mais est particulièrement chronophage, ce qui en empêche l'utilisation pour des études à grande échelle[70].

1.4.2. Méthodes d'amplification

1.4.2.1. Profil d'amplification

Cette méthode se base sur l'hypothèse que chaque souche aura un lot de gènes différents et que cette différence peut être utilisée pour distinguer des souches. Typiquement, des gènes d'utilisation des nutriments, de virulence et d'antibiorésistance sont utilisés. Un avantage intéressant de cette technique est que des gènes d'importance médicale peuvent être incorporés et fournir des informations utiles pour gérer la maladie.

1.4.2.2. Polymorphisme de longueur des fragments de restriction (AFLP)

Cette technique combine les bénéfices de la restriction et de l'amplification. L'ADN cellulaire est clivé en de multiples endroits pour donner un nombre élevé de fragment d'ADN. Ensuite, de courtes séquences complémentaires aux sites de clivages sont utilisées comme cible pour les amorces PCR. Puisqu'un trop grand nombre de fragments sont générés pour être analysable, de un à trois nucléotide sont ajoutés à la fin 3' des fragments. Chaque nucléotide ajouté doit interagir avec son complémentaire dans la séquence cible. Pour chaque nucléotide ajouté, il y a environ une réduction par un facteur de 4 du nombre de fragment généré. Les fragments sont séparés et détectés par électrophorèse sur gel. Pour augmenter l'efficacité de la technique, une sonde fluorescente peut être ajoutée à l'amorce. Cela permet de faire la séparation et la détection des fragments avec un séquenceur automatisé. En utilisant cette technique, le pouvoir discriminatoire est similaire au PFGE, mais nécessite un séquenceur automatisé[130].

1.4.2.3. Amplification aléatoire polymorphique de l'ADN (RAPD-PCR)

Une amplification PCR est faite en utilisant une amorce générique sous des conditions peu spécifique. Cela permet à l'amorce de se lier à des séquences pour lesquelles elle n'est pas complètement complémentaire. Les amplicons sont ensuite séparés par électrophorèse sur gel et les patrons obtenus sont utilisés pour comparer les souches entre-elles. Un des désavantages majeurs de cette technique est la faible reproductibilité. Une légère modification des réactifs, des conditions d'amplification et des paramètres d'analyses peut créer une différence dans les patrons obtenus[38].

1.4.2.4. Amplification d'éléments répétitifs (Rep-PCR)

Dans le génome bactérien, certaines séquences génétiques se répètent à plusieurs endroits. Les amorces de rep-PCR sont faites pour amplifier les séquences autour des éléments répétitifs. Si deux éléments répétitifs sont suffisamment proches l'une de l'autre, il y a amplification et un amplicon est généré. Plusieurs amplicons seront générés et leur taille variera selon la distance entre les éléments répétitifs. Les amplicons sont séparés par électrophorèse sur gel. Les patrons obtenus sont comparés pour différencier les souches. Plusieurs séquences ont été identifiées comme cible pour le rep-PCR. Ceux-ci sont le ERIC (enterobacterial repetitive intergenic consensus), REP (repetitive extragenic palindromic), BOXA1R et (GTG)₅. La répétabilité peut être affectée négativement par des changements de réactifs, de thermocyclages et des conditions d'électrophorèse. Le niveau de discrimination peut aussi diminuer si les souches analysées n'ont pas l'élément répétitif recherché en quantité suffisante ou que la distance entre les éléments répétitifs est trop grande pour générer un amplicon. Cette méthode est moins discriminatoire que le PFGE. Par contre, elle est facile et peu dispendieuse à réaliser et peut être utilisée pour un grand nombre de souches. Selon l'amorce utilisée et le nombre d'amplicons générés, cette technique peut permettre une excellente distinction entre différentes souches. [92-94].

1.4.3. Méthodes de séquençage

1.4.3.1. Séquençage du génome entier

Le séquençage du génome entier est une technique de pointe qui permet d'obtenir de l'information de très haute de résolution. Cette technique est entre autre un outil très utile afin de mettre en évidence les sources en cause et les modes de transmission lors d'épidémie.[77] Ce type d'outil sera de plus en plus abordable pour usage courant dans les grands laboratoires de microbiologie avec une réduction des coûts et des temps d'analyse. [17] Il est encore nécessaire de développer des outils de bioinformatique afin de pouvoir gérer adéquatement l'information générée par ce type de technique.[17, 77] De plus, les coûts encore élevés rendent son utilisation pour une grande quantité de souches irréaliste.

1.4.3.2. Typage des séquences multilocus (MLST)

Généralement, des gènes constitutifs sont choisis pour cette méthode. Les séquences de nucléotide de ces gènes sont analysées à l'aide d'un séquenceur. Puisqu'il y a peu de pression de sélection au niveau des gènes constitutifs, les variations des séquences de ceux-ci seront plus généralement le fruit de mutations et de recombinaisons que de fortes pressions de sélection. Il est à noter que certains protocoles utilisent seulement des gènes de virulence. Le choix des gènes est un facteur critique pour déterminer le pouvoir discriminatoire de la méthode, allant de presque nul à comparable avec le PFGE. Les résultats du séquençage sont comparés à une base de donnée et selon les résultats, chaque souche est assignée à un type de séquence (ST : Sequence type). Deux isolats qui ont le même ST sont considérés comme étant clonaux du point de vue du MLST. Cette technique a le potentiel d'offrir un excellent pouvoir de discrimination entre les souches, mais est dispendieuse et nécessite de l'équipement spécialisé. Cela compromet la possibilité d'évaluer un très grand nombre de souches[28, 83].

1.5. Utilisations de l'empreinte génétique d'ADN par rep-PCR

Il existe plusieurs applications des techniques de rep-PCR afin de déterminer l'origine d'une souche d'*E. coli*. Plusieurs chercheurs ont utilisé cette technique afin de mettre en évidence les relations entre les humains et différentes espèces animales. En Ouganda, 672 isolats d'*E. coli* ont été analysés par REP-PCR afin d'obtenir une indication du taux de transmission d'*E. coli* entre les humains et le bétail. Une analyse de la variance moléculaire a été faite en utilisant le logiciel Arlequin. Comme résultat d'intérêt, il a été noté que les gens qui ne se lavaient pas les mains avant de manger avaient une flore d'*E. coli* beaucoup plus similaire au bétail que les gens qui se lavaient les mains.[110] La même technique a également été utilisée, encore une fois en Ouganda, afin de mesurer la similitude des populations d'*E. coli* entre des humains, des primates et du bétail. Des résultats ayant une portée similaire ont été notés : les humains vivant près de la forêt avaient des *E. coli* plus similaires aux primates vivant dans cette forêt que les primates vivant dans des fragments de forêt plus éloignés. De plus, les populations d'*E. coli* des humains et du bétail étaient plus semblables à celles des guenons à queue rouge qu'aux autres primates.

Il est à noter que ce type de primate a tendance à s'aventurer fréquemment dans les zones habitées afin de piller les récoltes.[54] Une autre étude utilisant également le REP-PCR a permis d'obtenir des conclusions semblables. Dans un parc national de l'Ouganda, il a été noté que les humains travaillant dans des centres de recherche ou dans le tourisme avaient des *E. coli* plus semblables aux chimpanzés que les humains vivant dans les villages avoisinants.[56]

D'autres chercheurs utilisent ce type de technique lors de contamination fécale d'un plan d'eau dans le but d'en trouver la source. Ce type de technique permet d'obtenir une indication quant à l'espèce en cause. En 2000, Dombek et al ont utilisé l'amorce BOXA1R pour faire des analyses de rep-PCR sur 154 souches de *E. coli*. Les résultats ont été analysés en utilisant l'algorithme d'association de bandes de Jaccard. L'analyse par Jackknife des coefficients de similitude obtenus a permis de classer correctement tous les isolats provenant de poulets et de vaches et entre 78-90% des isolats provenant d'humains, d'oies, de canards, de cochons et de moutons. Le dendrogramme construit à partir des coefficients de similitude a permis de séparer presque complètement les isolats humains des non-humains[40]. Des résultats semblables avec la même amorces ont été obtenus par Carlos et al en 2011[27]. En 2007, Mohapatra et al ont comparé le pouvoir discriminant de diverses amorces utilisées pour la technique du rep-PCR, soit ERIC, ERIC2, BOXA1R, REP et (GTG)₅. La conclusion fut que le (GTG)₅ avait le meilleur pouvoir discriminant et serait un outil prometteur en surveillance épidémiologique de la contamination d'environnements aquatiques [92]. Goldberg a comparé les dendrogrammes obtenus par le rep-PCR en utilisant l'amorce BOXA1R avec les résultats de MLST et a conclu qu'un haut niveau de correspondance existait entre les deux techniques [55]. Ces résultats sont intéressants puisque le rep-PCR peut être très facilement et rapidement utilisé sur un grand nombre de souches.

Lors de projet ayant trait à l'attribution de source, le taux de classification correct par Jackknife est régulièrement utilisé.[27, 40, 84, 92] Cette technique consiste premièrement, à manuellement assigner à chaque échantillon le groupe auquel il devrait appartenir. Par la suite, chaque échantillon sera un à un retiré de son groupe, puis assigné au groupe avec lequel il a le plus similarité. Cette méthode permet d'avoir une idée de la précision avec laquelle le coefficient de similarité peut prédire le groupe d'origine d'un échantillon.

Lors de comparaison entre différentes méthodes de différenciation d'individus ou d'échantillons au sein d'une population, l'index de diversité de Simpson peut être utilisé. Cet index donne une mesure de la capacité d'une méthode à différencier des échantillons provenant de différents groupes.[62] Mohapatra a d'ailleurs utilisé cet index lors de sa comparaison entre cinq amorces utilisées en rep-PCR afin de déterminer laquelle donnerait le meilleur pouvoir de différenciation.[92]

1.6. Objectifs et hypothèses de travail

Le but du projet était de déterminer s'il était possible d'identifier des *E. coli* « signatures » spécifiques à certains poulaillers et de déterminer leur évolution suite au détassement, à savoir si de nouveaux *E. coli* ont fait leur apparition ou si certains groupes ont disparu.

Le choix de la technique s'est arrêté sur le (GTG)₅-PCR. La capacité de réaliser un grand nombre d'analyse et le succès dans son utilisation pour des études de détermination d'origine de contamination ont motivé le choix.

La première hypothèse est que la technique permettra de mettre en évidence certains groupes de *E. coli* uniques à certains poulaillers. La deuxième hypothèse était que certains groupes de *E. coli* apparaîtraient ou disparaîtraient suite au détassement.

III. Matériel et méthodes

Article I : Differentiation of fecal *Escherichia coli* populations from chicken houses on different farms and evaluation of response to thinning by rep-PCR genomic fingerprinting.

Title: Differentiation of fecal *Escherichia coli* populations from chicken houses on different farms and evaluation of response to thinning by rep-PCR genomic fingerprinting.

Author names and affiliations: Benoît Lanthier^a, John Morris Fairbrother^b, Ghyslaine Vanier^b, Martine Boulianne^a

^a Chair in Poultry Research, Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Montréal, C.P. 5000, Saint-Hyacinthe (Québec), J2S 7C6, Canada.

^b OIE Reference Laboratory for *Escherichia coli* (EcL), Université de Montréal, C.P. 5000, Saint-Hyacinthe (Québec), J2S 7C6, Canada.

Corresponding author: John Morris Fairbrother

Phone number: +1 (450) 773-8521

Postal address: OIE Reference Laboratory for *Escherichia coli*(EcL), Université de Montréal, C.P. 5000, Saint-Hyacinthe (Québec), J2S 7C6, Canada

Abstract

Rep-PCR genomic fingerprinting, which uses repetitive intergenic DNA sequences, was investigated as a mean to identify signature pattern of chicken fecal *Escherichia coli* populations and evaluate their changes over time. The (GTG)₅ primer was used to generate DNA fingerprints from 522 isolates originating from 7 chicken houses just prior to, and five days after, thinning. The DNA fingerprints were analysed by using the Jaccard band-matching algorithm. Jackknife analysis of the resulting similarity coefficients revealed that between 73% and 93% of the isolates could correctly be grouped in their house of origin. A dendrogram constructed by using Jaccard similarity coefficients grouped the isolates in 42 clusters with approximately half of them in the same cluster. Out of the 6 largest clusters, containing 80% of all isolates, 4 consisted mostly of isolates coming from only 1 house. These clusters could represent signature clusters identifying specific houses. A comparison of the number of clusters present before and after thinning for each house revealed a substantial difference in the behaviour of the fecal *E. coli*. For some houses, there were few clusters represented both before and after thinning, with a high number of new clusters appearing after thinning whereas in other houses, the contrary was observed. Our results suggest the presence of a signature subpopulation in some chicken houses and a variable response of the *E. coli* population to the effect of thinning.

Keywords: *Escherichia coli*, thinning, partial depopulation, rep-PCR, (GTG)₅-PCR

1. Introduction

The health status of a chicken house is influenced by numerous management factors such as biosecurity measures[1, 34, 37, 38, 41], drug and vaccine use[3, 5, 16, 17, 21, 24], rodent and pest control[18, 22, 30, 40, 42], water quality[29, 41], feed ingredients[11], chick origin[6], hatchery[2, 7, 10, 28], density and local environment[14, 34, 39], hence making each house unique. Another important factor which may affect the sanitary status of a chicken house is thinning i.e., the process of partially depopulating a flock in order to optimize space when producing heavy birds. Thinning is considered to be a risk factor for *Campylobacter* contamination[1, 34, 38] and for outbreaks of infectious laryngotracheitis.[15]

Catching crews go from farm to farm and seldom use any measures of biosecurity[15], thus presenting a risk of introducing pathogens into a flock. The thinning procedure is a stressful event for the birds, due to disruption of their routine by the presence of a large team of people, with possible introduction of new microorganisms, and drastic change in flock density. However, the effect of thinning on the intestinal microbiota is unknown.

Many techniques can describe the intestinal microflora including the analysis of the *E. coli* population. *E. coli* is a common and widespread bacterium and a normal inhabitant of warm-blooded animals' intestinal tract. Because of its consistent presence in large numbers in the feces of all sampled animals, *E. coli* is a suitable candidate as an indicator for monitoring changes in the intestinal microflora. Various techniques are used to classify *E. coli* isolates, such as restriction[20, 35, 43], amplification[12, 31-33, 44] or sequencing[4, 9, 23, 25] based methods. An amplification based approach, repetitive element sequence-based PCR (rep-PCR), has been successfully used to determine the source of *E. coli* isolates in cases of fecal contamination of water. For instance, Dombek et al.[13] differentiated to some extent isolates from humans,

geese, ducks, sheep, pigs, chickens and cows using BOXA1R primer. Similar results were obtained using BOXA1R (Carlos et al.[8]) or using REP, BOXA1R and (GTG)₅ primers (Ma et al.[26]). Mohapatra et al.[32] found (GTG)₅ to be the most discriminating among 5 different primers for rep-PCR.

In this study, we examined *E. coli* isolates from fecal samples obtained from chickens in houses from various farms just before and 5 days after thinning, by rep-PCR genomic fingerprinting using the (GTG)₅ primer. We wanted to verify if this method would yield signature patterns specific to each house and if this signature pattern could be used to evaluate variation over time of the fecal *E. coli* populations especially following thinning and possible contamination from catching crews. A questionnaire regarding biosecurity practices was also completed by the manager of each farm, providing insight into additional sources of contamination.

2. Material and Methods

2.1 Sample and data collection

A list of farms practicing thinning was provided by the Québec association of producers (Les Éleveurs de volailles du Québec – ÉVQ) and the first 12 farms which accepted to participate were selected. On each farm, one chicken house was randomly selected. A questionnaire on farm biosecurity and drug use was completed at each visit. The first sample was taken between one and five hours prior to thinning and the second five days later. For each farm, two different flocks in the same house were sampled during partial depopulation at different producing periods. Five sets of samples of fresh fecal droppings originating from approximately 10-15 birds each were collected on each floor of studied houses. Feces were picked up using clean latex gloves and put in sterile bags numbered from 0 to 4. Each floor was separated in four

quarters. One sample (#0) was made of fecal samples from all quarters and the 4 other samples (#1-#4) came from each individual quarter.

2.2 Strain isolation for genomic fingerprinting

Fecal samples were stored at -70°C before processing. A quantity of 10g of each thawed sample was incubated in a filter bag with 90 ml of non-selective buffered peptone water for 12h at 37°C . Cultures were ten-fold serially diluted in peptone water to 10^{-5} dilution, from which a last dilution was made in peptone water containing 1% of tween 80 to obtain 10^{-7} diluted subsamples. Three ml of the last dilution was filtered through a hydrophobic grid membrane filter (HGMPF) using a Spreadfilter (Filtaflex, Almonte, Ontario, Canada). Filters were placed onto MacConkey agar plates and incubated overnight at 37°C to obtain HGMPF master filters bearing predominantly *E. coli* lactose-positive colonies. Forty typical *E. coli* colonies were recovered from the filter, inoculated in Luria-Bertani (LB) enrichment broth and incubated overnight as described[27]. Cultures were centrifuged at 12 000 rpm for 5 minutes, washed in isotonic buffer (FA Buffer, DifcoTM) and placed at 100°C for 10 min to prepare the DNA templates for PCR reactions and conserved at -20°C according to a protocol of the Reference Laboratory for Escherichia coli (EcL – Faculté de Médecine Vétérinaire de L'Université de Montréal) available at http://www.apzec.ca/en/APZEC/Protocols/APZEC_PCR_en.aspx. Isolates were conserved with 30% glycerol at -70°C .

2.3 (GTG)₅-PCR genomic fingerprinting

(GTG)₅-PCR genomic fingerprinting was carried out as previously described by Mohapatra in 2007[32] with minor modifications. A larger amount, 100 to 200 ng, of template DNA was used. Gel staining was carried out with SYBR safe DNA Gel Stain instead of ethidium bromide and

electrophoresis lasted systematically for 12h. The photo of the gel was taken by Fusion-Fx luminescence system (Vilber Lourmat).

2.4 Computer-assisted rep-PCR genomic fingerprint analysis

Analysis of the gels was carried out as previously done by Dombek in 2000 with minor differences. [13] External reference positions were set at 1000, 1650, 2000, 3000, 4000 and 5000 bp and DNA fragments less than 1000 bp and more than 5000 bp were not included in analyses because they tended to be indistinct.

Statistical analyses were also carried out similarly to Dombek in 2000. The Jaccard band-based method was used to generate similarity coefficients with the same options as Dombek with the addition of the relaxed doublet settings which was used to account for the lack of contrast between two close-by bands occasionally appearing as one broad band. Jackknife analysis was used to determine the ability of the maximum group similarity coefficient to predict the house origin of an isolate. [13]

The Simpson's index of diversity was calculated as a reference towards the variability of the classification produced by our clustering.[19]

3. Results

3.1 Sample collection and biosecurity questionnaire

Twelve houses located on twelve distinct farms which practice thinning were sampled between June 2011 and February. Flock size of studied houses varied from 20,000 to 30,000 birds. Samples from only 7 houses were analyzed due to time and cost restraints. The questionnaire revealed highly variable biosecurity practices between each farm. One farm had turkeys in the same house as chickens. Another one had calves in a paddock adjacent to the chicken house.

One manager admitted to never using any biosecurity measures and collecting dead chickens only every three days whereas another manager strictly enforced the principles of the Danish entry system for all visitors. Biosecurity practices ranged from inexistent to well used.

3.2 (GTG)₅-PCR genomic fingerprints

A total of 522 isolates originating from 7 houses produced high-quality DNA fingerprints. Figure 1 shows typical fingerprints for *E. coli* isolates generated by using (GTG)₅-PCR DNA fingerprints. The size of the PCR products ranged from under 650 bp to over 8000 bp. However, in many instances, the contrast around the bands greater than 5000 bp and less than 1000 bp ranged from average to poor. Hence, these sections were not taken in consideration during the analyses. There were sequences of three bands that appeared just above the 2000 bp marker and just below the 1650 bp marker, as well a band just above the 1000 bp marker, for almost every isolate studied. Most isolates demonstrated between 15 and 20 bands although several had as few as three, or as many as 25, bands.

The number of isolates studied ranged from 45 to 120 per house. Jaccard similarity coefficients were calculated for the (GTG)₅-PCR DNA fingerprints. The isolates were then manually assigned to their respective house as the correct source group and a Jackknife analysis was performed. Table 1 shows that for 6 out of the 7 houses, more than 70% of the isolates were assigned to the correct group, just over 93% of the isolates being assigned correctly for house 8. Houses 1 and 11 had more than 10% of reciprocal misidentification. On the other hand, house 2 had a very low rate of correct assignments at 55%. This house demonstrated a high level of misidentification with houses 1 (11.1%) and 11 (20%), although this was not reciprocal, only 1.4% of isolates from house 1 being identified as house 2 and none from house 11.

3.2 Dendrogram construction

To determine the relatedness of strains, a dendrogram based on (GTG)₅-PCR DNA fingerprint data was constructed by using Jaccard similarity coefficients and the Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean (UPGMA) clustering method (Figure 2). By using a cut-off value of 55% similarity, 42 clusters were generated. As shown in figure 3, 17 clusters had only 1 isolate and a total of 36 clusters had less than 10 isolates. These 36 clusters represent about 20% of the isolates studied with the remaining 6 clusters representing 80% of all the isolates. The largest cluster contained a total of 281 isolates, representing more than half the isolates present in the study. Figure 4 shows the composition of the 6 largest clusters. Cluster 1 contained isolates from every house except house 8 whereas cluster 3 contained almost exclusively isolates from house 8. Cluster 2 contained isolates mostly from houses 4 and 5. Clusters 4, 5 and 6 contained respectively almost exclusively isolates from houses 4, 1 and 5. The dendrogram shows that a sizeable portion of the *E. coli* isolates studied were grouped together in the same cluster which likely represents a portion of the population well preserved across the various houses. Interestingly, the other major clusters demonstrated a majority of isolates coming from only 1 or, at most, 2 houses. This classification with our samples had a Simpson's diversity index of 0.69.

Figure 5 shows the information from the dendrogram broken down for each individual house in regards to the time of sampling, before or after thinning. Total number of clusters per house ranged from 4 to 17 and the number of clusters present both before and after thinning ranged from 1 to 5. Some clusters were present only before thinning (from 1 to 7 clusters per house) and others only after thinning (from 1 to 8 clusters per house). Houses 2 and 11 had the highest proportion of clusters present only after thinning at respectively 67% and 78% and the lowest

proportion of shared clusters at respectively 8% and 11%. On the other hand, house 1 had the lowest proportion of clusters present only after thinning at 14% and the highest proportion of shared clusters at 43%. Houses 4, 5, 8 and 9 had more moderate proportions between 25% and 40% for clusters only present after thinning and between 24% and 33% of shared clusters. There is a great variety in the number of clusters present in each house. There is also a sizable gap in the presence through time of these clusters. In some cases, there was a high proportion of clusters preserved through time with a low proportion of new clusters, such as for house 1, whereas the contrary was observed in the cases of houses 2 and 11.

4. Discussion

The objectives of this study were to determine if (GTG)₅-PCR DNA fingerprint analysis could give a signature pattern for each house and if these signature patterns could be used to evaluate the modification of *E.coli* microflora following thinning. We found that GTG₅-PCR DNA fingerprint analysis and Jaccard similarity coefficient could give a signature pattern for a limited number of houses. The most obvious example is house 8 for which most isolates grouped in one cluster originating almost exclusively from that house with houses 1, 4 and 5 showing slightly less exclusivity. Many factors, such as chick and feed sources, which can contribute to this observation are unknown due to the lack of information obtained from the farms. Chicken production in Québec is not fully vertically integrated, which makes traceability from the breeders to the pen impossible. Feed content is also not fully known. The ingredients can change through time and the quality can vary widely. Also some feed mills will put additional antibiotics or natural products in the feed in order to get better performances and this information may not have been communicated when completing the questionnaire. Considering the work of Racicot et al.[36], even when the producer reported having good biosecurity practices at his farm, it is

possible that many mistakes are regularly made thus reducing effectiveness of biosecurity. All these factors and others contribute to make each house unique and are largely unknown, making signature cluster interpretation difficult. There are, however, a few noteworthy factors. For example, house 8 was singularly different from the other houses with no isolates belonging to the largest cluster, but had a pasture for calves about 10m away from the chicken house. House 1 barn contained both turkeys and chickens on different floors. Such information is generally interesting, but lack of specific knowledge for each house impedes further discussion on the relevance of these results.

The second part of the analysis revealed, for 2 houses, a low proportion of clusters that could be found both before and after thinning whereas for another house, it was the opposite. Based on these results, it appears that the reaction of the fecal *E. coli* population to thinning can be very different from one house to another. As in the first part of the analysis, there are many unknown factors which could contribute to these changes, such as the cleanliness of the catching crew i.e., 1st or 2nd site to be depopulated. Also, the addition of various products, such as prebiotics, probiotics or antibiotics, in the feed or the water of chickens as an attempt to alleviate negative impact of thinning on health could affect intestinal *E. coli* populations. Our questionnaire revealed high variability in the practices of biosecurity for studied farms. This important variable which is not under our control could significantly affect the nature and behavior of the fecal *E. coli* populations. There are also many other parameters unaccounted for such presence of vermin or darkling beetles, occurrence of a clinical disease, number of visitors, etc. The Simpson's diversity index was fairly low, indicating a potential lack of discriminatory power of the technique used. In order to improve this, an interesting follow-up to this study would be to investigate the presence of virulence genes and antibiotic resistance profiles and compare

isolates from clusters present only before and only after thinning. This would validate the relevance of the technique, increase discriminatory power as well as giving qualitative information.

5. Conclusion

The (GTG)₅-PCR DNA fingerprint was able, in a small proportion of cases, to separate fecal *E. coli* isolates from different houses into different signature clusters. Analysis of the clusters showed modification of the fecal *E. coli* populations following thinning, ranging from slight to major. However, the information obtained through this study is insufficient to reliably use the technique in future studies to identify signature patterns and modification of *E. coli* populations over time. Future studies would be needed to confirm our conclusions. More discriminatory genotyping techniques, such as MLST and PFGE, or qualitative characterisation of the isolates in the various clusters, such as for the presence of various virulence genes and antibiotic resistance profiles, would permit the validation of the relevance of the clustering observed by our approach and give useful additional information.

REFERENCES

1. Allen VM, Weaver H, Ridley AM, Harris JA, Sharma M, Emery J, Sparks N, Lewis M, Edge S., *Sources and spread of thermophilic Campylobacter spp. during partial depopulation of broiler chicken flocks.* Journal of Food Protection, 2008. **Vol. 71(2)**: p. 7.
2. Bailey JS, Cox NA, Berrang ME, *Hatchery-acquired salmonellae in broiler chicks.* Poultry Science, 1994. **73(7)**: p. 5.
3. Baurhoo B, Ferket PR, Zhao X., *Effects of diets containing different concentrations of mannanoligosaccharide or antibiotics on growth performance, intestinal development, cecal and litter microbial populations, and carcass parameters of broilers.* Poultry Science, 2009. **88(11)**: p. 11.
4. Bertelli C, Greub G., *Rapid bacterial genome sequencing: methods and applications in clinical microbiology.* Clinical microbiology and infection, 2013. **19(9)**: p. 11.
5. Biggs P, Parsons CM., *The effects of several organic acids on growth performance, nutrient digestibilities, and cecal microbial populations in young chicks.* Poultry Science, 2008. **87(12)**: p. 9.
6. Bortolaia V, Bisgaard M, Bojesen AM, *Distribution and possible transmission of ampicillin- and nalidixic acid-resistant Escherichia coli within the broiler industry.* Veterinary Microbiology, 2009. **142(3-4)**: p. 7.
7. Byrd J, Bailey RH, Wills R, Nisbet D, *Recovery of Campylobacter from Commercial Broiler Hatchery Trayliners.* Poultry Science, 2007. **86**: p. 4.
8. Carlos C, Alexandrino F, Stoppe NC, Sato MI, Ottoboni LM, *Use of Escherichia coli BOX-PCR fingerprints to identify sources of fecal contamination of water bodies in the State of São Paulo, Brazil.* Journal of Environmental Management, 2012. **93(1)**: p. 6.
9. Chaudhuri RR, Henderson IR, *The evolution of the Escherichia coli phylogeny.* Infection, Genetics and Evolution, 2012. **12**: p. 13.
10. Cox NA, Bailey JS, Mauldin JM, Blankenship LC, *Presence and impact of Salmonella contamination in commercial broiler.* Poultry Science, 1990. **69(9)**: p. 4.
11. da Costa PM, Oliveira M, Bica A, Vaz-Pires P, Bernardo F, *Antimicrobial resistance in Enterococcus spp. and Escherichia coli isolated from poultry feed and feed ingredients.* Veterinary Microbiology, 2007. **120**: p. 10.
12. Dhama K, Rajagunalan S, Chakraborty S, Verma AK, Kumar A, Tiwari R, Kapoor S., *Food-borne pathogens of animal origin-diagnosis, prevention, control and their zoonotic significance: a review.* Pakistan Journal of Biological Sciences, 2013. **16(20)**: p. 10.
13. Dombek PE, Johnson LK, Zimmerley ST, Sadowsky MJ, *Use of Repetitive DNA Sequences and the PCR To Differentiate Escherichia coli Isolates from Human and Animal Sources.* Applied and Environmental Microbiology, 2000. **Vol. 66(No. 6)**: p. 5.
14. Duan H, Chai T, Cai Y, Zhong Z, Yao M, Zhang X, *Transmission identification of Escherichia coli aerosol in chicken houses to their environments using ERIC-PCR.* Science in China. Series C, Life Sciences / Chinese Academy of Sciences, 2008. **51(2)**: p. 10.
15. EQCMA, Équipe québécoise de Contrôle des Maladies Avicoles -, *Personal Communication.* 2010.
16. Ghosh TK, Haldar S, Bedford MR, Muthusami N, Samanta I., *Assessment of yeast cell wall as replacements for antibiotic growth promoters in broiler diets: effects on performance, intestinal histo-morphology and humoral immune responses.* Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition, 2012. **96(2)**: p. 10.

17. Hassan HMA, Mohamed MA, Youssef AW, Hassan ER, *Effect of Using Organic Acids to Substitute Antibiotic Growth Promoters on Performance and Intestinal Microflora of Broilers*. Asian-Australasian Journal of Animal Sciences, 2010. **23**(10): p. 6.
18. Hazeleger WC, Bolder NM, Beumer RR, Jacobs-Reitsma WF., *Darkling beetles (*Alphitobius diaperinus*) and their larvae as potential vectors for the transfer of *Campylobacter jejuni* and *Salmonella enterica* serovar *paratyphi B* variant Java between successive broiler flocks*. Applied and Environmental Microbiology, 2008. **74**(22): p. 5.
19. Hunter PR, Gaston MA., *Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity*. Journal of Clinical Microbiology, 1988. **26**(11): p. 2.
20. Karama M, Gyles CL., *Methods for genotyping verotoxin-producing *Escherichia coli**. Zoonoses and Public Health, 2010. **57**(7-8): p. 16.
21. Kim GB, Seo YM, Kim CH, Paik IK., *Effect of dietary prebiotic supplementation on the performance, intestinal microflora, and immune response of broilers*. Poultry Science, 2011. **90**(1): p. 8.
22. Lapuz RR, Umali DV, Suzuki T, Shiota K, Katoh H, *Comparison of the prevalence of *Salmonella* infection in layer hens from commercial layer farms with high and low rodent densities*. Avian Diseases, 2012. **56**(1): p. 6.
23. Le VT, Diep BA., *Selected insights from application of whole-genome sequencing for outbreak investigations*. Current Opinion in Critical Care, 2013. **19**(5): p. 8.
24. Looft T, Allen HK, Casey TA, Alt DP, Stanton TB., *Carbadox has both temporary and lasting effects on the swine gut microbiota*. Frontier in Microbiology, 2014. **10**(5).
25. LW, Riley, *Pandemic lineages of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli**. Clinical Microbiology and Infection, 2014. **20**(5): p. 11.
26. Ma HJ, Fu LL, Li JR., *Differentiation of Fecal *Escherichia coli* from Human, Livestock, and Poultry Sources by rep-PCR DNA Fingerprinting on the Shellfish Culture Area of East China Sea*. Current Microbiology, 2011. **62**: p. 8.
27. Maluta, R.P., Fairbrother, J.M., Stella, A.E., Rigobelo, E.C., Martinez, R., Avila, F.A., *Potentially pathogenic *Escherichia coli* in healthy, pasture-raised sheep on farms and at the abattoir in Brazil*. Veterinary Microbiology, 2014. **169**: p. 7.
28. Martin E, Jäckel U, *Characterization of bacterial contaminants in the air of a duck hatchery by cultivation based on molecular methods*. Journal of Environmental Monitoring, 2011. **13**: p. 7.
29. Martins da Costa PM, Vaz-Pires PM, Bernardo FM, *Antibiotic Resistance of *Enterococcus* spp. Isolated from Wastewater and Sludge of Poultry Slaughterhouses*. Journal of Environmental Science and Health, 2006. **41**(8): p. 11.
30. McDowell SW, Menzies FD, McBride SH, Oza AN, McKenna JP, Gordon AW, Neill SD, **Campylobacter* spp. in conventional broiler flocks in Northern Ireland: epidemiology and risk factors*. Preventive Veterinary Medicine, 2008. **84**(3-4): p. 6.
31. Mohapatra BR, Broersma K, Mazumder A, *Differentiation of fecal *Escherichia coli* from poultry and free-living birds by (GTG)₅-PCR genomic fingerprinting*. International Journal of Medical Microbiology, 2008. **298**: p. 8.
32. Mohapatra BR, Broersma K, Mazumder A, *Comparison of five rep-PCR genomic fingerprinting methods for differentiation of fecal *Escherichia coli* from humans, poultry and wild birds*. Federation of European Microbiological Societies, 2007. **277**(1): p. 9.
33. Mohapatra BR, Broersma K, Nordin R, Mazumder A, *Evaluation of repetitive extragenic palindromic-PCR for discrimination of fecal *Escherichia coli* from humans, and different domestic- and wild-animals*. Microbiology and Immunology, 2007. **51**(8): p. 8.

34. Patriarchi A, Fox A, Maunsell B, Fanning S, Bolton D, *Molecular Characterization and Environmental Mapping of Campylobacter Isolates in a Subset of Intensive Poultry Flocks in Ireland*. Foodborne Pathogens and Disease, 2011. **Vol. 8**(1): p. 10.
35. Pavlic M, Griffiths MW., *Principles, applications, and limitations of automated ribotyping as a rapid method in food safety*. Foodborne Pathogens and Disease, 2009. **6**(9): p. 9.
36. Racicot M, Venne D, Durivage A, Vaillancourt JP., *Description of 44 biosecurity errors while entering and exiting poultry barns based on video surveillance in Quebec, Canada*. Preventive Veterinary Medicine, 2011. **100**(3-4): p. 7.
37. Ramabu SS, Boxall NS, Madie P, Fenwick SG, *Some potential sources for transmission of Campylobacter jejuni to broiler chickens*. Letters in Applied Microbiology, 2004. **39**: p. 5.
38. Ridley A, Morris V, Gittins J, Cawthraw S, Harris J, Edge S, Allen V, *Potential sources of Campylobacter infection on chicken farms: contamination and control of broiler-harvesting equipment, vehicles and personnel*. Journal of Applied Microbiology, 2011. **110**(no. doi: 10.1111/j.1365-2672.2011.05038.x): p. 12.
39. Singer RS, Jeffrey JS, Carpenter TE, Cooke CL, Atwill ER, Johnson WO, Hirsh DC., *Persistence of cellulitis-associated Escherichia coli DNA fingerprints in successive broiler chicken flocks*. Veterinary Microbiology, 2000. **75**(1): p. 13.
40. Skov MN, Spencer AG, Hald B, Petersen L, Nauerby B, Carstensen B, Madsen M., *The role of litter beetles as potential reservoir for Salmonella enterica and thermophilic Campylobacter spp. between broiler flocks*. Avian Diseases, 2004. **48**(1): p. 10.
41. SM, Shane, *The significance of Campylobacter jejuni infection in poultry : a review*. Avian Pathology : Journal of the W.V.P.A., 1992. **21**(2): p. 5.
42. Souillard R, Woudstra C, Le Maréchal C, Dia M, Bayon-Auboyer MH, Chemaly M, Fach P, Le Bouquin S., *Investigation of Clostridium botulinum in commercial poultry farms in France between 2011 and 2013*. Avian Pathology, 2014. **43**(5): p. 9.
43. Steven L. Foley, Aaron M. Lynne, Rajesh Nayak, *Molecular typing methodologies for microbial source tracking and epidemiological investigations of Gran-negative bacterial foodborne pathogens*. Infection, Genetics and Evolution, 2009. **9**: p. 11.
44. Veenemans J, Overdeest IT, Snelders E, Willemsen I, Hendriks Y, Adesokan A, Doran G, Bruso S, Rolfe A, Pettersson A, Kluytmans JA., *Next-generation sequencing for typing and detection of resistance genes: performance of a new commercial method during an outbreak of extended-spectrum-beta-lactamase-producing Escherichia coli*. Journal of Clinical Microbiology, 2014. **52**(7): p. 7.

Figure 1: Typical (GTG)₅-PCR DNA fingerprint patterns

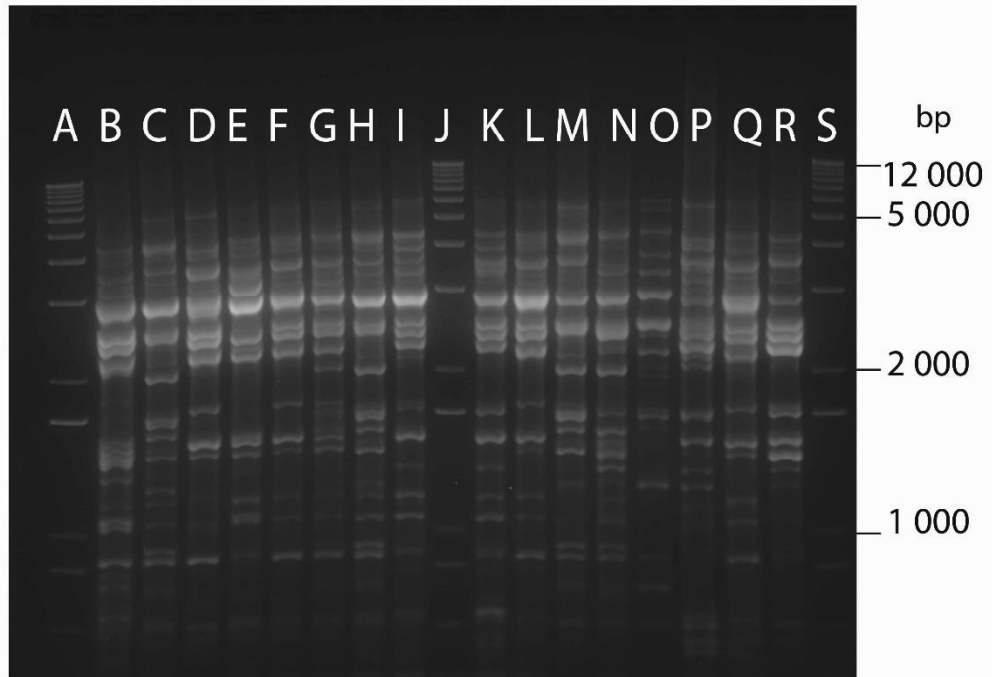


FIG. 1. (GTG)₅-PCR DNA fingerprint.

Lane A, J and S contained an external standard, a 1-kb plus molecular weight ladder. Lanes B to I and K to Q are samples and lane R is the positive control. Negative control would be in Lane T (not shown)

Figure 2: Dendrogram showing the relatedness of *Escherichia coli* isolates

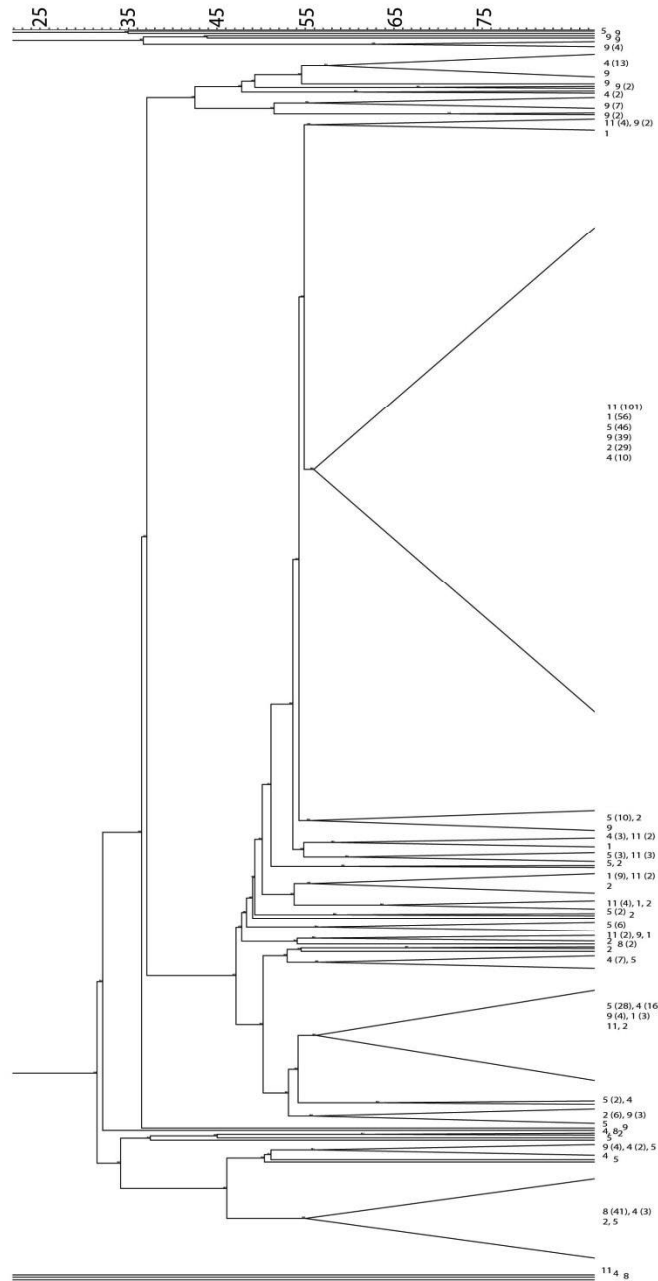


FIG. 2. Dendrogram showing the relatedness of isolates from site 1, 2, 4, 5, 8, 9 and 11 by (GTG)₅-PCR DNA fingerprint Relationships were determined by using Jaccard similarity coefficients and the UPGMA method. Numbers in parenthesis are the number of isolates for each site

Figure 3: Number of clusters in relation to the number of isolates and of source houses per cluster

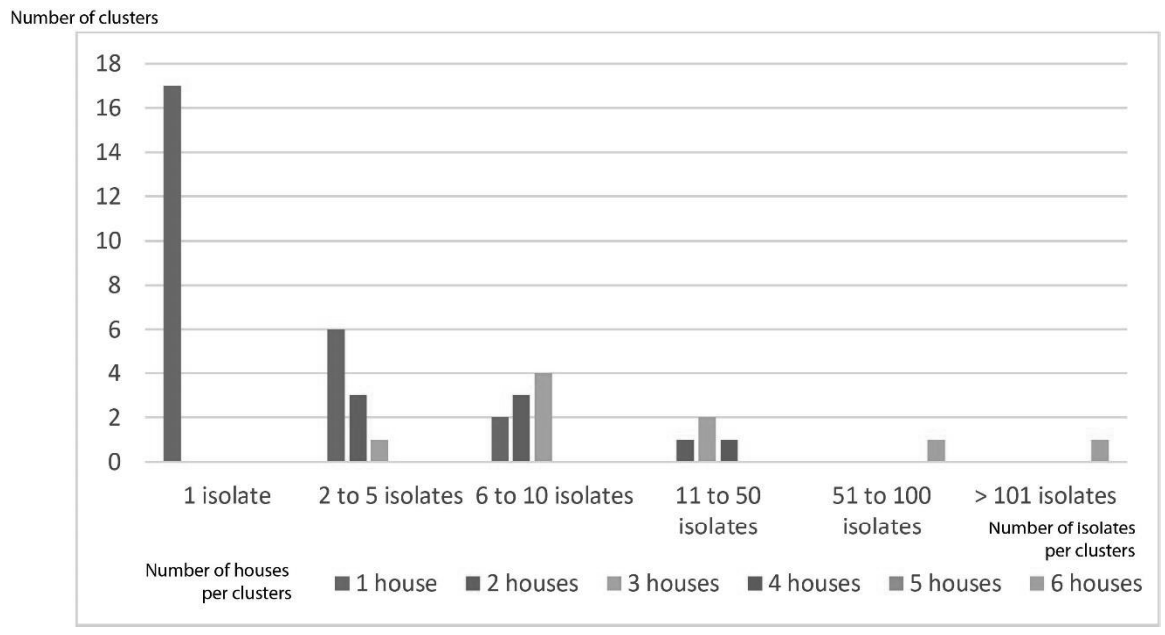


Figure 4: Breakdown of the 6 largest clusters by the house of origin of the isolates

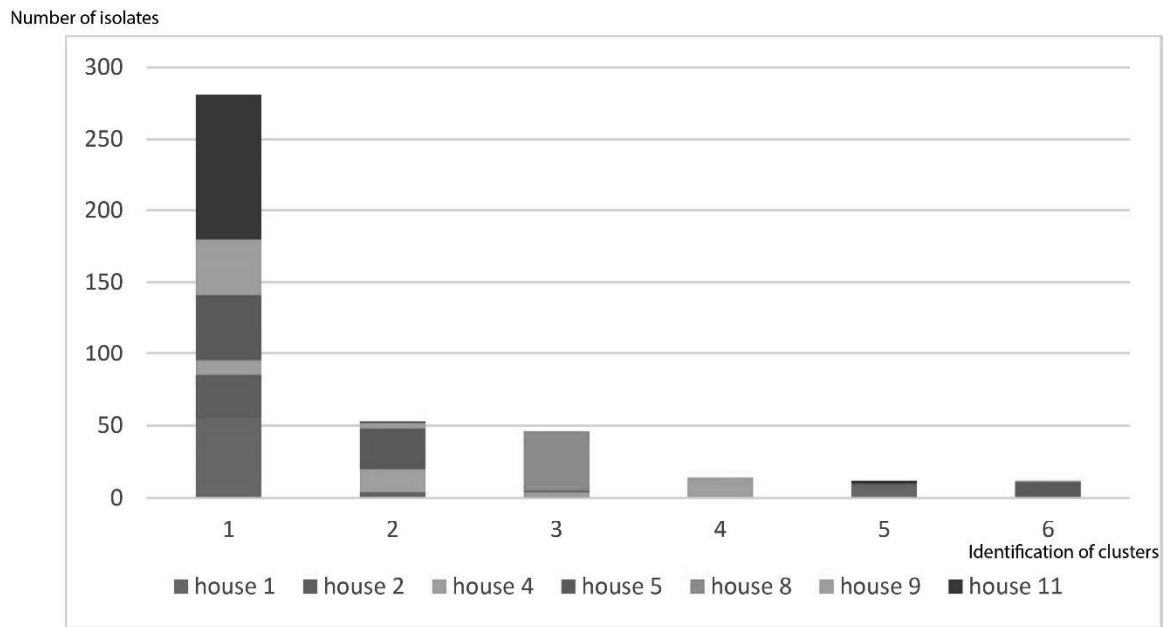


Figure 5: Number of clusters containing isolates from each house based on their representation through time.

Number of clusters

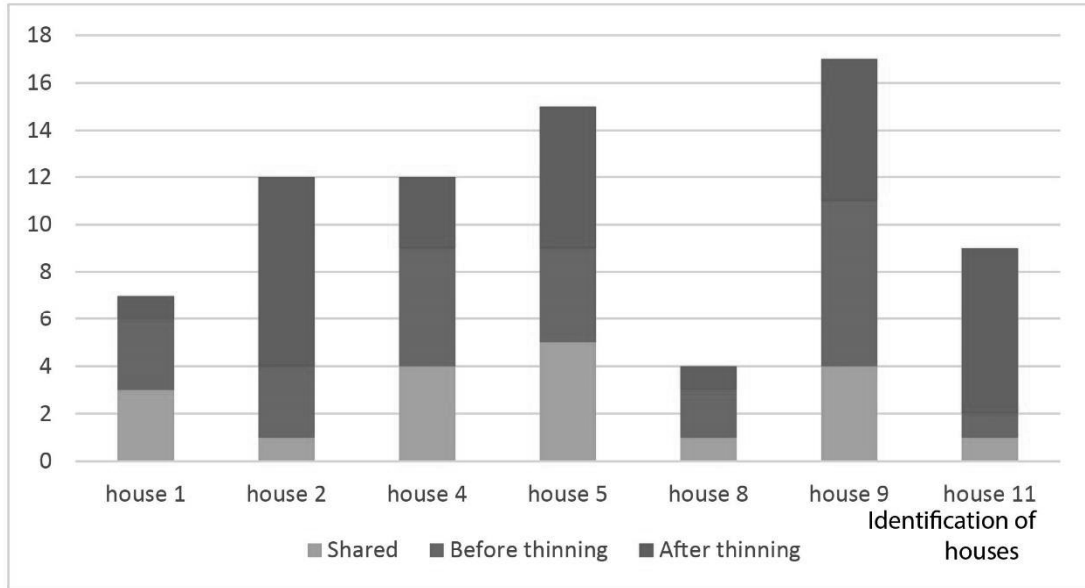


Figure 6: Supplementary data; Predicted number of clusters based on similarity cut-off value

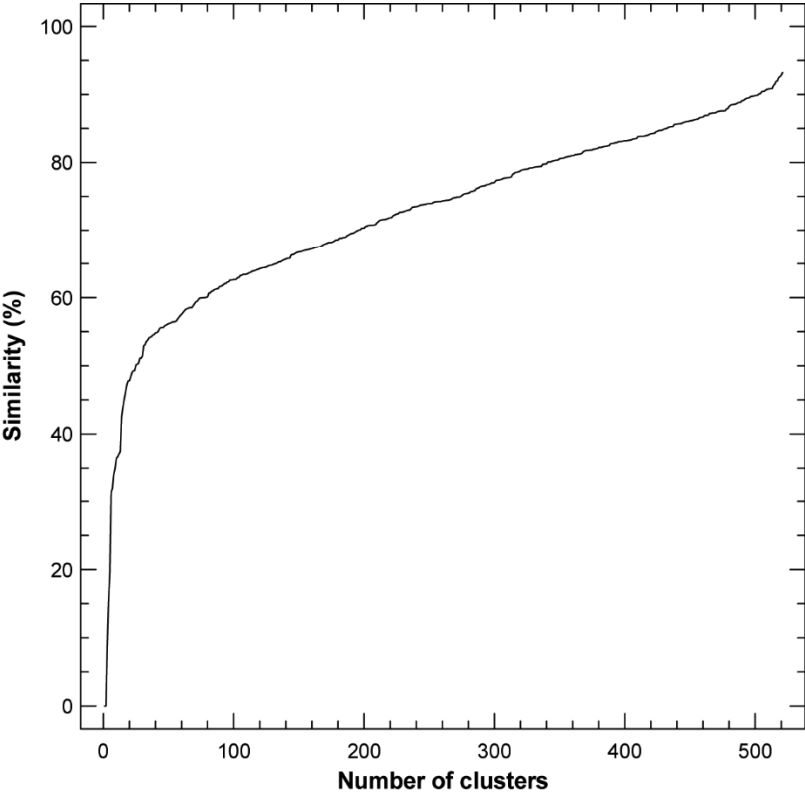


Table I: Assignment of isolates to house source groups by using (GTG)₅-PCR DNA fingerprints and Jackknife analysis

Table 1 : Assignment of isolates to chicken house source groups by using GTG5 PCR DNA fingerprints and Jackknife analysis

Assigned house	% of isolates in assigned house ^a						
	1	2	4	5	8	9	11
1	75,0	11,1	0,0	3,8	0,0	1,3	11,7
2	1,4	55,6	0,0	1,0	2,2	0,0	0,0
4	1,4	6,7	73,3	4,8	2,2	5,3	0,0
5	4,2	0,0	15,0	76,2	2,2	5,3	4,2
8	0,0	2,2	5,0	1,9	93,3	0,0	0,0
9	5,6	4,4	5,0	5,7	0,0	85,3	5,8
11	12,5	20,0	1,7	6,7	0,0	2,7	78,3

^a Values in boldface indicate percentages of isolates correctly assigned to source house.

IV. Discussion

Nos résultats montrent que la technique de rep-PCR en utilisant l'amorce GTG5 permet d'obtenir des agrégats signatures pour certains sites. Ce type de signature n'a pas été retrouvé pour tous les sites. Dans certains cas, nos résultats démontrent par contre une modification des *E. coli* fécaux suite au détasement, indiquant une perturbation mesurable de la flore intestinale. La signification de ces résultats doit être interprétée prudemment car il y a une quantité de facteurs inconnus pour chacun des sites pouvant expliquer en partie la variabilité de la population bactérienne.

En premier lieu, il y a la source des poussins. Au Québec, il y a cinq couvoirs commerciaux fournisseurs de poussins et chacun de ces couvoirs possède plusieurs troupeaux de reproduction répartis à divers endroits dans la province. De plus, même si deux troupeaux de reproduction fournissent le même couvoir, il est probable que la gestion des troupeaux soit différente. Entre autre, l'usage d'antibiotique peut varier en fonction des troubles sanitaires que chacun des troupeaux ont pu éprouver. De plus, même si une des fermes étudiée dit obtenir ses poussins du couvoir A, il n'est pas impossible que les poussins proviennent réellement du couvoir B. Cela s'explique par le fait que les livraisons de poussins provenant des divers couvoirs sont dépendantes du pourcentage d'éclosion obtenu à chaque jour. Si le couvoir A a eu un faible taux d'éclosion et que le couvoir B a eu un trop haut taux d'éclosion, le couvoir B vendra des poussins au couvoir A qui lui les vendra au producteur sans nécessairement l'aviser de leur origine réelle. En plus de cela, 21% des œufs d'incubation et des poussins vendus au Québec sont importés des États-Unis de troupeaux fournisseurs et de couvoirs pour lesquels très peu d'information de type sanitaire n'est disponible.

Un deuxième facteur inconnu qui peut faire varier les populations d'*E. coli* est la nature de l'aliment donné aux volailles. Certaines informations ont pu être obtenues des producteurs concernant le programme prophylactique d'anticoccidien et d'antibiotique. Par contre, ces informations peuvent parfois être incomplète. Certains meuniers ajouteront un antibiotique, le triméthoprim-sulfadiazine, dans la moulée de début afin d'aider le producteur à obtenir de meilleurs résultats de départ. Parfois, le producteur ne sera pas au courant ou ne rapportera dans la fiche d'élevage transmise à l'abattoir que ce qui est administré dans la dernière ration. Ce

même type de pratique peut être fait suite aux détassements afin de limiter la mortalité associée à la colibacillose suite à ce stress. Une autre pratique courante est d'ajouter des produits naturels, tel que des MOS, des probiotiques, des huiles essentielles ou des acides organiques qui peuvent avoir un impact sur les populations de *E. coli*. Le but de ces ajouts est d'obtenir une moulée produisant de meilleures performances zootechniques, facilitant le travail de vente des meuneries. Cette information ne sera pas nécessairement relayée au producteur et même s'il est au courant, celui-ci pourrait juger que cette information n'était pas pertinente à transmettre lors des échantillonnages.

Un autre facteur très difficile à évaluer est la mise en application des mesures de biosécurité. Les données recueillies par le questionnaire sur la biosécurité laisse croire que les producteurs et les visiteurs changent leurs bottes, portent des survêtements et se lavent les mains à chaque fois avant d'entrer dans le poulailler. Par contre, comme l'a démontré Racicot et coll., les mesures de biosécurité ne sont pas appliquées uniformément d'un site à l'autre, ni d'une journée à l'autre. [104] Il est donc pratiquement impossible de connaître le réel statut de biosécurité de chacun des sites échantillonnés. Certains éléments étaient toutefois évidents. Pour un site en particulier, le site 5, il était clair que peu d'attention était donné à la biosécurité et ceci a même été rapporté dans le questionnaire : il y avait des signes très flagrants d'infestations de rongeurs et la présence d'une accumulation d'environ cinq cm de larves de ténébrions partout sur le plancher de l'antichambre. De plus, les poulets morts étaient ramassés environ une fois à tous les trois jours. Ce site était exceptionnel en matière de non-respect des mesures de biosécurité. Quoique nous ne pouvons pas y associer une conclusion définitive, il est intéressant de noter qu'une des grappes, la grappe 6, était composée presque entièrement d'isolats de ce site. Nous pouvons nous questionner à savoir si cette grappe serait une signature de ce site possédant une gestion bien particulière.

Deux autres sites, les sites 1 et 8, avaient aussi des composantes distinctives. Le poulailler du site 1 était composé d'un parquet de poulets et d'un parquet de dindes immédiatement adjacent. Seulement une porte séparait les deux espèces et aucune mesure de biosécurité n'était mise en place afin de les ségréguer. En ce qui concerne le site 8, il y avait un enclos de veaux à environ 10m de la porte d'entrée du poulailler. Pour les sites 1 et 8, il y avait des grappes, respectivement les grappes 5 et 3, qui étaient composées presque exclusivement d'isolats provenant de ces sites.

Encore une fois, nous pourrions émettre l'hypothèse que ces grappes sont des signatures de ces sites en raison des conditions de régie particulière ou la présence d'espèces animales autres que les poulets.

Le questionnaire en Annexe A, qui a été administré aux éleveurs lors de chaque visite, a été développé afin de documenter les pratiques de biosécurité susceptibles d'avoir un impact sur la flore intestinale de *E. coli*. L'objectif étant de mettre en évidence les facteurs pouvant affecter nos résultats. Tel que discuté précédemment, beaucoup de facteurs potentiellement confondant ont été obtenus. Les divergences de pratiques de biosécurité marquées entre les différents sites de production faisant partie de l'étude nous ont forcés à laisser tomber l'analyse de l'impact d'utilisation de mesures de biosécurité par les équipes d'attrapeurs, de même que l'incorporation du questionnaire et de ses résultats dans l'article. Les sources de contamination par de nouvelles souches de *E. coli* sont trop élevée dans plusieurs cas. Cette contamination possible par des facteurs hors de notre contrôle aurait gêné l'interprétation des résultats. En effet, en prenant le cas d'un détassement où les attrapeurs utilisent les mesures prescrites, s'il y avait eu de gros changements de la nature des *E. coli* fécaux, nous aurions pu conclure que les mesures étaient insuffisantes. Dans ce cas, il aurait été possible que les changements de *E. coli* soient plutôt dûs à l'introduction de nouvelles souches par l'éleveur qui n'utilisent pas de mesures de biosécurité. À l'inverse, l'absence de changements chez les *E. coli* alors que les attrapeurs n'utilisent pas de mesures de biosécurité nous aurait amené à la conclusion que ces mesures n'étaient pas nécessaires alors que cela aurait pu être simplement la présence de dindes sur le parquet adjacent qui a un effet tampon sur les altérations de la flore.

Par la suite, avant le détassement a été comparé à après le détassement pour chacun des sites. Certains agrégats, Av, étaient retrouvés seulement avant le détassement et d'autres, Ap, seulement après. Il y avait aussi des agrégats commun, Cm, qui possédaient des isolats provenant d'avant et après le détassement. Les résultats obtenus étaient très variable. Pour deux sites, il y avait un haut taux (> 65%) d'agrégats dans la catégorie Ap et un très faible taux (< 15%) d'agrégats Cm alors que pour un site, c'était tout-à-fait l'opposé avec 43% de Cm et seulement 14% de Ap. Pour les 4 autres sites, les différences étaient plus modérées, avec un pourcentage de Ap et de Cm qui variait principalement entre 25 et 35%. Ces résultats montrent une réaction de la flore fécale d'*E. coli* variable en fonction des sites. À la lumière des

informations recueillies, aucune hypothèse ne peut être émise pour expliquer pourquoi les sites 2 et 11 ont eu un aussi haut taux de nouveaux agrégats après le détassement. En ce qui concerne le site 1, l'hypothèse pouvant expliquer le taux de conservation des agrégats suite au détassement serait la présence de dindes sur le parquet adjacent aux poulets. Possiblement que ceux-ci servent de réservoir pour la flore fécale normale et contribuent à la maintenir stable dans le temps. Encore une fois, il y a trop de facteurs inconnus pour tirer de réelles conclusions de ces résultats. Normalement pour une équipe d'attrapeurs de poulets, le site faisant du détassement est le premier client desservi dans un quart de travail afin de diminuer le risque de transmission de maladies infectieuses. L'expérience dans le domaine montre que même si c'est ce qui est visé, ce n'est pas toujours le cas. Dans d'autres cas, même s'il s'agit du premier site visité dans un quart de travail, il n'est pas impossible que certains travailleurs de l'équipe aient terminé très tard le quart de travail précédent et n'aient pas eu le temps de se changer et de se laver avant d'entreprendre le quart suivant, diminuant ainsi le niveau de biosécurité.

Une autre pratique courante qui pourrait amener de grands changements au niveau de la flore bactérienne est l'usage d'antibiotique. Il n'est pas rare que des producteurs utilisent un antibiotique, le triméthoprime-sulfadiazine, dans la moulée d'office suite à un détassement afin de réduire les risques et la sévérité d'épisode de colibacillose suite à ce stress. Ce type de pratique ne sera pas nécessairement connu ou déclaré par le producteur.

Sur la base de ces résultats, nous pouvons affirmer que la technique (GTG)₅-PCR permet de mettre en évidence des changements mesurables dans les populations de *E. coli* fécaux suite au détassement. Il est également possible que pour les sites pour lesquels peu de changements ont été détectés avec le (GTG)₅-PCR, certaines modifications aient tout de même eu lieu comme par exemple l'acquisition par une souche résidente d'un plasmide possédant des gènes de virulence ou d'antibiorésistance. Lors de l'interprétation des résultats, il est important de se rappeler que les grappes ont été créées en se basant sur un degré de similarité arbitraire de 55%. Ce chiffre a été choisi car il permettait d'obtenir un maximum de similarité entre les souches d'une même grappe tout en minimisant le nombre de grappe. Plus le pourcentage de similarité utilisé aurait été élevé, plus le nombre de grappe aurait été élevé. À 100% de similarité, il y aurait eu un très grand nombre de grappe contenant seulement entre un et trois isolats. À ce pourcentage, des différences mineures de l'apparence des patrons de bandes sur les gels

d'électrophorèse ou des artéfacts de migration pourraient séparer des souches très semblables dans des grappes différentes, rendant l'analyse peu pertinente. En travaillant avec un degré de similarité à 55%, il est possible que certaines grappes distinctes se soient retrouvées à l'intérieur d'une même grappe majeure nous amenant à tort à la conclusion qu'il n'y a que peu de différence entre l'avant et l'après détassement.

La nécessité de travailler avec un degré de similarité aussi faible que 55% fait partie des limites de la technique choisie. Un grand nombre de bandes est généré par le (GTG)₅-PCR et le contraste de chacune d'elles n'est pas identique à chaque répétition, malgré le fait que la technique a été retravaillée pendant environ trois mois avant d'obtenir des résultats jugés satisfaisants pour notre travail. Afin de valider la pertinence des grappes signatures mises en évidence et les changements d'agrégats suite au détassement, d'autres analyses seraient nécessaires. De plus, selon Hunter et Gaston, une technique qui permet un bon pouvoir de différenciation devrait séparer les échantillons dans des groupes de telle façon à obtenir un index de diversité de Simpson supérieur à 0.90. Dans notre cas, l'index se situant à 0.69 n'est pas optimal, signifiant qu'il est fortement possible que des changements aient échappés à notre technique. La détection de gènes de virulence associés au APEC tel que décrite dans l'introduction permettrait une meilleure compréhension de l'impact possible sur la santé des troupeaux de ces agrégats signatures. La présence d'un plus grand nombre de gènes de virulence sur les *E. coli* de ces agrégats qu'en général laisserait supposer une augmentation du risque ou de la sévérité d'épisode de colibacillose. De plus, la comparaison des profils de virulence entre les *E. coli* fécaux en général et ceux des agrégats signatures permettrait de valider la séparation faite par la technique d'empreinte génétique d'ADN par rep-PCR. L'analyse des profils de résistance aux antibiotiques ajouterait de l'information pouvant donner une meilleure idée des usages courants d'antibiotiques dans les divers sites et possiblement expliquer une portion des différences observées. Certaines analyses de ce type, soit PCR des gènes de virulence et analyse phénotypique de l'antibiorésistance, ont déjà été commencé sur 174 souches provenant d'échantillons prélevés avant le détassement des 7 poulaillers présentés dans ce projet. Il est prévu de continuer les analyses pour des souches de ces mêmes poulaillers provenant d'échantillons prélevés après le détassement. Éventuellement, des techniques de séquençage tel que le MLST permettrait de valider les agrégats générés par la technique utilisée dans le projet

actuel. Afin d'obtenir la meilleure information, le séquençage du génome entier serait l'idéal. Cette technique permettrait de valider l'information comparative obtenue dans le présent projet et de donner des informations qualitatives sur les souches analysées.

Les infections à *E. coli* présentent un problème majeur et constant pour les médecins vétérinaires en production avicole. Les pertes économiques qui y sont associées sont énormes et beaucoup de pression est mise sur les vétérinaires afin d'en limiter l'impact. Mis à part les antibiotiques et un vaccin, il y a très peu d'outils disponibles. Certains fabricants de produits naturels, tel que des acidifiants ou des huiles essentielles, affirment que leurs produits améliore la flore de *E. coli* donnant ainsi l'impression que les produits limiteraient la mortalité et la morbidité qui lui est associé. Ces produits sont utilisés de façon empirique et ne donnent pas nécessairement de résultats clairs. Les vétérinaires bénéficieraient fortement d'un outil diagnostique permettant de juger la qualité de la flore de *E. coli* d'un troupeau. En sachant, par exemple, qu'un troupeau reproducteur a une flore de *E. coli* prédisposant leurs poussins à souffrir d'omphalite, des actions pourraient être prises et leurs impacts mesurés pour corriger la situation. Les fabricants de produits naturels auraient aussi des outils pour développer et mettre en marché des produits répondant réellement aux besoins de l'industrie en matière de prévention d'infection par *E. coli*.

V. Conclusion

Cette étude révèle que la technique d'empreinte génétique de l'ADN par rep-PCR en utilisant l'amorce (GTG)₅ permet de classer dans différents agrégats les *E. coli* fécaux provenant de différents sites. La méthode a aussi permis de mettre en évidence une modification des populations de *E. coli* qui varie beaucoup d'un site à l'autre.

Nos résultats ne fournissent pas d'informations sur la nature des isolats. Des analyses additionnelles concernant la présence de divers gènes de virulence ainsi que sur les patrons de résistance aux antibiotiques permettraient de valider la pertinence des agrégats générés par notre méthode et fourniraient de précieuses informations sur la nature de ces isolats. De plus, en couplant de telles analyses avec la technique utilisée, nous obtiendrions un pouvoir de

différentiation plus élevée qui permettrait possiblement de mettre en évidence des modifications additionnelles des populations de *E. coli* suite au détassement.

Bibliographie

1. Alarcon P, Rushton J, Nathues H, Wieland B., *Economic efficiency analysis of different strategies to control post-weaning multi-systemic wasting syndrome and porcine circovirus type 2 subclinical infection in 3-weekly batch system farms*. Preventive Veterinary Medicine, 2013. **110**(2): p. 16.
2. Allen VM, Weaver H, Ridley AM, Harris JA, Sharma M, Emery J, Sparks N, Lewis M, Edge S., *Sources and spread of thermophilic Campylobacter spp. during partial depopulation of broiler chicken flocks*. Journal of Food Protection, 2008. **Vol. 71**(2): p. 7.
3. Amass SF, Halbur PG, Byrne BA, Schneider JL, Koons CW, Cornick N, Raglan D, *Mechanical transmission of enterotoxigenic Escherichia coli to weaned pigs by people, and biosecurity procedures that prevented such transmission*. Journal of Swine Health and Production, 2003. **11**: p. 8.
4. Amass SF, Pacheco JM, Mason PW, Schneider JL, Alvarez RM, Clark LK, Ragland D, *Procedures for preventing the transmission of foot-and-mouth disease virus to pigs and sheep by personnel in contact with infected pigs*. The Veterinary Record, 2003. **153**(5): p. 4.
5. Anderson TC, Crawford PC, Dubovi EJ, Gibbs EP, Hernandez JA., *Prevalence of and exposure factors for seropositivity to H3N8 canine influenza virus in dogs with influenza-like illness in the United States*. Journal of the American Veterinary Medical Association, 2013. **242**(2).
6. Annandale CH, Holm DE, Ebersohn K, Venter EH., *Seminal Transmission of Lumpy Skin Disease Virus in Heifers*. Transboundary and Emerging Diseases, 2013.
7. Aslam M, Toufeer M, Narvaez Bravo C, Lai V, Rempel H, Manges A, Diarra MS., *Characterization of Extraintestinal Pathogenic Escherichia coli isolated from retail poultry meats from Alberta, Canada*. International Journal of Food Microbiology, 2014. **177**: p. 8.
8. Asmare K, Sibhat B, Molla W, Ayelet G, Shiferaw J, Martin AD, Skjerve E, Godfroid J., *The status of bovine brucellosis in Ethiopia with special emphasis on exotic and cross bred cattle in dairy and breeding farms*. Acta Tropica, 2013. **126**(3): p. 7.
9. Bahrndorff S, Rangstrup-Christensen L, Nordentoft S, Hald B., *Foodborne disease prevention and broiler chickens with reduced campylobacter infection*. Emerging Infectious Diseases, 2013. **19**(3): p. 6.
10. Bailey JS, Cox NA, Berrang ME, *Hatchery-acquired salmonellae in broiler chicks*. Poultry Science, 1994. **73**(7): p. 5.
11. Barasona JA, Vercauteren KC, Saklou N, Gortazar C, Vicente J., *Effectiveness of cattle operated bump gates and exclusion fences in preventing ungulate multi-host sanitary interaction*. Preventive Veterinary Medicine, 2013.
12. Barbieri NL, Oliveira AL, Tejkowski TM, Pavanelo DB, Matter LB, Pinheiro SR, Vaz TM, Nolan LK, Logue CM, Brito BG, Horn F., *Molecular Characterization and Clonal Relationships Among Escherichia coli Strains Isolated from Broiler Chickens with Colisepticemia*. Foodborne Pathogens and Disease, 2015. **12**(1): p. 10.
13. Barnes HJ, Guy JS, Vaillancourt JP, *Poult enteritis complex*. Revue Scientifique et Technique (International Office of Epizootics), 2000. **19**(2): p. 24.
14. Baurhoo B, Ferket PR, Zhao X., *Effects of diets containing different concentrations of mannanoligosaccharide or antibiotics on growth performance, intestinal development, cecal*

- and litter microbial populations, and carcass parameters of broilers.* Poultry Science, 2009. **88**(11): p. 11.
15. Baurhoo B, Letellier A, Zhao X, Ruiz-Feria CA., *Cecal populations of lactobacilli and bifidobacteria and Escherichia coli populations after in vivo Escherichia coli challenge in birds fed diets with purified lignin or mannanoligosaccharides.* Poultry Science, 2007. **86**(12): p. 18.
 16. Bélanger L, Garenaux A, Harel j, Boulianne M, Nadeau E, Dozois CM, *Escherichia coli from animal reservoirs as a potential source of human extraintestinal pathogenic E. coli.* Federation of European Microbiological Societies, 2011. **62**(1): p. 10.
 17. Bertelli C, Greub G., *Rapid bacterial genome sequencing: methods and applications in clinical microbiology.* Clinical microbiology and infection, 2013. **19**(9): p. 11.
 18. Biggs P, Parsons CM., *The effects of several organic acids on growth performance, nutrient digestibilities, and cecal microbial populations in young chicks.* Poultry Science, 2008. **87**(12): p. 9.
 19. Blanco JE, Blanco M, Mora A, Jansen WH, García V, Vázquez ML, Blanco J., *Serotypes of Escherichia coli isolated from septicaemic chickens in Galicia (northwest Spain).* Veterinary Microbiology, 1998. **61**(3): p. 7.
 20. Bojesen AM, Nielsen SS, Bisgaard M, *Prevalence and transmission of haemolytic Gallibacterium species in chicken production systems with different biosecurity levels.* Avian Pathology, 2003. **32**(5): p. 8.
 21. Bortolaia V, Bisgaard M, Bojesen AM, *Distribution and possible transmission of ampicillin- and nalidixic acid-resistant Escherichia coli within the broiler industry.* Veterinary Microbiology, 2009. **142**(3-4): p. 7.
 22. Bottoms K, Poljak Z, Dewey C, Deardon R, Holtkamp D, Friendship R., *Evaluation of external biosecurity practices on southern Ontario sow farms.* Prev Vet Med, 2013. **109**(1-2): p. 11.
 23. Brennan ML, Christley RM., *Cattle producers' perceptions of biosecurity.* BMC Veterinary Research, 2013. **9**(71).
 24. Brzuszkiewicz E, Brüggemann H, Liesegang H, Emmerth M, Olschläger T, Nagy G, Albermann K, Wagner C, Buchrieser C, Emody L, Gottschalk G, Hacker J, Dobrindt U, *How to become a uropathogen: Comparative genomic analysis of extraintestinal pathogenic Escherichia coli strains.* Proceedings of the National Academy of Sciences, 2006. **103**(34): p. 6.
 25. Byrd J, Bailey RH, Wills R, Nisbet D, *Recovery of Campylobacter from Commercial Broiler Hatchery Trayliners.* Poultry Science, 2007. **86**: p. 4.
 26. Carey CM, Kostrzynska M, Ojha S, Thompson S., *The effect of probiotics and organic acids on Shiga-toxin 2 gene expression in enterohemorrhagic Escherichia coli O157:H7.* Journal of Microbiological Methods, 2008. **73**(2): p. 8.
 27. Carlos C, Alexandrino F, Stoppe NC, Sato MI, Ottoboni LM, *Use of Escherichia coli BOX-PCR fingerprints to identify sources of fecal contamination of water bodies in the State of São Paulo, Brazil.* Journal of Environmental Management, 2012. **93**(1): p. 6.
 28. Chaudhuri RR, Henderson IR, *The evolution of the Escherichia coli phylogeny.* Infection, Genetics and Evolution, 2012. **12**: p. 13.
 29. Chauvin C, Bouvarel I, Beloeil PA, Orand JP, Guillemot D, Sanders P, *A pharmaco-epidemiological analysis of factors associated with antimicrobial consumption level in turkey broiler flocks.* Veterinary Research, 2005. **36**(2): p. 13.
 30. Chinivasagam HN, Tran T, Maddock L, Gale A, Blackall PJ, *Mechanically Ventilated Broiler Sheds: a Possible Source of Aerosolized Salmonella, Campylobacter, and Escherichia coli.* Applied and Environmental Microbiology, 2007. **75**(23): p. 9.

31. Chokboonmongkol C, Patchanee P, Gözl G, Zessin KH, Alter T., *Prevalence, quantitative load, and antimicrobial resistance of Campylobacter spp. from broiler ceca and broiler skin samples in Thailand*. Poultry Science, 2013. **92**(2).
32. Cogan TA, Humphrey TJ, *The rise and fall of Salmonella Enteritidis in the UK*. Journal of Applied Microbiology, 2003. **94**.
33. Cox NA, Bailey JS, Mauldin JM, Blankenship LC, *Presence and impact of Salmonella contamination in commercial broiler*. Poultry Science, 1990. **69**(9): p. 4.
34. da Costa PM, Oliveira M, Bica A, Vaz-Pires P, Bernardo F, *Antimicrobial resistance in Enterococcus spp. and Escherichia coli isolated from poultry feed and feed ingredients*. Veterinary Microbiology, 2007. **120**: p. 10.
35. de Been M, Lanza VF, de Toro M, Scharringa J, Dohmen W, Du Y, Hu J, Lei Y, Li N, Tooming-Klunderud A, Heederik DJ, Fluit AC, Bonten MJ, Willems RJ, de la Cruz F, van Schaik W., *Dissemination of cephalosporin resistance genes between Escherichia coli strains from farm animals and humans by specific plasmid lineages*. PLoS Genetics, 2014. **10**(18).
36. DebRoy C, Roberts E, Fratamico PM., *Detection of O antigens in Escherichia coli*. Animal Health Research Reviews, 2011. **12**(2): p. 17.
37. Delicato ER, de Brito BG, Gaziri LC, Vidotto MC., *Virulence-associated genes in Escherichia coli isolates from poultry with colibacillosis*. Veterinary Microbiology, 2003. **94**(2): p. 7.
38. Dhama K, Rajagunalan S, Chakraborty S, Verma AK, Kumar A, Tiwari R, Kapoor S., *Food-borne pathogens of animal origin-diagnosis, prevention, control and their zoonotic significance: a review*. Pakistan Journal of Biological Sciences, 2013. **16**(20): p. 10.
39. Diard M, Garry L, Selva M, Mosser T, Denamur E, Matic I, *Pathogenicity-Associated Islands in Extraintestinal Pathogenic Escherichia coli are fitness elements involved in intestinal colonization*. Journal of Bacteriology, 2010. **192**(19): p. 9.
40. Dombek PE, Johnson LK, Zimmerley ST, Sadowsky MJ, *Use of Repetitive DNA Sequences and the PCR To Differentiate Escherichia coli Isolates from Human and Animal Sources*. Applied and Environmental Microbiology, 2000. **Vol. 66**(No. 6): p. 5.
41. Dorea FC, Berghaus R, Hofacre C, Cole DJ, *Survey of biosecurity protocols and practices adopted by growers on commercial poultry farms in Georgia, U.S.A*. Avian Diseases, 2010. **54**(3): p. 9.
42. Duan H, Chai T, Cai Y, Zhong Z, Yao M, Zhang X, *Transmission identification of Escherichia coli aerosol in chicken houses to their environments using ERIC-PCR*. Science in China. Series C, Life Sciences / Chinese Academy of Sciences, 2008. **51**(2): p. 10.
43. Dziva F, Stevens MP, *Colibacillosis in poultry: unravelling the molecular basis of virulence of avian pathogenic Escherichia coli in their natural hosts*. Avian Pathology, 2008. **37**(4): p. 13.
44. ÉQCMA, *Communication personnelle*. 2010.
45. Ewers C, Janssen T, Kiessling S, Philipp HC, Wieler LH., *Rapid detection of virulence-associated genes in avian pathogenic Escherichia coli by multiplex polymerase chain reaction*. Avian Diseases, 2005. **49**(2): p. 5.
46. Ewers C, Janssen T, Kiessling S, Philipp HC, Wieler LH., *Molecular epidemiology of avian pathogenic Escherichia coli (APEC) isolated from colisepticemia in poultry*. Veterinary Microbiology, 2004. **104**(1-2): p. 11.
47. Ewers C, Janssen T, Wieler LH., *Avian pathogenic Escherichia coli (APEC)*. Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift, 2003. **116**(9-10): p. 15.
48. EZ Ron, *Host specificity of septicemic Escherichia coli: human and avian pathogens*. Current Opinion in Microbiology, 2006. **9**: p. 5.

49. Firestone SM, Lewis FI, Schemann K, Ward MP, Toribio JA, Dhand NK., *Understanding the associations between on-farm biosecurity practice and equine influenza infection during the 2007 outbreak in Australia*. *Prev Vet Med*, 2013. **110**(1): p. 9.
50. Firoozeh F, Saffari M, Neamati F, Zibaei M, *Detection of virulence genes in Escherichia coli isolated from patients with cystitis and pyelonephritis*. *International Journal of Infectious Diseases*, 2014. **29**: p. 4.
51. Ghosh TK, Haldar S, Bedford MR, Muthusami N, Samanta I., *Assessment of yeast cell wall as replacements for antibiotic growth promoters in broiler diets: effects on performance, intestinal histo-morphology and humoral immune responses*. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 2012. **96**(2): p. 10.
52. Gifford DH, Shane SM, Hugh-Jones M, Weigler BJ, *Evaluation of biosecurity in broiler breeders*. *Avian Diseases*, 1987. **31**(2): p. 6.
53. Gillespie IA, O'Brien SJ, Adak GK, Ward LR, Smith HR., *Foodborne general outbreaks of Salmonella Enteritidis phage type 4 infection, England and Wales, 1992-2002: where are the risks?* *Epidemiology and Infection*, 2005. **133**(5): p. 7.
54. Goldberg TL, Gillespie TR, Rwego IB, Estoff EL, Chapman CA, *Forest Fragmentation as Cause of Bacterial Transmission among Nonhuman Primates, Humans, and Livestock, Uganda*. *Emerging Infectious Diseases*, 2008. **Vol. 14**(9): p. 8.
55. Goldberg TL, Gillespie TR, Singer RS, *Optimization of Analytical Parameters for Inferring Relationships among Escherichia coli Isolates from Repetitive-Element PCR by Maximizing Correspondence with Multilocus Sequence Typing Data*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006. **vOL. 72**(9): p. 4.
56. Goldberg TL, Gillespie TR, Rwego IB, Wheelera E, Estoffa EL, Chapman CA, *Patterns of gastrointestinal bacterial exchange between chimpanzees and humans involved in research and tourism in western Uganda*. *Biological Conservation*, 2007. **135**: p. 7.
57. Gormley FJ, Little CL, Rawal N, Gillespie IA, Lebaigue S, Adak GK., *A 17-year review of foodborne outbreaks: describing the continuing decline in England and Wales (1992-2008)*. *Epidemiology and Infection*, 2011. **139**(5): p. 12.
58. Hacker J, Blum-Oehler G, Mühldorfer I, Tschäpe H., *Pathogenicity islands of virulent bacteria: structure, function and impact on microbial evolution*. *Molecular Microbiology*, 1997. **23**(6): p. 9.
59. Hassan HMA, Mohamed MA, Youssef AW, Hassan ER, *Effect of Using Organic Acids to Substitute Antibiotic Growth Promoters on Performance and Intestinal Microflora of Broilers*. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 2010. **23**(10): p. 6.
60. Hazeleger WC, Bolder NM, Beumer RR, Jacobs-Reitsma WF., *Darkling beetles (Alphitobius diaperinus) and their larvae as potential vectors for the transfer of Campylobacter jejuni and Salmonella enterica serovar paratyphi B variant Java between successive broiler flocks*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2008. **74**(22): p. 5.
61. Humphrey TJ, Henley A, Lanning DG., *The colonization of broiler chickens with Campylobacter jejuni: some epidemiological investigations*. *Epidemiology and Infection*, 1993. **110**(3): p. 7.
62. Hunter PR, Gaston MA., *Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity*. *Journal of Clinical Microbiology*, 1988. **26**(11): p. 2.
63. J Bray, *Isolation of antigenically homogeneous strains of Bact. coli neapolitanum from summer diarrhoea of infants*. *The Journal of Pathology and Bacteriology*, 1945. **57**(2): p. 9.
64. J Lubroth, *Control strategies for highly pathogenic avian influenza: a global perspective*. *Developmental Biology*, 2007. **130**: p. 9.
65. J Slater, *Ensuring equine biosecurity at London 2012*. *Veterinary Record*, 2013. **172**: p. 3.

66. JDD Pitout, *Extraintestinal pathogenic Escherichia coli : a combination of virulence with antibiotic resistance*. *Frontier in Microbiology*, 2012. **3**(9): p. 7.
67. Johnson JR, Murray AC, Gajewski A, Sullivan M, Snippes P, Kuskowski MA, Smith KE, *Isolation and Molecular Characterization of Nalidixic Acid-Resistant Extraintestinal Pathogenic Escherichia coli from Retail Chicken Products*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2003. **47**(7): p. 8.
68. Johnson JR, Russo TA, *Extraintestinal pathogenic Escherichia coli: "The other bad E coli"*. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 2001. **139**(3): p. 8.
69. Johnson TJ, Wannemuehler Y, Johnson SJ, Stell AL, Doetkott C, Johnson JR, Kim KS, Spanjaard L, Nolan LK, *Comparison of Extraintestinal Pathogenic Escherichia coli Strains from Human and Avian Sources Reveals a Mixed Subset Representing Potential Zoonotic Pathogens*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2008. **Vol. 74**(22): p. 8.
70. Karama M, Gyles CL., *Methods for genotyping verotoxin-producing Escherichia coli*. *Zoonoses and Public Health*, 2010. **57**(7-8): p. 16.
71. Kazemnia A, Ahmadi M, Dilmaghani M., *Antibiotic resistance pattern of different Escherichia coli phylogenetic groups isolated from human urinary tract infection and avian colibacillosis*. *Iranian Biomedical Journal*, 2014. **18**(4): p. 6.
72. Kim GB, Seo YM, Kim CH, Paik IK., *Effect of dietary prebiotic supplementation on the performance, intestinal microflora, and immune response of broilers*. *Poultry Science*, 2011. **90**(1): p. 8.
73. KS Kreager, *Chicken industry strategies for control of tumor virus infections*. *Poultry Science*, 1998. **77**: p. 4.
74. Landman WJ, Cornelissen RA., *[Virulence factors of Escherichia coli, with emphasis on avian pathogenic isolates]*. *Tijdschrift voor Diergeneeskunde*, 2006. **131**(22): p. 9.
75. Lapuz RR, Umali DV, Suzuki T, Shiota K, Katoh H, *Comparison of the prevalence of Salmonella infection in layer hens from commercial layer farms with high and low rodent densities*. *Avian Diseases*, 2012. **56**(1): p. 6.
76. Le Gall T, Clermont O, Gouriou S, Picard B, Nassif X, Denamur E, Tenaillon O, *Extraintestinal Virulence Is a Coincidental By-Product of Commensalism in B2 Phylogenetic Group Escherichia coli Strains*. *Molecular Biology Evolution*, 2007. **24**(11): p. 12.
77. Le VT, Diep BA., *Selected insights from application of whole-genome sequencing for outbreak investigations*. *Current Opinion in Critical Care*, 2013. **19**(5): p. 8.
78. Li H, Bai JY, Wang LY, Zeng L, Shi YS, Qiu ZL, Ye HH, Zhang XF, Lu QB, Kosoy M, Liu W, Cao WC., *Genetic diversity of Bartonella quintana in macaques suggests zoonotic origin of trench fever*. *Molecular Ecology*, 2013. **22**(8).
79. Li X, Chai T, Wang Z, Song C, Cao H, Liu J, Zhang X, Wang W, Yao M, Miao Z, *Occurrence and transmission of Newcastle disease virus aerosol originating from infected chickens under experimental conditions*. *Veterinary Microbiology*, 2009. **136**(3-4): p. 7.
80. Logue CM, Doetkott C, Mangiamele P, Wannemuehler YM, Johnson TJ, Tivendale KA, Li G, Sherwood JS, Nolan LK., *Genotypic and phenotypic traits that distinguish neonatal meningitis-associated Escherichia coli from fecal E. coli isolates of healthy human hosts*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2012. **78**(16): p. 7.
81. Looft T, Allen HK, Casey TA, Alt DP, Stanton TB., *Carbadox has both temporary and lasting effects on the swine gut microbiota*. *Frontier in Microbiology*, 2014. **10**(5).
82. Lumpkin JR, Miller YK, Inglesby T, Links JM, Schwartz AT, Slemp CC, Burhans RL, Blumenstock J, Khan AS., *The Importance of Establishing a National Health Security Preparedness Index*. *Biosecurity and Bioterrorism : Biodefense Strategy, Practice, and Science*, 2013. **11**(1): p. 7.

83. LW Riley, *Pandemic lineages of extraintestinal pathogenic Escherichia coli*. *Clinical Microbiology and Infection*, 2014. **20**(5): p. 11.
84. Ma HJ, Fu LL, Li JR., *Differentiation of Fecal Escherichia coli from Human, Livestock, and Poultry Sources by rep-PCR DNA Fingerprinting on the Shellfish Culture Area of East China Sea*. *Current Microbiology*, 2011. **62**: p. 8.
85. Madsen JM, Zimmermann NG, Timmons J, Tablante NL., *Avian influenza seroprevalence and biosecurity risk factors in Maryland backyard poultry: a cross-sectional study*. *PLoS One*, 2013. **8**(2).
86. Martin E, Jäckel U, *Characterization of bacterial contaminants in the air of a duck hatchery by cultivation based on molecular methods*. *Journal of Environmental Monitoring*, 2011. **13**: p. 7.
87. Martins da Costa PM, Vaz-Pires PM, Bernardo FM, *Antibiotic Resistance of Enterococcus spp. Isolated from Wastewater and Sludge of Poultry Slaughterhouses*. *Journal of Environmental Science and Health*, 2006. **41**(8): p. 11.
88. McDowell SW, Menzies FD, McBride SH, Oza AN, McKenna JP, Gordon AW, Neill SD, *Campylobacter spp. in conventional broiler flocks in Northern Ireland: epidemiology and risk factors*. *Preventive Veterinary Medicine*, 2008. **84**(3-4): p. 6.
89. Medhanie GA, McEwen SA, Weber L, Sanei B, Cooley L, Houghton S, Slavic D, Guerin MT., *Risk factors associated with the colonization of Ontario layer chicken flocks with Brachyspira species*. *Preventive Veterinary Medicine*, 2013. **109**(3-4): p. 8.
90. Millán Y, Hernández E, Millán B, Araque M., *Distribution of phylogenetic groups and virulence factors in CTX-M-15 β -lactamase-producing uropathogenic Escherichia coli strains isolated from patients in the community of Mérida, Venezuela*. *Revista Argentina de Microbiología*, 2014. **46**(3): p. 7.
91. Mohajeri P, Khademi H, Ebrahimi R, Farahani A, Rezaei M., *Frequency distribution of virulence factors in uropathogenic Escherichia coli isolated from Kermanshah in 2011-2012*. *International Journal of Applied & Basic Medical Research*, 2014. **4**(2): p. 6.
92. Mohapatra BR, Broersma K, Mazumder A, *Comparison of five rep-PCR genomic fingerprinting methods for differentiation of fecal Escherichia coli from humans, poultry and wild birds*. *Federation of European Microbiological Societies*, 2007. **277**(1): p. 9.
93. Mohapatra BR, Broersma K, Mazumder A, *Differentiation of fecal Escherichia coli from poultry and free-living birds by (GTG)₅-PCR genomic fingerprinting*. *International Journal of Medical Microbiology*, 2008. **298**: p. 8.
94. Mohapatra BR, Broersma K, Nordin R, Mazumder A, *Evaluation of repetitive extragenic palindromic-PCR for discrimination of fecal Escherichia coli from humans, and different domestic- and wild-animals*. *Microbiology and Immunology*, 2007. **51**(8): p. 8.
95. Momoh HA, Bello M, Inabo H, Wada Y, Adole EB, Madaiki BD, Aregbe EA., *Prevalence and some risk factors associated with trichinellosis in backyard pig farms in Zaria, Nigeria*. *Tropical Animal Health and Production*, 2013. **45**(5).
96. Negro-Calduch E, Elfadaly S, Tibbo M, Ankers P, Bailey E., *Assessment of biosecurity practices of small-scale broiler producers in central Egypt*. *Preventive Veterinary Medicine*, 2013. **110**(2): p. 10.
97. Ngeleka M, Brereton L, Brown G, Fairbrother JM., *Pathotypes of avian Escherichia coli as related to tsh-, pap-, pil-, and iuc-DNA sequences, and antibiotic sensitivity of isolates from internal tissues and the cloacae of broilers*. *Avian Diseases*, 2002. **46**(1): p. 10.
98. Oganessian AS, Petrova ON, Korennoy FI, Bardina NS, Gogin AE, Dudnikov SA., *African swine fever in the Russian Federation: spatio-temporal analysis and epidemiological overview*. *Virus Research*, 2013. **173**(1): p. 8.

99. Osmani MG, Thornton RN, Dhand NK, Hoque MA, Milon SM, Kalam MA, Hossain M, Yamage M., *Risk Factors for Highly Pathogenic Avian Influenza in Commercial Layer Chicken Farms in Bangladesh During 2011*. *Transboundary and Emerging Diseases*, 2013.
100. Patriarchi A, Fox A, Maunsell B, Fanning S, Bolton D, *Molecular Characterization and Environmental Mapping of Campylobacter Isolates in a Subset of Intensive Poultry Flocks in Ireland*. *Foodborne Pathogens and Disease*, 2011. **Vol. 8**(1): p. 10.
101. Pavlic M, Griffiths MW., *Principles, applications, and limitations of automated ribotyping as a rapid method in food safety*. *Foodborne Pathogens and Disease*, 2009. **6**(9): p. 9.
102. Pletinckx LJ, Verheghe M, Cromb   F, Dewulf J, De Bleecker Y, Rasschaert G, Butaye P, Goddeeris BM, De Man I., *Evidence of possible methicillin-resistant Staphylococcus aureus ST398 spread between pigs and other animals and people residing on the same farm*. *Preventive Veterinary Medicine*, 2013. **109**(3-4): p. 11.
103. Racicot M, Venne D, Durivage A, Vaillancourt JP, *Evaluation of strategies to enhance biosecurity compliance on poultry farms in Québec: Effect of audits and cameras*. *Preventive Veterinary Medicine*, 2012. **103**: p. 11.
104. Racicot M, Venne D, Durivage A, Vaillancourt JP., *Description of 44 biosecurity errors while entering and exiting poultry barns based on video surveillance in Quebec, Canada*. *Preventive Veterinary Medicine*, 2011. **100**(3-4): p. 7.
105. Ramabu SS, Boxall NS, Madie P, Fenwick SG, *Some potential sources for transmission of Campylobacter jejuni to broiler chickens*. *Letters in Applied Microbiology*, 2004. **39**: p. 5.
106. Ridley A, Morris V, Gittins J, Cawthraw S, Harris J, Edge S, Allen V, *Potential sources of Campylobacter infection on chicken farms: contamination and control of broiler-harvesting equipment, vehicles and personnel*. *Journal of Applied Microbiology*, 2011. **110**(no. doi: 10.1111/j.1365-2672.2011.05038.x): p. 12.
107. RL Levings, *Emerging and exotic zoonotic disease preparedness and response in the United States - coordination of the animal health component*. *Zoonoses Public Health*, 2012. **59**(Suppl 2): p. 11.
108. Rodriguez-Siek KE, Giddings CW, Doetkott C, Johnson TJ, Fakhr MK, Nolan LK., *Comparison of Escherichia coli isolates implicated in human urinary tract infection and avian colibacillosis*. *Microbiology*, 2005. **151**(6): p. 14.
109. Rodriguez-Siek KE, Giddings CW, Doetkott C, Johnson TJ, Nolan LK., *Characterizing the APEC pathotype*. *Veterinary Research*, 2005. **36**(2): p. 16.
110. Rwego IB, Gillespie TR, Isabirye-Basuta G, Goldberg TL, *High Rates of Escherichia coli Transmission between Livestock and Humans in Rural Uganda*. *Journal of Clinical Microbiology*, 2008. **Vol. 46**(10): p. 5.
111. Sánchez-Vizcaíno JM, Mur L, Martínez-López B., *African swine fever (ASF): Five years around Europe*. *Veterinary Microbiology*, 2013. **165**(1-2).
112. Sayers RG, Sayers GP, Mee JF, Good M, Bermingham ML, Grant J, Dillon PG., *Implementing biosecurity measures on dairy farms in Ireland*. *Veterinary Journal*, 2012.
113. Schemann K, Lewis FI, Firestone SM, Ward MP, Toribio JA, Taylor MR, Dhand NK., *Untangling the complex inter-relationships between horse managers' perceptions of effectiveness of biosecurity practices using Bayesian graphical modelling*. *Preventive Veterinary Medicine*, 2013. **110**(1): p. 8.
114. Simon-Grif   M, Martín-Valls GE, Vilar-Ares MJ, García-Bocanegra I, Martín M, Mateu E, Casal J., *Biosecurity practices in Spanish pig herds: perceptions of farmers and veterinarians of the most important biosecurity measures*. *Preventive Veterinary Medicine*, 2013. **110**(2).

115. Singer RS, Jeffrey JS, Carpenter TE, Cooke CL, Atwill ER, Johnson WO, Hirsh DC., *Persistence of cellulitis-associated Escherichia coli DNA fingerprints in successive broiler chicken flocks.* Veterinary Microbiology, 2000. **75**(1): p. 13.
116. Skov MN, Spencer AG, Hald B, Petersen L, Nauerby B, Carstensen B, Madsen M., *The role of litter beetles as potential reservoir for Salmonella enterica and thermophilic Campylobacter spp. between broiler flocks.* Avian Diseases, 2004. **48**(1): p. 10.
117. Skyberg JA, Johnson TJ, Johnson JR, Clabots C, Logue CM, Nolan LK., *Acquisition of avian pathogenic Escherichia coli plasmids by a commensal E. coli isolate enhances its abilities to kill chicken embryos, grow in human urine, and colonize the murine kidney.* Infection and Immunity, 2006. **74**(11): p. 6.
118. SM Shane, *The significance of Campylobacter jejuni infection in poultry : a review.* Avian Pathology : Journal of the W.V.P.A., 1992. **21**(2): p. 5.
119. Souillard R, Woudstra C, Le Maréchal C, Dia M, Bayon-Auboyer MH, Chemaly M, Fach P, Le Bouquin S., *Investigation of Clostridium botulinum in commercial poultry farms in France between 2011 and 2013.* Avian Pathology, 2014. **43**(5): p. 9.
120. Steven L, Foley Aaron M. Lynne, Rajesh Nayak, *Molecular typing methodologies for microbial source tracking and epidemiological investigations of Gram-negative bacterial foodborne pathogens.* Infection, Genetics and Evolution, 2009. **9**: p. 11.
121. Swayne DE, Glisson JR, McDougald LR, Nolan LK, Suarez DL, Nair V, *Diseases of Poultry, 13th Edition.* 2013.
122. T Douglas, *Biosecurity and the division of cognitive labour.* Journal of Medical Ethics, 2013. **39**(4): p. 11.
123. Tablante NL, Myint MS, Johnson YJ, Rhodes K, Colby M, Hohenhaus g, *A survey of biosecurity practices as risk factors affecting broiler performance on the Delmarva Peninsula.* Avian Diseases, 2002. **46**(3): p. 5.
124. Tenaillon O, Skurnik D, Picard B, Denamur E, *The population genetics of commensal Escherichia coli.* Nature Reviews, 2010. **8**: p. 11.
125. Toma L, Stott AW, Heffernan C, Ringrose S, Gunn GJ., *Determinants of biosecurity behaviour of British cattle and sheep farmers-a behavioural economics analysis.* Preventive Veterinary Medicine, 2013. **108**(4): p. 3.
126. Tombari W, Paul M, Bettaieb J, Larbi I, Nsiri J, Elbehi I, Gribaa L, Ghram A., *Risk factors and characteristics of low pathogenic avian influenza virus isolated from commercial poultry in Tunisia.* PLoS One, 2013. **8**(1).
127. Unwin S, Chatterton J, Chantrey J., *Management of severe respiratory tract disease caused by human respiratory syncytial virus and Streptococcus pneumoniae in captive chimpanzees (Pan troglodytes).* Journal of Zoo and Wildlife Medicine, 2013. **44**(1): p. 11.
128. van Balen J, Kelley C, Nava-Hoet RC, Bateman S, Hillier A, Dyce J, Wittum TE, Hoet AE., *Presence, Distribution, and Molecular Epidemiology of Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus in a Small Animal Teaching Hospital: A Year-Long Active Surveillance Targeting Dogs and Their Environment.* Vector-Borne and Zoonotic Diseases, 2013. **13**(5): p. 13.
129. van de Giessen A, Mazurier SI, Jacobs-Reitsma W, Jansen W, Berkers P, Ritmeester W, Wernars K., *Study on the epidemiology and control of Campylobacter jejuni in poultry broiler flocks.* Applied and Environmental Microbiology, 1992. **58**(6): p. 5.
130. Veenemans J, Overdeest IT, Snelders E, Willemsen I, Hendriks Y, Adesokan A, Doran G, Brusio S, Rolfe A, Pettersson A, Kluytmans JA., *Next-generation sequencing for typing and detection of resistance genes: performance of a new commercial method during an outbreak of extended-*

- spectrum-beta-lactamase-producing Escherichia coli*. Journal of Clinical Microbiology, 2014. **52**(7): p. 7.
131. Wiles TJ, Kulesus RR, Mulvey MA, *Origins and Virulence Mechanisms of Uropathogenic Escherichia coli*. Experimental and Molecular Pathology, 2008. **85**(1): p. 9.
132. Woo PC, To AP, Lau SK, Yuen KY, *Facilitation of horizontal transfer of antimicrobial resistance by transformation of antibiotic-induced cell-wall-deficient bacteria*. Medical Hypotheses, 2003. **61**(4): p. 6.
133. Yao M, Zhang X, Gao J, Chai T, Miao Z, Ma W, Qin M, Li Q, Li X, Liu J, Zhang H, *The occurrence and transmission characteristics of airborne H9N2 avian influenza virus*. Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift, 2011. **124**(3-4): p. 6.
134. Zentek J, Ferrara F, Pieper R, Tedin L, Meyer W, Vahjen W., *Effects of dietary combinations of organic acids and medium chain fatty acids on the gastrointestinal microbial ecology and bacterial metabolites in the digestive tract of weaning piglets*. Journal of Animal Science, 2013. **91**(7): p. 11.
135. Zhang H, Sun J, Liu X, Hong C, Zhu Y, Liu A, Li S, Guo H, Ren F., *Lactobacillus paracasei subsp. paracasei LCO1 positively modulates intestinal microflora in healthy young adults*. Journal of Microbiology, 2013. **51**(6): p. 6.
136. Zhang ZF, Kim IH., *Effects of probiotic supplementation in different energy and nutrient density diets on performance, egg quality, excreta microflora, excreta noxious gas emission, and serum cholesterol concentrations in laying hens*. Journal of Animal Science, 2013. **91**(10): p. 7.

Annexe A : Questionnaire sur les mesures de biosécurité

PROJET SUR L'EFFICACITÉ DES MESURES DE BIOSÉCURITÉ LORS DE L'ATTRAPAGE CHEZ LE POULET DE CHAIR

*Chaire en recherche avicole, Faculté de médecine vétérinaire, Université de
Montréal*

Questionnaire à l'éleveur

No de plaque : _____

No de quotas : _____

Nom du propriétaire : _____

Adresse : _____

Nom de la compagnie d'attrapage : _____

Nom de l'abattoir: _____

Date et heure du début de l'attrapage: _____ / _____ : _____
jour mois heure minute

Date et heure de la fin de l'attrapage: _____ / _____ : _____
jour mois heure minute

Description du site

1. Nombre de poulaillers sur le site : _____

2. Nombre d'oiseaux par poulaillers : _____

3. Nombre d'oiseaux dans le poulailler étudié : _____
4. Nombre d'oiseaux attrapés : _____
5. Race des oiseaux attrapés : _____
6. Y a-t-il différentes espèces sur le même site ?
 Oui
 Non
7. Si oui, quelles espèces et combien ? : _____

8. Distance avec un autre élevage le plus proche : _____
9. Quel type d'élevage ? (poulailler, porcherie...) : _____
9. Élevage privé ou corporatif :
 Corporatif
 Privé
10. Si le PASAF 1 n'est pas disponible:
- A. Date d'entrée des poussins _____ / _____
jour mois
- B. Date du nettoyage _____ / _____
jour mois
- C. Durée du vide sanitaire : _____
- D. Contrôle des rongeurs. Produit + quantité : _____

E. Contrôle des insectes. Produit + quantité : _____

Mesures de biosécurité

- Survêtement
 - Changement de bottes
 - Lavage / désinfection des bottes
 - Lavage des mains
1. Mesures de biosécurité prises par l'éleveur (ou employé en systématiques charge de l'élevage) durant l'élevage
- Lavage des mains seulement après avoir récupéré les morts
 - Autres (gants, masque, filet à cheveux...) _____
2. L'éleveur (ou employé en charge de l'élevage) est présent lors de l'attrapage
- Oui
 - Non
3. Lavabo avec savon
- Oui
 - Non
4. Mesures de biosécurité prises par les attrapeurs
- Survêtement
 - Changement de bottes
 - Lavage / désinfection des bottes
 - Lavage des mains systématiques

Lavage des mains seulement
après avoir récupéré les morts

Véhicule lavé et désinfecté.

Si oui, à quelle fréquence

Intérieur du véhicule lavé
avant chaque quart de travail

Autres (gants, masque, filet
à cheveux...) _____

Oui, quoi, où et à quel

5. Est-ce qu'un outil / objet quelconque potentiellement moment _____
contaminé est entré dans la ZAR ? Non

Médication

1. Quels antibiotiques sont utilisés en prévention ? À quel moment _____
(départ, croissance, finition) et à quelle dose ? : _____

2. Quel médicament est utilisé en prévention de la coccidiose ? : _____

3. Y a-t-il eu des antibiotiques prescrits durant l'élevage ? Si oui, _____
lesquels, à quelle dose et pourquoi : _____

Documentation à obtenir

- Bons de livraisons de moulé
- PASAF 1
- PASAF 2
- PASAF 3
- Bon de livraison du couvoir
- Feuille d'information du le troupeau (FIT)
- PASAF annuel
- Ordonnances vétérinaires, s'il y a lieu

