

Université de Montréal

**Détection des gènes de résistance aux agents antimicrobiens chez des souches
d'*Escherichia coli* entérotoxigènes et extraintestinales**

par

CHRISTINE MAYNARD

**Département de pathologie et microbiologie
Faculté de médecine vétérinaire**

**Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade
de Maître ès sciences (M. Sc.)
en sciences vétérinaires
option microbiologie**

Avril, 2003

© Christine Maynard, 2003



SF

607

UB4

2003

V.019

Direction des bibliothèques

AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé

**Détection des gènes de résistance aux agents antimicrobiens chez des souches
d'*Escherichia coli* entérotoxigènes et extraintestinales**

présenté par
CHRISTINE MAYNARD

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes

.....
Sylvain Quessy, président-rapporteur

.....
Josée Harel, directrice de recherche

.....
Serge Larivière, codirecteur de recherche

.....
Patrick Boerlin, membre du jury

Résumé

Dans le monde entier, une augmentation préoccupante de la prévalence de la résistance aux agents antimicrobiens chez les bactéries est remarquée. L'utilisation des agents antimicrobiens semble conduire vers une inévitable émergence de souches multirésistantes. *Escherichia coli* est une bactérie qui a la capacité de se multiplier chez différents animaux à sang chaud, y compris l'humain. Elle peut résider dans la flore commensale de son hôte mais peut aussi provoquer des infections intestinales ou extraintestinales. Puisque cette bactérie peut être retrouvée chez plusieurs espèces d'animaux, l'étude de celle-ci peut nous informer des pressions sélectives et du processus d'évolution des bactéries qui existent en général. Nous pouvons donc caractériser la bactérie *E. coli* comme étant une bactérie sentinelle.

Dans notre étude, nous avons voulu, dans un premier temps, vérifier comment la résistance aux agents antimicrobiens codée par des gènes acquis retrouvés chez des souches appartenant à un même groupe évoluait dans une période de temps donnée. Pour ce faire, un total de 118 souches *E. coli* entérotoxigènes (ETEC) appartenant au séro groupe O149: K91, isolées de porcelets atteints d'une diarrhée postsevrage dans la province de Québec, entre 1978 et 2000, et résistantes à au moins un agent antimicrobien, ont été caractérisées pour détecter leur profil phénotypique et génotypique de résistance aux agents antimicrobiens.

Parmi les dix agents antimicrobiens testés, la majorité des souches ETEC était résistante à la tétracycline et aux sulfamides, alors qu'aucune n'était résistante aux céphalosporines. De plus, entre 1978 et 2000, une augmentation du nombre de souches ETEC résistantes au chloramphénicol et de la multirésistance ont été observées. La distribution des gènes de résistance pour les β -lactamines, les aminoglycosides, le chloramphénicol, la tétracycline, la triméthoprime et les sulfamides a été déterminée par hybridation sur colonies et ce, pour toutes les souches ETEC. Des différences significatives dans la distribution des gènes de résistance parmi ces souches, selon leur période d'isolement, ont été observées. En effet, la distribution des gènes de résistance à la tétracycline (*tet(A)*, *tet(B)*, *tet(C)*), à la triméthoprime (*dhfrI*, *dhfrV*, *dhfrXIII*) et aux sulfamides (*sulI*, *sulII*) a varié parmi les souches ETEC dans le temps (1978-2000). Certains des gènes de résistance ciblés dans l'étude montraient certaines associations entre eux. Parmi les souches ETEC, il a été démontré que les gènes *tem* et *shv*, de même que les gènes *tet(A)* et *tet(C)* sont positivement associés entre eux de façon

statistiquement significative. L'association qui peut exister entre les gènes est influencée par la présence d'éléments génétiques mobiles. Ainsi, l'intégron de classe 1, a été détecté dans 63% des souches ETEC. Quatre régions variables de longueurs différentes d'intégron de classe 1 ont été détectées par PCR et ont été caractérisées. Toutefois, la multirésistance observée dans cette étude ne semble pas être complètement associée à cet intégron.

Dans une seconde étude, la distribution des gènes acquis de résistance aux agents antimicrobiens a été analysée chez des souches *E. coli* appartenant au pathotype d'infections extraintestinales (ExPEC), isolées de différents hôtes. Pour atteindre cet objectif, 109 souches *E. coli* d'infections extraintestinales (ExPEC) résistantes à au moins un agent antimicrobien testé, dont 39 souches provenaient de différents tissus d'animaux et de 70 souches isolées d'infections urinaires d'humains, ont été caractérisées pour établir leur profil phénotypique et génotypique de résistance aux agents antimicrobiens.

Parmi les souches ExPEC isolées d'animaux et d'humains, la résistance à l'ampicilline, à la tétracycline et aux sulfamides était fréquente tout comme chez les ETEC. Toutefois, une résistance aux céphalosporines n'a été détectée que chez les souches d'origine animale. Plusieurs souches ExPEC démontraient une résistance à plus de trois agents antimicrobiens. La distribution des gènes de résistance a été déterminée par hybridation sur colonies. Parmi les souches ExPEC animales et humaines, la distribution des gènes de résistance est différente. La répartition des gènes correspondant à une résistance à la tétracycline (*tet(D)*), au chloramphénicol (*catI*, *catIII*, *floR*) et à la triméthoprimine (*dhfrI*, *dhfrV*, *dhfrVII*, *dhfrXIII*) est différente selon l'origine de la souche (animale ou humaine). Parmi les souches ExPEC, les mêmes associations positives retrouvées chez les souches ETEC ont pu être observées sauf pour les gènes *tem* et *shv*. Environ le tiers des souches ExPEC isolées d'animaux (36%) et des souches ExPEC isolées d'humains (31%) possédaient un intégron de classe 1. Quatre régions variables de longueurs différentes, situées sur ces intégrons, ont été amplifiées par PCR parmi les souches ExPEC et ont été caractérisées.

En conclusion, il a été démontré que parmi des souches *E. coli* d'origine porcine entérotoxigènes de sérotype O149 : K91 et des ExPEC provenant d'animaux et d'humains, différents gènes de résistance peuvent être associés à un phénotype donné. En effet, nos études démontrent que parmi les souches *E. coli* isolées à différentes périodes, les

gènes responsables de la résistance aux agents antimicrobiens ne sont pas les mêmes. De plus, les gènes responsables de la résistance chez les ExPEC diffèrent selon la provenance de la souche (animale ou humaine). La mobilité des gènes de résistance aux agents antimicrobiens ainsi que les pressions sélectives exercées sur les bactéries, jouent un rôle dans l'établissement des profils génétiques de la résistance bactérienne. Sans une analyse génotypique de la résistance, la comparaison des profils de résistance entre deux bactéries peut être erronée et amener à des conclusions incomplètes. Ces dernières conclusions confirment l'importance de la caractérisation génotypique de la résistance des souches bactériennes lors d'études épidémiologiques.

Mots clés : *Escherichia coli* entérotoxigène/ infection extraintestinale/ intégron/ hybridation sur colonies/ résistance/ antibiotique.

Summary

Around the world, an increase of the prevalence of antimicrobials resistance in bacteria is observed. The use of antimicrobials in human and animals seems to lead to an inevitable emergence of resistant strains. *Escherichia coli* is a bacterium which has the capacity to multiply in different mammals, including humans. It can reside in the commensal flora of its host but it can also cause intestinal or extraintestinal infections. Since this bacterium can be isolated from different animal species, it can inform us on selective pressures and on the evolution of bacteria, in general. So, we can characterised *E. coli* like a sentinel bacterium.

In a first step, we wanted to evaluate the dynamic of the acquired resistance genes over time. To do that, a total of 118 enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) O149: K91 strains isolated from pigs with postweaning diarrhoea collected in the province of Quebec between 1978 and 2000, and presenting at least one antimicrobial resistance, were characterised for their phenotypic and genotypic antimicrobial resistance profile to ten antimicrobials.

The majority of the ETEC strains were resistant to tetracycline and to sulfonamides, whereas resistance to cephalosporins was not detected. Also, an increase in multiresistant strains frequently was observed over time, particularly during the most recent period, 1995-2000. The distribution of the resistance genes for β -lactams, aminoglycosides, chloramphenicol, tetracycline, trimethoprim and sulfonamides was assessed by colony hybridisation on all isolates. Significant differences in the distribution of tetracycline (*tetA*, *tetB*, *tetC*), trimethoprim (*dhfrI*, *dhfrV*, *dhfrXIII*) and sulfonamides (*sullI*, *sullII*) resistance genes were observed among the ETEC strains according the their isolation period (1978 to 2000). Some target resistance genes in this study showed associations between them. Among the ETEC strains, a positive association of *tem* with *shv* as well as *tet(A)* with *tet(C)* was found. The existence of associations between two genes could be influenced by the presence of mobile genetic determinants in the strains. One of these determinants, class 1 integron, was detected in 63% of the ETEC strains. Four variable regions with different lengths, situated on these class1 integrons, were amplified with PCR and were characterized.

In a second step, the distribution of antimicrobial resistance acquired genes among *E. coli* strains belonging to the extraintestinal pathogenic *E. coli* (ExPEC) serogroup, isolated from

different hosts was evaluated. To reach this objective, 109 ExPEC strains resistant to at least one antimicrobial tested, composed of 39 strains isolated from different infected animal tissues and 70 strains isolated from human urine isolates, were characterised for their phenotypic and genotypic antimicrobial resistance profile to ten antimicrobials.

Among the animal and human ExPEC strains, the resistance to ampicillin, to tetracycline and to sulfonamides were the most frequent resistance. However, resistance to cephalosporins was detected only among the ExPEC strains of animal origin. Antimicrobial multiresistance was common among our ExPEC strains. The distribution of the resistance genes was assessed by colony hybridisation on all isolates. Different genotypic profiles of the resistance genes were established. In fact, the distribution of the genes corresponding to a resistance to tetracycline (*tet(D)*), to chloramphenicol (*catI*, *catIII*, *floR*) and to trimethoprim (*dhfrI*, *dhfrV*, *dhfrVII*, *dhfrXIII*) was different between the animal and human isolates. In the ExPEC strains, the same positive associations as with ETEC between genes were observed except for the association of *tem* with *shv*. Thirty six percent of the animal ExPEC and 31% of the human ExPEC strains had a class 1 integron. Four variable regions with different lengths, situated on these class1 integrons, were amplified by PCR and were characterised.

In conclusion, this study shows that among ETEC O149: K91 porcine strains and ExPEC strains isolated from animals and humans, the resistance genes are not static. Actually, our studies demonstrated that among *E. coli* strains isolated from different time periods, the genes responsible of the antimicrobial resistance were not the same and changed. Also, according to the isolation origin (animal or human), the genes responsible of the antimicrobial resistance in ExPEC changed. These results reinforce the necessity to use genotypic resistance analysis in future bacterial epidemiology studies.

Keywords : Enterotoxigenic *Escherichia coli*/ extraintestinal infections/ integron/ colony hybridisation/ antimicrobial resistance/ antibiotic.

Table des matières

Identification du jury	ii
Résumé	iii
Summary	vi
Table des matières	viii
Liste des tableaux	xiii
Liste des figures	xv
Liste des sigles et abréviations	xvi
Remerciements	xx
<i>SECTION I – Introduction</i>	1
Problématique	2
Recension de la littérature.....	4
1.0 L'utilisation des agents antimicrobiens et le phénomène de résistance bactérienn....	4
2.0 Transfert horizontal de la résistance, devons-nous craindre l'animal ?.....	10
3.0 La bactérie <i>Escherichia coli</i>	14
4.0 L'intégron.....	17
5.0 La génétique de la résistance	20
6.0 Les agents antimicrobiens	24
6.1 Les β -lactamines	24
6.2 Les aminoglycosides	27
6.3 Les tétracyclines	31
6.4 Les pénicols	33
6.5 La triméthoprime	35
6.6 Les sulfamides	38
7.0 Contrôle de la résistance antimicrobienne	41

SECTION II – Méthodologie et Résultats	42
Article I : Characterization and detection of antimicrobial resistance genes in enterotoxigenic <i>Escherichia coli</i> O149: K91 isolated from pigs over a 23-year period	43
Characterization and detection of antimicrobial resistance genes in enterotoxigenic <i>Escherichia coli</i> O149: K91 isolated from pigs over a 23-year period	44
Abstract	45
Introduction	46
Materials and methods	48
<i>Bacterial strains and growth conditions</i>	48
<i>Antimicrobial susceptibility testing</i>	48
<i>PCR primers and amplification</i>	49
<i>DNA sequencing</i>	49
<i>Colony hybridization</i>	50
<i>Statistical methods</i>	50
Results	51
<i>Antimicrobial resistance phenotype characteristics</i>	51
<i>Distribution of resistance genes in O149: K91 ETEC isolates</i>	51
(i) Beta-lactams	51
(ii) Aminoglycosides	52
(iii) Tetracycline	52
(iv) Phenicols	52
(v) Trimethoprim	52
(vi) Sulfonamides	53
<i>Identification of integrons</i>	53
<i>Association between resistance genes</i>	54
Discussion	55
Acknowledgments	59
References	60

Tables	64
Article II : Genetic analysis of antimicrobial resistance among extraintestinal <i>Escherichia coli</i> isolates of animal and human origin	72
Genetic analysis of antimicrobial resistance among extraintestinal <i>Escherichia coli</i> isolates of animal and human origin	73
Synopsis.....	74
Introduction	75
Materials and methods	77
<i>Bacterial strains and growth conditions</i>	77
<i>Antimicrobial susceptibility testing</i>	77
<i>PCR primers and amplification</i>	77
<i>DNA sequencing</i>	78
<i>Colony hybridization</i>	78
<i>Statistical methods</i>	78
Results	80
<i>Antimicrobial resistance phenotype characteristics</i>	80
<i>Distribution of resistance genes</i>	80
(i) Beta-lactams	80
(ii) Aminoglycosides	81
(iii) Tetracycline	81
(iv) Phenicols	81
(v) Trimethoprim	82
(vi) Sulfonamides	82
<i>Identification and characterisation of integrons</i>	82
<i>Distribution of virulence genes</i>	83
<i>Association between resistance and virulence genes</i>	83
<i>Phylogenetic grouping results</i>	83

Discussion	85
Acknowledgments	90
References	91
Tables	98
SECTION III – Discussion	106
Discussion	107
Étude sur les isolats <i>Escherichia coli</i> entérotoxigènes	107
1.0 Profil génotypique de la résistance	108
1.0.1 Sélection de la résistance	108
1.0.2 Émergence de la multirésistance	110
1.1 Profil génotypique de la résistance	111
1.1.1 Diversité des gènes	111
1.1.2 Mobilité des gènes de résistance	114
1.2 Association des gènes de résistance et co-sélection	116
1.3 Changements factoriels et diversité des profils	117
1.4 Expériences et analyses à venir	119
Étude sur les souches <i>Escherichia coli</i> pathogènes extraintestinales d’origine animale et humaine	120
2.0 Profil génotypique de la résistance	120
2.0.1 Vision d’ensemble	120
2.0.2 Homogénéité dans les profils de multirésistance	121
2.1 Profil génotypique de résistance	122
2.1.1 Diversité des gènes	122
2.1.2 Mobilité des gènes	123
2.2 Association et co-sélection des gènes de résistance	124
2.3 Virulence et phylogénie des souches	124

2.3.1 Profil de virulence	125
2.3.2 Association virulence et résistance	126
Conclusion	127
SECTION IV – Bibliographie	129
SECTION V – Annexes	xxi
Annexe 1 : Évolution de la multirésistance chez les souches <i>Escherichia coli</i> entérotoxigènes	xxii
Annexe 2 : Analyse statistique du chi-carré entre différents gènes de résistance et l'intégron de classe 1 retrouvés parmi les souches ETEC isolées entre 1978 et 1989 .	xxiii
Annexe 3 : Analyse statistique du chi-carré entre différents gènes de résistance et l'intégron de classe 1 retrouvés parmi les souches ETEC isolées entre 1990 et 2000 ...	xxiv
Annexe 4 : Distribution du phénotype de résistance aux agents antimicrobiens selon l'âge des porcs	xxv
Annexe 5 : Distribution de l'âge des porcs selon l'année d'isolement de la souche	xxvi

Liste des tableaux

SECTION I – Introduction	1
Recension de la littérature.....	4
<i>Tableau I : Agents antimicrobiens employés au Canada en médecine vétérinaire et chez les humains selon le type d'utilisation</i>	<i>13</i>
<i>Tableau II : Mécanismes d'action des déterminants génétiques de résistance</i>	<i>22</i>
SECTION II – Méthodologie et Résultats	42
Article I : Characterization and detection of antimicrobial resistance genes in enterotoxigenic <i>Escherichia coli</i> O149: K91 isolated from pigs over a 23-year period	43
<i>Table 1 : PCR primers used for antimicrobial resistance gene and class 1 integron amplifications.....</i>	<i>64</i>
<i>Table 2 : Trends in resistance of ETEC O149 : K91 isolates with time as determined by the disc diffusion method</i>	<i>66</i>
<i>Table 3 : Distribution of antimicrobial resistance genes detected in ETEC O149 : K91 isolates according to the isolation periods</i>	<i>67</i>
<i>Table 4 : Distribution of class 1 integron among the ETEC O149 : K91 isolates</i>	<i>70</i>
<i>Table 5 : Association between the various antimicrobial resistance genes and class 1 integron among ETEC O149 : K91 isolates</i>	<i>71</i>
Article II : Genetic analysis of antimicrobial resistance among extraintestinal <i>Escherichia coli</i> isolates of animal and human origin	72
<i>Table I : PCR primers used for antimicrobial resistance gene amplifications</i>	<i>98</i>
<i>Table II : Number of resistant animal and human isolates determined by disc diffusion method</i>	<i>100</i>

Table III : Animal and human isolates which gave a positive hybridisation with the resistance and virulence tested probes and had the associated resistance phenotype 101

Table IV : Distribution of class 1 integron among the animal and human E. coli strains 103

Table V : Association between antimicrobial resistance genes, class 1 integron and virulence genes among the ExPEC strains isolated from animals 104

Table VI : Association between antimicrobial resistance genes, class 1 integron and virulence genes among the ExPEC strains isolated from humans 105

SECTION V – Annexes xxi

Tableau III : Association des gènes de résistance et e l'intégron de classe 1 parmi les souches ETEC isolées entre 1978 et 1989 xxiii

Tableau IV : Association des gènes de résistance et e l'intégron de classe 1 parmi les souches ETEC isolées entre 1990 et 2000 xxiv

Liste des figures

SECTION I – Introduction	1
Recension de la littérature.....	4
<i>Figure 1 : Structure générale de l'intégron de classe 1</i>	<i>19</i>
SECTION V – Annexes	xxi
<i>Figure 2 : Évolution ascendante de la multirésistance chez les souches ETEC isolées de porcs atteints d'une diarrhée postsevrage entre les années 1978 et 2000</i>	<i>xxii</i>
<i>Figure 3 : Pourcentage de souches ETEC selon le nombre de résistances aux agents antimicrobiens testés en fonction de l'âge des porcs d'où proviennent les souches</i>	<i>xxv</i>
<i>Figure 4 : Pourcentage de souches ETEC selon l'âge des porcs d'où proviennent les souches en fonction de la période d'isolement de celles-ci</i>	<i>xxvi</i>

Liste des sigles et abréviations

AAC	Acétyltransférase
ADN (DNA)	Acide désoxyribonucléique (desoxyribonucleic acid)
ACIA	Agence canadienne d'inspection des aliments
afa	afimbrial adhesin
AMP	Ampicilline
AMK	Amoxicilline
AMX	Amoxicilline-acide clavulanique
ANT	Adénylyltransférase
APH	Phosphotransférase
APR	Apramycine
ARN	Acide ribonucléique
ATM	Aztreonam
CAR	Carbenicilline
CAT	Chloramphénicol acétyltransférase
CE	Communauté européenne
CHL	Chloramphénicol
CMI	Concentration minimale inhibitrice
CRO	Ceftriaxone
CS	Conserved sequences
CTX	Cefotaxime
DHFR	Dihydrofolate réductase
DHPS	Dihydroptérate synthase
DPT	Direction des productions thérapeutiques
DMV	Direction des médicaments vétérinaires
dNTP	deoxyribonucleoside triphosphate
<i>E. aerogenes</i>	<i>Enterobacter aerogenes</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EHEC	Enterohemorrhagic <i>Escherichia coli</i>
EIs	Extraintestinal infections
EPEC	Enteropathogenic <i>Escherichia coli</i>

ESBL	Extended-spectrum β -lactamase
ETEC	Enterotoxigenic <i>Escherichia coli</i>
ExPEC	Extraintestinal pathogenic <i>E. coli</i>
ERV	Entérocoques résistants à la vancomycine
FDA	Food and drug administration
FFL	Florfénicol
FPPQ	Fédération des producteurs de porcs du Québec
GCG	Genetics computer group
GEN	Gentamicine
GREMIP	Groupe de recherche sur les maladies du porc
IS	Insertion sequences
KAN	Kanamycine
<i>K. oxytoca</i>	<i>Klebsiella oxytoca</i>
LB	Luria Bertani
LCR	Ligase chain reaction
MH	Mueller-Hinton
MIN	Minocycline
NCCLS	National committee for clinical laboratory standards
NEO	Néomycine
NSERC	Natural sciences and engineering research council of Canada
ORF	Open reading frame
PABA	para-aminobenzoic acid
pap	pyelonephritis-associated pili
PBP	Penicillin binding protein
PCR	Polymerase chain reaction
PIP	Piperacilline
RAPD	Random amplification of polymorphic DNA
RNSM	Recueil des notices sur les substances médicamenteuses du Canada
RV (VR)	Région variable (variable region)
TET	Tétracycline
TIC	Ticarcilline

TIM	Ticarcilline-acide clavulanique
TMP	Triméthoprim
TOB	Tobramycine
<i>S. enterica</i>	<i>Salmonella enterica</i>
sfa	S fimbrial adhesin
<i>S. rimosus</i>	<i>Streptomyces rimosus</i>
SRRP	Syndrome reproductif et respiratoire porcin
STEC	Shiga toxin-producing <i>E. coli</i>
SUL	Sulfamides
UTI	Urinary tract infection
TSB	Tryptic soy broth
TSA	Tryptic soy agar

Unités de mesure

C	celcius
g	gramme
kb	Kilobase
kg	Kilogramme
min	minute
ml	millilitre
mM	millimolaire
pb (bp)	Paire de bases (base pairs)
pmol	picomole
sec	seconde
µg	microgramme
µl	microlitre
µM	micromolaire
U	unité
v / v	volume / volume
w / v	weight / volume

Symboles β

bêta

 λ

lambda

°

degrés

 \pm

plus ou moins

 \geq

plus grand ou égal à...

 \leq

plus petit ou égal à...

Remerciements

Je tiens à remercier sincèrement tous ceux et celles qui ont rendu ce projet de maîtrise réalisable, et plus particulièrement :

Serge Larivière, d'avoir cru en ce projet dès le départ et su me montrer l'ampleur de celui-ci ;

Josée Harel, pour sa grande générosité, pour ses connaissances et surtout d'avoir su pousser mes limites ;

Sadjia Bekal, pour sa patience, son tact et de m'avoir appris la détermination ;

Madeleine Fortin, pour son dévouement et sa gentillesse ;

les membres du GREMIP, chercheurs, collègues et ami(e)s, pour le partage de vos idées, de vos connaissances et pour tous les bons moments passés ensemble ;

mes amies qui ne m'auront pas tellement vu pendant ces dernières années et qui continuent à m'offrir leur amitié ;

Julie Parenteau, pour avoir posé son regard sur mes mots parfois défectueux ;

Michel et Francine, pour leur amour, leur patience et de m'avoir endurer pendant ces deux années (et plus !) ;

Dominik, pour sa compréhension et son soutien ;

la Fédération des producteurs de porcs du Québec (FPPQ), pour avoir cru bon d'investir dans ce projet ;

et finalement, je remercie le CRSNG et le réseau canadien de recherche sur les bactéries pathogènes du porc pour le financement de ce projet de maîtrise.

SECTION I - Introduction

Problématique

Escherichia coli (*E. coli*) est une cause importante d'infections chez l'animal et chez l'humain dans le monde entier (Bopp, C. A. *et al.* 2003). Cette bactérie peut être divisée en trois groupes : souches commensales, souches pathogènes intestinales et souches causant des pathologies extraintestinales. Les deux derniers groupes sont ceux qui retiennent plus particulièrement l'attention à cause de leur pouvoir pathogène. Les souches pathogènes intestinales peuvent être à leur tour divisées en plusieurs groupes dont quatre majeurs : *E. coli* entérotoxigène (ETEC), entéropathogénique (EPEC), entéroinvasive (EIEC), entéroaggrégative (EAaggEC).

Les souches ETEC sont des agents pathogènes importants du porc causant des diarrhées chez les nouveau-nés et chez les porcelets en postsevrage. Les ETEC de sérogroupe O149 : K91 sont isolées de plus en plus fréquemment. D'ailleurs, les souches ETEC appartenant à ce sérogroupe sont isolées dans le monde entier et représente le sérogroupe prédominant associé aux diarrhées chez le porc (Wray, C. *et al.* 1993; Garabal, J. I. *et al.* 1996; Wada, Y. *et al.* 1996; Nagy, B. *et al.* 1990; Wieler, L. H. *et al.* 2001; Amezcua, R. *et al.* 2002). Avec l'augmentation mondiale de la résistance aux agents antimicrobiens chez *E. coli*, le traitement des diarrhées en postsevrage devient très difficile. Les souches ETEC développent des résistances aux agents antimicrobiens qui sont employés présentement, peu importe le mode d'action ou la voie d'administration de ceux-ci (Amezcua, R. *et al.* 2002; Bischoff, K. M. *et al.* 2002).

Par ailleurs, il existe des souches *E. coli* causant des infections extraintestinales appelées ExPEC. Les ExPEC peuvent causer des infections à plusieurs sites anatomiques différents chez l'animal, mais aussi chez l'humain (Russo, T. A. and Johnson, J. R. 2000). L'usage des agents antimicrobiens dans le traitement d'infections extraintestinales causées par *E. coli* est un outil important dans la guérison de celles-ci. Cependant, la résistance aux agents antimicrobiens est répandue et touche gravement la médecine vétérinaire et celle des humains (Aubry-Damon, H. and Courvalin, P. 1999; Monroe, S. and Polk, R. 2000; Teshager, T. *et al.* 2000). Une association existe entre l'utilisation d'agents antimicrobiens et le développement

de souches résistantes (Schwarz, S. and Chaslus-Dancla, E. 2001; Aarestrup, F. M. and Wegener, H. C. 1999; Guillemot, D. 1999). La plupart des classes d'agents antimicrobiens utilisées en médecine pour les humains sont aussi employées en médecine vétérinaire. Chez les animaux, les agents antimicrobiens sont non seulement utilisés pour contrôler les infections, mais aussi pour stimuler leur croissance (Santé Canada, 2002). Conséquemment, nous nous inquiétons du fait que l'utilisation des agents antimicrobiens chez les animaux puisse contribuer directement ou indirectement à l'émergence de bactéries pathogènes résistantes aux agents antimicrobiens chez les humains. Ceci est toutefois difficile à démontrer. Afin d'étayer ce lien, les études de caractérisation de la résistance génotypique des souches pourraient être utiles. Toutefois, la majorité des études portant sur la résistance aux agents antimicrobiens se concentrent plutôt sur l'augmentation de la résistance phénotypique et très peu portent sur la caractérisation de cette résistance.

Le premier objectif de notre étude consiste à vérifier si la résistance aux agents antimicrobiens des souches appartenant à un même groupe évolue dans le temps. Pour ce faire, nous avons identifié certains des gènes de résistance aux agents antimicrobiens causant la résistance phénotypique retrouvée chez des souches ETEC isolées de porcelets atteints d'une diarrhée en postsevrage. Ces souches de sérotype O149 : K91 ont été isolées à des périodes différentes, entre 1978 et 2000.

Le deuxième objectif de notre étude consiste à vérifier si les profils de résistance aux agents antimicrobiens des souches appartenant à un même groupe, mais isolées d'hôtes différents, sont différents. Afin d'atteindre cet objectif, nous avons déterminé la présence de certains gènes de résistance aux agents antimicrobiens chez des souches ExPEC isolées d'infections extraintestinales d'animaux et d'humains.

Recension de la littérature

1.0 L'utilisation des agents antimicrobiens et le phénomène de résistance bactérienne

Les antibiotiques sont décrits comme des substances produites par des organismes vivants qui sont, à faibles concentrations, capables d'inhiber la croissance d'autres organismes. Toutefois, on a souvent tendance à inclure dans cette définition des substances synthétiques utilisées comme médicaments anti-infectieux comme, par exemple, les sulfamides. Dans ce cas, il est préférable d'utiliser un terme plus général, celui d'agents antimicrobiens. Les agents antimicrobiens sont surtout employés pour combattre les infections chez l'humain, les animaux et plantes, mais sont également utilisés pour préserver certains composés biologiques ainsi que pour favoriser la croissance de certains animaux.

Dans le monde entier, on remarque qu'il y a une augmentation de la prévalence de la résistance bactérienne aux agents antimicrobiens. Il est généralement accepté que le facteur majeur de l'augmentation de la résistance est dû à l'augmentation de l'utilisation des agents antimicrobiens (Aarestrup, F. M. and Wegener, H. C. 1999; Health Canada 2002; Alekshun, M. N. and Levy, S. B. 2000). L'utilisation des agents antimicrobiens semble conduire vers une émergence de gènes de résistance et de souches résistantes à cause de leur sélection. Cette situation est applicable à l'usage vétérinaire et humain des agents antimicrobiens.

Environ la moitié des agents antimicrobiens fabriqués aux États-Unis seraient distribués aux animaux (van den Bogaard, A. E. and Stobberingh, E. E. 2000). Les agents antimicrobiens employés en indication vétérinaire ne sont pas seulement utilisés en traitement ou en prévention d'infections bactériennes, ils sont aussi administrés dans les aliments donnés à l'animal afin de promouvoir leur croissance et d'augmenter la conversion alimentaire (van den Bogaard, A. E. and Stobberingh, E. E. 2000).

Plusieurs études rétrospectives et prospectives ont étudié l'émergence de la résistance bactérienne chez l'animal à la suite de l'utilisation d'agents antimicrobiens. Plusieurs de ces études montrent qu'après l'introduction d'un agent antimicrobien dans la pratique vétérinaire,

la résistance des bactéries pathogènes comme des bactéries de la flore intestinale, augmente. Toutefois, peu d'études se concentrent sur la résistance aux agents antimicrobiens qui sont utilisés comme facteur de croissance chez les animaux. En ce qui concerne la bactérie *Escherichia coli*, une augmentation significative de souches résistantes au carbadox, un agent antimicrobien approuvé au Canada en 1970, a été notée après que cet agent ait été employé comme facteur de croissance dans l'élevage du porc (Ohmae, K. *et al.* 1981). Toutes les souches *E. coli* résistantes au carbadox possédaient le même plasmide transférable causant la résistance à cet agent. Le carbadox n'a pas été utilisé dans l'élevage des poulets et aucune résistance à celui-ci n'a été détectée chez les souches *E. coli* isolées des poulets de la même région. Ohmae *et al.* ont noté une augmentation du pourcentage de souches *E. coli* résistantes au carbadox de 37 à 61% après l'introduction de celui-ci. Cependant, le carbadox n'est pas seulement employé comme facteur de croissance chez les porcs, mais aussi en prévention à la dysenterie porcine et, à plus fortes doses, pour le traitement des salmonelloses.

L'intérêt des agents antimicrobiens utilisés comme facteurs de croissance chez les animaux a augmenté après l'émergence d'entérocoques résistants à la vancomycine (ERV) chez l'humain. En Europe, l'avoparcin, un agent antimicrobien apparenté à la vancomycine, a été rapidement pointé du doigt comme étant la cause de cette résistance. Dans les pays où cet agent antimicrobien a servi de facteur de croissance, les ERV n'ont pas été seulement isolés d'animaux ayant reçu cet agent, mais aussi chez des animaux et des humains en bonne santé et n'ayant jamais reçu de l'avoparcin (Bates, J. *et al.* 1994).

La Suède interdit l'usage des facteurs de croissance dans la nourriture des animaux depuis 1986. La prévalence de la résistance aux agents antimicrobiens utilisés comme facteurs de croissance en 1997, était beaucoup plus faible chez les porcs de Suède comparativement aux porcs de la Suisse (van den Bogaard, A. E. and Stobberingh, E. E. 2000). De plus, en Suède tout comme aux États-Unis, où l'avoparcin n'a jamais été employé, un faible taux de ERV résistants à cet agent antimicrobien, dans les isolats fécaux d'animaux sains et d'humains à l'extérieur des hôpitaux, a été détecté (Coque, T. M. *et al.* 1996).

Par contre, les restrictions quant à l'utilisation des agents antimicrobiens comme facteur de croissance chez les animaux destinés à la consommation humaine, ne semblent pas permettre de contrôler entièrement la résistance microbienne. En fait, il semblerait que la résistance à certains agents antimicrobiens persiste après l'arrêt de l'usage vétérinaire de ces agents. Certains pays européens ont interdit, vers 1995, l'utilisation de la vancomycine (avoparcin), l'avilamycine, l'érythromycine et la virginiamycine comme facteur de croissance chez les animaux (Aarestrup, F. M. *et al.* 2001). Cinq années après leur interdiction, une baisse significative de la résistance à ceux-ci chez les entérocoques isolés des porcs, sauf dans le cas de la résistance à la vancomycine, a été observé (Aarestrup, F. M. *et al.* 2001; Boerlin, P. *et al.* 2001). La persistance de la résistance à la vancomycine (avoparcin) chez *Enterococcus faecium* pourrait être due à l'utilisation par ces pays de la tylosine, un macrolide, jusqu'en 1999. Le mécanisme de résistance offrant une résistance à la vancomycine, a peut-être été favorisé par l'utilisation de la tylosine. Par contre, maintenant que tous les agents antimicrobiens employés comme facteurs de croissance ont été bannis par plusieurs pays de l'Europe, il ne semble pas que la fréquence de souches d'ERV ait diminué (Heuer, O. E. *et al.* 2002).

Nous savons que le développement de la résistance aux agents antimicrobiens est affecté par trois facteurs : (1) le volume d'agents utilisés, (2) le taux de formation de mutants résistants et (3) le coût biologique de la résistance et ses compensations génétiques (Bjorkman, J. and Andersson, D. I. 2000). Le fait que l'arrêt de l'utilisation des agents antimicrobiens n'amène pas automatiquement une régression de la résistance à ceux-ci, peut être l'effet d'une compensation due à des mutations au niveau soit du chromosome bactérien ou du plasmide qui transporte la résistance (Bjorkman, J. and Andersson, D. I. 2000). Ces mutations permettent aux bactéries de contourner les coûts biologiques que la résistance peut infliger. Par exemple, il a été démontré que certains mutants de *Salmonella typhimurium*, qui étaient résistants à la streptomycine, étaient moins virulents que la souche sauvage non résistante (Maisnier-Patin, S. *et al.* 2002). Alors, dans des conditions non sélectives (sans streptomycine), le mutant résistant était défavorisé comparativement à la souche sauvage. Toutefois, certains de ces mutants avaient retrouvé leur virulence tout en conservant la résistance à la streptomycine. Ces mutants possédaient une substitution compensatoire d'un

acide aminé dans un de leurs gènes chromosomiques *rps*. Ceci démontre que la résistance à un agent antimicrobien créée par une mutation chromosomique peut être coûteuse à la bactérie qui la possède, mais que celle-ci peut compenser ces effets néfastes par une autre mutation.

Nous remarquons ce phénomène aussi parmi les bactéries qui sont résistantes aux agents antimicrobiens par l'acquisition d'un plasmide. En effet, certains plasmides amènent des inconvénients à la bactérie qui le possède. C'est le cas du plasmide pBR322 qui porte le gène *tet(C)* et qui transmet la résistance à la tétracycline. L'expression du plasmide réduit l'activité de l'enzyme ATPase de la bactérie, ce qui ralentit considérablement la vitesse de croissance de la bactérie (Valenzuela, M. S. *et al.* 1996). En absence de tétracycline, la bactérie peut se débarrasser du plasmide ou, alternativement, le conserver et créer une mutation compensatoire afin de n'être pas désavantagée par le port du plasmide.

Certaines bactéries ou mutants ont la capacité de créer un taux élevé de mutations et sont donc plus sujettes à posséder des mutations compensatoires aux inconvénients associés à la résistance aux agents antimicrobiens. Seul un faible pourcentage des bactéries *E. coli* et *S. enterica* possèdent cette caractéristique. Cependant, un tiers des bactéries *Pseudomonas aeruginosa* possède un phénotype « mutateur » (Bjorkman, J. and Andersson, D. I. 2000).

L'approbation de tous les agents antimicrobiens, incluant les facteurs de croissance, est réglementée afin de réduire leur utilisation. Santé Canada réglemente présentement la vente des médicaments au Canada grâce à la *Loi sur les aliments et drogues* et de son Règlement ainsi que de la *Loi réglementant certaines drogues et autres substances*. Pour ce qui est des médicaments pour usage humain, c'est la Direction des produits thérapeutiques (DPT) qui administre principalement ces lois. La Direction des médicaments vétérinaires (DMV), anciennement le Bureau des médicaments vétérinaires, administre ces lois pour les médicaments à usage vétérinaire, dont les agents antimicrobiens pour les animaux destinés à l'alimentation. La DMV est responsable des questions de sécurité pour l'alimentation humaine concernant les médicaments à usage vétérinaire. Actuellement, il n'existe pas à la DMV de méthodes et de critères particuliers pour évaluer la sécurité pour la santé humaine

des médicaments à usage vétérinaire, en ce qui a trait à la résistance aux agents antimicrobiens (Santé Canada. http://www.hc-sc.gc.ca/vetdrugs-medsvet/amr/pdf/f_chapter4.pdf). Cela s'applique aussi à la sécurité pour les animaux.

Les médicaments à usage vétérinaire sont classés en groupes, d'après une approche basée sur la gestion du risque:

1. Les médicaments contrôlés sont utilisés pour une thérapie donnée sous le strict contrôle d'un vétérinaire. Ce groupe de médicaments comprend des produits comme les stimulants, les anesthésiques et les sédatifs;
2. Les médicaments à usage vétérinaire non inscrits sont ceux qui sont vendus sans ordonnance, comme l'aspirine;
3. Les médicaments destinés à l'utilisation vétérinaire qui demandent l'ordonnance d'un pharmacien, d'un praticien (c'est-à-dire, un vétérinaire) ou d'un fabricant titulaire d'une licence;
4. Les médicaments inscrits qui peuvent se vendre sans ordonnance et sont étiquetés ainsi.
5. Les aliments médicamenteux : le Recueil des notices sur les substances médicatrices du Canada (RNSM) donne la liste des ingrédients médicamenteux (y compris les agents antimicrobiens) approuvés par Santé Canada pour une utilisation dans les aliments.

De plus, tous les produits médicamenteux n'ayant que des allégations thérapeutiques ne peuvent servir de stimulateur de croissance, même avec une ordonnance vétérinaire. Les médicaments, y compris les stimulateurs de croissance, sont approuvés pour une utilisation dans les aliments et inclus dans le RNSM sur la base d'allégations faites par les fabricants du médicament. Une allégation représente une utilisation spécifique, un taux d'utilisation et une formulation du produit pour une substance médicatrice particulière.

Au Canada, les provinces possèdent leur propre organisme de contrôle, ainsi que le droit de réglementer plus strictement la vente de médicaments, y compris les agents antimicrobiens, une fois ceux-ci approuvés au niveau fédéral. Certaines provinces ont promulgué leur propre

législation. Au Québec, les médicaments à usage vétérinaire sont réglementés par la *Loi sur la pharmacie*, la *Loi sur les médecins vétérinaires* et la *Loi sur la protection sanitaire, la sécurité et le bien-être des animaux*. Cette province limite la vente de médicaments à usage vétérinaire aux pharmaciens et aux médecins vétérinaires. La réglementation concernant les modalités et les conditions de la vente de médicaments contient cinq annexes. Les trois premières fournissent la liste des médicaments pour les humains et les deux autres, la liste des médicaments pour les animaux. Il existe des permis pouvant être émis aux personnes qui fabriquent, distribuent et vendent des pré mélanges ou des aliments médicamenteux. Un détenteur de ce permis doit obtenir et détenir une ordonnance vétérinaire pour vendre les aliments médicamenteux. Un producteur peut préparer des aliments médicamenteux pour ses propres animaux sans détenir un permis, en autant qu'il ne prépare pas plus d'un kilogramme ou d'un litre d'aliment médicamenteux.

2.0 Transfert horizontal de la résistance, devons-nous craindre l'animal ?

Présentement, on remarque que l'utilisation thérapeutique et sub-thérapeutique des agents antimicrobiens chez l'animal suscitent l'intérêt public et scientifique. Ceci provient probablement de l'accroissement de la multirésistance chez les bactéries pathogènes à caractère zoonotique (Bolton, L. F. *et al.* 1999). L'utilisation d'agents antimicrobiens amène une sélection de la résistance chez les souches pathogènes et celles de la flore endogène chez l'animal et l'humain. Les bactéries résistantes isolées chez l'animal peuvent rejoindre la population humaine par contact direct, mais aussi par la voie des aliments d'origine animale. Ces bactéries peuvent coloniser l'humain ou transférer leurs gènes de résistance à d'autres bactéries de la flore endogène de l'humain (van den Bogaard, A. E. and Stobberingh, E. E. 2000).

Des bactéries colonisant l'intestin et appartenant à l'espèce *E. coli*, nonpathogènes et résistantes aux agents antimicrobiens, représentent probablement un important réservoir de gènes de résistance (Osterblad, M. *et al.* 2000). D'une part, les souches *E. coli* résistantes et d'origine animale peuvent coloniser l'intestin de l'humain, et ce, pour au moins un certain temps (Marshall, B. *et al.* 1990). D'autre part, l'habileté des bactéries à transférer de nouveaux gènes de résistance entre elles par la conjugaison, par exemple, contribue significativement à l'émergence de souches résistantes

Il a été démontré que les traitements aux agents antimicrobiens ciblés à un individu peuvent influencer la flore endogène d'un autre individu côtoyant celui-ci ou étant relativement près physiquement de celui-ci. Une étude réalisée par Oppegaard *et al* (Oppegaard, H. *et al.* 2001) en Norvège a montré que des souches *E. coli* isolées de vaches et d'humains ayant côtoyé ces vaches montraient des profils de résistance semblables. Cependant, après le sérotypage de ces souches, les auteurs en sont venus à la conclusion que la résistance avait été disséminée par des événements de transferts horizontaux des gènes de résistance plutôt que par des transferts d'isolats résistants.

Il est difficile de prouver le transfert de la résistance entre l'animal et l'humain, car les agents antimicrobiens employés chez l'animal sont souvent utilisés chez l'humain et *vice-versa* (Tableau I). Toutefois, dans les cas où l'agent antimicrobien est utilisé seulement chez l'animal, certaines évidences d'un transfert ont été démontrées. Après l'introduction de la streptothricine comme facteur de croissance durant les années 80 dans les élevages d'animaux, une émergence de souches *E. coli* possédant un plasmide qui transmet la résistance à la streptothricine a été notée. Ce plasmide a été isolé de souches provenant de porcs, d'éleveurs de porcs et de leur famille (Hummel, R. *et al.* 1986). De plus, de telles observations ont aussi été notées après l'introduction de l'apramycine dans la médecine vétérinaire. Un transfert direct de la résistance à l'apramycine de souches *E. coli* isolées de porcs à d'autres isolées d'humains a été observé et proviendrait de la présence d'un gène de résistance situé sur un plasmide (Hunter, J. E. *et al.* 1994; Hunter, J. E. *et al.* 1993; Johnson, A. P. *et al.* 1994). En fait, puisque les pressions sélectives sont plus élevées chez l'animal que chez l'humain, à cause de l'usage d'agents antimicrobiens fréquent, on suggère que la résistance développée par les bactéries entériques apparaît premièrement chez l'animal et que, par la suite, cette résistance est transmise aux humains (van den Bogaard, A. E. 1997). Comme la plupart des gènes de résistance provoquent une résistance croisée à d'autres agents, les plasmides ou les gènes de résistance peuvent être sélectionnés par l'usage d'autres agents antimicrobiens utilisés chez l'humain.

Les agents antimicrobiens qu'on emploie afin de traiter les infections représentent de loin la plus grande proportion d'agents utilisés chez l'animal. On estime que, même s'ils comptent seulement 15% du total des agents antimicrobiens administrés, les agents antimicrobiens employés comme facteurs de croissance, compte pour environ 50% (kg) des molécules actives (comprenant les agents antimicrobiens, médicaments, vitamines, etc.) administrées à l'animal (van den Bogaard, A. E. 1997). Une étude hollandaise a démontré que la quantité d'agents antimicrobiens utilisée chez l'animal destiné à la consommation humaine équivaut à la quantité d'agents antimicrobiens utilisée chez l'humain (van den Bogaard, A. E. 1997). Selon certains auteurs, il demeure illogique de continuer à différencier les agents antimicrobiens exploités comme facteurs de croissance à ceux destinés aux traitements d'infections en médecine vétérinaire, puisque que tous les deux conduisent à la résistance

bactérienne. Il serait plus juste de penser que la diminution de l'administration d'agents antimicrobiens, peu importe le type d'utilisation, diminuerait la résistance (van den Bogaard, A. E. 1997).

En fait, tout usage d'agents antimicrobiens favorise l'émergence de bactéries résistantes aux agents antimicrobiens. La question est de savoir jusqu'à quel point l'utilisation d'agents antimicrobiens chez les animaux est responsable des problèmes de résistance antimicrobienne chez l'humain.

Tableau I. Agents antimicrobiens employés au Canada en médecine vétérinaire et chez les humains selon le type d'utilisation.

Classe d'agent antimicrobien	Approuvés pour différentes utilisations selon les différentes espèces animales ^a			Thérapie humaine
	Thérapie	Facteur de croissance	Prévention, prophylaxie et/ou contrôle	
Ampicilline	B, P, C, Ch	Non	Non	Oui
Ceftiofur	B, P, C	Non	Non	Non
Cefotaxime	Non	Non	Non	Oui
Gentamicine	B, A, P, C, Ch	Non	A	Oui
Néomycine	B, C, P	B	B, P, C	Oui
Kanamycine	Non	Non	Non	Oui
Chloramphénicol	C, Ch	Non	Non	Oui ^b
Florfénicol	B	Non	Non	Non
Chlortétracycline	B, A, P	B, A, P	B, A, P	Oui ^b
Oxytétracycline	B, A, P	B, A, P	B, A, P	Oui
Tétracycline hydrochloride	B, A, P, C, Ch	Non	A	Ouib
Doxycycline	Ch	Non	Non	Oui
Sulfadiazine	B, P, C, Ch	Non	Non	Oui
Sulfadiméthoxine	B, P, C, Ch	Non	Non	Oui ^b
Sulfaguanidine	B, P, C, Ch	Non	B, P	Oui
Sulfaméthazine	B, A, P, C, Ch	B, A, P	B, P	Non
Triméthoprime	B, P, C, Ch	Non	Non	Oui

^a B, Bovin; P, Porcin; A, Aviaire; C, Chien; Ch, Chat.

^b Rarement utilisé.

3.0 La bactérie *Escherichia coli*

La bactérie *Escherichia coli* a été décrite par Theodor Escherich en 1919 comme étant un bâtonnet à Gram-négatif anaérobie facultatif et non-sporulant de la famille des *Enterobacteriaceae*. Cette bactérie constitue une cause d'infection importante chez l'animal et l'humain [Bopp, 2003 #322].

Les souches pathogènes intestinales *E. coli* causent des diarrhées chez des porcelets nouveau-nés. Les souches responsables de ces diarrhées sont principalement des souches *E. coli* entérotoxigènes (ETEC) appartenant au sérotype O149: K91 qui colonisent l'intestin grêle et produisent des entérotoxines agissant sur les entérocytes de l'animal [Bertschinger, 1999 #227]. Les signes cliniques d'une infection causée par les ETEC peuvent être observés quelques heures après la naissance ainsi que quelques jours après le sevrage des porcelets. Il en résulte, dans la plupart des cas, une hypersécrétion d'eau et d'électrolytes ainsi qu'une diminution de l'absorption.

Le traitement d'une infection aux ETEC nécessite habituellement l'utilisation d'agents antimicrobiens de large spectre. Toutefois, une augmentation d'environ 20% du nombre de souches ETEC multirésistantes, isolées de porcs atteints d'une diarrhée postsevrage, a été notée entre 1980 et 2000 (Amezcuca, R. *et al.* 2002; Bertchinger, H. U. and Fairbrother, J. M. 1999; Fontaine, F. *et al.*). Ceci est probablement le résultat d'usages fréquents dans l'élevage et le traitement des porcelets d'agents antimicrobiens (Bertchinger, H. U. and Fairbrother, J. M. 1999; Hampson, D. J. 1994). Le pourcentage de souches résistantes est très élevé pour les agents antimicrobiens suivants : tétracycline, sulfamides et spectinomycine.

Les infections extraintestinales causées par *E. coli* (ExPEC) sont communes chez les animaux et chez les humains et peuvent être localisées dans plusieurs organes (Russo, T. A. and Johnson, J. R. 2000). Les infections typiques aux ExPEC incluent les infections urinaires (UTI), les méningites, diverses infections intra-abdominales, des pneumonies, des infections des muscles lisses, septicémies et ostéomyélites (Russo, T. A. and Johnson, J. R. 2000). Les ExPEC sont la cause la plus commune d'infections urinaires (UTI) chez les animaux de

compagnie et chez l'humain. La thérapie aux agents antimicrobiens est un outil important dans le traitement de ces infections. Cependant, la résistance aux agents antimicrobiens utilisés est étendue et concerne autant la médecine vétérinaire que la médecine humaine (Aubry-Damon, H. and Courvalin, P. 1999; Monroe, S. and Polk, R. 2000; Teshager, T. *et al.* 2000).

Même si *E. coli* est associé à plusieurs types de maladies, un haut degré de spécificité existe entre l'hôte et le type d'infection pour les différents sérogroupes. Certains sérogroupes prédominent dans les infections chez les animaux, tandis que d'autres sont retrouvés seulement dans les infections chez l'humain (Aarestrup, F. M. and Wegener, H. C. 1999). Toutefois, les ExPEC peuvent être isolés chez plusieurs différents hôtes. Des souches *E. coli* isolées d'UTI canine et humaine semblent montrer beaucoup de similitudes génotypiques et phylogéniques. Ces observations permettent de croire que les souches isolées du chien ne feraient pas partie d'une population à part des souches isolées de l'humain (Johnson, J. R. *et al.* 2001; Feria, C. *et al.* 2001). Néanmoins, il semblerait, que ces similitudes ne sont pas rencontrées lorsque la souche *E. coli* est isolée de lésions cutanées. Caya *et al.* (Caya, F. *et al.* 1999) ont comparé des souches *E. coli* provenant de lésions sur des poulets et de différents organes humains. Les résultats obtenus n'ont pas permis de démontrer qu'il existe entre ces souches certaines similitudes qui permettraient de les mettre toutes dans un seul et même groupe.

Les souches *E. coli* extraintestinales peuvent se distinguer des souches commensales *E. coli* et des souches pathogènes intestinales selon leur lien phylogénétique (Johnson, J. R. and Russo, T. A. 2002). Les souches commensales dérivent des groupes phylogénétiques A ou B1, définis par l'électrophorèse des enzymes de base de la souche (Johnson, J. R. and Russo, T. A. 2002). De plus, on a démontré que les souches appartenant au groupe phylogénétique A ou B possèdent moins de facteurs de virulence que les souches causant des infections (Herzer, P. J. *et al.* 1990). Les différentes souches pathogènes intestinales, qui donnent rarement des infections extraintestinales, dérivent des groupes phylogénétiques A, B1 ou D ou encore d'une lignée non regroupée. Celles-ci possèdent des facteurs de virulence caractéristiques liés à des syndromes diarrhéiques. Par exemple, *E. coli* O157: H7 ainsi que d'autres *E. coli*

entérohémorragiques (EHEC) produisent des shigatoxines, des adhésines intimines et des co-facteurs leur conférant une adhérence de type « attachement-effacement » caractéristique. Contrairement aux souches commensales ou intestinales *E. coli*, les ExPEC dérivent du groupe phylogénétique B2 et, plus rarement, du groupe D. Les facteurs de virulence caractéristiques des ExPEC incluent diverses adhésines, polysaccharides, toxines, sidérophores, protéases, invasines et des protéines.

4.0 L'intégron

La résistance bactérienne non croisée à plus de trois agents antimicrobiens est courante dans le monde de la médecine vétérinaire et humaine. On appelle ce phénomène la multirésistance. Même si la sensibilité à un agent antimicrobien peut revenir après l'arrêt de l'utilisation de celui-ci, les bactéries résistantes à cet agent antimicrobien peuvent persister longtemps après la baisse des pressions sélectives. La résistance aux agents antimicrobiens peut persister car celle-ci est unie à des liens génétiques créés par les changements occasionnés par les pressions sélectives. L'habileté des bactéries à acquérir et à disséminer des gènes via des éléments génétiques mobiles comme les plasmides et les transposons a été un aux agents antimicrobiens durant les 50 dernières années. Vers la fin des années 80, un autre facteur majeur dans le développement de la multirésistance a été découvert. Ce mécanisme implique un élément d'ADN, appelé intégron, qui permet l'intégration de gènes de résistance à un site spécifique par un événement de recombinaison.

Les intégrons sont impliqués dans la propagation, parmi les bactéries à Gram-négatif et spécialement parmi les bactéries entériques, de plusieurs gènes de résistance aux agents antimicrobiens. Les intégrons contiennent généralement un gène codant pour une intégrase de la famille de λ (*intI*), un site d'intégration de cassettes (*attI*), où les gènes de résistance sous forme de cassettes peuvent s'intégrer, et un promoteur responsable de l'expression des cassettes insérées. L'intégrase de l'intégron recombine les cassettes en aval du site proximal *attI* du promoteur. Une cassette contient une région codante (gène de résistance) et un élément court de 59 paires de bases (pb) répété inversé contenant un site de recombinaison. L'intégration de la cassette au site *attI* produit la formation d'un deuxième site d'insertion (*attC*) en aval de la cassette. Jusqu'à maintenant, plus de 40 cassettes ont été décrites et quatre classes d'intégrons sont connues (Recchia, G. D. and Hall, R. M. 1995). Les différentes classes d'intégrons se distinguent par leurs gènes *int*. C'est l'intégron de classe 1 qui est le plus souvent retrouvé parmi les souches cliniques d'entérobactéries.

Les intégrons de classe 1 contiennent à l'extrémité 3' un gène codant pour une résistance à l'ammonium quaternaire nommé *qacEΔ1* ainsi qu'un gène codant pour une résistance aux

sulfamides, *sulI* (Figure 1). Les régions conservées 5' et 3' entourent une région variable (RV) qui contient la ou les cassette(s). Les intégrons acquièrent ou échangent les gènes de la RV en utilisant l'intégrase codée par le gène *intI*, qui est capable d'insérer et de faire la recombinaison d'ADN mobile (cassette) à un site spécifique contenant une séquence consensus (GTTRRRY). Cette intégrase est responsable de la liaison de gènes de résistance permettant de former un large locus contenant de multiples gènes de résistance. L'intégron de classe 1 a été détecté pour la première fois sur des dérivés complets ou tronqués du transposon « Mu-like » Tn402 qui réside sur un plasmide ayant une spécificité d'hôte étendue ainsi que parmi le transposon Tn21 ou « Tn21-like ». Tn21 est un grand transposon de 19,7-kb de classe 2 qui transporte avec lui un opéron codant pour une résistance au mercure (*mer*), un intégron de classe 1 (In2) et un module de transposition (*tnpA*, *tnpR* et un site *res*). Les différentes variantes du transposon Tn21 possèdent certaines cassettes ajoutées et/ou des séquences d'insertion (IS) à la région 3' insérées ou délétées. Le prototype de Tn21 porte le gène de résistance à la spectinomycine et à la streptomycine, *aadA1*, sur son intégron en plus du gène *merA* qui confère la résistance au mercure. La large distribution du transposon Tn21 parmi les isolats cliniques est possiblement attribuable aux plasmides conjugatifs sur lesquels il réside. L'usage des sulfamides pendant six décennies et l'utilisation de la combinaison triméthoprime-sulfamide ont entraîné une forte sélection en faveur des intégrons de classe 1 qui portent à leur extrémité 3' le gène *sulI*.

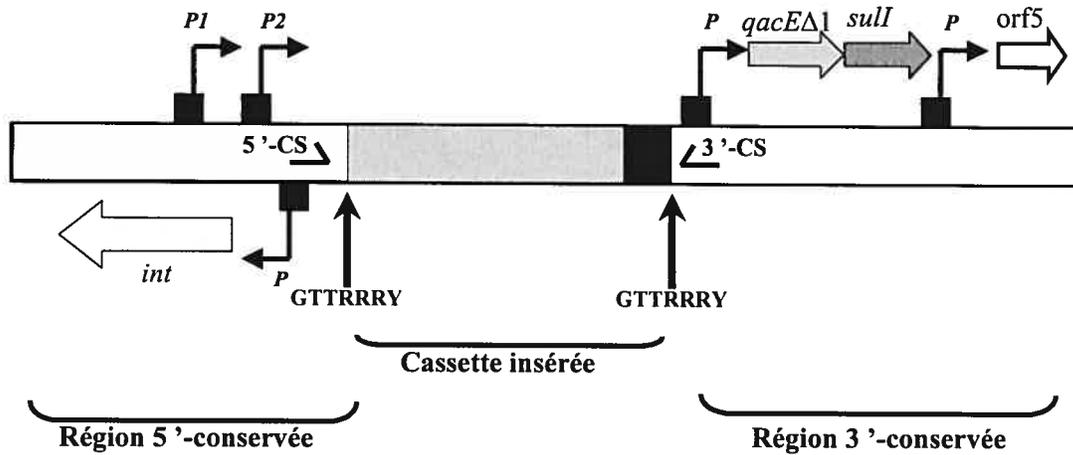


Figure 1. Structure générale de l'intégron de classe 1. Les flèches indiquent la direction de la transcription. La direction et l'emplacement des différents promoteurs ($P1$, $P2$ et P) sont indiqués. La région GTTRRRY est la séquence d'intégration des cassettes. Les oligonucléotides de 5'-CS et 3'-CS sont spécifiques à la région conservée 5' et 3' respectivement. Une cassette insérée dans la région variable est montrée avec ses 59-pb conservées illustrées, ici, par un bloc noir. (Adaptée et tirée de (Levesque, C. *et al.* 1995))

5.0 La génétique de la résistance

Certaines espèces bactériennes possèdent une résistance intrinsèque à des agents antimicrobiens donnés. Cette résistance est observée dès l'utilisation de l'antibiotique. Par exemple, les mycoplasmes sont résistants à la pénicilline. Cependant, ce n'est pas ce type de résistance qui cause problème dans le traitement des infections bactériennes. Les résistances qui sont acquises par la bactérie représentent la problématique principale. La résistance peut provenir d'une ou des mutations ponctuelles dans certains gènes chromosomiques, mais ces événements surviennent très rarement (1 sur 10^8) chez les bactéries. Puisque chez *E. coli*, la résistance acquise à la faveur de nouveaux gènes est la plus courante pour les agents antimicrobiens considérés dans cette étude, la résistance aux agents antimicrobiens due à des mutations chromosomiques sera peu discutée dans ce mémoire. Ce qui sera plus largement discuté ici aura trait aux résistances aux agents antimicrobiens qui résulte de l'acquisition de gènes de résistance par la bactérie.

Plusieurs mécanismes de résistance existent. Certains gènes vont permettre la production d'enzymes qui vont inactiver l'agent antimicrobien. D'autres vont permettre la production de protéines transmembranaires jouant un rôle de pompe cellulaire. Ces pompes vont excréter spécifiquement les différents agents antimicrobiens hors de la cellule. La bactérie peut aussi produire une nouvelle cible pour l'agent antimicrobien ou, simplement, modifier la cible originale.

La bactérie acquiert une ou des résistances à différents agents antimicrobiens par l'acquisition de nouveaux gènes via les éléments génétiques mobiles (transposons, intégrons, plasmides, etc.). En fait, plusieurs gènes peuvent être transmis par le même élément génétique.

La résistance croisée est un phénomène commun entre les membres d'une même famille. Par exemple, une bactérie résistante à l'oxytétracycline l'est automatiquement à la chlortétracycline et la tétracycline. La résistance croisée se différencie de la résistance multiple par le fait qu'elle se manifeste chez une souche vis-à-vis plusieurs antibiotiques appartenant à des familles différentes. Alors que la résistance croisée implique un mécanisme

de résistance commun, la résistance multiple est généralement associée à plus d'un mécanisme. Par exemple, la résistance à l'ampicilline, la tétracycline et le chloramphénicol chez une même souche relève de la résistance multiple.

Plusieurs gènes de résistance permettant à la bactérie qui les acquière de développer des résistances à plusieurs agents antimicrobiens ont été décrits dans la littérature. Puisque le sujet de cette maîtrise porte sur la résistance aux agents antimicrobiens retrouvée chez *E. coli*, seuls les gènes de résistance acquis, et donc mobiles, qui sont les plus souvent retrouvés chez cette bactérie, seront décrits (Tableau II).

Tableau II. Mécanismes d'action des déterminants génétiques de résistance^a

Enzyme	Localisation génétique ^b	Gène	Nomenclature alternative	Mécanisme d'action	Profil de résistance ^c	Numéros d'accèsion
TEM-1	p	<i>tem-1</i>	-		AMP, AMK, PIP, TIC	AF309824
SHV-1	p	<i>shv-1</i>	<i>pit-2</i>		AMP, AMK, PIP, TIC	AF148850
OXA-1	p	<i>oxa-1</i>	-	Hydrolyse le noyau beta-lactam des beta-lactamines	AMP, AMK, AMX, PIP, TIC	AJ238349
OXA-7	p	<i>oxa-7</i>	-		AMP, AMK, AMX, PIP, TIC	X75562
PSE-4	chr, p, tn	<i>pse-4</i>	-		AMP, CAR, PIP, TIC	J05162
CTX-M-3	p	<i>ctx-m-3</i>	-		AMP, AMX, ATM, CTX, CRO, PIP, TIC, TIM	X92506
ANT(2 ^{''})-I	p	<i>ant(2^{''})-Ia</i>	<i>aadB</i>	Modifie la fonction hydroxyl des aminoglycosides par une adénylation	GEN, KAN, TOB	X04555
AAC(3)-II	p	<i>aac(3)-Ia</i>	<i>aacC2, aacC3, aacC5, aac(3)-Va</i>	Modifie la fonction amino des aminoglycosides par une acétylation	GEN, TOB	X54723
AAC(3)-IV	p	<i>aac(3)-IVa</i>	-		APR, GEN, TOB	X01385
APH(3 ['])-I	tn	<i>aph(3['])-Ia</i>	<i>aphA-1</i>	Modifie la fonction hydroxyl des aminoglycosides par une phosphorylation	KAN, NEO	M18329
APH(3 ['])-II	tn	<i>aph(3['])-IIa</i>	<i>aphA-2</i>		KAN, NEO	V00618
Tet(A)	p	<i>tet(A)</i>	-	Protéine de membrane exportant la tétracycline	TET	X00006
Tet(B)	p	<i>tet(B)</i>	-		MIN, TET	J01830
Tet(C)	p	<i>tet(C)</i>	-		TET	J01749
Tet(D)	p	<i>tet(D)</i>	-		TET	X65876
Tet(E)	p	<i>tet(E)</i>	-		TET	L06940
Tet(Y)	p	<i>tet(Y)</i>	-		TET	AF070999
CAT _I	p, tn	<i>catI</i>	-		Catalyse l'acétylation du OH-3' du chloramphénicol	CHL
CAT _{II}	p, tn	<i>catII</i>	-	CHL		X53796
CAT _{III}	p, tn	<i>catIII</i>	-	CHL		X07848
FloR	chr, p	<i>floR</i>	<i>flo</i>	Protéine de membrane exportant le chloramphénicol et le florfenicol	CHL, FLO	AF252855
Dhfr I	chr, p, tn	<i>dhfrI</i>	<i>dfr1</i>	Variant de l'enzyme cible dihydrofolate insensible à la triméthoprim	TMP	X00926
Dhfr V	chr, p, tn	<i>dhfrV</i>	<i>dfr5</i>		TMP	X12868
Dhfr VII	chr, p, tn	<i>dhfrVII</i>	<i>dfr7</i>		TMP	X58425
Dhfr IX	chr, p, tn	<i>dhfrIX</i>	<i>dfr9</i>		TMP	X57730
Dhfr XIII	chr, p, tn	<i>dhfrXIII</i>	<i>dfr13</i>		TMP	Z50802
Sull	p, tn	<i>sull</i>	<i>sul1</i>	Variant de l'enzyme cible dihydropteroate insensible aux sulfamides	SUL	X12869
SullI	p	<i>sullI</i>	<i>sul2</i>		SUL	M36657

^a Ces informations ont été tirées des références suivantes : (Ambler, R. P. *et al.* 1991; Bush, K. *et al.* 1995; Du Bois, S. K. *et al.* 1995; Yang, Y. *et al.* 1999; Kotra, L. P. *et al.* 2000; Mingeot-Leclercq, M. P. *et al.* 1999; Shaw, K. J. *et al.* 1993; Wright, G. D. *et al.* 1998;

Chopra, I. and Howe, T. G. 1978; Chopra, I. and Roberts, M. 2001; Huovinen, P. *et al.* 1995; Skold, O. 2001).

^b chr, chromosomique; p, plasmidique; tn, transposon.

^c AMP, ampicilline; AMK, amoxicilline; AMX, amoxicilline-acide clavulanique; ATM, aztreonam; APR, apramycine; CAR, carbenicilline; CRO, ceftriaxone; CTX, cefotaxime; CHL, chloramphénicol; FFL, florfénicol; GEN, gentamicine; KAN, kanamycine; MIN, minocycline; NEO, néomycine; PIP, piperacilline; SUL, sulfamides; TET, tétracycline; TIC, ticarcilline; TIM, ticarcilline-acide clavulanique; TMP, triméthoprimine; TOB, tobramycine.

6.0 Les agents antimicrobiens

6.1 Les β -lactamines

Les β -lactamines restent toujours la famille d'agent antimicrobiens la plus utilisée, la plus diversifiée et la moins toxique. Elle reste en pleine évolution grâce aux nouveaux produits qui paraissent continuellement.

Depuis la mise en marché de la pénicilline G en 1942, on a assisté à l'apparition de la première pénicilline oral, la pénicilline V. Par la suite, à partir de l'obtention de l'acide 6-aminopénicillanique, le noyau commun de toutes les pénicillines, et de l'acide 7-aminocéphalosporanique, le noyau commun de toutes les céphalosporines, il y a eu l'apparition successive des β -lactamines semi-synthétiques et des céphalosporines de première, deuxième, troisième et quatrième génération. Il s'en suit de la synthèse des monobactames, des pénèmes et carbapénèmes et finalement, des inhibiteurs irréversibles de β -lactamases (Neuman, M. 1990). Le développement des aminopénicillines, qui inclu l'ampicilline, a permis de traiter les infections causées par la bactérie *E. coli*, laquelle est naturellement résistante à la pénicilline.

Les β -lactamines peuvent être classées selon plusieurs critères. Le plus employé fait appel à leur mode d'obtention, leur composition chimique et leur indication principale. Les β -lactamines vont fixer préférentiellement les cibles (récepteurs) spécifiques, que sont les « penicillin binding proteins » (P.B.P.). Ces P.B.P., mises en évidence par Spratt en 1975 sur un mutant de *E. coli* non producteur de β -lactamases, sont situées sur la membrane interne de la paroi bactérienne (Neuman, M. 1990). Cette fixation entraîne l'arrêt de la synthèse du peptidoglycan et donc de la croissance bactérienne, ce qui correspond à l'effet bactériostatique de la β -lactamine. L'effet bactéricide des β -lactamines résulte de la libération d'autolysines par la bactérie, ce qui provoque l'éclatement cellulaire de la bactérie. Le mode d'action des β -lactamines explique leur inactivité sur les bactéries sans paroi ou intra cellulaire : *Mycoplasma*, *Chlamydia*, *Rickettsia*.

Mécanismes d'action des β -lactamases

La production de β -lactamases qui hydrolysent le noyau β -lactam et inactivent l'agent antimicrobien engendre la résistance aux β -lactamines est le mécanisme le plus fréquent (Livermore, D. M. 1995). Plusieurs différentes β -lactamases ont été décrites (Bush, K. *et al.* 1995; Livermore, D. M. 1995). Plus de 200 β -lactamases ont été classifiées en trois groupes principaux et huit sous-groupes, selon leur fonction et leurs caractéristiques structurales (Bush, K. *et al.* 1995). Leur mode d'action varie légèrement d'une enzyme à une autre mais, fondamentalement, il repose sur le fait que l'enzyme se lie de façon non covalente aux β -lactamines. Par la suite, le noyau β -lactam est attaqué par des molécules hydroxyle libres générant un lien covalent. Finalement, l'enzyme active est libérée par une hydrolyse au niveau du lien covalent et ceci inactive la β -lactamine (Livermore, D. M. 1995). Chez les bactéries à Gram-négatif, ces enzymes sont produites et restent emprisonnés dans l'espace périplasmique de la bactérie, contrairement aux bactéries à Gram-positif qui excrètent plutôt les β -lactamases (Livermore, D. M. 1995).

Les β -lactamases sont divisées en trois groupes selon leurs caractéristiques fonctionnelles. Le premier groupe contient les céphalosporinases non inhibées par l'acide clavulanique; le deuxième groupe comprend les pénicillinases, les céphalosporinases et la β -lactamases à large spectre qui sont généralement affectées par les inhibiteurs de β -lactamases; et le troisième groupe regroupe les metallo- β -lactamases qui hydrolysent les pénicillines, les céphalosporines et les carbapénèmes. Une autre classification a été proposée; celle-ci fait appel à la structure des enzymes. La classe A contient toutes les β -lactamase de type pénicillinases; la classe B, les metallo- β -lactamases; la classe C regroupe les céphalosporinases; et finalement la classe D les enzymes hydrolysant les oxacillines (Bush, K. *et al.* 1995). Parmi ces classes, il existe des β -lactamases qu'on appelle des « Extended-spectrum β -lactamase » ou ESBL et qui ont comme caractéristique de rendre la bactérie résistante à plusieurs céphalosporines de troisième génération.

E. coli représente le seul cas, avec *Shigella* spp., où une enzyme de classe C chromosomique, non inductible, de type AmpC, peut être impliquée dans la résistance aux β -lactamines

(Jacoby, G. A. and Carreras, I. 1990). La bactérie peut produire en grande quantité des enzymes de type AmpC et devenir résistante. Toutefois, cette enzyme n'est pas le seul mode de résistance retrouvée chez *E. coli*. Généralement, la résistance provient de l'acquisition de gènes de résistance via l'acquisition de plasmides.

Les enzymes les plus fréquemment isolées sont de type TEM, SHV, OXA, PSE et plus rarement, de type CTX-M. Les gènes codant ces enzymes sont très nombreux. Les variantes des gènes *tem* ainsi que *shv*, *pse* et *ctx-m* se différencient par un ou deux changements dans la séquence nucléotidique. Ces mutations transforment la structure tri-dimensionnelle des enzymes et changent par le fait même leur spécificité enzymatique (Du Bois, S. K. *et al.* 1995). Présentement, 92 variantes de *tem*, 26 de *shv*, 40 de type *oxa*, 4 de *pse* et 15 de *ctx-m* ont été décrites (Perilli, M. *et al.* 2002; Chang, F. Y. *et al.* 2001; Lopez-Otsoa, F. *et al.* 2002; Savoie, A. *et al.* 2000; Poirel, L. *et al.* 2002).

Les différentes variantes de ces déterminants ont des spectres d'action différents selon les mutations ponctuelles. Il en résulte donc un spectre d'action élargi et l'inactivation de certaines céphalosporines. Toutefois, la plupart reste tout de même inactive contre les inhibiteurs de β -lactamases (Livermore, D. M. 1995). La sensibilité à ces inhibiteurs peut être modifiée par différents mécanismes. Le mécanisme le plus fréquent est l'hyperproduction ou la synthèse d'une β -lactamase résistante aux inhibiteurs de β -lactamase de type TEM. Une autre possibilité est l'hyperproduction d'une β -lactamase chromosomique ou plasmidique de type AmpC, par une amplification de gènes ou l'introduction de mutations au niveau du promoteur. La production d'une β -lactamase de type OXA peut aussi conduire à une résistance aux inhibiteurs (Livermore, D. M. 1995).

Il est à noter que les gènes *tem* sont les gènes les plus fréquemment retrouvés chez *E. coli*. Les gènes *shv*, qui semblent dériver de *Klebsiella* spp., montrent environ 65% d'identité avec les gènes *tem* (Bush, K. *et al.* 1995). Les régions non identiques dans leur séquence permettent de les différencier lors d'études biomoléculaires.

Distribution et mobilité de la résistance

Depuis les 50 dernières années, la résistance aux β -lactamines, transmise grâce à des plasmides, est devenue courante chez les entérobactéries et autres bactéries à Gram-négatif. Les enzymes de type TEM, SHV, OXA, PSE et CTX sont produites par des gènes portés par des plasmides. L'expression de la β -lactamase TEM-1 est le mécanisme de résistance le plus commun chez les bactéries à Gram-négatif (Bush, K. *et al.* 1995; Chaibi, E. B. *et al.* 1999). Le gène codant pour cette enzyme est localisé sur le transposon Tn3, quoique celui-ci et ses dérivés puissent être retrouvés sur Tn2 (Rasmussen, B. A. *et al.* 1993). Le transposon où réside le gène *tem-1* est certainement plus mobile que l'ADN qui contient le gène *shv-1*, ce qui expliquerait que les gènes *tem-1* sont plus souvent retrouvés que *shv-1*. Toutefois, ce phénomène n'a pas été clairement démontré.

Utilisation des β -lactamines

Les β -lactamines sont utilisées largement afin de traiter des infections chez l'animal et chez l'humain. L'augmentation de l'utilisation ainsi que l'usage répété des β -lactamines ont conduit vers une résistance fréquente à ces agents antimicrobiens. Deux stratégies ont alors été employées afin de contrer cette résistance. Premièrement, de nouvelles β -lactamines qui étaient moins touchées par les β -lactamases ont été développées. Deuxièmement, l'utilisation de la combinaison d'inhibiteurs de β -lactamases, comme l'acide clavulanique, le sulbactame ou le tazobactame, de concert avec une pénicilline a aussi été privilégiée afin de rendre efficace les traitements aux β -lactamines. Toutefois, vers 1990, l'efficacité de ces agents inhibiteurs a chuté à cause de l'émergence de variantes de l'enzyme de type TEM qui rendent les bactéries résistantes à plusieurs de ces agents (Thomson, K. S. and Smith Moland, E. 2000).

6.2 Les aminoglycosides

Malgré tous les efforts pour remplacer les aminoglycosides, en raison de leurs inconvénients réels (marge thérapeutique étroite, à cause de leur toxicité pour les reins et les oreilles et conséquemment, la nécessité fréquente de monitoring des taux sériques, en plus de la nécessité d'administration parentérale à cause de leur faible absorption au niveau gastro-intestinal), ceux-ci restent toujours indispensables et continuent leur carrière surtout en milieu

hospitalier dans le traitement des infections nosocomiales sévères, en association avec une β -lactamine.

Les aminoglycosides ont une action bactéricide, dose-dépendante, sur les bactéries par l'altération de la synthèse protéique de celles-ci par action directe sur leur ribosome. L'agent se fixe sur la protéine S₁₂ et sur d'autres sites des sous-unités 30S des ribosomes avec, comme conséquence, la formation de peptides aberrants non fonctionnels par transcription incorrecte de l'information par l'ARN messager (erreur de lecture) et l'inhibition de la translocation (Neuman, M. 1990). Le passage transmembranaire des aminoglycosides dans la bactérie est un phénomène actif qui requiert de l'oxygène et, de ce fait, il ne peut intervenir en anaérobiose. Ce qui explique la résistance naturelle des bactéries anaérobies strictes aux aminoglycosides.

Mécanisme d'action de la résistance aux aminoglycosides

Chez les bactéries, la résistance aux aminoglycosides fait souvent suite à l'inactivation enzymatique par des acétyltransférases (AAC), adénylyltransférases (ou nucléotidyltransférases) (ANT) et des phosphotransférases (APH) (Shaw, K. J. *et al.* 1993). Chacun de ces enzymes affecte différents membres de la famille des aminoglycosides. En plus de la résistance enzymatique, des altérations du ribosome ainsi qu'une perte de perméabilité chez la bactérie peuvent amener une résistance aux aminoglycosides. Toutefois, à l'exception de la résistance à la streptomycine ou à la spectinomycine, il semblerait que la résistance soit due plus fréquemment à une acquisition de gènes de résistance via des plasmides que par des mutations au niveau du chromosome (Shaw, K. J. *et al.* 1993).

La nomenclature des enzymes impliquées dans la résistance aux aminoglycosides est établie comme suit (Shaw, K. J. *et al.* 1993) :

- 1- Le type de modification enzymatique est déterminé (AAC (acétyltransférases), ANT (adénylyltransférases) ou APH (phosphotransférases))
- 2- Le site de la modification est nommé ((1), (3), (6), (9), (2'), (3'), (4'), (6'), (2''), ou (3'''))

3- Pour le profil de résistance, I, II, III, IV, etc. est utilisé suivi de a, b, c, d, etc. pour l'unique désignation enzymatique

Ainsi, AAC(6')-Ia et AAC(6')-Ib sont deux enzymes distinctes, conférant un profil de résistance identique. Les gènes codant ces enzymes portent la même nomenclature à l'exception que les lettres sont toutes en minuscules et le nom est en italique. Pour suivre l'exemple précédant, les gènes codant pour ces deux enzymes se nomment *aac(6')-Ia* et *aac(6')-Ib*. D'autres nomenclatures sont aussi employées, mais celle-ci est la plus fréquemment utilisée.

En raison de la grande diversité des gènes de résistance aux aminoglycosides, on compte 33 mécanismes de résistance et plus de 70 gènes décrits (Shaw, K. J. *et al.* 1993). Seuls les gènes retrouvés chez *E. coli* seront discutés dans le présent mémoire. Parmi les gènes de résistance aux aminoglycosides codant pour un acétyltransférase, le gène *aac(3)-Ia* qui procure une résistance à la gentamicine est retrouvé chez 10 à 17% des bactéries à Gram-négatif. Le gène *aac(3)-IIa* qui procure entre autres une résistance à la gentamicine est retrouvé chez 60,3% des bactéries à Gram-négatif. Finalement, le gène *aac(3)-IVa*, conférant une résistance à la gentamicine ainsi qu'à l'apramycine, n'est retrouvé que rarement (3,5%) chez les *Enterobacteriaceae* (Shaw, K. J. *et al.* 1993). Le gène *ant(2'')-Ia* est l'un des gènes les plus communs chez les bactéries à Gram-négatif (15%) codant pour une enzyme ayant une activité de 2''-O-adenylyltransférase. Celui-ci code pour une résistance à la gentamicine et à la kanamycine. Parmi les gènes codant pour une enzyme ayant une activité de phosphorylation, *aph(3')-Ia*, retrouvé sur le transposon Tn903, est le plus fréquemment retrouvé (46%) parmi les bactéries à Gram-négatif avec le gène *aph(3')-IIa* retrouvé parfois chez *E. coli*. Tous les deux confèrent une résistance à la néomycine ainsi qu'à la kanamycine (Shaw, K. J. *et al.* 1993).

Distribution et mobilité des gènes de résistance

Les gènes de résistance qui codent pour une enzyme qui modifie les aminoglycosides par une acétylation, adénylation ou phosphorylation, constituent des gènes fréquemment rencontrés sous forme de cassettes dans la RV des intégrons. Les gènes de résistance codant pour une enzyme de type ANT(3'') sont retrouvés sous forme de cassettes dans la nature. Le gène

ant(3'')-Ia (aadA1) qui a été décrit pour la première fois par Sundström *et al* (Sundstrom, L. *et al.* 1988), est souvent retrouvé sur le transposon Tn21.

Il existe plus de 20 gènes de résistance à la gentamicine qui sont décrits jusqu'à maintenant. Le gène *aac(3)-IIa* (aussi nommé *aacC2*), *ant(2'')-Ia (aadB)* et *aac(3)-Ia (aacC1)* sont souvent retrouvés parmi les souches à Gram-négatif isolées d'humains (Shaw, K. J. *et al.* 1993; Miller, G. H. *et al.* 1997). Le gène *aac(3)-IV* qui donne une résistance à la gentamicine, tobramycine et l'apramycine a été retrouvé chez des isolats provenant d'animaux (Wray, C. *et al.* 1993; Hunter, J. E. *et al.* 1994). Il semblerait qu'aucun autre gène de résistance à la gentamicine, sauf ces quatre gènes, n'a été isolé chez l'animal (Sandvang, D. and Aarestrup, F. M. 2000). Tous les gènes de résistance à la gentamicine donnent une résistance croisée à d'autres aminoglycosides.

Utilisations des aminoglycosides

Les aminoglycosides sont utilisés le plus souvent chez les humains en milieu hospitalier. Elles sont destinées aux traitements d'infections nosocomiales et presque toujours en association avec un deuxième agent. En pratique extra-hospitalière, les indications sont rares, à l'exception de la spectinomycine dans le traitement des gonococcies résistantes aux β -lactamines. Les aminoglycosides servent à traiter les septicémies, les endocardites et autres infections graves (Neuman, M. 1990).

À cause de la toxicité des aminoglycosides et de leur capacité à rester longtemps dans les tissus, l'utilisation de ces agents chez les animaux par voie parentérale a été largement réduite. Leur usage est maintenant réservé pour les septicémie ou les infections systémiques. Le premier choix est alors la gentamicine, suivi de l'amikacine et de la tobramycine (Prescott, J. F. *et al.* 2000). Toutefois, les aminoglycosides tels que la néomycine et l'apramycine restent encore utilisés par voie orale afin de contrôler les diarrhées causées par les entérobactéries (Prescott, J. F. *et al.* 2000).

6.3 Les tétracyclines

Les tétracyclines, qui ont été découvertes dans les années 40, appartiennent à une famille d'agents antimicrobiens qui inhibent la synthèse protéique par l'empêchement de l'attachement de l' aminoacyl de l'ARN de transfert au ribosome. Les tétracyclines sont des agents antimicrobiens à large spectre. Leur activité touche plusieurs bactéries à Gram-positif et à Gram-négatif, mais aussi les bactéries atypiques comme les *Chlamydia*, les *Mycoplasma*, et certains protozoaires (Chopra, I. and Roberts, M. 2001). Les propriétés avantageuses de ces agents antimicrobiens et l'absence d'effets secondaires majeurs ont mené à une utilisation importante des tétracyclines dans le traitement des infections chez l'animal et chez l'humain. De plus, en Amérique du nord, ceux-ci sont utilisés à des fins autres que thérapeutiques chez les animaux de consommation comme facteurs de croissance. Même si les tétracyclines présentent beaucoup d'intérêts pour la médecine vétérinaire et humaine, l'émergence de microorganismes résistants limite leur efficacité. Les efforts qui ont été faits pour améliorer la compréhension de la résistance aux tétracyclines ont permis la découverte d'une nouvelle génération de tétracyclines, les glycylyclines (Chopra, I. and Roberts, M. 2001).

La chlortétracycline et l'oxytétracycline ont été découvertes à la fin des années 40. Ces molécules sont produites par *Streptomyces aureofaciens* et *S. rimosus*, respectivement. D'autres, moins utilisées, proviennent aussi des *Streptomyces* ou encore d'une production semi-synthétique. La glycylycline, la dernière des tétracyclines à être introduite, est d'origine semi-synthétique (Chopra, I. and Roberts, M. 2001).

Mécanisme d'action des gènes de résistance à la tétracycline

La résistance aux tétracyclines est un phénomène relativement répandu et découle de son utilisation intensive dans l'agriculture et en médecine humaine. La résistance aux tétracyclines émerge chez les bactéries commensales et pathogènes suite à l'acquisition des gènes *tet*. Vingt-neuf gènes de résistance à la tétracycline *tet* et trois gènes de résistance à l'oxytétracycline (*otr*) ont été caractérisés. Certains de ces gènes codent pour des pompes à efflux et d'autres codent pour une protection ribosomale. Les pompes sont les plus documentées et étudiées des protéines Tet. Tous les gènes *tet* codant pour les pompes, codent pour des protéines associées à la membrane qui exportent les molécules de tétracycline de

l'intérieur de la cellule à l'extérieur (Chopra, I. and Roberts, M. 2001). Ces gènes sont retrouvés chez les bactéries à Gram-positif et à Gram-négatif. La majorité de ces protéines Tet confèrent une résistance à la tétracycline, mais non à la minocycline et à la glycylycyclines. Seul *tet(B)* confère la résistance à la tétracycline et à la minocycline. Les gènes *tet* codant pour une pompe retrouvée chez les bactéries à Gram-négatif sont normalement associés avec des plasmides conjugatifs. Les gènes *tet* retrouvés chez *E. coli* sont : *tet(A)*, *tet(B)*, *tet(C)*, *tet(D)*, *tet(E)*, *tet(I)* et *tet(Y)* (Chopra, I. and Roberts, M. 2001). Tous font partie des gènes codant pour des pompes. Il n'y a donc aucun gène *tet* retrouvé chez *E. coli* qui puisse conférer une protection ribosomale. Les gènes *tet* codant pour une pompe retrouvés chez les bactéries à Gram-négatif sont régulés par la tétracycline. En l'absence de tétracycline, la transcription de ces gènes est bloquée (Chopra, I. and Roberts, M. 2001).

De plus, d'autres mécanismes de résistance non plasmidique ont été décrits. Certaines résistances sont dues à des mutations au niveau du chromosome (*mar* locus) de la bactérie ou encore au niveau de la région 16S de l'ARN ribosomal (Linde, H. J. *et al.* 2000; Cohen, S. P. *et al.* 1993; Ross, J. I. *et al.* 1998).

Distribution et mobilité des gènes *tet*

On retrouve les gènes *tet* chez une variété de bactéries isolées d'animaux et d'humains. La majorité des gènes *tet* sont associés à des éléments génétiques mobiles. Les gènes *tet* retrouvés chez les bactéries à Gram-négatif et codant pour des pompes à efflux sont retrouvés sur divers groupes de plasmides conjugatifs pouvant avoir des incompatibilités de groupes (Jones, C. S. *et al.* 1992). Deux plasmides s'excluant mutuellement, c'est-à-dire ne pouvant coexister dans la même bactérie, appartiennent au même groupe d'incompatibilité. Jones *et al* ont trouvé une corrélation entre l'incompatibilité de certains plasmides et la présence de certains gènes *tet* sur ceux-ci. Ils suggèrent que certains de ces gènes sont liés génétiquement par leur incompatibilité. Le gène *tet(E)* diffère des autres gènes codant pour une pompe à efflux, car il est associé à un gros plasmide qui n'est ni mobile ni conjugatif (Allard, J. D. and Bertrand, K. P. 1993). Ceci peut expliquer sa distribution et sa prédominance limitée.

Utilisation des tétracyclines

Les tétracyclines ont été largement employées en médecine humaine. Toutefois, avec le développement de résistance dans un pourcentage élevé d'entérobactéries et de cocci à Gram-positif et anaérobies (*Streptococcus*, *Staphylococcus* et *Enterococcus*), les indications actuelles de tétracyclines se limitent aux traitements des infections à bactéries intracellulaires (*Brucella*, *Borrelia*, *Chlamydia*, *Mycoplasma*, *Rickettsia* et *Yersinia*) (Neuman, M. 1990).

Chez l'animal, les tétracyclines sont employées dans le traitement d'infections chez les porcs, la volaille, les vaches et les moutons. Les tétracyclines représentent la classe d'agents antimicrobiens la plus utilisée chez les animaux ; ils représentent environ 50% (en quantité) des agents antimicrobiens utilisés chez l'animal [Schwarz, 2001 #234]. Elles peuvent être aussi proscrites pour le traitement de certaines d'infections chez les animaux de compagnie. Les tétracyclines sont aussi utilisées à des fins autres que thérapeutiques chez les animaux de consommation, afin d'augmenter leur taux de croissance et la conversion alimentaire. Les propriétés subthérapeutiques des tétracyclines ont été découvertes en 1949. Ces effets subthérapeutiques ont été observée chez la volaille, puis chez le porc et le bovin. Cependant, ce n'est qu'en 1951 et 1953 que la chlortétracycline et l'oxytétracycline, respectivement, ont été approuvées par la « Food and Drug Administration » (FDA) aux États-Unis comme additif alimentaire chez les animaux. Ensuite, ces utilisations ont été mises en question par la Grande-Bretagne qui suggérait que l'utilisation subthérapeutique des tétracyclines augmente la résistance à ces agents chez l'animal et l'humain. En Europe, cette hypothèse a été prise au sérieux. Il en est résulté le bannissement de l'utilisation des tétracyclines comme facteur de croissance chez les animaux, en 1970.

6.4 Les phénicolés

Le chloramphénicol est un agent antimicrobien de large spectre qui était utilisé de façon intensive avant son bannissement à cause de ses propriétés toxiques. En effet, l'humain exposé à cet agent pouvait développer une aplasie médullaire irréversible (Neuman, M. 1990). C'est donc par mesure de précaution que son usage chez les animaux de ferme a été banni au Canada en 1980. Présentement, seule la forme fluorée, sous le nom de florfénicol, peut être employée chez les animaux.

Le florfénicol est un composé fluoré analogue au chloramphénicol et au thiamphénicol, approuvé par la FDA en 1996 pour le traitement des infections causées par les pathogènes des voies respiratoires bovines comme *Pasteurella* spp. (White, D. G. *et al.* 2000). Cependant, leur utilisation contre les infections entériques bovines à *E. coli* n'est pas encore approuvée aux États-Unis. Son utilisation chez l'humain n'est pas acceptée. Le florfénicol possède un spectre d'action similaire au chloramphénicol. Toutefois, il est actif à des concentrations moindres que ce dernier, et ce, pour une vaste sélection de microorganismes, même ceux démontrant une résistance au chloramphénicol (Syriopoulou, V. P. *et al.* 1981). Le florfénicol est considéré comme un agent bactériostatique (White, D. G. *et al.* 2000). Il agit directement sur la synthèse protéique de la bactérie par une liaison de la molécule à la sous-unité 50S du ribosome.

Mécanisme d'action de la résistance

La résistance au chloramphénicol peut provenir d'une réaction enzymatique via une inactivation chimique de l'agent ou à des pompes à efflux. Le chloramphénicol acétyltransférase (CAT) catalyse l'acétylation du OH-3' du chloramphénicol et est responsable en majorité de la résistance à cet agent (Murray, I. A. and Shaw, W. V. 1997). Il existe aussi une résistance non enzymatique au chloramphénicol provoquée par l'acquisition du gène *cmlA* (Bissonnette, L. *et al.* 1991). De plus, récemment, un nouveau gène, *floR*, a été identifié sur un plasmide isolé d'une souche *E. coli*. Ce gène confère une résistance croisée au chloramphénicol et au florfénicol due à l'action d'une pompe (Cloeckaert, A. *et al.* 2000). Contrairement au gène *floR*, les gènes *cat* et *cmlA* ne peuvent donner une résistance au florfénicol.

L'acquisition de gènes de type *cat* est la cause majeure des résistances observées au chloramphénicol. Ces gènes codant pour une chloramphénicol acétyltransférase sont dispersés parmi plusieurs espèces bactériennes à Gram-positif et à Gram-négatif (Murray, I. A. and Shaw, W. V. 1997). Trois variantes de ces gènes ont été très bien décrites dans la littérature [Murray, 1997 #170]. Il s'agit de *catI*, *catII* et *catIII*.

Distribution et mobilité de la résistance

Les gènes *cat* sont retrouvés sur plusieurs plasmides de type « F-like » liés ou associés à la présence de transposons. Par exemple, le gène *catI* est retrouvé sur le transposon Tn9 (Murray, I. A. and Shaw, W. V. 1997).

Le gène *floR* est porté par des plasmides et/ou des transposons (White, D. G. *et al.* 2000). Cependant, la séquence de l'ADN entourant le gène *floR* retrouvé chez *E. coli* montre des similitudes avec la séquence du plasmide RSF1010 séquencé chez *Pasteurella piscicida*. Ceci suggère que le gène de résistance au florfénicol et au chloramphénicol retrouvé chez *E. coli* vient d'un transfert entre deux espèces d'un plasmide ayant une spécificité d'hôte étendue (White, D. G. *et al.* 2000). De plus, une étude récente a démontré l'existence de ce gène sur le chromosome de certaines souches *E. coli* (Doublet, B. *et al.* 2002). Ceci peut être expliqué par le fait que différents sites d'intégration aux transposons existent sur le chromosome de la bactérie.

Utilisation du chloramphénicol

Du fait de sa toxicité, le chloramphénicol n'est employé chez l'humain qu'en cas de sévères infections, où ses qualités pharmacocinétiques de diffusion tissulaire, de concentration dans la lymphe et de pénétration intracellulaire, le rendent encore indispensable. Le traitement des salmonelloses systémiques, des méningites à *Haemophilus influenzae* et des mélioïdoses peut justifier l'usage du chloramphénicol (Neuman, M. 1990).

L'usage du chloramphénicol en médecine vétérinaire est limité. C'est à cause de sa toxicité chez l'humain que l'usage du chloramphénicol chez les animaux destinés à la consommation humaine est maintenant banni, mais reste toujours accepté pour les animaux de compagnie et pour le traitement d'infections systémiques à *Salmonella*, d'infections profondes de l'œil et d'infections causées par des bactéries anaérobies (Prescott, J. F. *et al.* 2000).

6.5 La triméthoprime

La triméthoprime est un agent antimicrobien synthétique appartenant au groupe des composés diaminopyrimidine (Skold, O. 2001). Cet agent a été utilisé pour la première fois en 1962 en

Angleterre. La triméthoprine interfère de façon spécifique avec l'enzyme bactérienne, la dihydrofolate réductase (DHFR). La triméthoprine a une structure analogue à la dihydrofolate, ce qui lui permet d'être en compétition avec celle-ci pour la DHFR. Ceci empêche la réduction de la dihydrofolate en tétrahydrofolate (Huovinen, P. *et al.* 1995) qui est nécessaire pour la synthèse de la thymine (Skold, O. 2001). Il est à noter que l'enzyme DHFR humaine est naturellement résistante à la triméthoprine. Ceci a été démontré par des études en cristallographie aux rayons-X. Ces études ont montré que la triméthoprine s'intégrait bien dans le site de liaison aux nucléotides de la DHFR bactérienne, mais aucunement à la DHFR des mammifères (Matthews, D. A. *et al.* 1985).

Puisque la triméthoprine est un agent antimicrobien synthétique, une résistance bactérienne à cet agent n'avait pas été considérée possible. Par contre, 16 gènes exprimant une DHFR résistante à la triméthoprine sont maintenant décrits chez différentes espèces bactériennes (Skold, O. 2001).

Mécanismes d'action de la résistance

La résistance à la triméthoprine chez les entérobactéries est devenue problématique vers les années 1983 et 1984. Avant cela, moins de 4% des isolats d'entérobactéries étaient résistants.

Le mécanisme le plus commun de résistance à la triméthoprine chez les entérobactéries est la production d'un plasmide qui produit une DHFR additionnelle et qui, contrairement à l'enzyme chromosomique, est beaucoup moins sensible à la triméthoprine. Seize enzymes procurant une résistance à la triméthoprine ont été identifiées et caractérisées. Celles-ci ont été regroupées en deux groupes selon leur homologie de séquences. Le plus grand de ces deux groupes contient les gènes que l'on retrouve le plus fréquemment et les enzymes de « type I-like », qui inclut *dhfrI*, *dhfrIb*, *dhfrV*, *dhfrVI* et *dhfrVII* (Huovinen, P. *et al.* 1995). Une des caractéristiques de ces enzymes est qu'elles portent un cadre de lecture ouvert (ORF) de 157 acides aminés (Huovinen, P. *et al.* 1995).

En plus de la présence de gènes de résistance pouvant être acquis par la bactérie, il existe des résistances dues à des mutations dans le gène codant pour la DHFR chromosomique.

Certaines de ces mutations provoquent une hyperproduction d'enzymes, jusqu'à cent fois plus que normalement, avec une baisse de l'affinité pour la triméthoprine (Flensburg, J. and Skold, O. 1987). Un autre type de mutation au niveau du chromosome a été observé. Elle fait en sorte que la bactérie est totalement dépendante de l'approvisionnement externe en thymines, ce qui lui confère ainsi une résistance à la triméthoprine (King, C. H. *et al.* 1983).

Distribution et mobilité des gènes de résistance

La majorité des gènes de résistance *dhfr* sont retrouvés sous forme de cassettes. La probabilité de retrouver les gènes de résistance à la triméthoprine sur les intégrons de classe 1, qui contiennent normalement à leur extrémité 3' le gène de résistance *sulI* (résistance aux sulfamides), est favorisée par l'usage combiné de la triméthoprine-sulfamides comme traitement. Ceci exerce une sélection pour la résistance à ces deux agents antimicrobiens.

L'émergence des gènes de résistance à la triméthoprine parmi les bactéries pathogènes découle de la facilité de recrutement de ces gènes par des événements de transfert entre les bactéries. Le gène le plus souvent retrouvé parmi les bactéries à Gram-négatif semble être *dhfrI*. Le fait qu'on le retrouve, dans la majorité des cas, sous forme de cassettes intégrées dans les intégrons de classe 1 et de classe 2, peut expliquer son émergence parmi ces bactéries (Skold, O. 2001). L'intégron de classe 2 est retrouvé sur le transposon Tn7. Celui-ci s'insère facilement et à fréquence élevée dans le chromosome de plusieurs espèces bactériennes (Skold, O. 2001).

Un autre type de transposon a été observé chez des isolats de porcs (Jansson, C. and Skold, O. 1991). Le gène *dhfrIX* a été retrouvé chez plusieurs isolats *E. coli* provenant de porcs, mais très rarement dans des isolats provenant d'humains (Jansson, C. *et al.* 1992). Ce gène semble être porté par un transposon de type Tn3 en plus de s'apparenter au transposon Tn5393 d'*Erwinia* spp.

Utilisation de la triméthoprine

La triméthoprine est un agent antimicrobien utilisé le plus souvent en combinaison avec le sulfaméthoxazole dans le traitement d'infections causées par des bactéries à Gram-négatif.

Par contre, récemment, une augmentation de la résistance chez *E. coli* aux triméthoprime-sulfaméthoxazole, utilisé en premier recours contre les UTI, a été remarquée (Kahlmeter, G. 2000). En 1970, la triméthoprime était employée seule sous forme prophylactique, puis comme traitement des infections urinaires sévères (Huovinen, P. *et al.* 1995). En plus de son utilisation pour le traitement des infections urinaires, la combinaison triméthoprime-sulfamides peut être utile contre les shigelloses ainsi que contre certaines infections respiratoires et à staphylocoques (Huovinen, P. *et al.* 1995).

6.6 Les sulfamides

Les premiers agents antimicrobiens qui ont été utilisés pour leurs propriétés thérapeutiques sont les sulfamides. Des tests d'efficacité de ces agents ont été faits en 1932 sur des souris infectées par *Streptococcus pyogenes* dans la cavité abdominale. Cette expérience a été publiée en 1935 par Gerhard Domagk.

Les sulfamides sont des agents antimicrobiens de nature synthétique qui possèdent une analogie de structure avec l'acide *p*-aminobenzoïque (PABA) impliqué dans la biosynthèse de l'acide folique (Skold, O. 2001). Les sulfamides sont en compétition avec l'enzyme la dihydroptéroate synthase (DHPS) qui catalyse la dernière réaction menant à l'obtention de l'acide dihydrofolique et qui implique la condensation du PABA et du 7,8-dihydro-6-hydroxyméthylpterine-pyrophosphate en acide dihydroptéroïque (Skold, O. 2001). Ces agents ne peuvent donc pas attaquer les cellules eucaryotes, car elles ne produisent pas d'acide folique. Les sulfamides ont donc une action bactériostatique très sélective. Puisque les sulfamides sont des agents antimicrobiens synthétiques, une résistance bactérienne à cet agent n'avait pas été considérée comme étant possible. Toutefois, la résistance aux sulfamides est apparue chez les bactéries pathogènes un peu après son introduction en milieu hospitalier vers les années 40 (Skold, O. 2001).

Mécanisme d'action de la résistance

Les plasmides qui amènent la résistance aux sulfamides portent des variants des gènes codant pour l'enzyme dihydroptéroate synthase chromosomiques. Deux gènes codant pour une

dihydroptéroate synthase résistante aux sulfamides sont connus, *sull* et *sulll* (Sundstrom, L. *et al.* 1988; Radstrom, P. and Swedberg, G. 1988).

Les deux enzymes codées par les gènes de résistance ont des limitations structurales importantes qui empêchent une bonne liaison avec l'inhibiteur, les sulfamides, mais ne les empêchent pas de se lier à leur substrat, le PABA. Bien qu'elles résistent à des concentrations très fortes de sulfamides, les dihydroptéroate synthase résistantes produites par les gènes *sull* et *sulll* montrent toutes les deux un K_m très faible ($0.6\mu\text{M}$) pour le PABA, (Skold, O. 2001). De plus, l'enzyme du gène *sulll* semble avoir une acuité particulière au PABA qui permet sa distinction de l'inhibiteur (Skold, O. 2001).

Des mutations chromosomiques ont été rapportées, ce qui peut éventuellement affecter la sensibilité de la souche aux sulfamides. On note, entre autre, un changement dans le gène *folP* codant pour la dihydroptéroate synthase (Skold, O. 2000).

Distribution et mobilité de la résistance

Le gène *sull* est souvent retrouvé avec d'autres gènes de résistance sur l'intégron de classe 1, tandis que *sulll* est plutôt localisé sur un petit plasmide de type *incQ* (RSF1010) ou pBP1 (van Treeck, U. *et al.* 1981). Ces gènes sont habituellement retrouvés à la même fréquence dans les isolats cliniques à Gram-négatif (Radstrom, P. *et al.* 1991). L'origine de ces gènes n'est pas connue. Chez les bactéries à Gram-négatif, seulement deux plasmides portant ces deux gènes, *sull* et *sulll*, ont été décrits (Skold, O. 2001). Probablement que ceci est dû au fait, qu'en plus d'avoir un K_m très faible pour le PABA, ces deux gènes sont localisés sur des véhicules de dissémination très efficaces. Les deux enzymes montrent 57% d'identité en acides aminés (Huovinen, P. *et al.* 1995).

Utilisation des sulfamides

Les sulfamides sont des agents antimicrobiens à large spectre d'action incluant la plupart des bactéries pathogènes causant des UTI (*E. coli*, et autres membres des entérobactéries), les pathogènes du système respiratoire (*Streptococcus pneumoniae* et *Haemophilus influenzae*), les pathogènes de la peau (*Staphylococcus aureus*), en plus que certains pathogènes

entériques (*E. coli*, *Shigella* spp.) (Huovinen, P. *et al.* 1995). À cause de l'éventail des possibilités d'indications cliniques, les sulfamides sont souvent utilisés en combinaison avec la triméthoprine. De plus, les deux composés sont relativement peu coûteux, ce qui permet leur utilisation dans les pays en voie de développement.

7.0 Contrôle de la résistance antimicrobienne

La surveillance de la résistance bactérienne aux agents antimicrobiens est nécessaire afin limiter l'apparition de celle-ci. L'isolement physique, le contrôle de l'infection ou une meilleure hygiène, ainsi que de choisir l'agent antimicrobien à utiliser dans le traitement de l'infection selon le résultat de l'antibiogramme, sont des moyens permettant de limiter l'émergence de la résistance bactérienne. De plus, la caractérisation de la résistance bactérienne permet de procéder avec efficacité.

La caractérisation de la résistance aux agents antimicrobiens chez les bactéries peut se faire par différents moyens. Présentement, différents tests de microbiologie traditionnels tels que la diffusion des disques en gélose, la dilution en bouillon, la dilution en agar et le gradient de diffusion, sont utilisés afin de déterminer le phénotype de résistance aux agents antimicrobiens (Aarts, H. J. *et al.* 2001). Les bactéries doivent être isolées et mises en culture avant ces tests. La détection des gènes de résistance aux agents antimicrobiens peut être accomplie par une amplification PCR dont la cible est l'ADN et où, le résultat est visualisé sur un gel d'agarose. L'hybridation avec sondes radioactives sur filtre est aussi une méthode permettant de déterminer la présence de certains gènes de résistance et ainsi, permettre la caractérisation génotypique de la résistance bactérienne. La majorité de ces tests demandent plusieurs étapes, les manipulations peuvent être complexes et peu reproductibles ou demandent beaucoup de temps (Aarts, H. J. *et al.* 2001).

Dans certains cas, la détermination du phénotype de résistance des bactéries peut ne pas être suffisante. L'identification des gènes de résistance aux agents antimicrobiens, dans ces cas, permet une analyse plus complète. À ce niveau, les méthodes génétiques interviennent et deviennent indispensables lors d'études épidémiologiques.

SECTION II – Méthodologie et résultats

Article I :

Characterization and detection of antimicrobial resistance genes in enterotoxigenic

***Escherichia coli* O149: K91 isolated from pigs over a 23-year period**

(Accepté par Antimicrobial Agents and Chemotherapy, publication prévue en octobre 2003)

Characterization and detection of antimicrobial resistance genes in enterotoxigenic
Escherichia coli O149: K91 isolated from pigs over a 23-year period

Running title

Characterization of antimicrobial resistance in ETEC

Christine Maynard¹, John M. Fairbrother¹, Sadjia Bekal², François Sanschagrin³, Roger C. Levesque³, Roland Brousseau², Luke Masson², Serge Larivière¹ and Josée Harel^{1*}

¹Département de Pathologie et Microbiologie, Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Montréal, Saint-Hyacinthe, Québec, Canada, J2S 7C6, ²Biotechnology Research Institute, Montréal, Québec, Canada, H4P 2R2, ³ Pavillon C.- E. Marchand, Université Laval, Québec, Québec, Canada, G1K 7P4,

*Corresponding author. Mailing address: Département de Pathologie et Microbiologie, Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Montréal, 3200, rue Sicotte, C. P. 5000, Saint-Hyacinthe, Québec, Canada, J2S 7C6. Phone: 450 773 8521 ext. 8233. Fax 450 778 8108. E-mail: [REDACTED]

ABSTRACT

A total of 112 *Escherichia coli* O149: K91 strains isolated from pigs with diarrhea in Quebec between 1978 and 2000 were characterized for their genotypic antimicrobial resistance profile. Among the ten antimicrobial agents tested, resistance was most frequent for tetracycline and sulfonamides, but absent with cefotaxime and ceftiofur. An increase in the number of isolates resistant to at least three antimicrobials was observed over time. The distribution of 28 resistance genes covering six antimicrobial families (beta-lactams, aminoglycosides, chloramphenicol, tetracycline, trimethoprim and sulfonamides) was assessed by colony hybridization. Significant differences in the distribution of tetracycline (*tet(A)*, *tet(B)*, *tet(C)*), trimethoprim (*dhfrI*, *dhfrV*, *dhfrXIII*), and sulfonamide (*sulI*, *sulII*) resistance genes were observed in the study period (1978-2000). Sixty percent of the isolates possessed a class 1 integron illustrating the importance of integrons in the epidemiology of antibiotic resistance in *E. coli* isolated from pigs. Amplification of the integron's variable region resulted in four distinct fragment sizes of 1, 1.3, 1.6, 1.8-kb with the 1.6 and 1.8-kb fragments only appearing in the last half of the study period. Examination of linkages among the different resistance genes showed a variety of positive and negative associations. Association analysis of isolates divided into two groups between 1978-1989 and 1990-2000, revealed the appearance of new positive resistance gene associations. Our genotypic resistance analyses of ETEC isolates from pigs clearly indicate that the many of the antibiotic resistance genes behind phenotypic resistance are not static but rather in a state of flux driven by various selection forces such as the use of specific antimicrobials.

INTRODUCTION

Enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) is an important swine pathogen causing diarrhea in newborn and postweaning pigs. ETEC of serotype O149: K91 has been found more frequently in recent years and is the predominant serotype universally associated with diarrhea in pigs (3, 19, 31). ETEC are also found associated with several other serogroups, O8, O9, O20, O101, O138 and O141 (15). Despite this limited number of serogroups, ETEC shows diversity of genetic background (38). With the worldwide progressive increase in antimicrobial resistance of *E. coli* isolates, treatment of postweaning diarrhea has become increasingly difficult. In Quebec, aminopenicillins, chlortetracycline and trimethoprim-sulfonamides and to a less extent, the aminoglycosides neomycin and apramycin, are the usual antimicrobials used to treat diarrhea; however, with the appearance of increased antimicrobial resistance, the third generation cephalosporin, ceftiofur, is seeing increased usage (3).

The dissemination of antibiotic resistance genes among bacterial strains is an increasing problem in infectious diseases. Many antibiotic resistance genes are located on plasmids and/or on transposons, enabling their transfer among a variety of bacterial species. In recent years, another mechanism of resistance gene dissemination has been discovered, involving a DNA element that mediates the integration of resistance genes by a site-specific recombinational mechanism. This newly recognized DNA element, called an integron, is found either as part of a transposon within the Tn21 family or independently on several groups of broad-host-range plasmids. Class 1 integrons possess two conserved segments separated by a variable region (VR) which includes integrated antibiotic resistance genes or cassettes of unknown function (45). The 3'-conserved segment contains the *qacEΔ1* and *sull* genes and an open reading frame (ORF) called *orf5*. The *qacEΔ1* and *sull* genes determine resistance to ethidium bromide and quaternary ammonium compounds and to sulfonamide, respectively (45).

Hence, a study to analyze the evolution of different antimicrobial resistance phenotypes in ETEC O149: K91 strains isolated from clinical cases of diarrhea and other intestinal disorders in piglets from 1978 to 2000 (F. Fontaine, N. Nadeau, S. D'Allaire, S. Péres and J. M. Fairbrother, unpublished data), revealed an increase in the number of antimicrobial multiresistant strains in a bacterial population with time. In the present study, these same ETEC O149: K91 strains were characterized for their genotypic resistance gene profiles. Our findings show that during the 23-year study period, antimicrobial resistance gene

distribution among *E. coli* O149: K91 isolates is dynamic and the observed increases in phenotypic resistance correlated with an increase in multigene resistance.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains and growth conditions. Numerous *E. coli* isolates from diseased animals are sent to The *E. coli* Laboratory at the Faculté de médecine vétérinaire, at Saint-Hyacinthe, for serotyping and virulence factor determination (11). For our study, we selected all the ETEC isolates in this collection that came from pigs with diarrhea, belonged to serogroup O149: K91, contained virulence factors typically associated with the ETEC pathotype (e.g. *sta*, *stb*, F4, Lt, etc) and were resistant to one of the antimicrobial for which resistance genes were tested. In order to minimize any selection bias, only one isolate per farm was selected. The farms from which the isolates were obtained were distributed throughout the various regions of the Province de Quebec. After excluding 21 isolates which were susceptible to all antimicrobials tested, the remaining 112 ETEC which were obtained over a 23-year period, were divided into four groups based on the year of their isolation: 1978 to 1984, 1985 to 1989, 1990 to 1994 and 1995 to 2000. The reference strain, *Escherichia coli* ATCC[®] 25922, was used to test each lot of antimicrobial agents by the disc diffusion method. The bacterial strains, kept at -80°C in tryptic soy broth (TSB) medium containing 10% glycerol, were cultured on tryptic soy agar (TSA) supplemented with 5% (v/v) sheep blood.

The 28 strains used as positive controls and templates for DNA amplification were obtained from different laboratories (Table 1). These strains were kept at -80°C as frozen stocks in tryptic soy broth (TSB) medium containing 10% glycerol (v/v) and were propagated on Luria Bertani (LB) broth or agar containing one of the following antimicrobial agents at the appropriate concentrations: ampicillin (50 µg/ml), gentamicin (30 µg/ml), kanamycin (50 µg/ml), tetracycline (10 µg/ml), chloramphenicol (10 µg/ml), trimethoprim (10 µg/ml); sulfamethazine (200 µg/ml).

Antimicrobial susceptibility testing. Antimicrobial susceptibility testing was carried out by the disc diffusion method according to the recommendations reported by the National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) (33). As recommended by the NCCLS, Mueller-Hinton (MH) agar batches used as the culture medium were tested. The antimicrobial agent discs used in this study were: beta-lactams: ampicillin (10 µg), ceftiofur (30 µg), cefotaxime (30 µg); aminoglycosides: gentamicin (10 µg), kanamycin (30 µg), neomycin (30 µg); tetracycline (30 µg); chloramphenicol (30 µg); trimethoprim (5 µg); sulfaminoxazole (250 µg) (BBL, Bristol, CT, USA.).

The zone diameters were interpreted using the NCCLS recommendations except for neomycin, for which the breakpoints used were those recommended by the manufacturer. In

the case of trimethoprim, interpretation of the zone diameters was according to the method used for enterobacteria obtained from the urinary tract in the NCCLS recommendations.

PCR primers and amplification. Resistance gene primers were designed using the GCG software program "Prime" (Genetics Computer Group, Madison, WI, USA). Oligonucleotide primers were synthesized with a model DNA Synthesizer (BioCorp Inc., Ontario, Canada). The PCR primers, their amplified product size as well as the references for the corresponding strains used as amplification templates are listed in Table 1. The class 1 integron is characterized by the *qacEΔ1* and *sull* genes at its 3'-conserved segment (41). Primers located at the 3'-conserved segment were used as described by Sandvang *et al* (47) to investigate the presence of the class 1 integron (Table 1).

Amplifications were performed on 5 µl of supernatant from bacterial preparations boiled for 10 min (8). The PCR reaction mix (total 50 µl) included 29.6 µl H₂O, 5.0 µl of 10X PCR buffer (Amersham Pharmacia Biotech Inc., Piscataway, NJ, USA), 5.0 µl of dNTP 2 mM, 1 U of Taq polymerase (Amersham Pharmacia Biotech Inc.) and 25 pmol of each primer. DNA amplification was carried out in a GeneAmp[®] PCR system 9700 (Perkin-Elmer, Foster City, CA, USA) using the following conditions: 5 min at 94°C followed by 30 cycles of 94°C for 30 sec, 50°C for 30 sec and 72°C for 1,5 min. A sample of 3 µl of the PCR product was verified for size and purity by gel electrophoresis (1.2 % (w/v) agarose in 1X TAE buffer).

All isolates that contained the 3'-conserved segment of the class 1 integron were further investigated by another PCR amplification of a variable region (VR) within the integron using the following primers described by Sandvang *et al* (27) (Table 1). Amplification conditions for these primers were as follows: 5 min at 94°C followed by 35 cycles of 94°C for 1 min, 50°C for 1 min and 72°C for 5 min.

DNA sequencing. Amplified products were purified using the QIAquick gel extraction kit (QIAGEN Inc., Mississauga, Ontario, Canada). Their sequences were confirmed with the dRhodamine Terminator Cycle Sequencing Ready reaction Kit using an Applied Biosystem 377 DNA sequencer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Sequence comparisons were submitted to the National Center for Biotechnology Information (Bethesda, Md) for BLAST searches in GenBank. Multiple DNA alignments were performed by using the CLUSTALW program (32).

Colony hybridization. The amplicons were labelled with $\alpha P^{32}CTP$ using the DNA labelling beads kit (Amersham Pharmacia Biotech Inc.). Colony hybridizations were performed as previously described (11).

Statistical methods. Comparisons of association between resistance genes in the total population were made by using Pearson chi-square's exact test (SAS, version 8.2, CARY, N.C.). The statistical significance was $P < 0.05$. An association between two genes can be positive indicating that the genes are found together or negative indicating that the genes are not found together.

RESULTS

Antimicrobial resistance phenotype characteristics. Almost all (93%) of the 112 isolates were resistant to tetracycline, and a similar number (91%) were resistant to sulfonamides. The percentage of resistance to ampicillin, neomycin, kanamycin, chloramphenicol and to trimethoprim ranged from 21 to 38%, whereas only 14% isolates were resistant to gentamicin (Table 2). Finally, none of the tested isolates was resistant to cefotaxime or ceftiofur. Some isolates demonstrated a zone of inhibition at the limit (zone between resistance and susceptibility) to aminoglycosides, tetracycline and sulfonamides. To facilitate our analysis, these isolates were considered as resistant in our study.

As shown in Table 2, the percentage of multiresistance increased over time for certain antimicrobials. Between 1978 and 1984, the percentage of isolates resistant to neomycin, kanamycin, tetracycline and sulfonamides was already quite high. The resistance to ampicillin, gentamicin, chloramphenicol and trimethoprim showed the greatest increases in the last period (1995-2000). The percentage of strains resistant to at least three antimicrobials isolated in the periods between 1978-1984, 1985-1989, 1990-1994 and 1995-2000, were 44%, 31%, 68% and 83% respectively (data not shown).

Distribution of resistance genes in O149: K91 ETEC isolates. The choice of the resistance genes to be studied was based on their relative importance as observed in resistant *E. coli* isolates (5, 6, 13, 20, 21, 27, 35). Therefore, 28 genes coding for antimicrobial resistance, belonging to six antimicrobial families (beta-lactams, aminoglycosides, tetracycline, phenicols, trimethoprim and sulfonamides), were chosen to determine their distribution in O149: K91 ETEC isolates from pigs with diarrhea (Table 1).

(i) Beta-lactams. The DNA hybridization probes *bla*_{TEM} and *bla*_{SHV} detect all the known variants within the corresponding *bla*_{TEM} and *bla*_{SHV} gene families on colony hybridization. The probe *bla*_{OXA-7} detects *bla*_{OXA} variants such as *bla*_{OXA-10} to *bla*_{OXA-14}, *bla*_{OXA-16} to *bla*_{OXA-19}, *bla*_{OXA-28}, *bla*_{OXA-31}, *bla*_{OXA-35} (80% to 96% of similarity) and *bla*_{PSE-2} (96.3% of similarity). To further discriminate variants among the *bla*_{OXA-7} hybridization-positive isolates, a PCR-amplification was undertaken using the *bla*_{OXA-7} specific primers. All the 112 studied isolates possessed at least one of the tested resistance genes.

Eighty-six percent of the ampicillin-resistant isolates and all the *bla*_{SHV}-positive isolates were *bla*_{TEM}-positive. The *bla*_{OXA-1} gene was only found in 25% of ampicillin-resistant isolates isolated during the third period (1990-1994). None of the tested isolates were positive for the *bla*_{CTX-M-3}, *bla*_{PSE-4} or *bla*_{OXA-7} probes. One of the 69 isolates susceptible to

beta-lactams hybridized with *bla*_{TEM} and four isolates resistant to ampicillin did not possess any of the tested beta-lactam genes .

(ii) Aminoglycosides. Of the five tested aminoglycoside resistance genes, only *aph(3')-Ia*, *aph(3')-IIa* and *aac(3)-IV* were found among the resistant isolates (Table 3). The *aph(3')-Ia* and *aph(3')-IIa* genes, encoding a kanamycin and a neomycin resistance phenotype, were found in 87% and 15% of the neomycin-resistant isolates and in 79% and 19% of the kanamycin-resistant isolates, respectively. The relative importance of *aph(3')-Ia* and *aph(3')-IIa* varied throughout the studied periods (1978-2000). Two isolates harbouring the *aph(3')-Ia* gene were susceptible to kanamycin and neomycin. Only one gentamicin resistance gene, *aac(3)-IV*, was found among the isolates. Seventy-five percent of the gentamicin-resistant isolates and two gentamicin susceptible isolates had this gene.

(iii) Tetracycline. Of the six targeted tetracycline resistance genes, only the *tet(A)*, *tet(B)* and *tet(C)* genes were detected. The *tet(B)* gene was found in 80% of the tetracycline-resistant isolates and was by far the most frequently observed gene found during the first three periods. Only 25% tetracycline-resistant isolates were positive for the *tet(A)* and *tet(C)* probes over the whole study period. These two genes, less prevalent in the first periods (< 15%), appeared even slightly more frequently (54%) than *tet(B)* (51%) between 1995 and 2000 (Table 3). An association between the *tet(A)* and *tet(C)* genes was observed in all the *tet(A)*-positive isolates and only 5% of the *tet*-positive isolates possessed all three tetracycline resistance genes. No link between these genes and phenotype was observed in four isolates: two of the 8 isolates susceptible to tetracycline were *tet(B)*-positive and two of the 104 tetracycline-resistant isolates were negative for the six tested *tet* genes.

(iv) Phenicol. Only the chloramphenicol resistance genes *catI* and *floR* were detected among the tested isolates. On one hand, the gene *catI* was found in 79% of the chloramphenicol-resistant isolates. The *floR* gene was not detected in chloramphenicol-resistant isolates. Three chloramphenicol susceptible isolates were positive for the *catI* probe and one strain isolated in 1989 was *floR*-positive but was chloramphenicol susceptible. Four of the 24 chloramphenicol-resistant isolates did not hybridize with the tested *cat* genes.

(v) Trimethoprim. In our study, the trimethoprim resistance phenotype was found to be associated with the presence of three genes, *dhfrI*, *dhfrV* and *dhfrXIII*. These genes were not detected in strains isolated from 1978 to 1984. The genes *dhfrI* was detected in strains isolated in the second period (1985-1989), whereas *dhfrXIII* appeared in the third one (1990-1994). All three trimethoprim resistance genes were found among the strains isolated in the

last period with a predominance of *dhfrV*. Among the trimethoprim-resistant isolates, three were negative for the tested genes whereas one susceptible isolate was found to be *dhfrXIII*-positive.

(vi) Sulfonamides. Seventy-nine percent of sulfonamide-resistant isolates possessed the gene *sulI* as compared to 36% that possessed *sulIII* (Table 3). Seventeen percent of these resistant isolates possessed both *sulI* and *sulIII*. The percentage of the positive isolates to *sulI* did not vary significantly during any of the periods. However, the percentage of *sulIII*-positive isolates increased significantly to 56% in the last period. No correlation between the presence of sulfonamide resistance genes and phenotype was observed for six isolates. Four of the 10 sulfonamide-susceptible isolates were *sulI*-positive, whereas two of the 102 sulfonamide-resistant isolates were found to be *sulI*- and *sulIII*-negative.

Identification of integrons. Of the 112 isolates, 67 (60%) amplified a PCR fragment from the class 1 integron 3'-conserved region (Table 4). Among these positive isolates, 84% were also positive for a *sulI* probe by colony hybridization (data not shown). Among the 67 class 1 integron-positive isolates, four distinct amplicons of 1, 1.3, 1.6 and 1.8-kb were obtained by amplification of the variable region (VR) using the primers Fint1 and Rint1. More specifically, more than half of the isolates (55%) amplified a 1.3-kb VR fragment, followed by 29% amplifying a 1-kb fragment. The remaining 16% of the isolates produced fragments larger than 1.3-kb. The percentage of isolates exhibiting the larger 1.6 and 1.8-kb amplified VR fragments increased over time. Before 1990, none of the class 1 integron-positive isolates had a VR fragment larger than 1.3-kb. However, a larger VR fragment appeared in one (6%) of such isolates in the period 1990-1994, and the frequency of isolates with larger VR fragment increased to 50% in the latest period, 1995-2000.

Two representative VR fragments of each length were sequenced. Both VR fragments of the same length contained the same gene cassettes with more than 95% of similarity. The 1-kb VR fragment contained the *ant(3'')-Ia* (*aadA1*) gene cassette (accession no. X12870) encoding for streptomycin and spectinomycin resistance. The most frequently observed VR amplified fragments (i.e. 1.3-kb) contained, in addition to the *ant(3'')-Ia* gene cassette found in the 1-kb fragment, an orf named orfD (accession no. M86913 and AF140629). The 1.6-kb VR fragments contained two gene cassettes, *dhfrIb*, encoding for resistance to trimethoprim, and *ant(3'')-If* (*aadA6*), encoding for resistance to streptomycin and spectinomycin (accession no. AF393510 and AF140629). Finally, the 1.8-kb VR fragments possessed two gene cassettes, *dhfrXII* and *ant(3'')-If*, which confer a resistance to trimethoprim and a resistance to

streptomycin and spectinomycin, and one orf named orfF (accession no. Z21672 and AF284063).

Association between resistance genes. In order to see possible associations between resistance genes found among our isolates and if the co apparition of some resistance genes was statistically confirmed, the comparison of association was done using Pearson chi-square's exact test. Significant associations with respect to the occurrence of individual resistance genes among the whole collection of ETEC isolates were detected ($P < 0.05$) (Table 5). Some positive associations were obvious; for example, the association of *bla*_{TEM} and *bla*_{SHV} as well of *tet*(A) and *tet*(C) genes. The *bla*_{TEM} gene was associated with the *aph*(3')-Ia, *aac*(3)-IV, *dhfr*V, and *cat*I genes and also, although less strongly, associated with the *sul*II gene (Table 5). The *aac*(3)-IV gene showed a positive association with *bla*_{TEM} and *bla*_{SHV}, and also with *aph*(3')-Ia, *dhfr*V, and *dhfr*XII. The *aph*(3')-IIa gene was positively associated with *tet*(A) and *tet*(C) but negatively associated with *tet*(B). In contrast, the *sul*I gene was positively associated with *tet*(B) but negatively associated with the *tet*(A) and *tet*(C) genes. Although the class 1 integron was found together with the *sul*I gene in 68% of the *sul*I-positive isolates, no statistical association was observed between the presence of class 1 integron and *sul*I. Probably this no correlation is due to the presence of *sul*I in integron-negative isolates.

The association analysis was subsequently performed on the collection of isolates divided into two groups, group 1 representing those strains isolated between 1978 and 1989 and group 2 representing those isolated between 1990 and 2000 (data not shown). In the period 1990 to 2000, new positive associations were observed, such as *bla*_{TEM} with *bla*_{SHV}, *sul*I with *tet*(A), *tet*(B), *tet*(C) and the class 1 integron, and finally *cat*I with the class 1 integron. Some positive associations appeared more closely linked than previously observed in the whole collection; for example *bla*_{TEM} with *aph*(3')-Ia, *aac*(3)-IV and *dhfr*XIII with *sul*II.

DISCUSSION

ETEC is the most common bacterial etiologic agent of diarrhea in neonatal and postweaning pigs. Although treatment of enteric *E. coli* infection in swine commonly includes the use of antimicrobials (2, 10), relatively few studies have been directed towards the characterization of genotypic resistance profiles of *E. coli* strains isolated from animals. One study characterized the tetracycline and sulfonamides resistance gene profiles of *E. coli* isolated from animals and humans (17) while a second (27) characterized the aminoglycoside resistance gene profiles of porcine and bovine *E. coli* isolates. In the present study, ETEC O149: K91 strains isolated from pigs between 1978 and 2000 were characterized for their acquired resistance gene profiles against ten different antimicrobial agents.

In this study, phenotypic resistance was overestimated because only isolates showing initial resistance to one antimicrobial were further analyzed. Nevertheless, it remains that the phenotypic resistance observations reported here reflect the general trend observed with *E. coli* isolated from pigs (3, 19, 31). Although we did not test for all the antimicrobials which could inhibit growth of *E. coli* (other aminoglycosides, quinolones/fluoroquinolones, colistin) most of the resistant isolates were resistant to more than one antimicrobial, especially during the last period (1995-2000). No resistance to cephalosporins (ceftiofur and cefotaxime) was observed.

The resistance to tetracycline and sulfonamide antimicrobials observed in most of our ETEC isolates was also noted by other groups in pig isolates (17, 31). It is not surprising that the level of resistance of isolates to these antimicrobials was so high, as these antimicrobials have been and are still being used as growth promoters in Canada and USA, in disease prevention and in therapy in swine production (12). Among the tetracycline-resistant isolates, the *tet(B)* gene was largely predominant until 1994 when two other closely associated tetracycline resistance genes, *tet(A)* and *tet(C)*, became dominant during the last study period (1995-2000). Another study done on pigs from three herds with different histories of antimicrobial exposure produced similar results in that *tet(B)* was predominant in two of the herds exposed to antimicrobials and when present, *tet(A)* and *tet(C)* were also found together (18). In contrast, a recent study by Lanz *et al* (17) showed that the *tet(A)* gene alone was the most prevalent *tet* gene in *E. coli* isolates from pig with diarrhea or enterotoxaemia. The mode of action as well as the specificity of certain antimicrobial enzymes could exert positive selection pressure and contribute to the emergence of new genes over time. For example, class A, B and C tetracycline-resistant determinants are efflux pumps with different specificities.

Most of the efflux proteins confer resistance to tetracycline but not to minocycline or glycylicycline antimicrobial groups. In contrast, the *tet(B)* gene encodes for an efflux protein which confers resistance to tetracycline, doxycycline and minocycline but not glycylicycline (24). These specificities correlate with the emergence of the diverse distribution of different tetracycline resistance genes over time. It is not known if such a selective effect exists between the commonly used tetracyclines in swine production, i.e. oxytetracycline and chlortetracycline. Similarly, the *sulI* gene was more predominant than *sulII* in strains isolated during the three first periods, whereas, the *sulII* gene appeared as frequently as *sulI* in the last period (1995-2000). The predominance of *sulI* among pig isolates was also observed by Lanz *et al* (17). The *sulI* and *sulII* genes encode dihydropteroate synthase enzymes with different sensitivities (K_i), even if the two enzymes show the same low K_m values (0.6 μ M) for PABA which is implicated in the bacterial folic acid biosynthesis. The enzyme encoded by *sulII* discerns the normal PABA substrate from the inhibitor, the sulfonamides (29).

In spite of a ban on the use of chloramphenicol in food animals in Canada since 1980 (9), an increase of chloramphenicol resistance in ETEC isolates was observed. The persistence or increase of chloramphenicol resistance in *E. coli* has been observed by others in swine (3, 17, 31) and from other animal species (34). Resistance to chloramphenicol was closely associated with the presence of the *catI* gene. In a study done by Bischoff *et al* (7), only four out of 48 chloramphenicol-resistant isolates were harboring a *catII* gene; the relatively unknown gene, *cmlA*, was responsible for the resistance of the other isolates. Finally, we detected the *floR* gene in only one isolate. Other studies report the presence of *floR* in a large number of *E. coli* isolated from chickens and cattle (7, 16, 35).

Interestingly, 35% of the isolates were resistant to neomycin and 38% to kanamycin even though kanamycin is not used in the Canadian swine industry. It is likely the result of cross-resistance by most of the aminoglycosides resistance genes (34). Our study showed that certain antimicrobial resistance genes are more prevalent than others and that this incidence changed over time within the ETEC. The *bla*_{TEM} genes were widely distributed whereas the *bla*_{OXA} genes appeared infrequently. Among the genes tested in our ETEC isolates, only the aminoglycoside resistance genes revealed limited diversity with most prevalent genes being *aph(3')-Ia* and *aph(3')-IIa*. These genes, which are also responsible for cross resistance to different aminoglycosides (neomycin and kanamycin), did not vary in frequency over the duration of our study. In contrast, a Danish publication showed a varying frequency among

the aminoglycoside resistance genes with *ant(2'')-Ia* and *aac(3)-IIa* being the most prevalent among pig isolates (27).

One clear observation arising from our study is that the number and diversity of genes driving the phenotypic resistance is dynamic. During the 23-year period, some genes or association of genes appeared whereas other genes became more rare (Table 5). The association of the *bla_{SHV}* gene with *bla_{TEM}* could be explained by the fact that the *bla_{SHV}* gene might have been acquired in isolates harboring *bla_{TEM}* resulting in an increase of resistance to beta-lactams (4). We observed that the *tet(A)* and *tet(C)* genes were always found together. During the three first periods, *tet(B)* was the most prevalent tetracycline resistance gene. Incompatibility of plasmids carrying tetracycline resistance determinants could explain the existence of the negative associations between *tet(A)/tet(C)* and *tet(B)* (15).

Resistance genes are associated with mobile DNA such as plasmids, transposons and integrons which facilitates resistance gene distribution (14, 30). Most of the isolates (62%) possessed a class 1 integron. Because integrons are characterized by their integration of many different gene cassettes between insertion sites in the VR, site-specific insertion represents another mechanism driving the evolution of plasmids and transposons of gram-negative bacteria. In our *E. coli* collection, most class 1 integrons contained VRs of 1.3 and 1-kb. The VR of integrons found in Shiga toxin-producing *E. coli* (STEC) isolates showed similar sizes (36). Interestingly, an increase in VR length was observed in *E. coli* strains isolated during the last period, a phenomenon also observed by Schmitz *et al* (28). They showed that the VR of the class 1 integrons in human *E. coli* strains isolated in 1993 ranged from 0.65 to 1.8-kb and those isolated in 1999, from 0.75 to 3-kb, suggesting an accumulation of inserted gene cassettes into the class 1 integron among the ETEC isolates, due to selection by antimicrobials. In this study, most of the tested isolates which possessed the same length of VR appear to have acquired the same gene cassettes into their integron. However, genes responsible for the resistance to beta-lactams, tetracycline and chloramphenicol were not associated with class 1 integrons.

Multiple cassette insertions and more than 40 distinct cassettes have been identified among integrons (25). Among the class 1 integrons of the isolates, four different sizes of VR were detected (Table 4). Representatives of these VRs were sequenced. As in other studies, our study shows that the different gene cassettes of the integron VRs included genes encoding for aminoglycosides and/or trimethoprim resistance, which are the most frequently described antimicrobial resistance gene cassettes (1, 23, 26).

In the last period (1995-2000), we observed an increase in the number of isolates having multiple resistance genes as well as the appearance of resistance genes such as *aac(3)-IV*, *dhfrV*, and *sulIII*. These observed increases in resistance to the different antimicrobials are presumably due to increased selection pressure resulting from changed management styles, for example, the early medicated weaning of piglets introduced in early nineties. The direct use of antimicrobials can drive the co-selection of resistance genes. For example, the use of injectable oxytetracycline in cattle receiving in-feed chlortetracycline was associated with an increase in the incidence of resistance to chloramphenicol and sulfisoxazole (22). In our study, the association of *aac(3)-IV*, *catI* and *dhfrV*, encoding for resistance to gentamicin, chloramphenicol and trimethoprim, respectively, was observed and the incidence of these genes increased in a similar distribution over time. This suggests that the increased use of gentamicin or sulfa-trimethoprim in pig production could have co-selected for the resistance to chloramphenicol thus explaining the increase in chloramphenicol-resistant isolates, even though this antimicrobial agent has not been used in swine production since 1980.

In conclusion, our genotypic resistance analyses of ETEC isolates show that the genes behind phenotypic resistance are not static but rather in a state of flux driven by various selection forces such as the use of specific antimicrobials. Often, more than one gene was associated with a given phenotypic resistance. A different distribution of resistance genes was observed over time: an increase in multigene resistance correlating with the observed phenotypic multiresistance among ETEC O149: K91 strains. The difference observed with studies in other countries suggest that relative resistance genes frequencies not only vary over time within a population but also between populations of different geographical origins. This study reinforces the necessity of using genotypic resistance analyses in future epidemiology studies.

ACKNOWLEDGMENTS

We are very grateful to Guy Beauchamp for statistical analysis and to Kim Messier for phenotypic resistance characterization of isolates. We appreciate the technical assistance provided by the members of the Groupe de Recherche sur les Maladies du Porc (GREMIP).

This work was supported by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC), being part of a research work unit of the Canadian Research Network on Bacterial Pathogens of Swine grant 225155 and by the Fédération des Producteurs de Porcs du Québec (FPPQ).

REFERENCES

1. **Bass, L., C. A. Liebert, M. D. Lee, A. O. Summers, D. G. White, S. G. Thayer, and J. J. Maurer.** 1999. Incidence and characterization of integrons, genetic elements mediating multiple-drug resistance, in avian *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* **43**:2925-9.
2. **Bertchinger, H. U., and J. M. Fairbrother.** 1999. *Escherichia coli* Infections, p. 431-468. In B. E. Straw, S. D'Allaire, W. L. Mengeling, and D. J. Taylor (ed.), *Diseases of swine*, 8 ed. Iowa State University Press, Ames.
3. **Bischoff, K. M., D. G. White, P. F. McDermott, S. Zhao, S. Gaines, J. J. Maurer, and D. J. Nisbet.** 2002. Characterization of chloramphenicol resistance in beta-hemolytic *Escherichia coli* associated with diarrhea in neonatal swine. *J Clin Microbiol* **40**:389-94.
4. **Bradford, P. A., C. Urban, A. Jaiswal, N. Mariano, B. A. Rasmussen, S. J. Projan, J. J. Rahal, and K. Bush.** 1995. SHV-7, a novel cefotaxime-hydrolyzing beta-lactamase, identified in *Escherichia coli* isolates from hospitalized nursing home patients. *Antimicrob Agents Chemother* **39**:899-905.
5. **Bush, K., G. A. Jacoby, and A. A. Medeiros.** 1995. A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother* **39**:1211-33.
6. **Chopra, I., and M. Roberts.** 2001. Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiol Mol Biol Rev* **65**:232-60 ; second page, table of contents.
7. **CloECKaert, A., S. Baucheron, G. Flaujac, S. Schwarz, C. Kehrenberg, J. L. Martel, and E. Chaslus-Dancla.** 2000. Plasmid-mediated florfenicol resistance encoded by the *floR* gene in *Escherichia coli* isolated from cattle. *Antimicrob Agents Chemother* **44**:2858-60.
8. **Daigle, F., J. Harel, J. M. Fairbrother, and P. Lebel.** 1994. Expression and detection of *pap*-, *sfa*-, and *afa*-encoded fimbrial adhesin systems among uropathogenic *Escherichia coli*. *Can J Microbiol* **40**:286-91.
9. **Gilmore, A.** 1986. Chloramphenicol and the politics of health. *Cmaj* **134**:423, 426-8, 433-5.

10. **Hampson, D. J.** 1994. Postweaning *Escherichia coli* diarrhoea in pigs, p. 171-191. In C. L. Gyles (ed.), *Escherichia coli* in domestic animals and humans. CAB international, Guelph.
11. **Harel, J., H. Lapointe, A. Fallara, L. A. Lortie, M. Bigras-Poulin, S. Lariviere, and J. M. Fairbrother.** 1991. Detection of genes for fimbrial antigens and enterotoxins associated with *Escherichia coli* serogroups isolated from pigs with diarrhea. *J Clin Microbiol* **29**:745-52.
12. **Health Canada.** 2002. Uses of antimicrobial drugs in food animals, p. 53-67, Used of antimicrobials in food animals in Canada : Impact on resistance and human health. Health Products and food branch, Canada.
13. **Huovinen, P., L. Sundstrom, G. Swedberg, and O. Skold.** 1995. Trimethoprim and sulfonamide resistance. *Antimicrob Agents Chemother* **39**:279-89.
14. **Jacoby, G. A.** 1994. Extrachromosomal resistance in gram-negative organisms: the evolution of beta-lactamase. *Trends Microbiol* **2**:357-60.
15. **Jones, C. S., D. J. Osborne, and J. Stanley.** 1992. Enterobacterial tetracycline resistance in relation to plasmid incompatibility. *Mol Cell Probes* **6**:313-7.
16. **Keyes, K., C. Hudson, J. J. Maurer, S. Thayer, D. G. White, and M. D. Lee.** 2000. Detection of florfenicol resistance genes in *Escherichia coli* isolated from sick chickens. *Antimicrob Agents Chemother* **44**:421-4.
17. **Lanz, R., P. Kuhnert, and P. Boerlin.** 2003. Antimicrobial resistance and resistance gene determinants in clinical *Escherichia coli* from different animal species in Switzerland. *Vet Microbiol* **91**:73-84.
18. **Lee, C., B. E. Langlois, and K. A. Dawson.** 1993. Detection of tetracycline resistance determinants in pig isolates from three herds with different histories of antimicrobial agent exposure. *Appl Environ Microbiol* **59**:1467-72.
19. **Mathew, A. G., A. M. Saxton, W. G. Upchurch, and S. E. Chattin.** 1999. Multiple antibiotic resistance patterns of *Escherichia coli* isolates from swine farms. *Appl Environ Microbiol* **65**:2770-2.
20. **Miller, G. H., F. J. Sabatelli, R. S. Hare, Y. Glupczynski, P. Mackey, D. Shlaes, K. Shimizu, and K. J. Shaw.** 1997. The most frequent aminoglycoside resistance

- mechanisms--changes with time and geographic area: a reflection of aminoglycoside usage patterns? Aminoglycoside Resistance Study Groups. *Clin Infect Dis* **24 Suppl 1**:S46-62.
21. **Murray, I. A., and W. V. Shaw.** 1997. *O*-Acetyltransferases for chloramphenicol and other natural products. *Antimicrob Agents Chemother* **41**:1-6.
 22. **O'Connor, A. M., C. Poppe, and S. A. McEwen.** 2002. Changes in the prevalence of resistant *Escherichia coli* in cattle receiving subcutaneously injectable oxytetracycline in addition to in-feed chlortetracycline compared with cattle receiving only in-feed chlortetracycline. *Can J Vet Res* **66**:145-50.
 23. **Peters, E. D., M. A. Leverstein-van Hall, A. T. Box, J. Verhoef, and A. C. Fluit.** 2001. Novel gene cassettes and integrons. *Antimicrob Agents Chemother* **45**:2961-4.
 24. **Petersen, P. J., N. V. Jacobus, W. J. Weiss, P. E. Sum, and R. T. Testa.** 1999. In vitro and in vivo antibacterial activities of a novel glycylicycline, the 9-t-butylglycylamido derivative of minocycline (GAR-936). *Antimicrob Agents Chemother* **43**:738-44.
 25. **Recchia, G. D., and R. M. Hall.** 1997. Origins of the mobile gene cassettes found in integrons. *Trends Microbiol* **5**:389-94.
 26. **Roy, P. H.** 1997. Dissémination de la résistance aux antibiotiques : le génie génétique à l'oeuvre chez les bactéries. *Médecine/Sciences* **13**:927-933.
 27. **Sandvang, D., and F. M. Aarestrup.** 2000. Characterization of aminoglycoside resistance genes and class 1 integrons in porcine and bovine gentamicin-resistant *Escherichia coli*. *Microb Drug Resist* **6**:19-27.
 28. **Schmitz, F. J., D. Hafner, R. Geisel, P. Follmann, C. Kirschke, J. Verhoef, K. Kohrer, and A. C. Fluit.** 2001. Increased prevalence of class I integrons in *Escherichia coli*, *Klebsiella* species, and *Enterobacter* species isolates over a 7-year period in a German university hospital. *J Clin Microbiol* **39**:3724-6.
 29. **Skold, O.** 2001. Resistance to trimethoprim and sulfonamides. *Vet Res* **32**:261-73.
 30. **Tenover, F. C., and J. K. Rasheed.** 1998. Genetic methods for detecting antimicrobial and antiviral resistance genes, p. 1578-1592. *In* P. R. Murray (ed.), *Manual of clinical microbiology*, 7 ed, Washington, D.C.

31. **Teshager, T., I. A. Herrero, M. C. Porrero, J. Garde, M. A. Moreno, and L. Dominguez.** 2000. Surveillance of antimicrobial resistance in *Escherichia coli* strains isolated from pigs at Spanish slaughterhouses. *Int J Antimicrob Agents* **15**:137-42.
32. **Thompson, J. D., D. G. Higgins, and T. J. Gibson.** 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* **22**:4673-80.
33. **Watts, J. L., M. M. Chengappa, J. R. Cole, J. M. Cooper, T. J. Inzana, M. R. Plaunt, T. R. Shryock, C. Thornsberry, R. D. Walker, and C. Wu.** 1999. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests for bacteria isolated from animals; Approved standard document, M31-A ed, vol. 19, Wayne, Pennsylvania.
34. **Werckenthin, C., S. Seidl, J. Riedl, E. Kiossis, G. Wolf, R. Stolla, and O. R. Kaaden.** 2002. *Escherichia coli* isolates from young calves in Bavaria: in vitro susceptibilities to 14 anti-microbial agents. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* **49**:61-5.
35. **White, D. G., C. Hudson, J. J. Maurer, S. Ayers, S. Zhao, M. D. Lee, L. Bolton, T. Foley, and J. Sherwood.** 2000. Characterization of chloramphenicol and florfenicol resistance in *Escherichia coli* associated with bovine diarrhea. *J Clin Microbiol* **38**:4593-8.
36. **Zhao, S., D. G. White, B. Ge, S. Ayers, S. Friedman, L. English, D. Wagner, S. Gaines, and J. Meng.** 2001. Identification and characterization of integron-mediated antibiotic resistance among Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolates. *Appl Environ Microbiol* **67**:1558-64.

TABLE 1. PCR primers used for antimicrobial resistance gene and class 1 integron amplifications

Antimicrobial family	Resistance gene	Forward PCR primer sequence 5'-3'	Reverse PCR primer sequence 5'-3'	Amplicon size (bp)	Genbank accession no.	Source of DNA	
Beta-Lactams	<i>bla</i> _{TEM}	GAGTATTCAACATTTTCGT	ACCAATGCTTAATCAGTGA	857	AF309824	R. C. Levesque	
	<i>bla</i> _{SHV}	TCGCCTGTGATTATCTCCC	CGCAGATAAAATCACCACAATG	768	AF148850	R. C. Levesque	
	<i>bla</i> _{oxA-1}	GCAGGCCAGTGCATCAAC	CCGCATCAAATGCCATAAGTG	198	AJ238349	Pasteur Institute	
	<i>bla</i> _{oxA-7}	AGTTCCTGCGGAAGCC	TCTCAACCCCAACCAACCC	591	X75562	R. C. Levesque	
	<i>bla</i> _{PSE-4}	CTGCTCGTATAGGTGTTCC	TCGCATCATTTTCGGCTTTC	705	J05162	R. C. Levesque	
	<i>bla</i> _{CTX-M-3}	AATCACTGCGTCAGTTCAC	TTTATCCCCCACAAACCCAG	701	X92506	A. Huletsky	
	Aminoglycosides	<i>ant</i> (2'')-Ia (<i>aadB</i>) ^a	TCCAGAACCTTGACCGAAC	GCAAGACCTCAACCTTTTCC	700	X04555	R. C. Levesque
		<i>aac</i> (3)-IIa (<i>aacC2</i>)	CGGAAGGCAATAACGGAG	TCGAACAGGTAGCACTGAG	740	X54723	D. Sandvang
		<i>aac</i> (3)-IV	GTGTGCTGCTGGTCCACAGC	AGTTGACCCAGGGCTGTCCG	627	X01385	J. Harel
		<i>aph</i> (3')-Ia (<i>aphA1</i>)	ATGGGCTCGGATAAATGTC	CTCACCGAGGCAGTTCCAT	600	M18329	J. Harel
<i>aph</i> (3')-IIa (<i>aphA2</i>)		GAACAAGATGGATTGCACGC	GCTCTTCAGCAATATCACGG	680	V00618	J. Harel	
Tetracycline		<i>tet</i> (A)	GTGAAACCCCAACATACCCC	GAAAGCAAGCAGGATGTAG	888	X00006	J. Harel
		<i>tet</i> (B)	CCTTATCATGCCAGTCTTGC	ACTGCCGTTTTTTCGCC	774	J01830	J. Harel
		<i>tet</i> (C)	ACTTGAGCCACTATCGAC	CTACAAATCCATGCCAACCC	881	J01749	J. Harel
		<i>tet</i> (D)	TGGCAGATGGTCAGATAAG	CAGCACACCTGTAGTTTTC	827	X65876	S. B. Levy
		<i>tet</i> (E)	TTAATGGCAACAGCCAGC	TCCATACCCATCCATTCCAC	853	L06940	M. C. Roberts
	<i>tet</i> (Y)	ACCGCACTCAATTGTTGTC	TTCCAAGCAGCAACACAC	823	AF070999	M. C. Roberts	

Phenicolis	<i>catI</i>	AGTTGCTCAAATGTACCTATAACC	TTGTAATTCATTAAGCATTCTGCC	547	M62822	J. Harel
	<i>catII</i>	ACACTTTGCCCTTTATCGTC	TGAAAGCCATCACATACTGC	543	X53796	Pasteur Institute
	<i>catIII</i>	TTCCGCCGTGAGCAATTTTG	TCGGATGAGTATGGGCAAC	286	X07848	I. A. Murray
	<i>floR</i>	CGCCGTCAATTCCTCACCTTC	GATCACGGGCCACCGCTGTGTC	215	AF252855	D. G. White
Trimethoprim	<i>dhfrI</i>	AAGAATGGAGTTATCGGGAATG	GGGTAAAAAACTGGCCATAAAAATTG	391	X00926	J. Harel
	<i>dhfrV</i>	CTGCCAAAAGCGAAAAAACGG	AGCAATAGTTAATGTTTGAGCTAAAAG	432	X12868	O. Sköld
	<i>dhfrVII</i>	GGTAATGGCCCTGATATCCC	TGTAGATTTGACCGCCACC	265	X58425	O. Sköld
	<i>dhfrIX</i>	TCTAAACATGATTGTCGCTGTC	TTGTTTTCAGTAAATGGTCGGG	462	X57730	C. Wallen
	<i>dhfrXIII</i>	CAGGTGAGCAGAAGATTTTT	CCTCAAAGGTTTGATGTACC	294	Z50802	P. V. Adrian
Sulfonamides	<i>sulI</i>	TTCCGGCAITCTGAATCTCAC	ATGATCTAACCCCTCGGTCTC	822	X12869	R. C. Levesque
	<i>sulII</i>	CGGCATCGTCAACATAACC	GTGTCCGGATGAAGTCAG	722	M36657	J. Harel
Class 1 integron	<i>qacEA1-sulI</i>	ATCCCAATAGTTGGCGAAGT	GCAAGGGCGAAAAACCCCGCGCC	797	X12870	
	<i>VR</i>	GGCATCCAAGCAGCAAGC	AAGCAGACTTGACCTGAT	Variable	X12870	

^a Alternative nomenclature.

TABLE 2. Trends in resistance of ETEC O149: K91 isolates with time, as determined by the disc diffusion method

ATM ^b	Number of resistant ETEC O149: K91 isolates (%) ^a					Total (n = 112)
	1978-1984 (n = 25)	1985-1989 (n = 24)	1990-1994 (n = 22)	1995-2000 (n = 41)		
AMP	8 (32)	2 (8)	8 (36)	25 (61)	43 (38)	
CTX	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	
XLN	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	
GEN	1 (4)	2 (8)	1 (4)	12 (29)	16 (14)	
NEO	10 (40)	5 (21)	4 (18)	20 (49)	39 (35)	
KAN	10 (40)	6 (25)	8 (36)	19 (46)	43 (38)	
TET	22 (88)	22 (92)	21 (95)	39 (95)	104 (93)	
CHL	4 (16)	1 (4)	2 (9)	17 (41)	24 (21)	
TMP	1 (4)	2 (8)	2 (9)	25 (61)	30 (27)	
SUL	22 (88)	24 (100)	22 (100)	34 (83)	102 (91)	

^a Phenotypic resistance was overestimated because only isolates showing initial resistance to one antimicrobial were further analyzed.

^b ATM, antimicrobials: AMP, ampicillin; CTX, cefotaxime; XLN, ceftiofur; GEN, gentamicin; NEO, neomycin; KAN, kanamycin; CHL, chloramphenicol; TET, tetracycline; TMP, trimethoprim; SUL, sulfonamides.

TABLE 3. Distribution of antimicrobial resistance genes detected in ETEC O149: K91 isolates according to the isolation periods

Antimicrobial resistance	Antimicrobial resistance probe	Number of positive isolates according to the isolation periods (%) ^a					Total number (%) of positive isolates
		1978-1984	1985-1989	1990-1994	1995-2000		
Ampicillin	<i>bla</i> _{TEM}	8 (100)	1 (50)	3 (38)	25 (100)	37 (86)	
	<i>bla</i> _{SHV}	3 (38)	0 (0)	1 (12)	5 (20)	9 (21)	
	<i>bla</i> _{OXA-1}	0 (0)	0 (0)	2 (25)	0 (0)	2 (5)	
	<i>bla</i> _{OXA-7} , <i>bla</i> _{PSE}	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	
	<i>bla</i> _{CTX-M-3}	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	
Gentamicin	<i>aac</i> (3)-IV	0 (0)	0 (0)	1 (100)	11 (92)	12 (75)	
	<i>ant</i> (2'')-Ia, <i>aac</i> (3)-IIa	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	
Neomycin	<i>aph</i> (3')-Ia	9 (90)	4 (80)	4 (100)	17 (85)	34 (87)	
	<i>aph</i> (3')-IIa	1 (10)	1 (20)	2 (50)	2 (10)	6 (15)	

Kanamycin

<i>ant(2'')-Ia</i>	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<i>aph(3')-Ia</i>	9 (90)	4 (67)	4 (50)	17 (89)	34 (79)
<i>aph(3')-IIa</i>	1 (10)	2 (33)	3 (38)	2 (10)	8 (19)
<i>ant(2'')-Ia</i>	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)

Tetracycline

<i>tet(A)</i>	1 (4)	1 (4)	3 (14)	21 (54)	26 (25)
<i>tet(B)</i>	21 (95)	23 (100)	19 (90)	20 (51)	83 (80)
<i>tet(C)</i>	1 (4)	1 (4)	3 (14)	21 (54)	26 (25)
<i>tet(D), tet(E), tet(Y)</i>	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)

Chloramphenicol

<i>catI</i>	4 (100)	1 (100)	2 (100)	12 (70)	19 (79)
<i>catII, catIII, floR</i>	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)

Trimethoprim	<i>dhfrI</i>	0 (0)	2 (100)	0 (0)	4 (16)	6 (20)
	<i>dhfrV</i>	0 (0)	0 (0)	0 (0)	14 (56)	14 (47)
	<i>dhfrXIII</i>	0 (0)	0 (0)	2 (100)	7 (28)	9 (30)
	<i>dhfrVII, dhfrIX</i>	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Sulfonamides	<i>sulII</i>	18 (82)	20 (83)	21 (95)	22 (65)	81 (79)
	<i>sulIII</i>	8 (36)	7 (29)	3 (14)	19 (56)	37 (36)

^a Percentage of probe-positive isolates among resistant ETEC isolates by period.

TABLE 4. Distribution of class 1 integron among the ETEC O149: K91 isolates

Isolation period	Total no. of isolates	No. of integron class 1-positive isolates	% of integron class 1-positive isolates according to the length of the variable region			
			1.0-kb	1.3-kb	1.6-kb	1.8-kb
1978-1984	25	14	21	79	0	0
1985-1989	24	14	29	72	0	0
1990-1994	22	19	26	68	0	6
1995-2000	41	20	35	15	35	15
Total	112	67	29	55	10	6

TABLE 5. Association between the various antimicrobial resistance genes and class 1 integron among ETEC O149: K91 isolates.

Antimicrobial resistance genes and class 1 integron ^a														
	<i>bla</i> _{TEM}	<i>bla</i> _{SHV}	<i>aph</i> (3')- <i>Ia</i>	<i>aph</i> (3')- <i>Ila</i>	<i>aac</i> (3)- <i>IV</i>	<i>dhfr</i> Π	<i>dhfr</i> Ψ	<i>dhfr</i> <i>XIII</i>	<i>sul</i> <i>II</i>	<i>sul</i> <i>III</i>	<i>tet</i> (A)	<i>tet</i> (B)	<i>tet</i> (C)	<i>cat</i> <i>I</i>
<i>bla</i> _{SHV}	+++													
<i>aph</i> (3')- <i>Ia</i>	+++	++												
<i>aph</i> (3')- <i>Ila</i>	-	-	-											
<i>aac</i> (3)- <i>IV</i>	+++	+	++	-										
<i>dhfr</i> <i>I</i>	-	-	-	-	-									
<i>dhfr</i> <i>V</i>	++	++	-	-	+++									
<i>dhfr</i> <i>XIII</i>	-	-	-	-	+									
<i>sul</i> <i>I</i>	-	-	-	-	-									
<i>sul</i> <i>III</i>	+	-	-	-	-			++						
<i>tet</i> (A)	-	-	-	+	-			-	(++) ^b					
<i>tet</i> (B)	-	-	-	(+)	-			-	+++		(+++)			
<i>tet</i> (C)	-	-	-	+	-			-	(++)		+++	(+++)		
<i>cat</i> <i>I</i>	+++	-	-	-	+			-	++		-	-	-	
Class 1 integron	-	-	-	-	-			-	-		-	-	-	-

^a Only antimicrobial resistance genes that exhibited association with another gene at the $P < 0.05$ level are shown. Significance level of association (as assessed by the chi-square exact test): -, $P > 0.05$; +, $0.05 \geq P \geq 0.01$; ++, $0.01 \geq P \geq 0.001$; +++, $0.001 \geq P$.

^b Parentheses indicate the negative associations.

Article II :

Genetic analysis of antimicrobial resistance among extraintestinal

***Escherichia coli* isolates of animal and human origin**

(Soumis à The Journal of Antimicrobial Chemotherapy)

Genetic analysis of antimicrobial resistance among extraintestinal *Escherichia coli* isolates of animal and human origin

Christine Maynard¹, Sadjia Bekal², François Sanschagrin³, Roger C. Levesque³, Roland Brousseau², Luke Masson², Serge Larivière¹ and Josée Harel^{1*}

¹Département de Pathologie et Microbiologie, Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Montréal, Saint-Hyacinthe, Québec, Canada, J2S 7C6, ²Biotechnology Research Institute, Montréal, Québec, Canada, H4P 2R2, ³ Pavillon C.- E. Marchand, Université Laval, Québec, Québec, Canada, G1K 7P4,

Key words: Antibioresistance, integron, urinary tract infection

*Corresponding author. Mailing address: Département de Pathologie et Microbiologie, Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Montréal, 3200, rue Sicotte, C. P. 5000, Saint-Hyacinthe, Québec, Canada, J2S 7C6. Phone: 450 773 8521 ext. 8233. Fax 450 778 8108.

E-mail: [REDACTED]

SYNOPSIS

Thirty-nine *Escherichia coli* strains collected in 2001 from different infected animal tissues, 16 human *Escherichia coli* strains isolated from patient with urinary tract infections (UTI) in 1990 and 54 isolates from patient with UTI collected in 2001 from urine specimens were characterised for their phenotypic and genotypic antimicrobial resistance profile. Among the ten antimicrobial agents tested, resistance was most frequent for ampicillin, tetracycline and sulfonamides, whereas resistance to cephalosporins was present only among animal isolates. Multiresistant strains were observed among the animal and the human strains. The distribution of the resistance genes for beta-lactams, aminoglycosides, chloramphenicol, tetracycline, trimethoprim and sulfonamides was assessed by colony hybridisation in all isolates. Significant differences in the distribution of tetracycline (*tet(D)*), chloramphenicol (*catI*, *catIII*, *floR*) and trimethoprim (*dhfrI*, *dhfrV*, *dhfrVII*, *dhfrXIII*) resistance genes were observed in the animal and human isolates. Difference between association of some resistance and virulence genes in the animal and human isolates was demonstrated. The associations of *tet(A)* with *tet(C)* and of *sulI* with the class 1 integron were observed in both groups of isolates. Thirty-three and thirty-one percent of the animal and human strains, respectively, possessed a class 1 integron. Four major different variable regions of class 1 integron were amplified which contained aminoglycosides (*aadA1*, *aadA2*, *aadA5*, *aadA6*) and/or trimethoprim (*dhfrIb*, *dhfrXII*, *dhfrXVII*) resistance genes, thus demonstrating the importance of integrons in the emergence of resistance in *E. coli* isolated from animals and humans. In conclusion, the animal and human ExPEC strains chosen in this study demonstrate distinct resistance and virulence profiles. The animal strains seem to be a more heterogeneous group than the human UTI strains.

INTRODUCTION

Escherichia coli is an important cause of animal and human disease worldwide¹. This bacterium can be classified into 3 major groups: commensal strains, intestinal pathogenic (enteric or diarrheagenic) strains, and extraintestinal pathogenic strains. Extraintestinal infections (EIs) due to *E. coli*, called extraintestinal pathogenic *E. coli* (ExPEC), are common in animal and human and can involve almost any organ or anatomical site². Typical EIs include urinary tract infection (UTI), meningitis, diverse intra-abdominal infections, pneumonia, soft-tissue infection, intra-vascular-device infections and osteomyelitis². Antimicrobial therapy is an important tool to treat these infections. However, resistance to existing antimicrobials is widespread and of concern to veterinary and human medicine³⁻⁵.

A close association exists between the usage of antimicrobial agents and the levels of resistance observed⁶⁻⁸. The antimicrobial classes routinely used for treatment of human infections are also used for animal either for therapy and prevention or as growth promotion factor. Food animal or pets provide favourable conditions for the spread in human of bacteria such as *E. coli*^{7, 9, 10}. Because the same antimicrobials are used for humans, pets and food animals, it is difficult to show the contribution of the resistant bacteria or genes from the animals in the emergence of antimicrobial resistant *E. coli* in humans and *vice-versa*¹⁰.

In cases where an antimicrobial agent is used for animals but not for humans, some lines of evidence exist. For example, after the introduction of streptothricin for growth promotion in 1980s, *E. coli* harbouring a plasmid mediating resistance appeared and were isolated from pigs, pig farmers and their families¹¹. Another example is the emergence of apramycin resistance after its introduction in veterinary medicine. Direct transfer of plasmids mediating apramycin resistance from *E. coli* in pigs to *E. coli* from humans has been observed¹²⁻¹⁴.

Furthermore, the virulent strains of *E. coli* that cause extraintestinal infection in animal and human have numerous phylogenetic, pathotypic and genotypic similarities^{15, 16}. Some studies support the hypothesis that ExPEC represent overlapping populations, with members of certain clones or clonal groups capable of causing infections in pets, food animals and humans^{7, 15, 17, 18}.

The dissemination of antimicrobial resistant and virulent strains among different hosts are an increasing problem in infectious diseases. Many antimicrobial resistance and virulence genes are located on plasmids and on transposons, enabling their transfer among a variety of bacterial species. In recent years, a third mechanism of resistance gene dissemination has been discovered. It involves a DNA element that mediates the integration of resistance genes by a

site-specific recombinational mechanism. This novel DNA element, now called an integron, is found either as part of transposons of the Tn21 family or independently on several groups of broad-host-range plasmids. Four different integron classes have been characterised and the most frequent one among clinical isolates is the class 1^{19, 20}. Class 1 integrons possess two conserved segments separated by a variable region (VR), which includes integrated antimicrobial resistance genes, or gene cassettes with unknown functions²¹. The 3' conserved segment contains the *qacEΔ1* and *sulI* genes and an open reading frame (ORF), *orf5*. The *qacEΔ1* and *sulI* genes determine resistance to ethidium bromide and quaternary ammonium compounds and to sulfonamides, respectively²¹.

Before reviewing the use of antimicrobials in animal husbandry and their effect on human health, it is helpful to determine the *E. coli* resistance gene profile of these two population groups. The objective of this study is to compare the genotypes of acquired ExPEC antimicrobial resistance. In this study, animal and human ExPEC collected from animal tissues and from urine of human UTIs, were analysed for their resistance to antimicrobials and the distribution of the related antimicrobial resistance genes. Also, the strains were characterised for their ExPEC virulence gene profile and for their phylogenetic group.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains and growth conditions. In this study, only strains showing at least one antimicrobial resistance were selected. Of the *Escherichia coli* isolated in 2001 from different infected animal tissues (lung, heart, liver, kidney, brain and other), only a small number (39) showed resistance to at least one antimicrobial and were kept for this study. Animal strains were isolated from swine (40%), chicken (20%), cattle (20%) and pets (20%). Only 8 antimicrobial resistant *E. coli* strains isolated from urine specimens of pets could be obtained for this study therefore to enlarge our study ExPEC from other animal origin were included. Sixteen human *E. coli* strains isolated from patients with UTI in 1990 at Sainte-Justine Hospital in Montreal²² and 54 isolates collected in 2001 at Honoré-Mercier Hospital in Saint-Hyacinthe were analysed in this study. The reference strain, *Escherichia coli* ATCC® 25922, was used to test each lot of antimicrobials by disc diffusion method. The bacterial strains, kept at -80°C in tryptic soy broth (TSB) medium containing 10% glycerol (v/v), were cultured on tryptic soy agar (TSA) supplemented with 5% sheep blood (v/v).

The thirty-two strains used as positive controls and templates for DNA amplification were obtained from different laboratories (Table I). These strains were kept at -80°C as frozen stocks in tryptic soy broth (TSB) medium containing 10% glycerol (v/v) and were propagated on Luria Bertani (LB) broth or agar containing one of these antimicrobials at the following concentrations: ampicillin (50 µg/mL), gentamicin (30 µg/mL), kanamycin (50 µg/mL), tetracycline (10 µg/mL), chloramphenicol (10 µg/mL), trimethoprim (10 µg/mL); sulfamethazine (200 µg/mL).

Antimicrobial susceptibility testing. Antimicrobial susceptibility testing was carried out for all strains by disc diffusion method according to the recommendations reported by the NCCLS²³. As recommended by the NCCLS, Mueller-Hinton (MH) agar was used as culture medium. The antimicrobial agents used in this study were: beta-lactams: ampicillin (10 µg), ceftiofur (30 µg), cefotaxime (30 µg); aminoglycosides: gentamicin (10 µg), kanamycin (30 µg), neomycin (30 µg); tetracycline (30 µg); chloramphenicol (30 µg); trimethoprim (5 µg); sulfaminoxazole (250 µg). The antimicrobial breakpoints were taken from the NCCLS recommendations except for neomycin, for which the breakpoints used were those recommended by the manufacturer.

PCR primers and amplification. Resistance gene primers were designed using the GCG software program "Prime" (Genetics Computer Group, Madison, WI, USA). Virulence genes which are associated to the ExPEC strains, *afa3*, *afaD8*, *sfaDE*, *papC*, *hlyA* and *iucD*, were tested and their primer sequences were previously described²⁴⁻²⁷ (Table I).

Oligonucleotide primers were synthesized with a model DNA Synthesizer (Biocorp Inc., Montréal, Québec, Canada). The class 1 integron is characterised by the *qacEΔ1* and *sull* genes at its 3' conserved segment²⁸. Primers located at the 3' conserved segment were used as described by Sandvang *et al*²⁹ to investigate the presence of the class 1 integron (Table I).

Amplification was performed on 5 μL of supernatant from bacterial preparation boiled for 10 minutes²². The PCR reaction mix (total 50 μL) included 29.6 μL H₂O, 5 μL of 10X PCR buffer (Amersham Pharmacia Biotech Inc., Piscataway, NJ, USA), 5 μL of dNTP 2 mM, 1 U of *Taq* polymerase (Amersham Pharmacia Biotech Inc.), and 25 pmol of each primer. DNA amplification was carried out in a GeneAmp[®] PCR system 9700 (Perkin-Elmer, Foster City, CA, USA) by using the following conditions: 5 min at 94°C followed by 30 cycles of 94°C for 30 s, 50°C for 30 s and 72°C for 1.5 min. A sample of 3 μL of the PCR product was verified for size and purity by gel electrophoresis (1.2 % (w/v) agarose in 1X TAE (Tris-acetate-EDTA) buffer).

All isolates that contained the 3' conserved segment of the class 1 integron were further investigated by another PCR amplification of a VR within the integron by using primers described by Sandvang and Aarestrup²⁹ (Table I). Amplification conditions for these primers were as follows: 5 min at 94°C, followed by 35 cycles of 94°C for 1 min, 50°C for 1 min, and 72°C for 5 min.

The phylogenetic group to which the ExPEC strains belong was determined by PCR based method as described by Clermont *et al*³⁰ (Table I). The data of the three amplifications resulted in an assignment of the strains to phylogenetic groups as follows: *chuA*⁻, TspE4.C2⁻, group A; *chuA*⁻, TspE4.C2⁺, group B1; *chuA*⁺, *yjaA*⁺, group B2; *chuA*⁺, *yjaA*⁻, group D³⁰.

DNA sequencing. The amplified products were purified with a QIAquick PCR purification kit or QIAquick gel extraction purification kit (QIAGEN Inc., Mississauga, Ontario, Canada). Their sequences were confirmed with the dRhodamine Terminator Cycle Sequencing Ready reaction Kit using a model 377 DNA sequencer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Sequences were submitted to the National Center for Biotechnology Information (Bethesda, Md) for comparison with sequences in GenBank by use of the BLAST program. Multiple DNA alignments were performed by using the CLUSTALW program³¹.

Colony hybridisation. The amplicons were labelled with [α -³²P]CTP by using a DNA labelling beads kit (Amersham Pharmacia Biotech Inc.). Colony hybridisations were performed as described previously³².

Statistical methods. Comparisons of the associations between resistance genes, class 1 integron and virulence genes, in ExPEC animal strains and in ExPEC human strains

separately, were made by using Pearson's chi-square exact test (SAS, version 8.2; SAS Institute, Inc., CARY, N.C., USA). The statistical significance was set at a P value of <0.05 . An association between two genes can be positive indicating that the genes are found together, or negative, indicating that the genes are not found together.

RESULTS

Antimicrobial resistance phenotype characteristics. One hundred nine isolates (39 from animal origin and 70 from human origin) have been selected and characterised for their antimicrobial resistant phenotype to ten commonly used antimicrobials by disc diffusion method. The percentage of resistant *E. coli* strains to the different antimicrobial agents isolated from tissues of animal and human UTI is presented in Table II. Some isolates demonstrated a zone of inhibition at the limit (the zone between resistance and susceptibility) for cephalosporins (ceftiofur and cefotaxime) and aminoglycosides. To facilitate our analysis, these isolates were considered as resistant in this study.

Similar patterns of resistance to the different antimicrobial agents between strains isolated from animal or from human origin were observed for six out of the ten antimicrobials tested. The *E. coli* strains isolated from animals appeared more resistant to cephalosporins, neomycin, kanamycin and tetracycline. All animal strains resistant to ceftiofur were also resistant to cefotaxime. Fifty-one percent of the animal isolates were resistant to at least four antimicrobials and 43 of them had the ampicillin/ tetracycline/ trimethoprim/ sulfonamides resistance profile (data not shown). Only one pet strain was multiresistant. The majority showed only one resistant to ampicillin or tetracycline.

Globally, the majority of the human strains were resistant to ampicillin and none of the strains were resistant to cephalosporins. Human *E. coli* strains that were isolated in 1990 were less resistant to antimicrobials than those isolated in 2001. None of the strains from 1990 were resistant to the aminoglycosides and chloramphenicol. Twenty-three percent of the human isolates were resistant to the following four antimicrobials: ampicillin, tetracycline, trimethoprim and sulfonamides. In 2001, 57% of the resistant strains showed more than three resistances to antimicrobials tested. Comparatively, in 1990, only 25% had more than three resistances to antimicrobials tested (data not shown).

Distribution of resistance genes. The choice of the studied resistance genes was based on their relative importance in resistant *E. coli* strains³³⁻³⁸. Therefore, 28 genes encoding for antimicrobial resistance belonging to six antimicrobial families (beta-lactams, aminoglycosides, tetracycline, phenicols, trimethoprim and sulfonamides) were chosen to determine their distribution in *E. coli* strains isolated from extraintestinal infections from animal and human cases (Table I).

(i) Beta-lactams. The DNA hybridisation probes *bla*_{TEM} and *bla*_{SHV} detect all the known variants within the corresponding *bla*_{TEM} and *bla*_{SHV} gene families on colony hybridisation. The probe *bla*_{OXA-7} detects *bla*_{OXA} variants such as *bla*_{OXA-10} to *bla*_{OXA-14},

*bla*_{OXA-16} to *bla*_{OXA-19}, *bla*_{OXA-28}, *bla*_{OXA-31}, *bla*_{OXA-35} (80% to 96% of similarity) and *bla*_{PSE-2} (96.3% of similarity). To further discriminate variants among the *bla*_{OXA-7} hybridisation-positive isolates, a PCR amplification was undertaken using the *bla*_{OXA-7} specific primers. All strains were positive for at least one of the tested genes except for four animal strains, five human strains isolated in 1990 and two human strains isolated in 2001.

More beta-lactams resistant isolates obtained from humans were positive to the *bla*_{TEM} probe (88%) than animal isolates (68%) (Table III). Twelve percent of ampicillin resistant *E. coli* strains isolated from humans possessed also a *bla*_{SHV} gene whereas none of the animal isolates were *bla*_{SHV}-positive. Three animal strains possessed the *bla*_{OXA-1} gene and none of the human strains possessed this gene. None of the strains were positive with *bla*_{CTX-M-3}, *bla*_{PSE-4}, and *bla*_{OXA-7} probes. Eleven (eight animal isolates and three human isolates) out of the 82 strains resistant to ampicillin did not possess one of the tested beta-lactam genes. The genes *bla*_{OXA-1} and *bla*_{TEM} were found among two cephalosporins resistant strains isolated from animals (data not shown).

(ii) Aminoglycosides. Of the five tested aminoglycoside resistance genes, *ant(2'')-Ia*, *aac(3)-IV*, and *aph(3')-IIa* were not found among the resistant strains. The *aph(3')-Ia* gene resulting in a kanamycin and neomycin resistance phenotype, was twice as frequent in animal isolates resistant to these two antimicrobials than the human isolates having the same resistance patterns (Table III). A resistance gene, *aac(3)-IIa*, was found in only four out of the 15 gentamicin resistant strains.

(iii) Tetracyclines. Of the six tested tetracycline resistance genes, *tet(A)*, *tet(B)*, *tet(C)* and *tet(D)* were found among the isolates. The *tet(A)*, *tet(B)* and *tet(C)* genes were found among animal and human isolates in high frequency (Table III). The *tet(A)* and *tet(C)* genes were found together in 75% of isolates. The *tet(D)* gene was found only in two humans strains isolated in 1990. Three animal and one human tetracycline resistant isolates were tet-negative.

(iv) Phenicol. Of the four tested chloramphenicol resistance genes, *catI*, *catIII*, and *floR* were found among the strains. Among the eight chloramphenicol resistant isolates found in animals, the most frequent phenicol resistance gene was *floR* (63%) (Table III). Only one strain possessed the *catI* gene and another *catIII* gene. Among the 17 human isolates, the most frequent chloramphenicol resistance gene was *catI* (82%). Only one human strain was *floR*-positive (Table III). Two animal and three human chloramphenicol resistant isolates were negative with the chloramphenicol probes. One out of the 31 chloramphenicol susceptible animal isolates was *floR*-positive and one out of 55 chloramphenicol susceptible human isolates was *catI*-positive.

(v) Trimethoprim. Trimethoprim resistance phenotype was associated, in this study, to four genes: *dhfrI*, *dhfrV*, *dhfrVII*, and *dhfrXIII* (Table III). Whereas the gene *dhfrI* is common in the different groups of isolates, *dhfrVII* was found exclusively in the 2001 human isolates group and *dhfrV* and *dhfrXIII* more specifically in the isolates of animal origin. Among the animal resistant strains, three were negative for the tested genes and one susceptible strain was positive for *dhfrXIII*. Among the 27 human resistant strains, seven were negative for the tested trimethoprim resistance genes.

(vi) Sulfonamides. The *sulI* and *sulII* genes were largely present among the animal and human isolates. Thirty-seven percent of sulfonamide resistant animal strains had both *sulI* and *sulII*. Whereas 30% of the resistant human strains isolated in 2001 contained both *sulI* and *sulII*, the human strains isolated from 1990 contained either *sulI* or *sulII*. Four out of the 30 resistant animal strains were *sul*-negative, whereas two of the 22 susceptible human strains were *sulI*-positive.

Identification and characterisation of integrons. The class 1 integron is characterised by the *qacEΔ1* and *sulI* genes at its 3' conserved segment responsible for the resistance to disinfectants and sulfonamides respectively²⁸. These genes were used to identify by PCR strains containing the 3' conserved region. Of the 109 isolates, 57 strains (52%) amplified a PCR fragment from the amplification of the class 1 integron 3' conserved region (Table IV). A similar percentage of class 1 integron positive strains was observed among the animal and human isolates. Two of the class 1 integron positive animal strains were *sulI*-negative.

The VR of class 1 integron positive strains was characterised using the primers Fint1 and Rint1 and among the 57 class 1 integron positive strains, five distinct amplicons of 0.5 kb, 1.0 kb, 1.6 kb, 1.7 kb, and 1.8 kb were obtained. Two representatives of each VR length (except for 1.7 kb) were sequenced. Both VR of the same length contained the same gene cassettes with more than 95% of similarity. The most frequent VR amplified fragments (i.e. 1.0 kb) in animal and human strains (58 and 59%, respectively) contained the *ant(3'')-Ia* (*aadA1*) gene cassette (GenBank accession no. X12870) encoding streptomycin and spectinomycin resistance. All human class 1 integron positive strains that were isolated in 1990 had a 1.0 kb VR. In 21 % of the animal and 28% human strains, respectively, the size of the VR was 1.6 kb that contained two gene cassettes, *dhfrIb*, encoding for resistance to trimethoprim, and *ant(3'')-If* (*aadA6*), encoding resistance to streptomycin and spectinomycin (GenBank accession nos. AF393510 and AF140629, respectively). Only one strain isolated from animal had a VR length of 1.7 kb. This VR possessed two gene cassettes named

dhfrXVII which confers a resistance to trimethoprim, and *ant(3'')-Ie (aadA5)*, which confers a resistance to streptomycin and spectinomycin (GenBank accession no. AF169041). Finally, the 1.8 kb VR fragments possessed two gene cassettes, *dhfrXII* and *ant(3'')-If*, which confer resistance to trimethoprim and resistance to streptomycin and spectinomycin, and one orf named *orfF* (GenBank accession nos. Z21672 and AF284063, respectively).

Distribution of virulence genes. The Table III shows the distribution of the ExPEC virulence genes, *afa3*, *afaD8*, *sfaDE*, *papC*, *hlyA* and *iucD*. More human strains were positive for these genes than animal strains, with the exception of *afaD8* and *iucD* that were twice as important in animal strains than human ones. The gene *iucD* was the most frequently detected virulence genes (77%) among the animal isolates. No specific virulence gene profile could be assigned for the animal isolates. In pet isolates *sfaDE*, *papC*, *hlyA* and *iucD* were present in 6 out of 8 isolates (data not shown). Only 8% of animal strains were negative for the tested virulence genes and 23% had more than two of these genes.

The most frequent virulence gene found in human isolates (53%) was *papC*. No important differences between the virulence profile of human strains isolated from 1990 and 2001 were noticed. Only 13% of human isolates did not have the tested virulence genes and 54% had more than two of these genes.

Association between resistance and virulence genes. Statistically significant associations between the occurrence of individual resistance and virulence genes among the whole collection of animal and human ExPEC isolates were detected ($P < 0.05$) (Table V and VI). In both groups of animal and human strains, the association of the gene *sulI* with the presence of class 1 integron was clear as well as the association of *tet(A)* with *tet(C)* genes. Several different associations were evident among the animal and human ExPEC strains. For example, the positive association of *bla_{TEM}* and *dhfrV* and the negative association of *tet(A)/tet(C)* with *tet(B)* genes were observed only among the animal strains. Also, some associations were observed only among human strains such as the positive association of *bla_{TEM}* with *sulIII* as well as *sulI* with *tet(A)/tet(C)* genes. In strains isolated from humans, *hlyA* was associated with *dhfrI* and *iucD* with *sulIII*. In animals strains, *sfaDE* was weakly associated with *dhfrXIII*, *tetA* and *tetC*. In both groups, *hlyA* was associated with the presence of *papC* but only with *sfaDE* in strains from humans. In strains isolated from humans, the gene *iucD* was positively associated with *sfaDE* and *hlyA* while negatively associated with these genes in strains from animals.

Phylogenetic grouping of results. Phylogenetic analysis studies suggest that *E. coli* can be divided into of four main phylogenetic groups (A, B1, B2 and D) and that more

virulent ExPEC strains mainly belong to groups B2 and D, whereas commensal and some virulent strains belong to group A and B1. Clermont *et al*³⁰ had described a simple and rapid phylogenetic grouping technique based on PCR.

The phylogenetic analysis showed that 46% of the strains isolated from animal tissues belong to phylogenetic group A, 20% to D, 20% to B2 and 15% to B1. Among the animal isolates, the phylogenetic group A and B1 were mostly (56% and 83% respectively) porcine strains (data not shown). More than 80% of these isolates were associated with sudden death of piglets due either to primary or secondary septicaemia and from which *E. coli* were isolated in significant numbers from intestine or extraintestinal organs. Most pet strains (88%) belonged to phylogenetic group B2 and 63% of avian strains were in the group D.

The half of the strains (54%) of the human isolates belonged to phylogenetic group B2, 23% to group D, 19% to group A and only 4% to group B1. Human strains isolated from 1990 belonged to group B2 in majority (75%) and 25% belonged to group A. Interestingly, most human strains isolated from 2001 belonged to either group B2 (45%) or D (45%) and a small proportion to group A and B1 (7% and 3%), respectively. Most animal isolates (71%) belonging to group B2 contained the virulence genes *sfaDE*, *papC* and *hlyA*; among human isolates the proportion was only 39%. Human strains belonging to group A contained fewer virulent genes than the other human isolates.

DISCUSSION

E. coli causes diverse extraintestinal infections in animals and in humans². It is the most common cause of UTI, community-acquired bacteraemia and sepsis³⁹. Treatment of ExPEC infection commonly includes the use of broad-spectrum antimicrobials⁴⁰. In the present study, ExPEC strains isolated from infected tissues of animal and from urine of human UTI, were analysed for the distribution of related acquired antimicrobial resistance genes and virulence genes, and were characterised for their class 1 integron profile and phylogenetic group.

Our study demonstrates that similar antibioresistance patterns could be observed in animal and human isolates. Ampicillin, tetracycline and sulfonamides were the antimicrobial agents to which most ExPEC strains were resistant. It is noteworthy that ampicillin and sulfonamides are old antimicrobials, which are widely used. Considering that tetracycline is much less used in humans than in animal, the relatively high resistance for tetracycline among the isolates of human origin is interesting (Table II). More animal strains were resistant to kanamycin than human strains while this antimicrobial agent is more widely used in human therapy. This can be explained by the fact that aminoglycoside resistance gene *aph(3')-Ia*, found in majority among these strains, can hydrolyse both kanamycin and neomycin. Therefore, the selected pressure due by the use of neomycin in animals, particularly in pigs, would have concurrently selected neomycin and kanamycin resistant strains. The multiresistance to antimicrobials observed in half of the isolates can be also explained by the co-selection of resistance genes by the use of some other antimicrobials⁴¹. For example, it was shown that the use of injectable oxytetracycline in cattle receiving in-feed chlortetracycline was associated with an increase in the prevalence of resistance to chloramphenicol and sulfisoxazole⁴².

E. coli strains from animals and humans with similar phenotypic patterns of antimicrobial resistance had differences in their genotypic resistance gene patterns. For example, whereas among the ampicillin resistant strains, the *oxa-1* gene was found only in animal strains, the *bla_{SHV}*-type determinant was found only in human strains. These two determinants are rarely found together among ampicillin resistant *E. coli*^{43, 44}. Ceftiofur is a cephalosporin used in food-producing animals in Canada and in the United States. Cephalosporin resistant isolates were found among animal origin strains but not from human origin. Our study seems to indicate that resistance to ceftiofur was associated with other beta-lactam genes than those tested. The cephamycinase *bla_{CMY}* genes that were not included in our study were found in *E. coli* showing a ceftiofur-ceftriazone resistance phenotype⁴⁵. In the

case of tetracycline resistant strains, the *tet(D)* gene was exclusively associated with the human strains origin. Furthermore, the *tet(D)* gene was only found in strains isolated in 1990. A more striking observation was that the aminoglycosides resistance gene *aph(3')-Ia* was present in kanamycin resistant human isolates twice less frequently than in animal isolates. It appeared that kanamycin resistance in human strains was due in majority to other resistance genes not tested in this study such as *aac(3)-III* or *aph(3')-VI* that were observed in other studies⁴⁶. Also, the majority to the chloramphenicol resistant human strains were due to the *catI* gene, while the majority of chloramphenicol resistant animal strains was associated with *floR*. In spite of a ban on the use of chloramphenicol in food animals in Canada since 1980⁴⁷, chloramphenicol resistance in *E. coli* has been also observed in various animal species by others^{5, 48-50}. In these studies, resistance to chloramphenicol was closely associated with the presence of the *catI* gene. In another study done by Bischoff *et al* [Bischoff, 2002 #202], only four out of 48 chloramphenicol-resistant isolates were harbouring a *catII* gene; the relatively unknown gene, *cmlA*, was responsible for the resistance of the other isolates. The *floR* gene is responsible for a cross-resistance between chloramphenicol and florfenicol, the latter although used in animal therapy is not used in human medicine⁶. Other studies report the presence of *floR* in a large number of *E. coli* isolated from chickens and cattle^{38, 51, 52}. Finally, the gene *dhfrVII* which is the most frequent trimethoprim resistant gene found in the strains isolated from humans was absent in strains from animals; on the other hand, the *dhfrV* and *dhfrXIII* the most frequent trimethoprim resistance genes in strains from animals were found in only one strain from humans.

Nevertheless, some resistance genes were equally represented in animal and human strains. It is shown by the Table III that the most frequent mechanism implicated of beta-lactams resistance in ExPEC from animal and human isolates was *bla*_{TEM}-type beta-lactamase. This is also documented by other studies^{43, 44}. These studies showed that mutations at the level of the *ampC* operon are another important cause of ampicillin resistance in *E. coli*. This could be the case for eight beta-lactam resistant strains that did not possess any of the acquired beta-lactam resistance genes tested. The resistance to sulfonamides in this study was associated to two resistance genes, *sulI* and *sulIII* which animal and human sulfonamide resistant strains possessed in similar proportion.

Resistance genes can be associated with mobile DNA like plasmids, transposons and integrons known to facilitate their distribution^{53, 54}. Half of the tested strains (52%) possessed a class 1 integron. Because the integrons can include many different gene cassettes between insertion sites at the VR, site-specific insertion of gene cassettes represents another further

mechanism that contributes to the evolution of plasmids and transposons of gram-negative bacteria. Similarly to another study done by Bass *et al*⁵⁵, the most frequent amplified VR length among the integron -positive avian pathogenic *E. coli* strains was 1.0 kb. In our study, most class 1 integron in our *E. coli* collection, which possessed the same VR length, appeared to have acquired the same gene cassettes into their integrons. Although multiple gene cassette insertions and over 40 distinct gene cassettes have been found linked to integrons²¹, only five different gene cassette sizes were detected among *E. coli* isolates in this study, and have been also reported in other studies^{56,57}. Furthermore, except for the *sull* gene, gene cassettes found among the sequenced class 1 integron did not correspond to the tested resistance genes in this study. The presence of integrons emphasizes their potential to contribute to efficient spread of antibiotic resistance. One clear observation arising from our study is that the number and diversity of genes driving the phenotypic resistance are dynamic. Some genes associations were observed. Similarly to other studies, the *sull* gene was associated with the class 1 integron^{28, 58}. As in our previous study on ETEC strains isolated in the Province of Quebec from pigs (Maynard, C., *et al.*, 2003 In press.), the association between *tet(A)* and *tet(C)* has also been observed. The *bla*_{TEM} genes isolated from animal strains origin were associated with *dhfrV*, whereas in strains isolated from humans, they were associated with the *sulIII* gene. Associations between genes could help the understanding of the certain genes presence in the light of co-selection or transmission. For example, because the association of *bla*_{TEM} genes with either *dhfrV* or *sulIII* depending on the origin of the isolates could suggest that strains from animal and human origin acquired different genes. Although some studies suggested that, in addition to the gene transfer between two different bacterium, bacteria could transfer its genetic material to another bacteria from to different hosts¹¹⁻¹⁴. In these cited studies, the acquired antimicrobial resistance genes were found on an integron or a plasmid that showing that the mobile DNA element importance in these resistant determinant spread. The *floR* gene presence in strains isolated from animals and in a strain isolated from human can indicate either gene transmission or resistant strain transfer between the two hosts. It would be tempting to suggest that the *floR* gene observed in one strain isolated from human is indicative of a gene transfer or of a resistant strain transfer from animals to human. The *floR* gene was reported in *Salmonella* isolates and in an old *Klebsiella* strain⁵⁹.

Although the virulence gene characterisation was not exhaustive, most *E. coli* isolates in this study possessed some traits of extraintestinal strains. The relative virulence marker representation is different in *E. coli* isolated from animals and humans. Among ExPEC strains, *pap* (pyelonephritis-associated pili), *sfa* (S fimbrial adhesin) and *afa* (afimbrial

adhesin) operons, encoding P, S, and Afa adhesins, respectively, are most commonly found⁶⁰. In our study, the *pap* sequences were found in half of animal strains and in of human strain, and of these many, 22% were positive to more than one adhesin. More human strains possessed *hlyA* than animal strains, and among the latter, *hlyA* was mostly urine isolates from pet animals. Other studies showed the important frequency of *hlyA* among ExPEC isolated from humans and animals. The aerobactin was frequently found in our collection. Interestingly, the majority of animal *E. coli* isolated from tissues were *iucD* (93%) comparatively to animal strains from urine isolates (7%). Similar results were reported by Opal *et al*⁶¹ among human isolates. Virulence genes are also associated with mobile elements. In our study, associations between the virulence genes *hlyA* and *iucD* and the resistance antimicrobial genes such as *sulII* and *dhfrI* were noticed in human strains. The aerobactin genes are associated with *IS1*-like elements and are found on large plasmids, often ColV-like, or chromosome in ExPEC⁶². Similarly the *hly* determinants can be associated to either plasmids or chromosome of *E. coli*⁶³. Strong associations between *hly*, *papC* and *sfaDE* genes as well as with *iucD* and *sfaDE* genes were observed in UTI strains of human origin. Similar associations were also observed in other studies on ExPEC^{15, 64}. Virulence genes are found in pathogenicity islands (PAIs) consisting of particular genomic regions carrying-associated genes together with the loci, the mobility of some PAIs has been demonstrated⁶⁵. Moreover, different UTI strains such as 536, CFT073, J96 contain PAIs carrying both *hly* and P determinants.

Phylogenetic analysis described by Herzer *et al*⁶⁶ have shown that virulent extraintestinal strains belong mainly to group B2 and, to a lesser extent, to group D^{67, 68}, whereas most commensal strains but also some virulent strains belong to group A and B1. While the majority of the UTI human isolates of our study belonged to virulent groups (B2 or D) as found in other studies^{15, 30}. But it is not the case of the strains isolated from animal tissues. Interestingly, the majority of the pet strains belonged to phylogenetic group B2. Although they share common traits, in general the animal and human ExPEC strains in this study demonstrate a distinct resistance and virulence gene pattern. Although our ExPEC collection originating from different host and tissues share some properties with strains from animals are more heterogeneous than human UTI strains. Consequently, it is difficult to establish links between the presence of given genes in both population groups. Interestingly, UTI strains from pets showed virulence and resistance gene profile similar to human UTI strains and most, in the two cases, belong to the pathogenic group B2. This commonality

between pets and human ExPEC was demonstrated by Johnson *et al*^{15, 64}. The authors suggested that infectious transfer between hosts of different origin can imply.

Our genotypic resistance analyses of extraintestinal isolates from different hosts show that the genes behind phenotypic resistance are not static but rather in a state of flux driven by various selection forces such as the use of specific antimicrobials. Often, more than one gene was associated with a given phenotypic resistance. This study reinforces the necessity of using genotypic resistance analyses in future epidemiological studies.

ACKNOWLEDGMENTS

We are very grateful to Guy Beauchamp for statistical analysis, to Dr. Madeleine Fortin and Saint-Hyacinthe Hospital for their implication in of the strains collect and to Kim Messier for phenotypic resistance characterisation of strains. We appreciate the technical assistance provided by the members of the Groupe de Recherche sur les Maladies du Porc (GREMIP).

This work was supported by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) under research work unit of Canadian Research Network on Bacterial Pathogens of Swine grant 225155 and by the Fédération des Producteurs de Porcs du Québec (FPPQ).

REFERENCES

1. Salyers, A. A. & Whitt, D. D. (1994). *Escherichia coli* gastro-intestinal infections. In: *Bacterial pathogenesis: a molecular approach*. (Salyers, A. A. & Whitt, D. D., Eds), pp. 190-204. American Society of Microbiology Press, Washington, D. C.
2. Russo, T. A. & Johnson, J. R. (2000). Proposal for a new inclusive designation for extraintestinal pathogenic isolates of *Escherichia coli*: ExPEC. *The Journal of infectious diseases* **181**, 1753-1754.
3. Aubry-Damon, H. & Courvalin, P. (1999). Bacterial resistance to antimicrobial agents: selected problems in France, 1996 to 1998. *Emerging infectious diseases* **5**, 315-320.
4. Monroe, S. & Polk, R. (2000). Antimicrobial use and bacterial resistance. *Current opinion in microbiology* **3**, 496-501.
5. Teshager, T., Herrero, I. A., Porrero, M. C., Garde, J., Moreno, M. A. & Dominguez, L. (2000). Surveillance of antimicrobial resistance in *Escherichia coli* strains isolated from pigs at Spanish slaughterhouses. *International journal of antimicrobial agents* **15**, 137-142.
6. Schwarz, S. & Chaslus-Dancla, E. (2001). Use of antimicrobials in veterinary medicine and mechanisms of resistance. *Veterinary research* **32**, 201-225.
7. Aarestrup, F. M. & Wegener, H. C. (1999). The effects of antibiotic usage in food animals on the development of antimicrobial resistance of importance for humans in *Campylobacter* and *Escherichia coli*. *Microbes and infection / Institut Pasteur* **1**, 639-644.
8. Guillemot, D. (1999). Antibiotic use in humans and bacterial resistance. *Current opinion in microbiology* **2**, 494-498.
9. van den Bogaard, A. E. & Stobberingh, E. E. (2000). Epidemiology of resistance to antibiotics. Links between animals and humans. *International journal of antimicrobial agents* **14**, 327-335.
10. Health Canada (2002). Uses of antimicrobial drugs in food animals. In: *Used of antimicrobials in food animals in Canada : Impact on resistance and human health*, pp. 53-67. Health Products and food branch, Canada.
11. Hummel, R., Tschape, H. & Witte, W. (1986). Spread of plasmid-mediated nourseothricin resistance due to antibiotic use in animal husbandry. *Journal of basic microbiology* **26**, 461-466.

12. Hunter, J. E., Bennett, M., Hart, C. A., Shelley, J. C. & Walton, J. R. (1994). Apramycin-resistant *Escherichia coli* isolated from pigs and a stockman. *Epidemiology and infection* **112**, 473-480.
13. Hunter, J. E., Hart, C. A., Shelley, J. C., Walton, J. R. & Bennett, M. (1993). Human isolates of apramycin-resistant *Escherichia coli* which contain the genes for the AAC(3)IV enzyme. *Epidemiology and infection* **110**, 253-259.
14. Johnson, A. P., Burns, L., Woodford, N., Threlfall, E. J., Naidoo, J., Cooke, E. M., *et al.* (1994). Gentamicin resistance in clinical isolates of *Escherichia coli* encoded by genes of veterinary origin. *Journal of medical microbiology* **40**, 221-226.
15. Johnson, J. R., Stell, A. L., Delavari, P., Murray, A. C., Kuskowski, M. & Gaastra, W. (2001). Phylogenetic and pathotypic similarities between *Escherichia coli* isolates from urinary tract infections in dogs and extraintestinal infections in humans. *The Journal of infectious diseases* **183**, 897-906.
16. Feria, C., Machado, J., Duarte Correia, J., Goncalves, J. & Gaastra, W. (2001). Distribution of papG alleles among uropathogenic *Escherichia coli* isolated from different species. *FEMS microbiology letters* **202**, 205-208.
17. van den Bogaard, A. E., London, N., Driessen, C. & Stobberingh, E. E. (2001). Antibiotic resistance of faecal *Escherichia coli* in poultry, poultry farmers and poultry slaughterers. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* **47**, 763-771.
18. Low, D. A., Braaten, B. A., Ling, G. V., Johnson, D. L. & Ruby, A. L. (1988). Isolation and comparison of *Escherichia coli* strains from canine and human patients with urinary tract infections. *Infection and immunity* **56**, 2601-2609.
19. Sallen, B., Rajoharison, A., Desvarenne, S. & Mabilat, C. (1995). Molecular epidemiology of integron-associated antibiotic resistance genes in clinical isolates of *enterobacteriaceae*. *Microbial drug resistance (Larchmont, N.Y.)* **1**, 195-202.
20. Jones, M. E., Peters, E., Weersink, A. M., Fluit, A. & Verhoef, J. (1997). Widespread occurrence of integrons causing multiple antibiotic resistance in bacteria. *Lancet* **349**, 1742-1743.
21. Recchia, G. D. & Hall, R. M. (1997). Origins of the mobile gene cassettes found in integrons. *Trends Microbiol* **5**, 389-394.
22. Daigle, F., Harel, J., Fairbrother, J. M. & Lebel, P. (1994). Expression and detection of *pap*-, *sfa*-, and *afa*-encoded fimbrial adhesin systems among uropathogenic *Escherichia coli*. *Canadian journal of microbiology* **40**, 286-291.

23. Watts, J. L., Chengappa, M. M., Cole, J. R., Cooper, J. M., Inzana, T. J., Plaunt, M. R., *et al.* (1999). *Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests for bacteria isolated from animals; Approved standard document, M31-A edn*, National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pennsylvania.
24. Le Bouguenec, C., Archambaud, M. & Labigne, A. (1992). Rapid and specific detection of the *pap*, *afa*, and *sfa* adhesin-encoding operons in uropathogenic *Escherichia coli* strains by polymerase chain reaction. *Journal of clinical microbiology* **30**, 1189-1193.
25. Lalioui, L., Jouve, M., Gounon, P. & Le Bouguenec, C. (1999). Molecular cloning and characterization of the *afa-7* and *afa-8* gene clusters encoding afimbrial adhesins in *Escherichia coli* strains associated with diarrhea or septicemia in calves. *Infection and immunity* **67**, 5048-5059.
26. Yamamoto, S., Terai, A., Yuri, K., Kurazono, H., Takeda, Y. & Yoshida, O. (1995). Detection of urovirulence factors in *Escherichia coli* by multiplex polymerase chain reaction. *FEMS immunology and medical microbiology* **12**, 85-90.
27. Herrero, M., de Lorenzo, V. & Neilands, J. B. (1988). Nucleotide sequence of the *iucD* gene of the pColV-K30 aerobactin operon and topology of its product studied with *phoA* and *lacZ* gene fusions. *Journal of bacteriology* **170**, 56-64.
28. Paulsen, I. T., Littlejohn, T. G., Radstrom, P., Sundstrom, L., Skold, O., Swedberg, G., *et al.* (1993). The 3' conserved segment of integrons contains a gene associated with multidrug resistance to antiseptics and disinfectants. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **37**, 761-768.
29. Sandvang, D. & Aarestrup, F. M. (2000). Characterization of aminoglycoside resistance genes and class 1 integrons in porcine and bovine gentamicin-resistant *Escherichia coli*. *Microbial drug resistance (Larchmont, N.Y.)* **6**, 19-27.
30. Clermont, O., Bonacorsi, S. & Bingen, E. (2000). Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. *Applied and environmental microbiology* **66**, 4555-4558.
31. Thompson, J. D., Higgins, D. G. & Gibson, T. J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic acids research* **22**, 4673-4680.
32. Harel, J., Lapointe, H., Fallara, A., Lortie, L. A., Bigras-Poulin, M., Lariviere, S., *et al.* (1991). Detection of genes for fimbrial antigens and enterotoxins associated with

- Escherichia coli* serogroups isolated from pigs with diarrhea. *Journal of clinical microbiology* **29**, 745-752.
33. Bush, K., Jacoby, G. A. & Medeiros, A. A. (1995). A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **39**, 1211-1233.
 34. Chopra, I. & Roberts, M. (2001). Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR* **65**, 232-260 ; second page, table of contents.
 35. Huovinen, P., Sundstrom, L., Swedberg, G. & Skold, O. (1995). Trimethoprim and sulfonamide resistance. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **39**, 279-289.
 36. Miller, G. H., Sabatelli, F. J., Hare, R. S., Glupczynski, Y., Mackey, P., Shlaes, D., *et al.* (1997). The most frequent aminoglycoside resistance mechanisms--changes with time and geographic area: a reflection of aminoglycoside usage patterns? Aminoglycoside Resistance Study Groups. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* **24 Suppl 1**, S46-62.
 37. Murray, I. A. & Shaw, W. V. (1997). O-Acetyltransferases for chloramphenicol and other natural products. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **41**, 1-6.
 38. White, D. G., Hudson, C., Maurer, J. J., Ayers, S., Zhao, S., Lee, M. D., *et al.* (2000). Characterization of chloramphenicol and florfenicol resistance in *Escherichia coli* associated with bovine diarrhea. *Journal of clinical microbiology* **38**, 4593-4598.
 39. Johnson, J. R. & Russo, T. A. (2002). Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: "the other bad *E coli*". *The Journal of laboratory and clinical medicine* **139**, 155-162.
 40. Bertchinger, H. U. & Fairbrother, J. M. (1999). *Escherichia coli* Infections. In: *Diseases of swine*, 8 edn. (Straw, B. E., D'Allaire, S., Mengeling, W. L. & Taylor, D. J., Eds), pp. 431-468. Iowa State University Press, Ames.
 41. Alekshun, M. N. & Levy, S. B. (2000). Bacterial drug resistance: Response to survival threats. In: *Bacterial stress responses*. (Storz, G. & Hengge-Aronis, R., Eds), pp. 323-366. ASM Press, Washinton, D. C.
 42. O'Connor, A. M., Poppe, C. & McEwen, S. A. (2002). Changes in the prevalence of resistant *Escherichia coli* in cattle receiving subcutaneously injectable oxytetracycline in addition to in-feed chlortetracycline compared with cattle receiving only in-feed chlortetracycline. *Canadian journal of veterinary research - Revue canadienne de recherche veterinaire*. **66**, 145-150.

43. Feria, C., Ferreira, E., Correia, J. D., Goncalves, J. & Canica, M. (2002). Patterns and mechanisms of resistance to beta-lactams and beta-lactamase inhibitors in uropathogenic *Escherichia coli* isolated from dogs in Portugal. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* **49**, 77-85.
44. Brinas, L., Zarazaga, M., Saenz, Y., Ruiz-Larrea, F. & Torres, C. (2002). beta-Lactamases in Ampicillin-Resistant *Escherichia coli* Isolates from Foods, Humans, and Healthy Animals. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **46**, 3156-3163.
45. Zhao, S., White, D. G., McDermott, P. F., Friedman, S., English, L., Ayers, S., *et al.* (2001). Identification and expression of cephamycinase *bla*(CMY) genes in *Escherichia coli* and *Salmonella* isolates from food animals and ground meat. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **45**, 3647-3650.
46. Shaw, K. J., Rather, P. N., Hare, R. S. & Miller, G. H. (1993). Molecular genetics of aminoglycoside resistance genes and familial relationships of the aminoglycoside-modifying enzymes. *Microbiological reviews* **57**, 138-163.
47. Gilmore, A. (1986). Chloramphenicol and the politics of health. *CMAJ : Canadian Medical Association journal - Journal de l'Association medicale canadienne* **134**, 423, 426-428, 433-425.
48. Bischoff, K. M., White, D. G., McDermott, P. F., Zhao, S., Gaines, S., Maurer, J. J., *et al.* (2002). Characterization of chloramphenicol resistance in beta-hemolytic *Escherichia coli* associated with diarrhea in neonatal swine. *Journal of clinical microbiology* **40**, 389-394.
49. Lanz, R., Kuhnert, P. & Boerlin, P. (2003). Antimicrobial resistance and resistance gene determinants in clinical *Escherichia coli* from different animal species in Switzerland. *Veterinary microbiology* **91**, 73-84.
50. Werckenthin, C., Seidl, S., Riedl, J., Kiossis, E., Wolf, G., Stolla, R., *et al.* (2002). *Escherichia coli* isolates from young calves in Bavaria: in vitro susceptibilities to 14 anti-microbial agents. *Journal of veterinary medicine. B, Infectious diseases and veterinary public health.* **49**, 61-65.
51. Keyes, K., Hudson, C., Maurer, J. J., Thayer, S., White, D. G. & Lee, M. D. (2000). Detection of florfenicol resistance genes in *Escherichia coli* isolated from sick chickens. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **44**, 421-424.
52. Cloeckaert, A., Baucheron, S., Flaujac, G., Schwarz, S., Kehrenberg, C., Martel, J. L., *et al.* (2000). Plasmid-mediated florfenicol resistance encoded by the *floR* gene in

- Escherichia coli* isolated from cattle. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **44**, 2858-2860.
53. Jacoby, G. A. (1994). Extrachromosomal resistance in gram-negative organisms: the evolution of beta-lactamase. *Trends Microbiol* **2**, 357-360.
 54. Tenover, F. C. & Rasheed, J. K. (1998). Genetic methods for detecting antimicrobial and antiviral resistance genes. *In: Manual of clinical microbiology*, 7 edn. (Murray, P. R., Ed), pp. 1578-1592, Washington, D.C.
 55. Bass, L., Liebert, C. A., Lee, M. D., Summers, A. O., White, D. G., Thayer, S. G., *et al.* (1999). Incidence and characterization of integrons, genetic elements mediating multiple-drug resistance, in avian *Escherichia coli*. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **43**, 2925-2929.
 56. Roy, P. H. (1997). Dissémination de la résistance aux antibiotiques : le génie génétique à l'oeuvre chez les bactéries. *Médecine/Sciences* **13**, 927-933.
 57. Schmitz, F. J., Hafner, D., Geisel, R., Follmann, P., Kirschke, C., Verhoef, J., *et al.* (2001). Increased prevalence of class I integrons in *Escherichia coli*, *Klebsiella* species, and *Enterobacter* species isolates over a 7-year period in a German university hospital. *Journal of clinical microbiology* **39**, 3724-3726.
 58. Levesque, C., Piche, L., Larose, C. & Roy, P. H. (1995). PCR mapping of integrons reveals several novel combinations of resistance genes. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **39**, 185-191.
 59. Meunier, D., Baucheron, S., Chaslus-Dancla, E., Martel, J. L. & Cloeckaert, A. (2003). Florfenicol resistance in *Salmonella enterica* serovar Newport mediated by a plasmid related to R55 from *Klebsiella pneumoniae*. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* **51**, 1007-1009.
 60. Smyth, C. J., Marron, M. & Smith, S. G. J. (1994). Fimbriae of *Escherichia coli*. *In: Escherichia coli in domestic animals and humans*. (Gyles, C. L., Ed), pp. 399-435. CAB international, Guelph.
 61. Opal, S. M., Cross, A. S., Gemski, P. & Lyhte, L. W. (1990). Aerobactin and alpha-hemolysin as virulence determinants in *Escherichia coli* isolated from human blood, urine, and stool. *The Journal of infectious diseases* **161**, 794-796.
 62. Bindereif, A. & Neilands, J. B. (1985). Aerobactin genes in clinical isolates of *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology* **161**, 727-735.

63. Donnenberg, M. S. & Welch, R. A. (1996). Virulence determinants of uropathogenic *Escherichia coli*. In: *Urinary tract infections*, H. L. T. Mobley and J. W. Warren ASM press edn), pp. 135-174.
64. Johnson, J. R., Delavari, P., Kuskowski, M. & Stell, A. L. (2001). Phylogenetic distribution of extraintestinal virulence-associated traits in *Escherichia coli*. *The Journal of infectious diseases* **183**, 78-88.
65. Hacker, J. & Kaper, J. B. (2000). Pathogenicity islands and the evolution of microbes. *Annual review of microbiology* **54**, 641-679.
66. Herzer, P. J., Inouye, S., Inouye, M. & Whittam, T. S. (1990). Phylogenetic distribution of branched RNA-linked multicopy single- stranded DNA among natural isolates of *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology* **172**, 6175-6181.
67. Boyd, E. F. & Hartl, D. L. (1998). Chromosomal regions specific to pathogenic isolates of *Escherichia coli* have a phylogenetically clustered distribution. *Journal of bacteriology* **180**, 1159-1165.
68. Bingen, E., Picard, B., Brahimi, N., Mathy, S., Desjardins, P., Elion, J., *et al.* (1998). Phylogenetic analysis of *Escherichia coli* strains causing neonatal meningitis suggests horizontal gene transfer from a predominant pool of highly virulent B2 group strains. *The Journal of infectious diseases* **177**, 642-650.

TABLE I. PCR primers used for antimicrobial resistance gene amplifications

Antimicrobial family	Genetic markers	Forward PCR primer sequence (5'-3')	Reverse PCR primer sequence (5'-3')	Amplicon size (bp)	Genbank accession no.	Source of DNA
Beta-Lactams	<i>bla</i> _{TEM}	GAGTATTCAACATTTTCGT	ACCAATGCTTAATCAGTGA	857	AF309824	R. C. Levesque
	<i>bla</i> _{SHV}	TCGCCTGTGTAATTATCTCCC	CGGAGATAAATCACCACAATG	768	AF148850	R. C. Levesque
	<i>bla</i> _{OXA-1}	GCAGGCCAGTGCATCAAC	CCGCATCAAATGCCATAAGTG	198	AJ238349	Pasteur Institute
	<i>bla</i> _{OXA-7}	AGTTCTTGC CGAAGCC	TCTCAACCCCAACCAACCC	591	X75562	R. C. Levesque
	<i>bla</i> _{PS-4}	CTGCTCGTATAGGTGTTCC	TCGCATCATTTTCGGCTTTC	705	J05162	R. C. Levesque
	<i>bla</i> _{CTX-M-3}	AATCACTGCGTCAGTTCAC	TTTTATCCCCCACAAACCCAG	701	X92506	A. Huletsky
	Aminoglycosides	<i>ant</i> (2'')-Ia (<i>aadB</i>) ^a	TCCAGAACCTTTGACCGAAC	GCAAGACCTCAACCTTTTCC	700	X04555
Tetracycline	<i>aac</i> (3)-IIa (<i>aacC2</i>)	CGGAAGGCAATAACGGAG	TCGAACAGGTAGCACTGAG	740	X54723	D. Sandvang
	<i>aac</i> (3)-IV	GTGTGCTGCTGGTCCACAGC	AGTTGACCCAGGGCTGTCCG	627	X01385	J. Harel
	<i>aph</i> (3')-Ia (<i>aphA1</i>)	ATGGGCTCGCGATAATGTC	CTCACCCGAGGCAGTTCCAT	600	M18329	J. Harel
	<i>aph</i> (3')-IIa (<i>aphA2</i>)	GAACAAGATGGATTGCACGC	GCTCTTCAGCAATATCACGG	680	V00618	J. Harel
	<i>tet</i> (A)	GTGAAACCCCAACATACCCC	GAAAGCAAGCAGGATGTAG	888	X00006	J. Harel
	<i>tet</i> (B)	CCTTATCATGCCAGTCTTGC	ACTGCCGTTTTTCGGCC	774	J01830	J. Harel
	<i>tet</i> (C)	ACTTGGAGCCACTATCGAC	CTACAATCCATGCCAAACCC	881	J01749	J. Harel
Phenicolis	<i>tet</i> (D)	TGGCAGATGGTCAGATAAG	CAGCACACCTGTAGTTTC	827	X65876	S. B. Levy
	<i>tet</i> (E)	TTAATGGCAACAGCCAGC	TCCATACCCATCCCATTCAC	853	L06940	M. C. Roberts
	<i>tet</i> (Y)	ACCGCACTCATTTGTTGC	TTCCAAGCAGCAACACAC	823	AF070999	M. C. Roberts
	<i>catI</i>	AGTTGCTCAATGTACCTATAACC	TTGTAATTCATTAAGCAITTCGCC	547	M62822	J. Harel

<i>catII</i>	ACACTTTGCCCTTTATCGTC	TGAAAAGCCATCACATACTGC	543	X53796	Pasteur Institute
<i>catIII</i>	TTCCCGGTGAGCAATTTTG	TCGGATGAGTATGGGCAAC	286	X07848	I. A. Murray
<i>floR</i>	CGCCGTCATTCTCTCACCTTC	GATCACGGGGCCACGGCTGTGTC	215	AF252855	D. G. White
<i>dhfrI</i>	AAGAAATGGAGTTATCGGAAATG	GGGTAAAAAACTGGCCTAAAAATTG	391	X00926	J. Harel
<i>dhfrV</i>	CTGCCAAAAGCGAAAACCGG	AGCAATAGTTAATGTTTGAGCTAAAAG	432	X12868	O. Sköld
<i>dhfrVII</i>	GGTAATGGCCCTGATATCCC	TGTAGATTTGACCGCCACC	265	X58425	O. Sköld
<i>dhfrIX</i>	TCTAAAACATGATTGTCGCTGTC	TTGTTTTTCAGTAATGGTCGGG	462	X57730	C. Wallen
<i>dhfrXIII</i>	CAGGTGAGCAGAAGATTTTT	CCTCAAAGGTTTGATGTACC	294	Z50802	P. V. Adrian
<i>sulI</i>	TTCCGGCATTCTGAATCTCAC	ATGATCTAACCCCTCGGTCTC	822	X12869	R. C. Levesque
<i>sulIII</i>	CGGCATCGTCAACATAACC	GTGTGGGATGAAGTCAG	722	M36657	J. Harel
<i>afa3</i>	CAT CAA GCT GTT TGT TCG TCC GCC G	GCT GGG CAG CAA ACT GAT AAC TCT	793	X76688	J. Harel
<i>afaD8</i>	GTT GAA CTG AGT CTT AAT ACC AGT	TGA GCA TTC TCC GCT AAC TGA TAA T	351	AF072900	J. Harel
<i>sfaDE</i>	CTC CGG AGA ACT GGG TGC ATC TTA C	CGG AGG AGT AAT TAC AAA CCT GGC	408	X16664	J. Harel
<i>papC</i>	GAC GGC TGT ACT GCA GGG TGT GGC G	ATA TCC TTT CTG CAG GGA TGC AAT A	318	X61239	J. Harel
<i>hlyA</i>	TGT TGA AAG ATC AGT CCT CA	CTG CGT AGA TAT TGG CTG AG	500	M10133	J. Harel
<i>iucD</i>	AAG TGT CGA TTT TAT TGG TGT A	CCA TCC GAT GTC AGT TTT CTG	778	M18968	J. Harel
<i>qacEΔ1-sulI</i>	ATCCCAATAGTTGGCGAAGT	GCAAGGGCGAAACCCCGCCC	797	X12870	J. Harel
<i>VR</i>	GGCATCCAAGCAGCAAGC	AAGCAGACTTGACCTGAT	Variable	X12870	
<i>chuA</i>	GAC GAA CCA ACG GTC AGG AT	TGC CGC CAG TAC CAA AGA CA	279	AF280396	
<i>yjaA</i>	TGA AGT GTC AGG AGA CGC TG	ATG GAG AAT GCG TTC CTC AAC	211	NC_000913	
TspE4.C2	GAG TAA TGT CGG GGC ATT CA	CGC GCC AAC AAA GTA TTA CG	152	AF222188	

^a Alternative nomenclature.

TABLE II. Number of resistant animal and human isolates determined by disc diffusion method

ATM ^a	No. of resistant animal and human strains (%)			
	Animal isolates (n = 39)	Human isolates from 1990 (n = 16)	Human isolates from 2001 (n = 54)	Total human isolates (n = 70)
AMP	28 (72)	10 (62)	44 (81)	54 (77)
CTX, XLN	7 (18)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
GEN	6 (15)	0 (0)	9 (17)	9 (13)
NEO	7 (18)	0 (0)	4 (7)	4 (6)
KAN	8 (21)	0 (0)	7 (13)	7 (10)
TET	32 (82)	6 (38)	29 (54)	34 (48)
CHL	8 (21)	0 (0)	17 (31)	17 (24)
TMP	16 (41)	4 (25)	23 (42)	27 (38)
SUL	30 (77)	8 (50)	40 (74)	48 (68)

^aATM, antimicrobials: AMP, ampicillin; CTX, cefotaxime; XLN, ceftiofur; GEN, gentamicin; NEO, neomycin; KAN, kanamycin; CHL, chloramphenicol; TET, tetracycline; TMP, trimethoprim; SUL, sulfonamides

TABLE III. Animal and human isolates which gave a positive hybridisation with the resistance and virulence tested probe and had the associated resistance phenotype

Number of positive isolates according to the isolation origin (%)^a

Antimicrobial agent	Genetic marker probe	Human isolates from			Total human isolates
		Animal isolates	1990	2001	
Ampicillin	<i>bla_{TEM}</i>	19 (68)	8 (80)	42 (89)	50 (88)
	<i>bla_{SHV}</i>	0 (0)	3 (30)	4 (9)	7 (12)
	<i>bla_{OXA-1}</i>	3 (11)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	<i>bla_{OXA-7}</i> , <i>bla_{PSE-4}</i> ,	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	<i>bla_{CTX-M-3}</i>				
Gentamicin	<i>aac(3)-IIa</i>	1 (17)	0 (0)	3 (33)	3 (33)
	<i>aac(3)-IV</i> ,	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	<i>ant(2'')-Ia</i>				
Kanamycin	<i>aph(3')-Ia</i>	6 (86)	0 (0)	2 (50)	2 (50)
	<i>ant(2'')-Ia</i>	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	<i>aph(3')-IIa</i>				
Neomycin	<i>aph(3')-Ia</i>	8 (100)	0 (0)	5 (71)	5 (71)
	<i>ant(2'')-Ia</i>	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	<i>aph(3')-IIa</i>				
Tetracycline	<i>tet(A)</i>	17 (53)	2 (33)	13 (46)	15 (44)
	<i>tet(B)</i>	14 (44)	3 (50)	15 (54)	18 (53)
	<i>tet(C)</i>	15 (47)	2 (33)	10 (36)	12 (35)
	<i>tet(D)</i>	0 (0)	2 (33)	0 (0)	2 (6)

	<i>tet(E)</i> , <i>tet(Y)</i>	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Chloramphenicol	<i>catI</i>	1 (13)	0 (0)	0 (0)	14 (82)	0 (0)
	<i>catII</i>	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	<i>catIII</i>	1 (13)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	<i>floR</i>	5 (63)	0 (0)	0 (0)	1 (6)	1 (6)
Trimethoprim	<i>dhfrI</i>	4 (25)	3 (75)	7 (30)	10 (37)	0 (0)
	<i>dhfrV</i>	6 (38)	0 (0)	1 (4)	1 (4)	1 (4)
	<i>dhfrVII</i>	0 (0)	0 (0)	9 (39)	9 (33)	0 (0)
	<i>dhfrXIII</i>	6 (38)	0 (0)	1 (4)	1 (4)	1 (4)
	<i>dhfrIX</i>	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Sulfonamides	<i>sulI</i>	14 (50)	3 (38)	30 (75)	33 (69)	0 (0)
	<i>sulII</i>	18 (67)	5 (63)	24 (60)	29 (60)	0 (0)
Virulence	<i>afa3</i>	1 (2)	3 (19)	4 (7)	7 (10)	0 (0)
	<i>afaD8</i>	5 (13)	0 (0)	1 (2)	1 (1)	0 (0)
	<i>sfaDE</i>	10 (26)	8 (50)	19 (35)	27 (38)	0 (0)
	<i>papC</i>	19 (49)	12 (75)	25 (46)	37 (53)	0 (0)
	<i>hlyA</i>	9 (23)	11 (69)	23 (43)	34 (48)	0 (0)
	<i>iucD</i>	30 (77)	4 (25)	30 (56)	34 (48)	0 (0)

^a Percentage of probe-positive isolates among resistant isolates

TABLE IV. Distribution of class 1 integron among the animal and human *E. coli* strains

Isolation periods	Total no. of strains	No. of class 1 integron positive strains (%)	No. of class 1 integron positive strains according to the length of the variable region (%)				
			0.5 kb	1.0 kb	1.6 kb	1.7 kb	1.8 kb
Animal isolates	39	13 (33)	1 (7)	8 (58)	3 (21)	1 (7)	0 (0)
Human isolates from 1990	16	3 (19)	0 (0)	3 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Human isolates from 2001	54	19 (35)	1 (5)	10 (53)	6 (32)	0 (0)	2 (10)
Total human isolates	70	22 (31)	1 (4)	13 (59)	6 (28)	0 (0)	2 (9)
Total	109	57 (52)	3 (5)	34 (59)	15 (26)	1 (2)	4 (7)

TABLE V. Association between antimicrobial resistance genes, class 1 integron and virulence genes among the ExPEC strains isolated from animals

Antimicrobial resistance genes, class 1 integron and virulence genes ^a																	
	<i>tem</i>	<i>floR</i>	<i>aph(3')-Ia</i>	<i>dhfrI</i>	<i>dhfrV</i>	<i>dhfrXIII</i>	<i>sull</i>	<i>sullI</i>	<i>tet(A)</i>	<i>tet(B)</i>	<i>tet(C)</i>	<i>Int 1</i>	<i>afaD8</i>	<i>sfaDE</i>	<i>papC</i>	<i>hlyA</i>	
<i>floR</i>	-																
<i>aph(3')-Ia</i>	-	+															
<i>dhfrI</i>	-	-															
<i>dhfrV</i>	++	-															
<i>dhfrXIII</i>	-	-															
<i>sull</i>	-	-															
<i>sullI</i>	-	-	++														
<i>tet(A)</i>	+	-															
<i>tet(B)</i>	-	-							(+) ^b								
<i>tet(C)</i>	+	-							+++								
<i>Int 1</i>	-	-					+++		+		+						
<i>afaD8</i>	-	-				+			-	+							
<i>sfaDE</i>	-	-							-								
<i>papC</i>	-	-							-						+		
<i>hlyA</i>	-	-							-						+++		-
<i>iucD</i>	-	-							-						(++)		(++)

^a Only antimicrobial resistance genes that exhibited association with another genes at the $P < 0.05$ level are shown. Significance level of association (as assessed by the chi-square exact test): -, $P > 0.05$; +, $0.05 \geq P \geq 0.01$; ++, $0.01 \geq P \geq 0.001$; +++, $0.001 \geq P$.

^b Parentheses indicate the negative associations.

TABLE VI. Association between antimicrobial resistance genes, class 1 integron and virulence genes among the ExPEC strains isolated from humans

Antimicrobial resistance genes, class 1 integron and virulence genes ^a																	
	<i>tem</i>	<i>shv</i>	<i>catI</i>	<i>aac(3)-II</i>	<i>dhfrII</i>	<i>dhfrVII</i>	<i>sulI</i>	<i>sulII</i>	<i>tet(A)</i>	<i>tet(B)</i>	<i>tet(C)</i>	<i>tet(D)</i>	<i>Int 1</i>	<i>sfaDE</i>	<i>papC</i>	<i>hlyA</i>	
<i>shv</i>	-																
<i>catI</i>	-	-															
<i>aac(3)-IIa</i>	-	-	-														
<i>dhfr-I</i>	-	-	-														
<i>dhfr-VII</i>	-	-	-	++													
<i>sulI</i>	-	-	-	-		+											
<i>sulII</i>	+++	-	-	-		-											
<i>tet(A)</i>	-	-	-	-		-	++										
<i>tet(B)</i>	-	-	++	-		-	-	++									
<i>tet(C)</i>	-	-	-	-		-	++	-	+++								
<i>tet(D)</i>	-	++	-	-		+	-	-	-								
<i>intI</i>	-	-	-	-		-	+++	-	+								
<i>sfaDE</i>	-	-	-	-		-	-	-	-		+						
<i>papC</i>	-	-	-	-		-	-	-	-		-			+			
<i>hlyA</i>	-	-	-	-		++	-	-	-		-			+++		+++	
<i>iucD</i>	-	-	-	-		-	-	++	-		-			+++		-	+

^a Only antimicrobial resistance genes that exhibited association with another genes at the $P < 0.05$ level are shown. Significance level of association (as assessed by the chi-square exact test): -, $P > 0.05$; +, $0.05 \geq P \geq 0.01$; ++, $0.01 \geq P \geq 0.001$; +++, $0.001 \geq P$.

SECTION III - Discussion

Discussion

Étude portant sur les isolats *Escherichia coli* entérotoxigènes

Les bactéries *Escherichia coli* entérotoxigènes (ETEC) sont des pathogènes du porc causant des diarrhées chez les nouveau-nés et chez les porcelets en postsevrage. Les ETEC de sérotype O149: K91 sont plus souvent isolées depuis quelques années et représentent le sérotype prédominant associé aux diarrhées chez le porc (Bischoff, K. M. *et al.* 2002; Teshager, T. *et al.* 2000; Mathew, A. G. *et al.* 1999). Les ETEC sont aussi associées à certains autres sérotypes : O8, O9, O20, O101, O138 et O141 (Garabal, J. I. *et al.* 1996). Malgré ce nombre limité de sérotypes, les souches ETEC montrent une certaine diversité génétique (Nagy, B. and Fekete, P. Z. 1999). En effet, par les événements de transferts horizontaux, les éléments génétiques acquis diffèrent entre les souches. Plusieurs clones semblent avoir évolué en prenant différentes directions et en acquérant de nouveaux gènes.

Chez les animaux, les infections entériques deviennent difficiles à traiter puisque, de plus en plus, l'agent pathogène en cause est résistant aux agents antimicrobiens. Ceci est dû, entre autre, à la grande quantité d'agents antimicrobiens qu'ils reçoivent. En effet, certains groupes d'animaux de ferme reçoivent des agents antimicrobiens dans leur moulu, en plus de ceux utilisés pour le contrôle des infections. Même si les agents antimicrobiens sont employés relativement fréquemment dans l'élevage des animaux et que la résistance à ceux-ci augmente rapidement, peu d'études ont tenté de caractériser directement les gènes codant pour cette résistance chez *E. coli*. Les études se sont plutôt intéressées au phénotype de résistance des isolats. Très peu d'études donnent des informations sur les gènes impliqués dans la résistance de ces isolats.

La caractérisation génétique de la résistance chez *E. coli* isolé d'animaux n'a été abordée, à notre connaissance, que par deux récentes études. La première s'est penchée sur la caractérisation génotypique de la résistance à la tétracycline, à la streptomycine et aux sulfamides chez des souches *E. coli* isolées d'animaux et d'humains (Lanz, R. *et al.* 2003). La deuxième s'est plutôt concentrée sur la caractérisation des profils de résistance aux aminoglycosides retrouvés chez des souches *E. coli* d'origine porcine et bovine (Sandvang, D. and Aarestrup, F. M. 2000). Notre étude démontre, quant à elle, les différents profils de

résistance en regroupant les 28 gènes de résistance différents retrouvés parmi 118 isolats ETEC de sérotype O149 : K91 provenant de porcelets atteints d'une diarrhée postsevrage. En plus d'offrir une information sur le génotype de résistance aux agents antimicrobiens chez les ETEC, notre étude donne une information supplémentaire sur le changement des profils de résistance qui se produit dans le temps puisque ces isolats ont été isolés sur une période de 23 années.

1.0 Profil phénotypique de la résistance

1.0.1 Sélection de la résistance

L'usage d'agents antimicrobiens permet une sélection des souches résistantes à ces agents. Par exemple, l'utilisation d'ampicilline permet une sélection au niveau des souches résistantes à l'ampicilline et ainsi, permet d'augmenter la concentration en bactéries résistantes à cet agent. Dans notre étude, nous avons pu mettre en évidence cette notion en regardant les agents antimicrobiens utilisés chez le porc et le phénotype de résistance exprimé par les souches ETEC. Nous savons que les tétracyclines sont employées dans l'élevage du porc pour le traitement d'infections de toutes sortes, mais aussi comme facteur de croissance et en prophylaxie, depuis plusieurs années (Tableau I, Recension de la littérature). Or, chez les isolats possédant au moins une résistance, nous observons que 90% sont résistantes à la tétracycline. Depuis 1978 jusqu'en l'an 2000, le pourcentage de souches résistantes à cet agent est demeuré assez stable. Les tétracyclines ont été utilisées de façon intensive avant 1978. Il n'est donc pas surprenant d'observer une résistance élevée. Toutefois, il ne faut pas perdre en tête le fait que les isolats choisis pour cette étude ont à prime à bord été sélectionnés à partir d'une banque de souches selon leur résistance. En effet, les souches ayant au moins une résistance aux agents testés ont été sélectionnées pour cette étude. Quant au phénotype de résistance aux sulfamides, le même scénario est observé. Les isolats sont résistants à cet agent dans 86% des cas et ce profil est resté stable depuis 1978.

Lorsque nous nous penchons sur le phénomène de résistance aux agents antimicrobiens utilisés seulement en traitement, le profil est différent de celui observé pour ceux utilisés comme facteur de croissance et/ou en prophylaxie. C'est le cas de l'ampicilline, de la gentamicine et de la triméthoprime (Tableau I, Recension de la littérature) qui ne sont administrés qu'en cas d'infections. L'ampicilline est donnée rarement chez le porc. Toutefois, un homologue à l'ampicilline, l'amoxicilline, est employée fréquemment dans l'eau contre

les infections à *Streptococcus suis* et *Haemophilus parasuis*. L'amoxicilline est une molécule non homologuée en médecine vétérinaire qui se différencie de l'ampicilline par un groupement OH au noyau benzène de la chaîne carboxyle. Cette substitution permet à l'amoxicilline d'être plus soluble et plus facilement absorbée que sont homologues (Prescott, J. F. *et al.* 2000). Cependant, la résistance bactérienne à l'un permet la résistance à l'autre sous forme de résistance croisée.

La gentamicine semble encore être peu employée et lorsqu'elle est utilisée, elle est administrée en injection afin de traiter différentes infections chez les porcs. La triméthoprimine peut être utilisée seule dans de rares cas mais, dans la majorité des cas, elle est utilisée en combinaison avec les sulfamides dans l'eau ou en injection chez les porcs. On observe une résistance à l'ampicilline, à la gentamicine et à la triméthoprimine chez environ 25% des souches *E. coli*. Même si la triméthoprimine est normalement administrée en combinaison avec une sulfamide, nous retrouvons un pourcentage d'isolats résistants à la triméthoprimine moindre que celui de la résistance aux sulfamides. L'utilisation des sulfamides seules dans la moule des porcs, comme facteur de croissance peut sélectionner les souches résistantes aux sulfamides seulement et ainsi expliquerait cet écart. En raison des problèmes de résidus de sulfamides dans les carcasses de viande, cet agent est de moins en moins employé chez les porcs destinés à la consommation humaine. Par l'utilisation de facteurs de croissance, on crée une situation où les souches résistantes sont sélectionnées, ce qui favorise le développement de la multirésistance bactérienne. Ceci vient donc renforcer l'hypothèse que la résistance se développe, non par une utilisation sporadique de forte quantité d'agents antimicrobiens, mais plutôt par une utilisation soutenue.

La hausse de la résistance au chloramphénicol est un phénomène qui a attiré notre attention puisque cet agent n'est plus employé au Canada depuis 1980 (Gilmore, A. 1986). La hausse de la résistance pourrait s'expliquer par une sélection croisée produite par l'utilisation de d'autres agents antimicrobiens ou par une utilisation illégale du chloramphénicol dans l'élevage du porc. Étant donné que l'Agence Canadienne d'Inspection des Aliments (ACIA) ne semble pas avoir retrouvé de traces de résidus de chloramphénicol dans les carcasses de porc examinées depuis son bannissement, nous pouvons présumer que l'utilisation illégale de chloramphénicol serait très sporadique si elle se faisait. La persistance ou l'augmentation de la résistance au chloramphénicol chez des souches *E. coli* isolées d'animaux a aussi été observée par d'autres auteurs (Bischoff, K. M. *et al.* 2002; Teshager, T. *et al.* 2000; Lanz, R.

et al. 2003; Werckenthin, C. *et al.* 2002). Bourque *et al.* ont aussi constaté durant leur étude que la résistance au chloramphénicol ainsi qu'à la néomycine et à l'ampicilline, chez des isolats ETEC, augmentait de façon significative lorsque les porcs recevaient dans leur moule 100 ppm de néomycine et 100 ppm de tétracycline (Bourque *et al.*, 1980). Toutefois, il faut noter que l'usage du chloramphénicol n'a pas été interdit dans tous les pays en même temps.

1.0.2 Émergence de la multirésistance

Lorsque nous observons de près nos résultats en rapport avec la phénotypie de la résistance des isolats ETEC, nous pouvons voir une augmentation dans le temps de la multirésistance (Figure 2, Annexes). Les isolats de la première période (1978-1984) étaient résistants en majorité (41%) à deux agents antimicrobiens testés et cette observation s'applique aussi pour la deuxième période (1985-1989) (57%). Nous pouvons noter tout de même que certains isolats dans ces deux périodes étaient multirésistants. Toutefois, à partir de 1990, le pourcentage d'isolats multirésistants devient plus élevé pour atteindre 76% dans la dernière période (1995-2000). Il semblerait que la résistance aux différents agents testés ait augmenté rapidement à partir de 1995. Vers les années 90, nous avons pu être témoin d'une nouvelle gestion des agents antimicrobiens dans l'élevage porcin, au Québec. Quarante pour cent des porcelets au Québec sont sevrés entre 16 et 19 jours d'âge. Ce sevrage plus hâtif des porcelets a contribué à l'établissement d'infections chez les porcelets en postsevrage et donc à l'administration d'agents antimicrobiens en prophylaxie (communication personnelle). Il en résulte une augmentation de la quantité d'agents antimicrobiens utilisés (chlortétracycline et triméthoprimé/ sulfisoxazole) chez le porc afin de prévenir les infections à *Streptococcus suis* ou à *Haemophilus parasuis* associées souvent au sevrage hâtif. Ceci expliquerait peut-être l'augmentation de la multirésistance chez *E. coli* isolé de porcs. La multirésistance chez des isolats *E. coli* provenant de porcs n'est pas rare. En effet, plusieurs études ont démontré la résistance à plus de deux agents antimicrobiens chez plusieurs isolats *E. coli* (Amezcuca, R. *et al.* 2002; Teshager, T. *et al.* 2000; Mathew, A. G. *et al.* 1999; Lanz, R. *et al.* 2003; Sunde, M. and Sorum, H. 1999; Mathew, A. G. *et al.* 1998). Les agents antimicrobiens les plus souvent en cause sont la tétracycline, les sulfamides, la triméthoprimé et le chloramphénicol. Nous devons préciser que peut-être des résistances à d'autres aminoglycosides tels que la streptomycine et la spectinomycine auraient pu être démontrées si nous avions testé ceux-ci. Cependant, comme nous recherchions des gènes acquis, il nous apparaissait difficile d'incorporer ces deux derniers agents puisque la résistance par mutation chromosomique peut survenir facilement.

Notre étude surestime le nombre de souches résistantes, car seulement les souches démontrant une résistance à un agent antimicrobien lors de leur isolement ont été analysées. Nous devons noter que quelques souches, qui avaient présenté une ou des résistances à certains agents antimicrobiens lors de leur caractérisation au Laboratoire *E. coli* de la faculté de médecine vétérinaire, n'étaient plus résistantes aux agents testés par la suite. Ceci pourrait s'expliquer par la perte de la résistance suite à des repiquages; un tel phénomène est reconnu depuis longtemps en bactériologie.

1.1 Profil génotypique de la résistance

1.1.1 Diversité des gènes

Les résultats de la résistance phénotypique retrouvée chez les souches ETEC de notre collection démontrent qu'il y a eu une augmentation de la multirésistance parmi les souches résistantes dans le temps. La caractérisation de cette résistance a démontré qu'elle était due à plusieurs gènes de résistance différents. Par exemple, la diversité génétique s'est beaucoup accrue au niveau des gènes de résistance à la triméthoprine (Table 3, Article I). En effet, sur les six gènes testés, quatre ont été retrouvés parmi les souches ETEC et associés une résistance phénotypique à cet agent. Toutefois, nous savons qu'il existe plusieurs gènes de résistance à la triméthoprine qui ont été décrits chez *E. coli* (Huovinen, P. *et al.* 1995). Cette diversité est donc déjà connue.

En plus de la diversité des gènes de résistance à la triméthoprine, nous remarquons que, dans l'ensemble, certains gènes sont plus présents dans une période d'isolement donnée tandis que d'autres le sont moins (Table 3, Article I). Les gènes de résistance aux aminoglycosides, à la tétracycline ou aux sulfamides sont les gènes pour lesquels ce phénomène est le plus fortement constaté. Le gène *aph(3')-IIa* devient plus fréquent chez les souches isolées dans la dernière période (1995-2000). Le gène *tet(B)* prédomine durant les trois premières périodes pour, en fin de compte, devenir aussi fréquent que les gènes *tet(A)* et *tet(C)* dans la dernière période. Finalement, un changement s'est fait dans la prévalence des gènes de résistance aux sulfamides, *sulI* et *sulII*, dont le deuxième devient aussi fréquent que le premier dans la dernière période. Tous ces changements sont surtout constatés dans la dernière période d'isolement des souches, ce qui laisse présumer qu'entre 1990 et 2000 certains facteurs auraient influencé une sélection de certains gènes de résistance. Afin d'expliquer

l'augmentation de la prévalence du gène *aph(3')-IIa* dans la dernière période et la baisse de la fréquence du gène *aph(3')-Ia*, nous ne pouvons que supposer que la sélection provient de l'émergence d'un clone possédant le gène *aph(3')-IIa* puisque, entre les deux enzymes codées par ces gènes, il n'existe pas de différences au niveau de leur mode d'action ni au niveau de leur spécificité. Les deux gènes codent pour une enzyme ayant une activité de phosphorylation et tous les deux confèrent une résistance à la néomycine ainsi qu'à la kanamycine (Shaw, K. J. *et al.* 1993). Certaines études ont déjà mis en évidence la propagation de gènes de résistance entre différents hôtes par l'isolement de souches ayant le gène de résistance (Hunter, J. E. *et al.* 1994).

La résistance croisée peut expliquer que certains gènes soient présents chez certains isolats à un moment donné. Toutefois, d'autres facteurs peuvent aussi être la cause de l'augmentation de la présence des gènes *tet(A)*, *tet(C)* et *sulIII* dans la dernière période. Une étude concernant trois différentes porcheries ayant une gestion différente des agents antimicrobiens a retrouvé en prédominance les gènes *tet(A)* et *tet(C)* chez les animaux non exposés aux agents antimicrobiens et en prédominance le gène *tet(B)* chez les porcs en ayant reçu (Lee, C. *et al.* 1993). Le mode d'action aussi bien que la spécificité de l'enzyme antimicrobien peuvent exercer une pression sélective positive et contribuer à l'émergence de nouveau gène dans le temps. Par exemple, les classes des déterminants de résistance à la tétracycline A, B, et C sont tous des enzymes ayant une fonction de pompe, mais possédant une spécificité différente. La plupart des gènes *tet* codant pour des pompes confèrent une résistance aux tétracyclines, mais non à la minocycline ou à la glycylicycline. Cependant, le gène *tet(B)* code pour une protéine ayant une fonction de pompe qui confère non seulement une résistance à la tétracycline, mais aussi à la doxycycline et à la minocycline (Testa, R. T. *et al.* 1993). Cette spécificité différente entre les gènes *tet* peut contribuer à la perte ou l'émergence de certaines classes de ces déterminants. Nous posons l'hypothèse que pour la souche, à certains moments, avoir un de ces déterminants plutôt que les autres pourrait donner un certain avantage à celle-ci, d'où l'émergence de ce déterminant.

D'autre part, le changement dans la présence des différents gènes *sul* ne peut être expliqué par un changement dans l'utilisation des agents antimicrobiens. Toutefois, entre les deux gènes, il existe une sensibilité différente pour le substrat PABA. En effet, le gène *sulIII* aurait la capacité de discerner le PABA de l'inhibiteur, les sulfamides (Skold, O. 2001). Bref, la présence du gène *sulIII*, contrairement à celle du gène *sulI*, offrirait à la souche un mécanisme

de résistance plus efficace, sans toutefois, sous-estimer la possibilité que ce gène soit apparu suite à la sélection d'une souche ayant d'autres résistances.

Outre cela, nous remarquons que les gènes de résistance aux différents agents antimicrobiens les plus fréquents correspondent parfois à ceux retrouvés par d'autres études. Par exemple, la résistance aux β -lactamines est conférée, dans la majorité des cas, par la présence des déterminants *tem* et *shv*. Les gènes *oxa*, *pse* et *ctx-m* n'ont pas été retrouvés, ou très peu souvent, parmi les souches testées. Chez les entérobactéries résistantes aux β -lactamines, les études démontrent que *tem* est le gène le plus souvent détecté suivi du gène *shv* (Pai, H. *et al.* 1999) tandis que les gènes *oxa*, *pse* et *ctx-m* sont plus rarement retrouvés. Parmi les gènes de résistance à la gentamicine testés, un seul domine durant toute l'étude. Ce gène nommé *aac(3)-IV* a aussi été détecté parmi des isolats *E. coli* de provenance animale par Sandvang *et al.* (Sandvang, D. and Aarestrup, F. M. 2000). Rappelons que ce gène confère, en plus d'une résistance à la gentamicine, une résistance à l'apramycine, un agent antimicrobien autorisé en médecine vétérinaire depuis 1988. Ces deux agents sont utilisés intensivement dans le traitement de la colibacillose en postsevrage chez le porc (Amezcuca, R. *et al.* 2002). Nous remarquons que les deux autres gènes de résistance aux aminoglycosides observés parmi nos souches sont tous les deux des gènes qui codent pour une phosphotransférase soit de type I ou de type II (Table 3, Article I). Ces gènes donnent une résistance croisée à la néomycine et à la kanamycine (34). Ceci explique le fait que nous ayons retrouvé des souches résistantes à la kanamycine, et ce, même si cet agent antimicrobien n'est pas utilisé dans l'industrie porcine au Canada. Contrairement à nos résultats, Sandvang *et al.* ont retrouvé les gènes de résistance *ant(2'')-Ia* et *aac(3)-IIa* comme étant les plus prévalant parmi des isolats de provenance porcine (Sandvang, D. and Aarestrup, F. M. 2000). Toutefois, les gènes de résistance aux aminoglycosides sont très nombreux à être caractérisés (voir Recension de littérature). Il n'est donc pas tellement surprenant que, d'une étude à une autre, la prévalence de ces gènes diffère. Une étude sur ces gènes de résistance, mais basée sur des isolats de provenance humaine, a démontré que la fréquence de détection de ces gènes varie dans le temps et selon la région géographique de l'isolement de la souche (Miller, G. H. *et al.* 1997). La résistance non attendue au chloramphénicol semble provenir de la présence du gène *catI*. Les gènes *catII* et *catIII* n'ont pas été détectés parmi les souches ETEC. Une étude accomplie par Bischoff *et al.* (Bischoff, K. M. *et al.* 2002), a démontré que parmi les 48 souches *E. coli* résistantes au chloramphénicol testées seulement quatre portaient le gène *catI* ; le gène relativement méconnu, *cmlA*, était responsable de la résistance des autres souches. Ce gène *cmlA* a été

caractérisé par Bissonnette *et al.* (Bissonnette, L. *et al.* 1991) et code pour une résistance non enzymatique due à la synthèse de pompe. Avant l'étude de Bischoff *et al.* en 2002, le gène *cmlA* avait été retrouvé que très rarement parmi des isolats *E. coli*. Peut-être ce gène, s'il avait été testé dans notre étude, serait-il présent chez les quatre souches résistantes au chloramphénicol, mais négatives à l'hybridation pour les gènes *cat*. Finalement, le gène *floR* n'a été détecté que chez une seule souche. D'autres études ont démontré une émergence de ce gène parmi les souches isolées d'animaux (White, D. G. *et al.* 2000; Cloeckaert, A. *et al.* 2000; Keyes, K. *et al.* 2000). Par contre, aucune de nos souches n'était résistante au florfenicol qui n'est utilisé que depuis quelques années dans l'industrie du porc.

De façon analogue aux gènes de résistance aux aminoglycosides, plusieurs gènes de résistance à la triméthoprimine ont été décrits. Sur les six différents gènes testés, quatre ont été détectés parmi les souches ETEC. Tous les quatre ont été isolés plus fréquemment dans la dernière période (1995-2000) d'isolement des souches (Table 3, Article I). Nos résultats peuvent être comparés à ceux obtenus dans une étude réalisée en Corée sur des isolats *E. coli* de provenance d'infections urinaires chez les humains (Lee, J. C. *et al.* 2001). Les auteurs de cette étude ont pu démontrer la présence, par ordre d'importance décroissante, des gènes *dhfrXVII*, *dhfrXII*, *dhfrI*, *dhfrV* et *dhfrVII* chez leurs isolats. La présence des trois derniers a été vérifiée dans notre étude, mais *dhfrVII* n'a pas été retrouvés. La résistance aux sulfamides, qui est souvent associée à celle de la triméthoprimine, est due, parmi les souches étudiées, à la présence du gène *sulI* (en majorité) suivi du gène *sulII*. La prévalence de *sulI* parmi des isolats de porc a aussi été remarquée par Lanz *et al.* (Lanz, R. *et al.* 2003).

1.1.2 Mobilité des gènes de résistance

La haute fréquence du gène *sulI* parmi les souches ETEC nous amène à croire en la présence d'intégrons de classe 1 chez ces souches. En effet, l'intégron de classe 1 est caractérisé par une région 3'-conservée contenant les gènes *qacEΔ1* et *sulI* (Figure 1, Recension de la littérature). La présence d'intégrons permet à la souche d'insérer plusieurs gènes de résistance aux agents antimicrobiens sous forme de cassettes à l'intérieur de celui-ci et donc, permet la dissémination, en plus de l'accumulation, de ces gènes. Comparativement aux plasmides, qui sont des éléments génétiques mobiles possédant une origine de répllication propre, l'intégron ne peut pas se répliquer de façon autonome. Il doit alors être répliqué soit grâce à l'origine de répllication d'un plasmide ou grâce à la répllication du chromosome de la bactérie hôte, selon si l'intégron est situé sur l'un ou l'autre.

Parmi les souches ETEC testées, la majorité des souches (62%) possèdent un intégron de classe 1 (Table 4, Article I). Une haute fréquence d'intégron de classe 1 parmi des souches *E. coli* isolées d'animaux a aussi été notée par d'autres auteurs (Sandvang, D. and Aarestrup, F. M. 2000; Lanz, R. *et al.* 2003; Sunde, M. and Sorum, H. 1999; Bass, L. *et al.* 1999). L'intégron de classe 1 représente donc un moyen efficace de dissémination de la résistance employé par plusieurs souches *E. coli*. Parce que l'intégron est caractérisé par sa fonction d'intégration de gènes à son site d'insertion situé dans la région variable de l'intégron (RV), la caractérisation de cette région peut nous donner plusieurs informations sur les gènes de résistance qu'il transporte ainsi que sur la résistance multiple que certaines souches démontrent. À la suite de l'amplification de cette RV, nous avons obtenu quatre longueurs d'amplicons différentes. Au total, ces quatre RV différentes comportent cinq différents gènes de résistance intégrés. Parmi nos souches, les RV qui ont été le plus souvent amplifiées mesurent 1,3 et 1,0-kb (Table 4, Article I). Les longueurs de RV amplifiées des intégrons contenus chez des isolats *E. coli* producteurs d'une Shiga-toxine (STEC) étaient de longueurs similaires aux nôtres (Zhao, S. *et al.* 2001). Il y a donc possiblement une dissémination de ces intégrons parmi des souches *E. coli* de différents sérogroupes. De plus, ces mêmes longueurs de RV d'intégrons de classe 1 ont aussi été amplifiées chez d'autres espèces bactériennes (*Klebsiella pneumoniae*, *K. oxytoca*, *Enterobacter cloacae* et *E. aerogenes*) (Schmitz, F. J. *et al.* 2001; van Belkum, A. *et al.* 2001).

Puisque la longueur de la RV nous donne un indice sur les gènes contenus, nous pouvons alors croire que les différentes RV démontreraient différents gènes intégrés. Nous pourrions aussi croire que, plus la RV est longue, plus elle contient de gènes. Lors du séquençage de deux représentants de longueurs différentes de RV, cinq différents gènes de résistance ont pu être détectés. Il s'agit de gènes de résistance à la triméthoprimine et aux sulfamides et des résistances les plus souvent décrites résidant sur ce type (Bass, L. *et al.* 1999; Roy, P. H. 1997; Peters, E. D. *et al.* 2001). Ceci nous laisse supposer que les gènes de résistance aux β -lactamines, à la tétracycline et au chloramphénicol ne sont pas associés avec les intégrons de classe 1 présents chez les souches ETEC testées. De plus, les gènes contenus dans les différentes RV correspondent avec ceux retrouvés sur des RV de même longueur que les nôtres, mais isolées des souches STEC (Zhao, S. *et al.* 2001).

Il est intéressant de voir que les RV les plus longues sont plus fréquentes dans la dernière période d'isolement des souches. Ce phénomène a aussi été remarqué chez des souches

isolées de spécimens de sang entre les années 1993 et 1999 (Schmitz, F. J. *et al.* 2001). Ce qui laisse croire que, dans le temps, il y aurait une accumulation de cassettes dans la RV, ce qui augmenterait progressivement la longueur de la RV. Toutefois, le nombre de cassette ne dépasse pas deux dans notre étude, ce qui limite l'application de cette hypothèse dans notre cas. Notre étude montre que les souches possédant les mêmes longueurs de RV amplifiées semblent avoir les mêmes gènes de résistance intégrés. Cependant, aucun des gènes de résistance ciblés par l'hybridation sur colonies n'a été retrouvé parmi les RV séquencées.

1.2 Association des gènes de résistance et co-sélection

Lors de l'analyse des résultats de nos hybridations sur colonies, nous avons pu mettre en évidence certaines associations de gènes de résistance. Il a été statistiquement prouvé que certains gènes sont associés de façon positive ou négative, selon la présence ensemble ou non de ceux-ci dans l'isolat. Ainsi, les gènes *tem* et *shv* ont montré une association très forte et positive entre eux (Table 5, Article I). Le gène *tem* a été décrit pour la première fois par Richmond en 1975, tandis que le gène *shv* a été décrit pour la première fois par Nugent en 1979. En prenant pour acquis que les bactéries accumulent les gènes de résistance si cela leur est favorable, nous pourrions expliquer cette association en posant l'hypothèse que toutes les souches qui possèdent le gène *shv* posséderaient déjà au départ le gène *tem* puisque celui-ci est présent depuis plus longtemps que *shv* dans l'environnement. Une seconde association a attiré notre attention, il s'agit des gènes *tet(A)/tet(C)* qui sont tous les deux très fortement associés positivement entre eux et négativement avec *tet(B)*. Ces résultats ne peuvent être dus à l'homologie de séquence de ces deux gènes car une technique plus sensible que l'hybridation, la PCR, nous a permis de vérifier la présence de ces deux gènes chez les souches. Nous savons que les déterminants *tet* sont très souvent associés à des plasmides. Une étude menée par Jones *et al.* (Jones, C. S. *et al.* 1992) a démontré que la plupart de ces plasmides avaient des incompatibilités entre eux et donc ne pouvaient se retrouver dans la même souche ensemble. Nous pourrions donc expliquer ces associations en supposant que les gènes *tet(A)/tet(C)* sont situés sur des plasmides compatibles mais incompatibles avec celui qui porte le gène *tet(B)*. La présence des gènes *tet(A)* et *tet(C)* chez une même souche a aussi été observée par Lee *et al.* (Lee, C. *et al.* 1993).

En plus d'observer une association entre les différents gènes de résistance, nous pouvons remarquer que ces associations changent dans le temps. En effet, certaines associations entre

les gènes peuvent être remarquées seulement lorsque les souches sont divisées en deux groupes ; le premier groupe est composé des souches isolées entre 1978 et 1989 et le deuxième groupe est composé des souches isolées entre 1990 et 2000 (Tableau III et IV, Annexes). De la sorte, nous pouvons remarquer que l'association entre le gène *tem* et les gènes *tet*, entre le gène *aph(3')-Ia* et *tet(A)/tet(C)* ainsi que l'association entre *sull* et *catI* ne sont présentes que chez les souches isolées dans le premier groupe. Toutefois d'autres associations présentes uniquement dans le deuxième groupe ont été notées. Par exemple, l'association entre les gènes *acc(3)-IV*, *dhfrV* et *catI* a été observée. Il est donc intéressant de souligner ici que le gène de résistance au chloramphénicol, *catI*, est associé dans le premier groupe avec le gène de résistance aux sulfamides tandis que, dans le deuxième groupe, il est plutôt associé avec les gènes de résistance à la gentamicine et à la triméthoprine. Puisque le chloramphénicol n'est plus utilisé en production porcine au Canada depuis 1980 et qu'il semblerait que la résistance à cet agent continue d'exister, nous pouvons croire en une co-sélection de cette résistance. L'utilisation de sulfamide, de gentamicine ou de triméthoprine pourrait sélectionner des souches résistantes au chloramphénicol grâce à l'association qui a été démontrée entre les gènes de résistance à ces différents agents antimicrobiens et au gène *catI*.

1.3 Changements factoriels et diversité des profils

Différents profils phénotypiques et génétiques de la résistance ont été déterminés parmi les souches étudiées. Certains facteurs peuvent être à l'origine de ces changements. Un de ces facteurs, qui a d'ailleurs été mis en évidence tout au long de l'étude, est le temps. L'année d'isolement des souches peut influencer le profil de résistance de la souche. En effet, certaines résistances phénotypiques se sont développées dans le temps. La résistance à la gentamicine, chloramphénicol et à la triméthoprine en sont des exemples (Table 2, Article I). Toutefois, même si nous remarquons qu'il y a peu de variation au niveau du pourcentage de souche résistante à un agent antimicrobien donné dans le temps, les gènes qui sont impliqués dans la résistance à celui-ci peuvent être différents selon l'année d'isolement de la souche. L'exemple des gènes *tet* et *sul* (voir deuxième partie de la discussion; mobilité des gènes) démontre bien ce phénomène.

Cependant, le facteur temps n'est pas le seul à intervenir dans le changement des profils observés. Le mode d'action de l'enzyme codée par le gène de résistance ainsi que sa

spécificité pour le substrat sont des éléments qui ont été démontrés dans la deuxième partie de cette discussion. Le site géographique d'isolement de la souche, le dosage et la gestion des agents antimicrobiens ainsi que le stade de la croissance du porc infecté peuvent influencer les résistances développées par les souches et donc leur profil de résistance. Les souches proviennent de porcs élevés dans la province de Québec. La région géographique est donc grande et les vétérinaires qui y utilisent des agents antimicrobiens sont nombreux. Nous savons que le fait d'administrer de façon parentérale des agents antimicrobiens, en plus des autres agents donnés dans le moulé, augmente la résistance à d'autres agents, due à une co-sélection des résistances. Par exemple, il a été montré que l'injection d'oxytétracycline chez les bovins qui reçoivent dans leur moulé de la chlortétracycline est associée à l'augmentation de la prévalence de la résistance au chloramphénicol et au sulfisoxazole (O'Connor, A. M. *et al.* 2002). Moins de souches multirésistantes sont observées chez les fermes qui utilisent peu d'agents antimicrobiens (Mathew, A. G. *et al.* 1999; Mathew, A. G. *et al.* 1998).

Un dernier facteur mérite d'être considéré. Il s'agit de l'âge des porcs desquels proviennent les souches ETEC. Plus de 97% des porcs de notre étude étaient âgés entre 1 et 70 jours d'âge. Nous remarquons que, lorsque la souche ETEC est isolée d'un porc âgé entre 1 et 10 jours, celle-ci est en général (40%) résistante à deux agents antimicrobiens (Figure 3, Annexes). En bas de 10 jours, les porcelets ne reçoivent pas d'agents antimicrobiens. Par la suite, entre 10 et 60 jours, les porcs reçoivent des agents antimicrobiens dans leur moulé et en traitement. Il n'est donc pas surprenant d'observer que plus l'âge du porc est élevé, plus les isolats sont résistants à plusieurs agents. Ce phénomène est surtout remarqué en bas de 30 jours d'âge. Par la suite, entre 31 et 70 jours, le nombre de résistance des souches isolées est très variable. Par contre, Mathew *et al.* ont aussi observé une augmentation de la multirésistance chez les souches isolées de porcs âgés de plus de 30 jours (Mathew, A. G. *et al.* 1998). Toutefois, il faut prendre en considération que, dans cette étude, la majorité des souches isolées de porcs âgés entre 1 et 20 jours l'ont été entre 1978 et 1989 (Figure 4, Annexes). Entre 1995 et 2000, les souches testées proviennent en majorité de porcs âgés entre 21 et 70 jours. Nous savons que, dans le temps, une augmentation de la multirésistance a été observée. Par contre, nous ne savons pas comment cela se présenterait si les souches isolées dans la quatrième période (1995-2000) avaient été isolées en majorité de porcs âgés entre 1 et 20 jours. Le faible nombre de souches provenant de porcs âgés entre 1 et 20 jours entre les années 1995 à 2000, est probablement dû au fait que, lorsqu'un porcelet âgé de moins de 20 jours est atteint d'une diarrhée, les chances que cela soit dû à une infection à *E. coli* sont très

élevées. Alors, les vétérinaires envoient que très rarement des échantillons de ces porcs au laboratoire pour un diagnostic et traitent le porcelet immédiatement avec des agents antimicrobiens. Puisque notre collection est formée des échantillons reçus au laboratoire de diagnostic de la faculté vétérinaire à Saint-Hyacinthe entre 1978 et 2000, il en résulte donc un faible lot de souches isolées de porcelets âgés entre 1 et 20 jours entre les années 1995 et 2000.

1.4 Expériences et analyses à venir

Comme qu'il a été souligné dans la sixième partie de la recension de la littérature, les gènes *tem* et *shv* possèdent de nombreux variants dus à des mutations ponctuelles dans le gène. Celles-ci n'ont pas pu être identifiées par la méthode choisie dans cette étude. Toutefois, il serait intéressant de les identifier afin de pouvoir les différencier d'une souche à l'autre. Ceci nous permettrait d'affiner notre caractérisation des souches. Effectivement, nous savons présentement que 35% des souches testées possédaient le gène *tem*, mais nous ne pouvons pas déterminer s'il s'agit du même variant. Ceci pourrait être confirmé en faisant, autre que du séquençage, du « Ligase Chain Reaction » (LCR) sur l'ADN des souches qui a comme principe de permettre une élongation du brin cible seulement si la mutation ponctuelle choisie est présente (Kim, J. and Lee, H. J. 2000; Barany, F. 1991). Puisque les variants du gène *tem* et *shv* connus sont séquencés, il serait donc possible de faire ce genre d'expérience.

De plus, plusieurs souches possèdent certaines ressemblances au niveau des profils génotypiques de résistance et certains gènes semblent être associés entre eux. Il semblerait donc que certaines souches proviendraient d'un même clone ou du même ancêtre. Toutefois, notre étude ne peut confirmer cette hypothèse. Une étude plus approfondie en ce qui a trait aux profils de digestion de l'ADN de ces souches ETEC pourrait nous informer davantage sur l'évolution de celles-ci. En effet, la migration en champs pulsés de l'ADN digéré par des enzymes de restriction nous permet d'obtenir des empreintes propres à la souche. Ainsi, une comparaison des ces profils permettrait de retracer certains clones et d'évaluer la distance phylogénétique qui existe entre les souches analysées (Rasheed, J. K. *et al.* 1997). Par contre, d'autres méthodes de typage peuvent aussi être utilisées comme l'analyse des plasmides ainsi que l'analyse des résultats de PCR avec des amorces arbitraires (RAPD).

Étude sur les souches *Escherichia coli* pathogènes extraintestinales d'origine animale et humaine

Il est connu que certaines souches *E. coli* peuvent causer des entéropathies. Toutefois, certaines autres souches causent des infections extraintestinales chez leur hôte sans générer de problème au niveau intestinal. Les ExPEC possèdent plusieurs similarités entre eux (facteurs de virulence, profil phylogénétique,...) laissant croire à des populations de souches croisées entre les différents hôtes (Johnson, J. R. *et al.* 2000; Johnson, J. R. *et al.* 2002). L'utilisation des agents antimicrobiens est jusqu'à maintenant l'arme d'excellence afin de contrôler les infections extraintestinales causées par les ExPEC, cependant, plusieurs souches sont devenues résistantes à ceux-ci. La caractérisation des gènes de résistance chez les isolats ExPEC permettrait d'établir des profils et de les comparer entre eux afin d'établir certains liens entre les différentes souches. Or, très peu d'études se sont concentrées à faire une caractérisation génotypique de la résistance chez les souches *E. coli* isolées de différents hôtes.

Notre étude a permis d'établir différents profils de résistance regroupant 28 gènes de résistance différents retrouvés parmi 39 isolats ExPEC isolées de tissus infectés chez des animaux et 70 isolats ExPEC isolées d'urine provenant d'humains. Il est à noter que ces isolats ont été sélectionnés sur la base de leur résistance à au moins un des agents antimicrobiens. Puisqu'en médecine vétérinaire, peu d'échantillons d'urine provenant d'animaux révèlent une résistance à un ou plusieurs agents antimicrobiens, nous avons donc préféré élargir le choix des échantillons en acceptant des isolats ExPEC animaux provenant de tissus infectés. Ce problème n'a pas existé lors de la collecte des échantillons d'urine de provenance humaine mais aurait existé si nous avions préféré la collecte de souches provenant de tissus infectés humains. Ces isolats ont été caractérisés selon leur phénotype de résistance à 10 agents antimicrobiens et selon la présence ou absence des différents gènes de résistance choisis.

2.0 Profil phénotypique de la résistance

2.0.1 Vision d'ensemble

Les profils phénotypiques de résistance établis chez les isolats d'animaux et d'humains étaient relativement semblables. De façon générale, les isolats étaient résistantes à l'ampicilline, à la tétracycline et aux sulfamides (Table II, Article II). Ces agents sont utilisés en thérapie et/ou comme facteurs de croissance et/ou donnés en prophylaxie aux animaux mais ils sont aussi couramment prescrits aux humains (Tableau I, recension de littérature). Il n'est donc pas surprenant de noter une fréquence élevée de la résistance à ces agents. Nous remarquons que la résistance aux céphalosporines (cefotaxime et ceftiofur) n'est exprimée que par des isolats provenant d'animaux. Ceci peut s'expliquer par le fait que ces agents sont fréquemment administrés aux animaux destinés à la consommation humaine. Par contre, il semblerait que la résistance aux céphalosporines chez l'animal soit plutôt rare et lorsqu'elle est présente, elle se retrouve surtout parmi les isolats de provenance bovine et aviaire (Lanz, R. *et al.* 2003; Chanal-Claris, C. *et al.* 1997) se qui correspond aussi avec nos résultats. La kanamycine est un aminoglycoside administré peu fréquemment à l'animal. Par contre, nous avons remarqué un pourcentage plus élevé d'isolats de provenance animale résistants à cet agent comparativement à ceux de provenance humaine. Dans ce cas, nous pouvons croire que cette résistance est due à un phénomène de résistance croisée avec d'autres aminoglycosides, particulièrement la néomycine (Recension de la littérature, sixième partie).

La comparaison des profils entre les isolats provenant des différents animaux a permis de noter une variation importante entre ceux-ci. Les isolats provenant des animaux de compagnie sont ceux qui possédaient le moins de résistance. Toutefois, ces isolats proviennent d'échantillons d'urines, comparativement aux autres isolats qui proviennent en majorité de tissus ou d'organes infectés. D'autres auteurs ont aussi remarqué que la multirésistance bactérienne provenant d'isolats d'urine animale était peu fréquente (Oluoch, A. O. *et al.* 2001). Plusieurs différences au niveau du phénotype de résistance ont été observées entre les isolats provenant d'urine humaine isolés en 1990 et ceux isolés en 2000. Effectivement, les souches isolées en 1990 possèdent généralement deux fois moins de résistances que celles isolées en 2000 (Table II, Article II). Une augmentation de la multirésistance dans le temps est donc notée comme nous l'avons aussi relevé parmi les isolats ETEC dans la première partie de la discussion de ce mémoire.

2.0.2 Homogénéité dans les profils de multirésistance

Dans notre étude, il n'a pas été rare de rencontrer des isolats qui possédaient plus de deux résistances. Environ la moitié des isolats provenant d'animaux et d'humains avaient plus de

deux résistances. Aucun profil de multirésistance n'a pu être associé à l'origine de la souche car nous retrouvons les mêmes résistances dans chacune des origines (animale et humaine). Toutefois, certaines souches isolées d'animaux possédaient jusqu'à 10 résistances, ce qui n'a pas pu être observé parmi les isolats de provenance humaine. Il semblerait donc que la caractérisation de la résistance au niveau du phénotype ne serait pas suffisante afin d'établir l'origine de l'isolat. Véritablement, les isolats ExPEC, peu importe leur origine d'isolement, possèdent un profil phénotypique de résistance semblable. Ceci a aussi été observé par Lanz *et al.* parmi des souches *E. coli* isolées d'infections extraintestinales de différents animaux (Lanz, R. *et al.* 2003). Par contre, lorsque ceux-ci ont comparé le phénotype de ces isolats ExPEC à celui des souches *E. coli* isolées des fèces de porcs, ils ont noté une différence entre les profils de résistance. Puisque les profils établis à partir du phénotype de résistance des isolats ExPEC sont similaires, nous pourrions croire en la possibilité que ces groupes ne forment pas deux groupes de souches distincts.

2.1 Profil génotypique de la résistance

2.1.1 Diversité des gènes

La comparaison des profils établis à partir du phénotype de résistance des différentes souches ExPEC, isolées d'animaux et d'humains, n'a pas permis l'établissement de patrons particuliers. Par contre, par l'hybridation sur colonies des différentes sondes représentant les 28 gènes de résistance choisis, nous observons que différents gènes sont acquis par les isolats de provenance animale de ceux acquis par les isolats provenant d'humains. En effet, différents profils établis à partir du génotype de résistance ont pu être précisés entre les différentes origines (animale ou humaine)(Table III, Article II). Pour un même phénotype, des gènes différents sont sollicités chez l'animal versus l'humain. Par exemple, le gène *oxa-1* n'est présent que chez les isolats de provenance animale tandis que le gène *shv* n'est présent quant à lui, que chez les isolats de provenance humaine. À l'occasion, les mêmes gènes ont été détectés parmi les souches isolées chez les deux origines, mais à des fréquences variées. Par exemple, les gènes *catI* sont plus fréquemment détectés chez les isolats d'origine humaine et le gène *floR*, chez les isolats d'origine animale.

En plus d'observer qu'il y a certains gènes qui sont plus souvent retrouvés parmi les souches isolées des animaux ou des humains, certaines particularités ont aussi été observées entre les isolats isolées de l'humain à des périodes différentes. Les souches isolées d'urine de

provenance humaine en 1990 résistantes à la tétracycline portent, dans 33% des cas, le gène *tet(D)*. Ce gène n'a pas été retrouvé parmi les isolats de provenance humaine isolés en 2000. De plus, les souches en 1990 qui étaient résistantes aux sulfamides possédaient soit le gène *sull* ou le gène *sullI*, mais jamais les deux ensemble. Toutefois, il n'est pas rare de retrouver ces deux gènes parmi les souches isolées en 2000. Ce qui laisse croire que les souches ont évolué dans le temps et qu'en plus de posséder plusieurs résistances, les souches isolées en 2000, ont pu se transférer les gènes de résistance. Ceci démontre encore une fois la mobilité ou l'instabilité des gènes de résistance.

Généralement, un gène de résistance a pu être associé à un phénotype de résistance chez l'isolat. Toutefois, seulement deux des sept souches résistantes aux céphalosporines semblent posséder un des gènes de résistance aux céphalosporines testés. Une possède le gène *tem* et l'autre le gène *oxa-1*. Par contre, il n'est pas rare de retrouver parmi les isolats *E. coli* résistantes aux « Extended-spectrum β -Lactamases » (EBSL) une hyper-production d'une β -lactamase chromosomique ou plasmidique de type AmpC (Feria, C. *et al.* 2002; Bradford, P. A. *et al.* 1999) ce qui pourrait être la cause de la résistance aux céphalosporines des cinq autres souches.

2.1.2 Mobilité des gènes

Plusieurs gènes de résistance semblent être distribués parmi les différents hôtes. Le transfert de souches résistantes entre les différents hôtes ou bien, le transfert de matériel génétique (gènes de résistance, intégrons, plasmides,...) entre souches d'hôtes différents ou non, sont là deux phénomènes qui peuvent favoriser la distribution des gènes de résistance entre les différents hôtes (Oppegaard, H. *et al.* 2001; Sunde, M. and Sorum, H. 1999; van den Bogaard, A. E. *et al.* 2001). La détection de l'intégron de classe 1 parmi les souches ExPEC et la caractérisation de la RV de ceux-ci peut nous permettre d'orienter notre choix sur une des deux causes suggérées ci-haut.

Comparativement aux échantillons ETEC étudiés dans cette étude, la présence d'intégron de classe 1 parmi les isolats ExPEC de provenance animale et humaine est deux fois moins fréquente (Table IV, Article II). Toutefois, ceux-ci sont impliqués dans la résistance aux agents antimicrobiens de ces souches puisqu'après caractérisation de ces intégrons, cinq différentes longueurs de RV ont été obtenues contenant différents gènes de résistance. Nous retrouvons parmi les isolats animaux et humains ces différentes longueurs de RV. Elles

correspondent aux longueurs de RV généralement amplifiées (Sandvang, D. and Aarestrup, F. M. 2000; Sunde, M. and Sorum, H. 1999; Lee, J. C. *et al.* 2001; Bass, L. *et al.* 1999). Trois de ces longueurs ont aussi été retrouvées parmi les isolats ETEC et correspondent à celles les plus fréquemment amplifiées soit 1,0, 1,3 et 1,6-kb.

Certaines différences entre les isolats de provenance animale ont été observées. En effet, les isolats de porcs semblent posséder plus fréquemment des intégrons de classe 1. Cependant, aucune longueur de RV n'est attribuable à un type d'isolat en particulier. Dans la littérature, aucune étude n'a pu établir ce lien, même s'il existe certaines particularités entre les différents genres bactériens (Schmitz, F. J. *et al.* 2001).

2.2 Association et co-sélection des gènes de résistance

Avoir des informations sur l'association entre les gènes de résistance, dans une population donnée, permet d'évaluer les possibilités de co-sélection. Le gène *sulI* qui est associé à la région conservée 3' de l'intégron de classe 1, permet de croire que l'utilisation de sulfamides permettrait à l'intégron de classe 1 et aux gènes intégrés dans la RV de celui-ci, d'être conservés par la bactérie. Dans ce cas, l'usage d'agents antimicrobiens permet une co-sélection de plusieurs gènes de résistance et oriente la population bactérienne vers la multirésistance (Bass, L. *et al.* 1999). Dans cette étude, nous avons démontré qu'il existait, en plus de l'association entre *sulI* et l'intégron de classe 1, la présence d'associations entre les gènes de résistance. Ces associations diffèrent selon l'origine de l'isolat. En effet, chez les isolats de provenance animale, il existe une forte association ($0.01 \geq P \geq 0.001$) entre les gènes *tem* et *dhfrV* (Table V, Article II). Toutefois, le gène *tem* parmi les isolats humains est plutôt associé avec la présence du gène *sulIII* ($0.001 \geq P$) (Table VI, Article II).

De plus, il semblerait que le profil d'association des gènes soit conservé selon la région géographique de l'isolement des souches. Dans la province de Québec, l'association des gènes de résistance à la tétracycline *tet(A)* et *tet(C)* semble être présente chez les isolats animaux et humains (Article I et Article II). Toutefois, même si cette association a déjà été rencontrée par d'autres auteurs, celle-ci n'a jamais été aussi forte dans les autres régions étudiées (Lanz, R. *et al.* 2003; Lee, C. *et al.* 1993).

2.3 Virulence et phylogénie des souches ExPEC

2.3.1 Profil de virulence

Parmi les isolats ExPEC, l'opéron *pap* (pyelonephritis-associated pili), *sfa* (S fimbrial adhesin) et *afa* (afimbrial adhesin) codent pour les adhésines les plus fréquemment isolées. Ces adhésines permettent l'attachement spécifique de la bactérie aux différents récepteurs situés à la surface de la cellule épithéliale (Smyth, C. J. *et al.* 1994). Le gène *pap* a été détecté parmi 49% des isolats animaux étudiés dans cette étude et 61% des isolats humains. Même si la moitié des isolats possèdent seulement l'adhésine P codée par le gène *pap*, 22% des isolats possèdent plus d'une adhésine. Posséder plusieurs types d'adhésines semble être un facteur important dans l'établissement d'infections extraintestinales et jouer un rôle dans la virulence de la souche (Harel, J. *et al.* 1991). Le gène *hlyA* encode pour une hémolysine. Il a été démontré dans un modèle d'infections urinaires de rats que les souches *E. coli* ne possédant pas d'hémolysines sont moins virulentes (Hacker, J. *et al.* 1983). Les isolats provenant d'humains possèdent en plus grand nombre le gène *hlyA* (48%) comparativement aux isolats d'animaux (15%). Cependant, les isolats provenant d'infections urinaires animales, possèdent en majorité ce gène. D'autres études ont aussi démontré l'importante fréquence de l'hémolysine HlyA parmi les ExPEC isolées d'humains et d'animaux (Johnson, J. R. *et al.* 2000; Opal, S. M. *et al.* 1990). Le gène *iucD* appartenant à l'opéron *iuc* code pour un système de captation du fer par une aérobactine. Plus d'échantillons animaux ont été positifs (69%) à l'hybridation avec la sonde *iucD* que d'humains (59%). Il est intéressant de voir que la majorité des isolats animaux provenant de tissus ont été positifs (93%) comparativement aux isolats provenant d'échantillons urinaires animaux (7%). Peut-être que cette différence vient du fait que ce sont deux infections différentes. Néanmoins, presque la totalité des isolats possèdent soit le gène *hlyA* ou le gène *iucD*. Des résultats semblables ont aussi été notés par Opal *et al.* chez des isolats d'origine humaine (Opal, S. M. *et al.* 1990). Nous pouvons supposer qu'en absence d'aérobactines, l'hémolysine pourrait servir de mécanisme compensatoire.

Quatre grands groupes phylogénétiques représentant les souches *E. coli*, A, B1, B2 et D, ont été décrits par Herzer *et al.* (Herzer, P. J. *et al.* 1990). Des analyses phylogénétiques ont démontré que les souches virulentes extraintestinales appartiennent en majorité au groupe B2 et en faible proportion au groupe D (Boyd, E. F. and Hartl, D. L. 1998; Bingen, E. *et al.* 1998). La plupart des souches commensales appartiennent plutôt aux groupes A et B1. Dans cette étude, la moitié des souches isolées d'animaux semblent appartenir aux groupes A et B1.

Parmi ces isolats, la majorité est représentée par des isolats porcins. Plus de 80% des isolats porcins ont été obtenus de porcs décédés de bactériémies primaires ou secondaires. Ceci se démarque des résultats obtenus des isolats humains. Ceux-ci appartiennent en majorité (77%) aux groupes B2 ou D. Cette proportion d'isolats d'origine humaine appartenant à ces groupes a aussi été notée par d'autres études (Johnson, J. R. *et al.* 2001; Clermont, O. *et al.* 2000). Selon nos résultats, il semble y avoir une différence notable au niveau du profil génotypique de la virulence entre les isolats provenant d'animaux à celles provenant d'humains.

Les résultats phylogéniques permettent de poser l'hypothèse que les isolats testées ne sont peut-être pas toutes des souches ExPEC proprement dites. En effet, les souches isolées d'infections urinaires humaines possèdent plusieurs similarités avec celles isolées d'infections urinaires animales (gènes de résistance, gènes de virulences et groupes phylogénétiques). Ce qui n'est pas le cas entre les souches isolées d'infections urinaires et celles isolées des tissus. Ces observations peuvent être dues au fait que les isolats provenant d'infections urinaires ont des caractéristiques déterminées et différentes des autres ExPEC.

2.3.2 Association virulence et résistance

Il est intéressant de voir que presque aucun des gènes de virulence testés n'est associé avec un gène de résistance. Par le test du chi-carré, seul le gène *afaD8* chez l'animal, le gène *sfaDE*, *hlyA* et *iucD* chez l'humain, sont associés avec la présence d'un gène de résistance (Table V et VI, Article II). Les associations retrouvées chez l'animal entre les gènes de résistance et de virulence sont différentes de celles retrouvées chez l'humain. Malgré cela, les associations entre les gènes de virulence sont retrouvées à la fois chez les isolats de provenance animale et humaine, mais à des forces différentes. Par exemple, le gène *hlyA* est fortement associé avec la présence du gène *sfaDE* et négativement associé avec le gène *iucD*. Ceci démontre que la présence des gènes de résistance est gérée indépendamment de celle des gènes de virulence. À notre connaissance, cette dernière observation n'a pas été notée par d'autres auteurs. Cette observation pourrait découler du fait que la majorité des gènes de résistance testés dans cette étude sont retrouvés sur des éléments génétiques mobiles, ce qui les rend instables. Par contre, les gènes de virulence qui ont été testés se retrouvent en majorité sur le chromosome bactérien, souvent retrouvés à l'intérieur d'îlots de pathogénicité chez *E. coli* (Dobrindt, U. *et al.* 2002).

Conclusions

L'étude portant sur la résistance aux agents antimicrobiens retrouvée chez différents groupes de souches *E. coli* entérotoxigènes (ETEC) O149 : K91 isolées de porcs souffrant de diarrhée, entre 1978 et 2000, nous permet de tirer les conclusions suivantes :

1. Il y a une augmentation de la multirésistance aux agents antimicrobiens, dans le temps, chez les souches ETEC O149 : K91;
2. Pour un même phénotype de résistance aux agents antimicrobiens, différents gènes responsables de cette résistance ont été retrouvés parmi les souches ETEC O149 : K91;
3. Les intégrons de classe 1 sont des éléments génétiques mobiles retrouvés fréquemment parmi les souches ETEC O149 : K91. On retrouve dans la région variable de ces intégrons des gènes de résistance aux agents antimicrobiens codant, en majorité, pour une résistance à la triméthoprine et/ou aux aminoglycosides;
4. Certains gènes de résistance sont associés, statistiquement, entre eux, et, selon la période d'isolement de la souche, les associations entre gènes de résistance sont différentes.

L'étude portant sur la résistance aux agents antimicrobiens retrouvée parmi des souches extraintestinales de *E. coli*, isolées de tissus infectés d'animaux et d'infections urinaires animales et humaines, nous permet de tirer les conclusions suivantes :

1. Les deux groupes partagent certaines caractéristiques quant à leur profil phénotypique de résistance aux agents antimicrobiens;
2. La distribution de certains gènes peut être différente selon si le groupe de souches est isolé d'animaux ou d'humains;
3. Les intégrons de classe 1 sont des éléments génétiques mobiles retrouvés fréquemment parmi les souches *E. coli* isolées de tissus infectés d'animaux et d'infections urinaires animales et humaines. On retrouve dans la région variable de ces intégrons des gènes de résistance aux agents antimicrobiens codant, en majorité, pour une résistance à la triméthoprine et/ou aux aminoglycosides;

4. Certains gènes de résistance et de virulence sont associés, statistiquement, entre eux, et, selon l'origine d'isolement de la souche (animale ou humaine), les associations entre gènes de résistance sont différentes.
5. Les souches isolées d'infections urinaires d'animaux présentent plusieurs caractéristiques génétiques qui les distinguent des souches isolées de tissus infectés d'animaux.

Dans l'avenir, il serait intéressant d'étudier dans les cas de multirésistance quelle est la relation entre ces déterminants génétiques, s'ils appartiennent au même élément génétique de résistance (plasmide, transposon, intégron) ou s'ils sont génétiquement indépendants. Ceci permettrait une meilleure compréhension du mode d'acquisition des gènes de résistance.

SECTION IV – Bibliographie

- Bopp, C. A., Brenner, F. W., Fields, P. I., Wells, J. G., and Strockbine, N. A.** (2003). *Escherichia, Shigella, and Salmonella*. In: Manual of Clinical Microbiology. 8th. ASM press 654-671.
- Wray, C., McLaren, I. M., and Carroll, P. J.** (1993). *Escherichia coli* isolated from farm animals in England and Wales between 1986 and 1991. *The Veterinary record*, **133**: 439-42.
- Garabal, J. I., Gonzalez, E. A., Vazquez, F., Blanco, J., Blanco, M., and Blanco, J. E.** (1996). Serogroups of *Escherichia coli* isolated from piglets in Spain. *Veterinary microbiology*, **48**: 113-23.
- Wada, Y., Nakaoka, Y., Kondo, H., Nakazawa, M., and Kubo, M.** (1996). Dual infection with attaching and effacing *Escherichia coli* and enterotoxigenic *Escherichia coli* in post-weaning pigs. *Journal of comparative pathology*, **114**: 93-9.
- Nagy, B., Casey, T. A., and Moon, H. W.** (1990). Phenotype and genotype of *Escherichia coli* isolated from pigs with postweaning diarrhea in Hungary. *Journal of clinical microbiology*, **28**: 651-3.
- Wieler, L. H., Ilieff, A., Herbst, W., Bauer, C., Vieler, E., Bauerfeind, R., et al.** (2001). Prevalence of enteropathogens in suckling and weaned piglets with diarrhoea in southern Germany. *Journal of veterinary medicine. B, Infectious diseases and veterinary public health.*, **48**: 151-9.
- Amezcuca, R., Friendship, R. M., Dewey, C. E., Gyles, C., and Fairbrother, J. M.** (2002). Presentation of postweaning *Escherichia coli* diarrhea in southern Ontario, prevalence of hemolytic *E. coli* serogroups involved, and their antimicrobial resistance patterns. *Canadian journal of veterinary research - Revue canadienne de recherche veterinaire.*, **66**: 73-8.
- Bischoff, K. M., White, D. G., McDermott, P. F., Zhao, S., Gaines, S., Maurer, J. J., et al.** (2002). Characterization of chloramphenicol resistance in beta-hemolytic *Escherichia coli* associated with diarrhea in neonatal swine. *Journal of clinical microbiology*, **40**: 389-94.
- Russo, T. A., and Johnson, J. R.** (2000). Proposal for a new inclusive designation for extraintestinal pathogenic isolates of *Escherichia coli*: ExPEC. *The Journal of infectious diseases*, **181**: 1753-4.
- Aubry-Damon, H., and Courvalin, P.** (1999). Bacterial resistance to antimicrobial agents: selected problems in France, 1996 to 1998. *Emerging infectious diseases*, **5**: 315-20.
- Monroe, S., and Polk, R.** (2000). Antimicrobial use and bacterial resistance. *Current opinion in microbiology*, **3**: 496-501.
- Teshager, T., Herrero, I. A., Porrero, M. C., Garde, J., Moreno, M. A., and Dominguez, L.** (2000). Surveillance of antimicrobial resistance in *Escherichia coli* strains isolated from pigs at Spanish slaughterhouses. *International journal of antimicrobial agents*, **15**: 137-42.
- Schwarz, S., and Chaslus-Dancla, E.** (2001). Use of antimicrobials in veterinary medicine and mechanisms of resistance. *Veterinary research*, **32**: 201-25.
- Aarestrup, F. M., and Wegener, H. C.** (1999). The effects of antibiotic usage in food animals on the development of antimicrobial resistance of importance for humans in *Campylobacter* and *Escherichia coli*. *Microbes and infection / Institut Pasteur*, **1**: 639-44.
- Guillemot, D.** (1999). Antibiotic use in humans and bacterial resistance. *Current opinion in microbiology*, **2**: 494-8.
- Santé Canada.** Réglementation et distribution des médicaments antimicrobiens en vue de leur utilisation chez les animaux destinés à l'alimentation, http://www.hc-sc.gc.ca/vetdrugs-medsvet/amr/pdf/f_chapter4.pdf .

- Alekshun, M. N., and Levy, S. B. (2000). Bacterial drug resistance: Response to survival threats. *In: Bacterial stress responses*. ASM Press, Washinton, D. C., 323-366.
- van den Bogaard, A. E., and Stobberingh, E. E. (2000). Epidemiology of resistance to antibiotics. Links between animals and humans. *International journal of antimicrobial agents*, **14**: 327-35.
- Ohmae, K., Yonezawa, S., and Terakado, N. (1981). R plasmid with carbadox resistance from *Escherichia coli* of porcine origin. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, **19**: 86-90.
- Bates, J., Jordens, J. Z., and Griffiths, D. T. (1994). Farm animals as a putative reservoir for vancomycin-resistant enterococcal infection in man. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, **34**: 507-14.
- Coque, T. M., Tomayko, J. F., Ricke, S. C., Okhyusen, P. C., and Murray, B. E. (1996). Vancomycin-resistant enterococci from nosocomial, community, and animal sources in the United States. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, **40**: 2605-9.
- Aarestrup, F. M., Seyfarth, A. M., Emborg, H. D., Pedersen, K., Hendriksen, R. S., and Bager, F. (2001). Effect of abolishment of the use of antimicrobial agents for growth promotion on occurrence of antimicrobial resistance in fecal enterococci from food animals in Denmark. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, **45**: 2054-9.
- Boerlin, P., Wissing, A., Aarestrup, F. M., Frey, J., and Nicolet, J. (2001). Antimicrobial growth promoter ban and resistance to macrolides and vancomycin in enterococci from pigs. *Journal of clinical microbiology*, **39**: 4193-5.
- Heuer, O. E., Pedersen, K., Andersen, J. S., and Madsen, M. (2002). Vancomycin-resistant enterococci (VRE) in broiler flocks 5 years after the avoparcin ban. *Microbial drug resistance (Larchmont, N.Y.)*, **8**: 133-8.
- Bjorkman, J., and Andersson, D. I. (2000). The cost of antibiotic resistance from a bacterial perspective. *Drug resistance updates : reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy*, **3**: 237-245.
- Maisnier-Patin, S., Berg, O. G., Liljas, L., and Andersson, D. I. (2002). Compensatory adaptation to the deleterious effect of antibiotic resistance in *Salmonella typhimurium*. *Molecular microbiology*, **46**: 355-66.
- Valenzuela, M. S., Siddiqui, K. A., and Sarkar, B. L. (1996). High expression of plasmid-encoded tetracycline resistance gene in *E. coli* causes a decrease in membrane-bound ATPase activity. *Plasmid*, **36**: 19-25.
- Bolton, L. F., Kelley, L. C., Lee, M. D., Fedorka-Cray, P. J., and Maurer, J. J. (1999). Detection of multidrug-resistant *Salmonella enterica* serotype *typhimurium* DT104 based on a gene which confers cross-resistance to florfenicol and chloramphenicol. *Journal of clinical microbiology*, **37**: 1348-51.
- Osterblad, M., Hakanen, A., Manninen, R., Leistevuo, T., Peltonen, R., Meurman, O., *et al.* (2000). A between-species comparison of antimicrobial resistance in enterobacteria in fecal flora. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, **44**: 1479-84.
- Marshall, B., Petrowski, D., and Levy, S. B. (1990). Inter- and intraspecies spread of *Escherichia coli* in a farm environment in the absence of antibiotic usage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **87**: 6609-13.
- Oppegaard, H., Steinum, T. M., and Wasteson, Y. (2001). Horizontal transfer of a multi-drug resistance plasmid between coliform bacteria of human and bovine origin in a farm environment. *Applied and environmental microbiology*, **67**: 3732-4.
- Hummel, R., Tschape, H., and Witte, W. (1986). Spread of plasmid-mediated nourseothricin resistance due to antibiotic use in animal husbandry. *Journal of basic microbiology*, **26**: 461-6.

- Hunter, J. E., Bennett, M., Hart, C. A., Shelley, J. C., and Walton, J. R. (1994). Apramycin-resistant *Escherichia coli* isolated from pigs and a stockman. *Epidemiology and infection*, **112**: 473-80.
- Hunter, J. E., Hart, C. A., Shelley, J. C., Walton, J. R., and Bennett, M. (1993). Human isolates of apramycin-resistant *Escherichia coli* which contain the genes for the AAC(3)IV enzyme. *Epidemiology and infection*, **110**: 253-9.
- Johnson, A. P., Burns, L., Woodford, N., Threlfall, E. J., Naidoo, J., Cooke, E. M., *et al.* (1994). Gentamicin resistance in clinical isolates of *Escherichia coli* encoded by genes of veterinary origin. *Journal of medical microbiology*, **40**: 221-6.
- van den Bogaard, A. E. (1997). Antimicrobial resistance--relation to human and animal exposure to antibiotics. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, **40**: 453-4.
- Bertchinger, H. U., and Fairbrother, J. M. (1999). *Escherichia coli* Infections. In: Diseases of swine. 8. Iowa State University Press, Ames, 431-468.
- Fontaine, F., D'Allaire, S., Péres, S., and Fairbrother, J. M. Trends in antibiotic resistance among enterotoxigenic *Escherichia coli* serotype O149: K91 isolated from piglets in Québec over years. *Unpublished*.
- Hampson, D. J. (1994). Postweaning *Escherichia coli* diarrhoea in pigs. In: *Escherichia coli* in domestic animals and humans. CAB international, Guelph, 171-191.
- Johnson, J. R., Stell, A. L., Delavari, P., Murray, A. C., Kuskowski, M., and Gaastra, W. (2001). Phylogenetic and pathotypic similarities between *Escherichia coli* isolates from urinary tract infections in dogs and extraintestinal infections in humans. *The Journal of infectious diseases*, **183**: 897-906.
- Feria, C., Machado, J., Duarte Correia, J., Goncalves, J., and Gaastra, W. (2001). Distribution of papG alleles among uropathogenic *Escherichia coli* isolated from different species. *FEMS microbiology letters*, **202**: 205-8.
- Caya, F., Fairbrother, J. M., Lessard, L., and Quessy, S. (1999). Characterization of the risk to human health of pathogenic *Escherichia coli* isolates from chicken carcasses. *Journal of food protection*, **62**: 741-6.
- Johnson, J. R., and Russo, T. A. (2002). Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: "the other bad *E coli*". *The Journal of laboratory and clinical medicine*, **139**: 155-62.
- Herzer, P. J., Inouye, S., Inouye, M., and Whittam, T. S. (1990). Phylogenetic distribution of branched RNA-linked multicopy single-stranded DNA among natural isolates of *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology*, **172**: 6175-81.
- Recchia, G. D., and Hall, R. M. (1995). Gene cassettes: a new class of mobile element. *Microbiology*, **141**: 3015-27.
- Levesque, C., Piche, L., Larose, C., and Roy, P. H. (1995). PCR mapping of integrons reveals several novel combinations of resistance genes. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, **39**: 185-91.
- Ambler, R. P., Coulson, A. F., Frere, J. M., Ghuysen, J. M., Joris, B., Forsman, M., *et al.* (1991). A standard numbering scheme for the class A beta-lactamases. *The Biochemical journal*, **276**: 269-70.
- Bush, K., Jacoby, G. A., and Medeiros, A. A. (1995). A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, **39**: 1211-33.
- Du Bois, S. K., Marriott, M. S., and Amyes, S. G. (1995). TEM- and SHV-derived extended-spectrum beta-lactamases: relationship between selection, structure and function. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, **35**: 7-22.
- Yang, Y., Rasmussen, B. A., and Shlaes, D. M. (1999). Class A beta-lactamases--enzyme-inhibitor interactions and resistance. *Pharmacology & therapeutics*, **83**: 141-51.

- Kotra, L. P., Haddad, J., and Mobashery, S.** (2000). Aminoglycosides: perspectives on mechanisms of action and resistance and strategies to counter resistance. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, **44**: 3249-56.
- Mingeot-Leclercq, M. P., Glupczynski, Y., and Tulkens, P. M.** (1999). Aminoglycosides: activity and resistance. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, **43**: 727-37.
- Shaw, K. J., Rather, P. N., Hare, R. S., and Miller, G. H.** (1993). Molecular genetics of aminoglycoside resistance genes and familial relationships of the aminoglycoside-modifying enzymes. *Microbiological reviews*, **57**: 138-63.
- Wright, G. D., Berghuis, A. M., and Mobashery, S.** (1998). Aminoglycoside antibiotics. Structures, functions, and resistance. *Advances in experimental medicine and biology*, **456**: 27-69.
- Chopra, I., and Howe, T. G.** (1978). Bacterial resistance to the tetracyclines. *Microbiological reviews*, **42**: 707-24.
- Chopra, I., and Roberts, M.** (2001). Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*, **65**: 232-60 ; second page, table of contents.
- Huovinen, P., Sundstrom, L., Swedberg, G., and Skold, O.** (1995). Trimethoprim and sulfonamide resistance. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, **39**: 279-89.
- Skold, O.** (2001). Resistance to trimethoprim and sulfonamides. *Veterinary research*, **32**: 261-73.
- Neuman, M.** (1990). Vade-Mecum des antibiotiques et agents chimiothérapiques anti-infectieux. 5. Paris.
- Livermore, D. M.** (1995). beta-Lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clinical microbiology reviews*, **8**: 557-84.
- Jacoby, G. A., and Carreras, I.** (1990). Activities of beta-lactam antibiotics against *Escherichia coli* strains producing extended-spectrum beta-lactamases. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, **34**: 858-62.
- Perilli, M., Segatore, B., De Massis, M. R., Pagani, L., Luzzaro, F., Rossolini, G. M., et al.** (2002). Biochemical characterization of TEM-92 extended-spectrum beta-lactamase, a protein differing from TEM-52 in the signal peptide. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, **46**: 3981-3.
- Chang, F. Y., Siu, L. K., Fung, C. P., Huang, M. H., and Ho, M.** (2001). Diversity of SHV and TEM beta-lactamases in *Klebsiella pneumoniae*: gene evolution in Northern Taiwan and two novel beta-lactamases, SHV-25 and SHV-26. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, **45**: 2407-13.
- Lopez-Otsoa, F., Gallego, L., Towner, K. J., Tysall, L., Woodford, N., and Livermore, D. M.** (2002). Endemic Carbapenem Resistance Associated with OXA-40 Carbapenemase among *Acinetobacter baumannii* Isolates from a Hospital in Northern Spain. *Journal of clinical microbiology*, **40**: 4741-4743.
- Savoie, A., Sanschagrin, F., Palzkill, T., Voyer, N., and Levesque, R. C.** (2000). Structure-function analysis of alpha-helix H4 using PSE-4 as a model enzyme representative of class A beta-lactamases. *Protein engineering*, **13**: 267-74.
- Poirel, L., Gniadkowski, M., and Nordmann, P.** (2002). Biochemical analysis of the ceftazidime-hydrolysing extended-spectrum beta-lactamase CTX-M-15 and of its structurally related beta-lactamase CTX-M-3. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, **50**: 1031-4.
- Chaibi, E. B., Sirot, D., Paul, G., and Labia, R.** (1999). Inhibitor-resistant TEM beta-lactamases: phenotypic, genetic and biochemical characteristics. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, **43**: 447-58.

- Rasmussen, B. A., Bradford, P. A., Quinn, J. P., Wiener, J., Weinstein, R. A., and Bush, K. (1993). Genetically diverse ceftazidime-resistant isolates from a single center: biochemical and genetic characterization of TEM-10 beta-lactamases encoded by different nucleotide sequences. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, **37**: 1989-92.
- Thomson, K. S., and Smith Moland, E. (2000). Version 2000: the new beta-lactamases of Gram-negative bacteria at the dawn of the new millennium. *Microbes and infection / Institut Pasteur*, **2**: 1225-35.
- Sundstrom, L., Radstrom, P., Swedberg, G., and Skold, O. (1988). Site-specific recombination promotes linkage between trimethoprim- and sulfonamide resistance genes. Sequence characterization of *dhfrV* and *sulI* and a recombination active locus of Tn21. *Molecular & general genetics : MGG*, **213**: 191-201.
- Miller, G. H., Sabatelli, F. J., Hare, R. S., Glupczynski, Y., Mackey, P., Shlaes, D., et al. (1997). The most frequent aminoglycoside resistance mechanisms--changes with time and geographic area: a reflection of aminoglycoside usage patterns? Aminoglycoside Resistance Study Groups. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, **24 Suppl 1**: S46-62.
- Sandvang, D., and Aarestrup, F. M. (2000). Characterization of aminoglycoside resistance genes and class 1 integrons in porcine and bovine gentamicin-resistant *Escherichia coli*. *Microbial drug resistance (Larchmont, N.Y.)*, **6**: 19-27.
- Prescott, J. F., Baggot, J. D., and Walker, R. D. (2000). Antimicrobial therapy in veterinary medicine. 3. Ames, Iowa.
- Linde, H. J., Notka, F., Metz, M., Kochanowski, B., Heisig, P., and Lehn, N. (2000). In vivo increase in resistance to ciprofloxacin in *Escherichia coli* associated with deletion of the C-terminal part of MarR. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, **44**: 1865-8.
- Cohen, S. P., Hachler, H., and Levy, S. B. (1993). Genetic and functional analysis of the multiple antibiotic resistance (*mar*) locus in *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology*, **175**: 1484-92.
- Ross, J. I., Eady, E. A., Cove, J. H., and Cunliffe, W. J. (1998). 16S rRNA mutation associated with tetracycline resistance in a gram-positive bacterium. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, **42**: 1702-5.
- Jones, C. S., Osborne, D. J., and Stanley, J. (1992). Enterobacterial tetracycline resistance in relation to plasmid incompatibility. *Molecular and cellular probes*, **6**: 313-7.
- Allard, J. D., and Bertrand, K. P. (1993). Sequence of a class E tetracycline resistance gene from *Escherichia coli* and comparison of related tetracycline efflux proteins. *Journal of bacteriology*, **175**: 4554-60.
- White, D. G., Hudson, C., Maurer, J. J., Ayers, S., Zhao, S., Lee, M. D., et al. (2000). Characterization of chloramphenicol and florfenicol resistance in *Escherichia coli* associated with bovine diarrhea. *Journal of clinical microbiology*, **38**: 4593-8.
- Syriopoulou, V. P., Harding, A. L., Goldmann, D. A., and Smith, A. L. (1981). In vitro antibacterial activity of fluorinated analogs of chloramphenicol and thiamphenicol. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, **19**: 294-7.
- Murray, I. A., and Shaw, W. V. (1997). O-Acetyltransferases for chloramphenicol and other natural products. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, **41**: 1-6.
- Bissonnette, L., Champetier, S., Buisson, J. P., and Roy, P. H. (1991). Characterization of the nonenzymatic chloramphenicol resistance (*cmlA*) gene of the In4 integron of Tn1696: similarity of the product to transmembrane transport proteins. *Journal of bacteriology*, **173**: 4493-502.
- Cloekaert, A., Baucheron, S., Flaujac, G., Schwarz, S., Kehrenberg, C., Martel, J. L., et al. (2000). Plasmid-mediated florfenicol resistance encoded by the *floR* gene in

- Escherichia coli* isolated from cattle. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, **44**: 2858-60.
- Doublet, B., Schwarz, S., Nussbeck, E., Baucheron, S., Martel, J. L., Chaslus-Dancla, E., et al.** (2002). Molecular analysis of chromosomally florfenicol-resistant *Escherichia coli* isolates from France and Germany. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, **49**: 49-54.
- Matthews, D. A., Bolin, J. T., Burridge, J. M., Filman, D. J., Volz, K. W., and Kraut, J.** (1985). Dihydrofolate reductase. The stereochemistry of inhibitor selectivity. *The Journal of biological chemistry*, **260**: 392-9.
- Flensburg, J., and Skold, O.** (1987). Massive overproduction of dihydrofolate reductase in bacteria as a response to the use of trimethoprim. *European journal of biochemistry / FEBS*, **162**: 473-6.
- King, C. H., Shlaes, D. M., and Dul, M. J.** (1983). Infection caused by thymidine-requiring, trimethoprim-resistant bacteria. *Journal of clinical microbiology*, **18**: 79-83.
- Jansson, C., and Skold, O.** (1991). Appearance of a new trimethoprim resistance gene, *dhfrIX*, in *Escherichia coli* from swine. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, **35**: 1891-9.
- Jansson, C., Franklin, A., and Skold, O.** (1992). Spread of a newly found trimethoprim resistance gene, *dhfrIX*, among porcine isolates and human pathogens. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, **36**: 2704-8.
- Kahlmeter, G.** (2000). The ECO.SENS Project: a prospective, multinational, multicentre epidemiological survey of the prevalence and antimicrobial susceptibility of urinary tract pathogens--interim report. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, **46 Suppl 1**: 15-22; discussion 63-5.
- Radstrom, P., and Swedberg, G.** (1988). RSF1010 and a conjugative plasmid contain *sulIII*, one of two known genes for plasmid-borne sulfonamide resistance dihydropteroate synthase. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, **32**: 1684-92.
- Skold, O.** (2000). Sulfonamide resistance: mechanisms and trends. *Drug resistance updates : reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy*, **3**: 155-160.
- van Treeck, U., Schmidt, F., and Wiedemann, B.** (1981). Molecular nature of a streptomycin and sulfonamide resistance plasmid (pBP1) prevalent in clinical *Escherichia coli* strains and integration of an ampicillin resistance transposon (TnA). *Antimicrobial agents and chemotherapy*, **19**: 371-80.
- Radstrom, P., Swedberg, G., and Skold, O.** (1991). Genetic analyses of sulfonamide resistance and its dissemination in gram-negative bacteria illustrate new aspects of R plasmid evolution. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, **35**: 1840-8.
- Aarts, H. J., Boumedine, K. S., Nesme, X., and Cloeckaert, A.** (2001). Molecular tools for the characterisation of antibiotic-resistant bacteria. *Veterinary research*, **32**: 363-80.
- Mathew, A. G., Saxton, A. M., Upchurch, W. G., and Chattin, S. E.** (1999). Multiple antibiotic resistance patterns of *Escherichia coli* isolates from swine farms. *Applied and environmental microbiology*, **65**: 2770-2.
- Nagy, B., and Fekete, P. Z.** (1999). Enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) in farm animals. *Veterinary research*, **30**: 259-84.
- Lanz, R., Kuhnert, P., and Boerlin, P.** (2003). Antimicrobial resistance and resistance gene determinants in clinical *Escherichia coli* from different animal species in Switzerland. *Veterinary microbiology*, **91**: 73-84.
- Gilmore, A.** (1986). Chloramphenicol and the politics of health. *CMAJ : Canadian Medical Association journal - Journal de l'Association medicale canadienne*, **134**: 423, 426-8, 433-5.

- Werckenthin, C., Seidl, S., Riedl, J., Kiossis, E., Wolf, G., Stolla, R., *et al.* (2002). *Escherichia coli* isolates from young calves in Bavaria: in vitro susceptibilities to 14 anti-microbial agents. *Journal of veterinary medicine. B, Infectious diseases and veterinary public health.*, **49**: 61-5.
- Sunde, M., and Sorum, H. (1999). Characterization of integrons in *Escherichia coli* of the normal intestinal flora of swine. *Microbial drug resistance (Larchmont, N.Y.)*, **5**: 279-87.
- Mathew, A. G., Upchurch, W. G., and Chattin, S. E. (1998). Incidence of antibiotic resistance in fecal *Escherichia coli* isolated from commercial swine farms. *Journal of animal science*, **76**: 429-34.
- Lee, C., Langlois, B. E., and Dawson, K. A. (1993). Detection of tetracycline resistance determinants in pig isolates from three herds with different histories of antimicrobial agent exposure. *Applied and environmental microbiology*, **59**: 1467-72.
- Testa, R. T., Petersen, P. J., Jacobus, N. V., Sum, P. E., Lee, V. J., and Tally, F. P. (1993). In vitro and in vivo antibacterial activities of the glycylicyclines, a new class of semisynthetic tetracyclines. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, **37**: 2270-7.
- Pai, H., Lyu, S., Lee, J. H., Kim, J., Kwon, Y., Kim, J. W., *et al.* (1999). Survey of extended-spectrum beta-lactamases in clinical isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* : prevalence of TEM-52 in Korea. *Journal of clinical microbiology*, **37**: 1758-63.
- Keyes, K., Hudson, C., Maurer, J. J., Thayer, S., White, D. G., and Lee, M. D. (2000). Detection of florfenicol resistance genes in *Escherichia coli* isolated from sick chickens. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, **44**: 421-4.
- Lee, J. C., Oh, J. Y., Cho, J. W., Park, J. C., Kim, J. M., Seol, S. Y., *et al.* (2001). The prevalence of trimethoprim-resistance-conferring dihydrofolate reductase genes in urinary isolates of *Escherichia coli* in Korea. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, **47**: 599-604.
- Bass, L., Liebert, C. A., Lee, M. D., Summers, A. O., White, D. G., Thayer, S. G., *et al.* (1999). Incidence and characterization of integrons, genetic elements mediating multiple-drug resistance, in avian *Escherichia coli*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, **43**: 2925-9.
- Zhao, S., White, D. G., Ge, B., Ayers, S., Friedman, S., English, L., *et al.* (2001). Identification and characterization of integron-mediated antibiotic resistance among Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolates. *Applied and environmental microbiology*, **67**: 1558-64.
- Schmitz, F. J., Hafner, D., Geisel, R., Follmann, P., Kirschke, C., Verhoef, J., *et al.* (2001). Increased prevalence of class I integrons in *Escherichia coli*, *Klebsiella* species, and *Enterobacter* species isolates over a 7-year period in a German university hospital. *Journal of clinical microbiology*, **39**: 3724-6.
- van Belkum, A., Goessens, W., van der Schee, C., Lemmens-den Toom, N., Vos, M. C., Cornelissen, J., *et al.* (2001). Rapid emergence of ciprofloxacin-resistant *enterobacteriaceae* containing multiple gentamicin resistance-associated integrons in a Dutch hospital. *Emerging infectious diseases*, **7**: 862-71.
- Roy, P. H. (1997). Dissémination de la résistance aux antibiotiques : le génie génétique à l'oeuvre chez les bactéries. *Médecine/Sciences*, **13**: 927-933.
- Peters, E. D., Leverstein-van Hall, M. A., Box, A. T., Verhoef, J., and Fluit, A. C. (2001). Novel gene cassettes and integrons. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, **45**: 2961-4.
- O'Connor, A. M., Poppe, C., and McEwen, S. A. (2002). Changes in the prevalence of resistant *Escherichia coli* in cattle receiving subcutaneously injectable oxytetracycline

- in addition to in-feed chlortetracycline compared with cattle receiving only in-feed chlortetracycline. *Canadian journal of veterinary research - Revue canadienne de recherche veterinaire.*, **66**: 145-50.
- Kim, J., and Lee, H. J.** (2000). Rapid discriminatory detection of genes coding for SHV beta-lactamases by ligase chain reaction. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, **44**: 1860-4.
- Barany, F.** (1991). Genetic disease detection and DNA amplification using cloned thermostable ligase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **88**: 189-93.
- Rasheed, J. K., Jay, C., Metchock, B., Berkowitz, F., Weigel, L., Crellin, J., et al.** (1997). Evolution of extended-spectrum beta-lactam resistance (SHV-8) in a strain of *Escherichia coli* during multiple episodes of bacteremia. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, **41**: 647-53.
- Johnson, J. R., O'Bryan, T. T., Low, D. A., Ling, G., Delavari, P., Fasching, C., et al.** (2000). Evidence of commonality between canine and human extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strains that express papG allele III. *Infection and immunity*, **68**: 3327-36.
- Johnson, J. R., Kuskowski, M. A., O'Bryan, T. T., and Maslow, J. N.** (2002). Epidemiological correlates of virulence genotype and phylogenetic background among *Escherichia coli* blood isolates from adults with diverse-source bacteremia. *The Journal of infectious diseases*, **185**: 1439-47.
- Chanal-Claris, C., Sirot, D., Bret, L., Chatron, P., Labia, R., and Sirot, J.** (1997). Novel extended-spectrum TEM-type beta-lactamase from an *Escherichia coli* isolate resistant to ceftazidime and susceptible to cephalothin. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, **41**: 715-6.
- Oluoch, A. O., Kim, C. H., Weisiger, R. M., Koo, H. Y., Siegel, A. M., Campbell, K. L., et al.** (2001). Nonenteric *Escherichia coli* isolates from dogs: 674 cases (1990-1998). *Journal of the American Veterinary Medical Association*, **218**: 381-4.
- Feria, C., Ferreira, E., Correia, J. D., Goncalves, J., and Canica, M.** (2002). Patterns and mechanisms of resistance to beta-lactams and beta-lactamase inhibitors in uropathogenic *Escherichia coli* isolated from dogs in Portugal. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, **49**: 77-85.
- Bradford, P. A., Petersen, P. J., Fingerhman, I. M., and White, D. G.** (1999). Characterization of expanded-spectrum cephalosporin resistance in *E. coli* isolates associated with bovine calf diarrhoeal disease. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, **44**: 607-10.
- van den Bogaard, A. E., London, N., Driessen, C., and Stobberingh, E. E.** (2001). Antibiotic resistance of faecal *Escherichia coli* in poultry, poultry farmers and poultry slaughterers. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, **47**: 763-71.
- Smyth, C. J., Marron, M., and Smith, S. G. J.** (1994). Fimbriae of *Escherichia coli*. In: *Escherichia coli in domestic animals and humans*. CAB international, Guelph, 399-435.
- Harel, J., Daigle, F., Maiti, S., Desautels, C., Labigne, A., and Fairbrother, J. M.** (1991). Occurrence of *pap*-, *sfa*-, and *afa*-related sequences among F165-positive *Escherichia coli* from diseased animals. *FEMS microbiology letters*, **66**: 177-82.
- Hacker, J., Hughes, C., Hof, H., and Goebel, W.** (1983). Cloned hemolysin genes from *Escherichia coli* that cause urinary tract infection determine different levels of toxicity in mice. *Infection and immunity*, **42**: 57-63.

SECTION V – Annexes

Annexe 1 : Évolution de la multirésistance chez les souches *Escherichia coli* entérotoxigènes

Résultats

À la suite de l'analyse des antibiogrammes effectués sur les isolats ETEC, nous pouvons remarquer que les souches isolées entre 1978 et 1984 sont résistantes en majorité à moins de trois agents antimicrobiens. Nous pouvons faire les mêmes observations pour les souches isolées entre 1985 et 1989. Par contre, dès 1990, le nombre de souches résistantes à plus de trois agents devient plus élevé. Et entre 1995 et 2000, les isolats ETEC sont en majorité résistants à plus de trois agents antimicrobiens allant jusqu'à huit résistances. Il y a, dans le temps, un phénomène d'ascension de la multirésistance chez les souches ETEC.

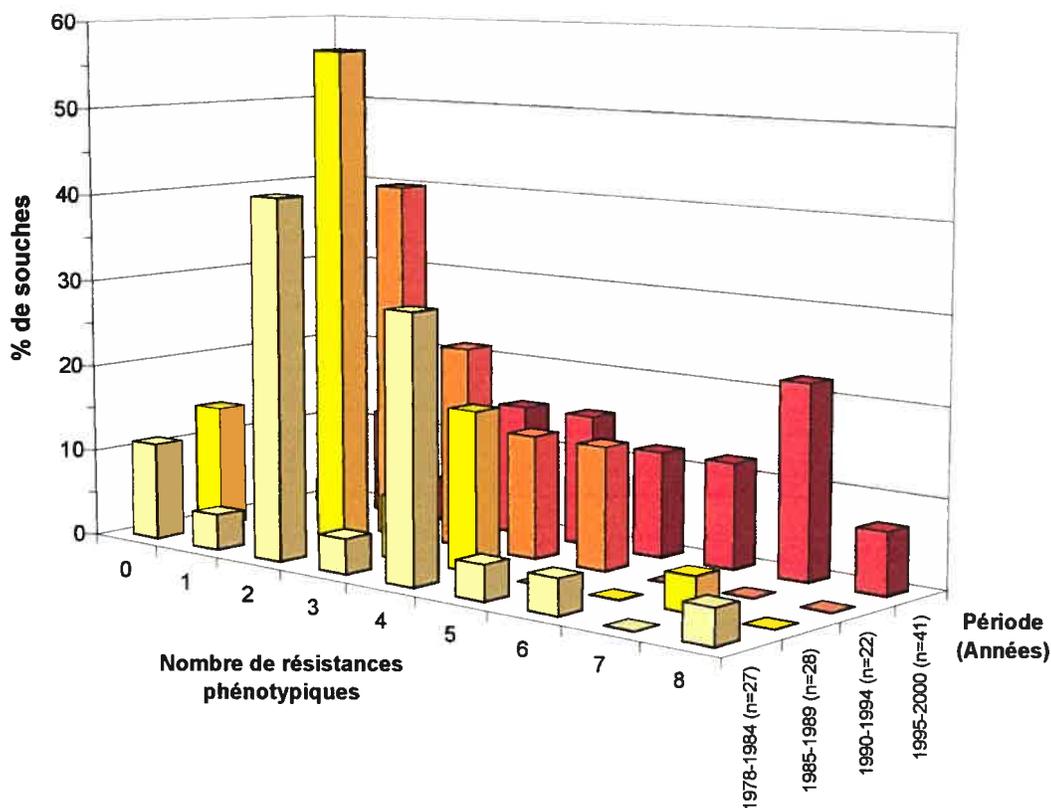


Figure 2. Évolution ascendante de la multirésistance chez les souches ETEC isolées de porcs atteints d'une diarrhée postsevrage entre les années 1978 et 2000

Annexe 2 : Analyse statistique du chi-carré entre différents gènes de résistance et l'intégron de classe 1 retrouvés parmi les souches ETEC isolées entre 1978 et 1989

Résultats

Voir article I.

Tableau III. Association des gènes de résistance et de l'intégron de classe 1 parmi les souches ETEC isolées entre 1978 et 1989

	Gènes de résistance aux agents antimicrobiens et intégron de classe 1 ^a														
	<i>TEM1</i>	<i>SHV</i>	<i>aphA1</i>	<i>aphA2</i>	<i>aac(3)-IV</i>	<i>dhfr1</i>	<i>dhfr5</i>	<i>dhfr13</i>	<i>dhfr15</i>	<i>sulI</i>	<i>sulII</i>	<i>tetA</i>	<i>tetB</i>	<i>tetC</i>	<i>catI</i>
<i>SHV</i>	-														
<i>aphA1</i>	+	-													
<i>aphA2</i>	-	-	-												
<i>aac(3)-IV</i>	+	-	++	-											
<i>dhfr1</i>	-	-	-	-	-										
<i>dhfr5</i>	-	++	-	-	-	-									
<i>dhfr13</i>	-	-	-	-	-	-	-								
<i>dhfr15</i>	-	-	-	-	-	+++	-	-							
<i>sulI</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	-						
<i>sulII</i>	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-					
<i>tetA</i>	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-				
<i>tetB</i>	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	(+++) ^b		
<i>tetC</i>	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+++	(+++)		
<i>catI</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>int1</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

^a Seuls les gènes de résistance aux agents antimicrobiens qui montraient une association avec un autre gène de résistance à niveau $P < 0.05$ sont inscrits. Les niveaux significatifs d'associations (tels que donnés par le test du chi-carré exact) : -, $P > 0.05$; +, $0.05 = P = 0.01$; ++, $0.01 = P = 0.001$; +++, $0.001 = P$.

^b Les parenthèses déterminent les associations négatives.

Annexe 3 : Analyse statistique du chi-carré entre différents gènes de résistance et l'intégron de classe 1 retrouvés parmi les souches ETEC isolées entre 1990 et 2000

Résultats

Voir article I.

Tableau IV. Association des gènes de résistance et de l'intégron de classe 1 parmi les souches ETEC isolées entre 1990 et 2000

	Gènes de résistance aux agents antimicrobiens et intégron de classe 1 ^a														
	<i>tem</i>	<i>shv</i>	<i>aphA1</i>	<i>aphA2</i>	<i>aac(3)-IV</i>	<i>dhfr1</i>	<i>dhfr5</i>	<i>dhfr13</i>	<i>dhfr15</i>	<i>sulI</i>	<i>sulII</i>	<i>tetA</i>	<i>tetB</i>	<i>tetC</i>	<i>catI</i>
<i>shv</i>	++														
<i>aphA1</i>	++	-													
<i>aphA2</i>	-	-	-												
<i>aac(3)-IV</i>	++	-	+	-											
<i>dhfr1</i>	-	-	-	-	-										
<i>dhfr5</i>	+	++	-	-	+	-									
<i>dhfr13</i>	-	-	-	-	-	-	-								
<i>dhfr15</i>	-	-	-	-	-	+++	-	-							
<i>sulI</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-						
<i>sulII</i>	-	-	-	-	-	-	-	++	-	-					
<i>tetA</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	-	(++) ^b	-				
<i>tetB</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	-	(+++)			
<i>tetC</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	-	(++)	-	+++	(+++)		
<i>catI</i>	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
class 1 integron	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	-	-	-	-	++

^a Seuls les gènes de résistance aux agents antimicrobiens qui montraient une association avec un autre gène de résistance à niveau $P < 0.05$ sont inscrits. Les niveaux significatifs d'associations (tels que donnés par le test du chi-carré exact) : -, $P > 0.05$; +, $0.05 = P = 0.01$; ++, $0.01 = P = 0.001$; +++, $0.001 = P$.

^b Les parenthèses déterminent les associations négatives.

Annexe 4 : Distribution du phénotype de résistance aux agents antimicrobiens selon l'âge des porcs

Résultats

Les souches isolées de porcs âgés entre 1 et 10 jours possèdent en majorité moins de trois résistances. Les souches isolées de porcs âgés entre 11 et 20 jours possèdent deux ou quatre résistances, et ce, en majorité aux agents antimicrobiens. Les autres isolats provenant de porcs âgés entre 21 et 70 jours qui ont été isolées possèdent un nombre de résistances plus varié entre elles, mais pouvant atteindre un nombre plus élevé que six. L'âge des porcs semble être un facteur qui interfère dans la multirésistance retrouvée chez les souches *E. coli* entérotoxigènes.

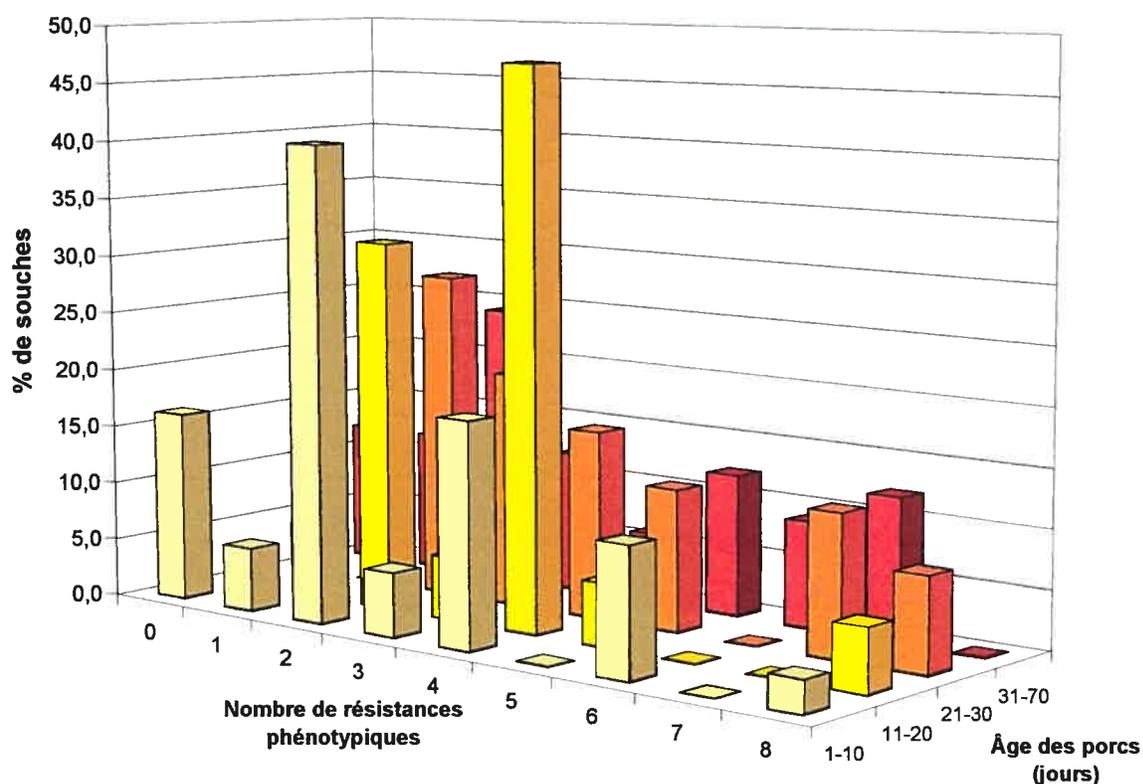


Figure 3. Pourcentage de souches ETEC selon le nombre de résistances aux agents antimicrobiens testés en fonction de l'âge des porcs d'où proviennent les souches

Annexe 5 : Distribution de l'âge des porcs selon l'année d'isolement de la souche

Résultats

Entre 1978 et 1984, plus de 70% des souches ETEC étaient isolées de porcs âgés entre 1 et 20 jours. Entre 1985 et 1989, les souches ETEC de notre collection étaient isolées de porcs avec un ratio égal entre les quatre différents groupes d'âges. La même observation est notée pour les souches isolées entre 1990 et 1994. Cependant, entre 1995 et 2000, les isolats proviennent surtout (84%) de porcs âgés entre 21 et 70 jours.

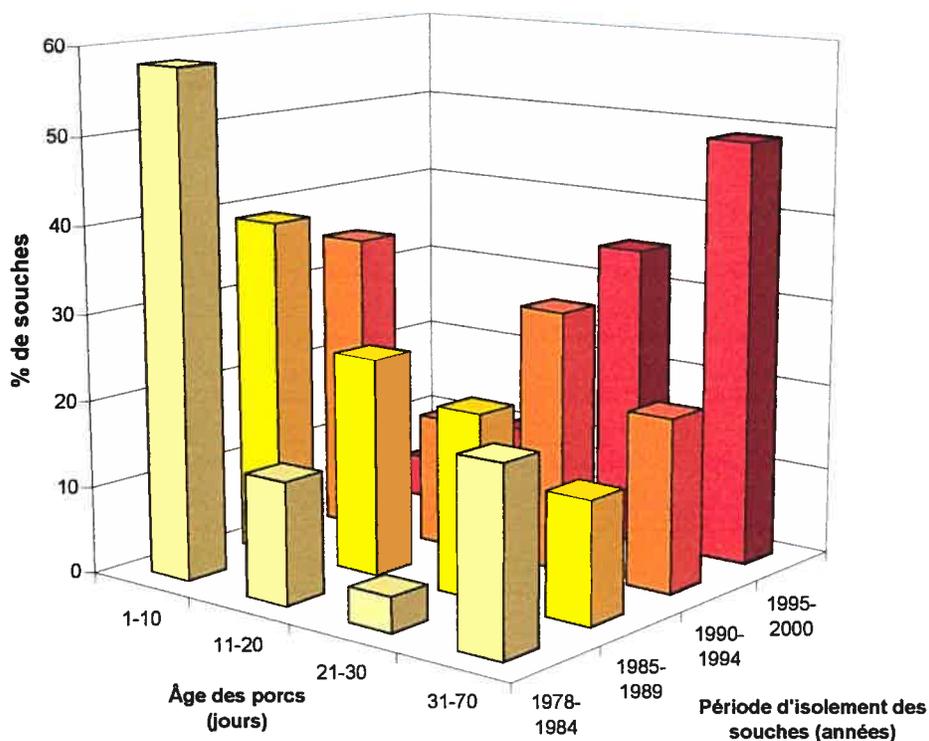


Figure 4. Pourcentage de souches ETEC selon de l'âge des porcs d'où proviennent les souches en fonction de la période d'isolement de celles-ci

ACCORD ET PERMISSION DES COAUTEURS D'UN ARTICLE¹

IDENTIFICATION DE L'ETUDIANT

Nom de l'étudiant Christine Maynard		Code permanent [REDACTED]
Sigle du programme M.Sc.	Titre du programme Sciences vétérinaires	Option Microbiologie

DESCRIPTION DE L'ARTICLE

Auteurs Christine Maynard, John M. Fairbrother, Sadjia Bekal-Si Ali, François Sanschagrin, Roger C. Levesque, Roland Brousseau, Luke Masson, Serge Larivière et Josée Harel	
Titre Characterization and detection of antimicrobial resistance genes in enterotoxigenic <i>Escherichia coli</i> O149: K91 isolated from pigs over a 23-year period	
Revue Soumis à Antimicrobial Agents and Chemotherapy	Date de publication Indéterminée

DECLARATION DES COAUTEURS

Déclaration		
À titre de coauteur de l'article identifié ci-dessus, j'autorise le microfilmage du mémoire et je suis d'accord que Christine Maynard inclut cet article dans son mémoire de maîtrise qui a pour titre « Distribution des gènes de résistance aux agents antimicrobiens parmi des souches <i>Escherichia coli</i> entérotoxigènes et extraintestinales ».		
Coauteur Roland Brousseau	Sig [REDACTED]	Date 18 mars 2003
Coauteur LUKE MASSON	Sig [REDACTED]	Date 18/03/03
Coauteur Sadjia BEKAL-SI ALI	Sig [REDACTED]	Date 20/03/03
Coauteur JOSEE HAREL	Sig [REDACTED]	Date 28.04.03
Coauteur	Signature	Date

Envoyé à la FÉS le 2003/04/28

ACCORD ET PERMISSION DES COAUTEURS D'UN ARTICLE¹

IDENTIFICATION DE L'ETUDIANT

Nom de l'étudiant Christine Maynard		Code permanent [REDACTED]
Sigle du programme M.Sc.	Titre du programme Sciences vétérinaires	Option Microbiologie

DESCRIPTION DE L'ARTICLE

Auteurs Christine Maynard, John M. Fairbrother, Sadjia Bekal-Si Ali, François Sanschagrin, Roger C. Levesque, Roland Brousseau, Luke Masson, Serge Larivière et Josée Harel	
Titre Characterization and detection of antimicrobial resistance genes in enterotoxigenic <i>Escherichia coli</i> O149. K91 isolated from pigs over a 23-year period	
Revue Soumis à Antimicrobial Agents and Chemotherapy	Date de publication Indéterminée

DECLARATION DES COAUTEURS

Déclaration A titre de coauteur de l'article identifié ci-dessus, j'autorise le microfilmage du mémoire et je suis d'accord que Christine Maynard inclut cet article dans son mémoire de maîtrise qui a pour titre « Distribution des gènes de résistance aux agents antimicrobiens parmi des souches <i>Escherichia coli</i> entérotoxinogènes et extraintestinales ».		
Coauteur	Sig [REDACTED]	Date
Coauteur SERGE LARIVIERE	Sig [REDACTED]	Date 2003/04/25
Coauteur JOHN M FAIRBROTHER	Sig [REDACTED]	Date 28/04/03
Coauteur	Signature	Date

Envoyé à la FÉS le 2003 04 28

ACCORD ET PERMISSION DES COAUTEURS D'UN ARTICLE¹

IDENTIFICATION DE L'ETUDIANT

Nom de l'étudiant		Code permanent
Christine Maynard		
Siège du programme	Titre du programme	Option
M.Sc.	Sciences vétérinaires	Microbiologie

DESCRIPTION DE L'ARTICLE

Auteurs	
Christine Maynard, John M. Fairbrother, Sadjia Bekal-Si Ali, François Sanschagrin, Roger C. Levesque, Roland Brousseau, Luke Masson, Serge Larivière et Josée Harel	
Titre	
Characterization and detection of antimicrobial resistance genes in enterotoxigenic <i>Escherichia coli</i> O149: K91 isolated from pigs over a 23-year period	
Revue	Date de publication
Soumis à Antimicrobial Agents and Chemotherapy	Indéterminée

DECLARATION DES COAUTEURS

Déclaration		
À titre de coauteur de l'article identifié ci-dessus, j'autorise le microfilmage du mémoire et je suis d'accord que Christine Maynard inclut cet article dans son mémoire de maîtrise qui a pour titre « Distribution des gènes de résistance aux agents antimicrobiens parmi des souches <i>Escherichia coli</i> entérotoxigènes et extraintestinales ».		
Coeuteur		Date
Roger C. Levesque		19-3-3
Coeuteur		Date
François Sanschagrin		19-3-3
Coeuteur	Signature	Date
Coeuteur	Signature	Date
Coeuteur	Signature	Date
Coeuteur	Signature	Date
Coeuteur	Signature	Date

Envoyé à la CESU: 20050478

ACCORD ET PERMISSION DES COAUTEURS D'UN ARTICLE¹

IDENTIFICATION DE L'ETUDIANT

Nom de l'étudiant Christine Maynard		Code permanent [REDACTED]
Sigle du programme M.Sc.	Titre du programme Sciences vétérinaires	Option Microbiologie

DESCRIPTION DE L'ARTICLE

Auteurs Christine Maynard, Sadjia Bekal-Si Ali, François Sanschagrin, Roger C. Levesque, Roland Brousseau, Luke Masson, Serge Larivière et Josée Harel	
Titre Genetic analysis of antimicrobial resistance among extraintestinal <i>Escherichia coli</i> isolates of animal and human origin	
Revue Soumis à The Journal of Antimicrobial Chemotherapy	Date de publication Indéterminée

DECLARATION DES COAUTEURS

Déclaration À titre de coauteur de l'article identifié ci-dessus, j'autorise le microfilmage du mémoire et je suis d'accord que Christine Maynard inclut cet article dans son mémoire de maîtrise qui a pour titre « Distribution des gènes de résistance aux agents antimicrobiens parmi des souches <i>Escherichia coli</i> entérotoxigènes et extraintestinales ».		
Coauteur Roland Brousseau	[REDACTED]	Date 18 mars 2003
Coauteur LUKE MASSON	[REDACTED]	Date 18/3/03
Coauteur Sadjia BEKAL-Si Ali	[REDACTED]	Date 20/3/03
Coauteur JOSÉE HAREL	Signature [REDACTED]	Date 28.4.03
Coauteur	Signature	Date
Coauteur	Signature	Date
Coauteur	Signature	Date

Envoyé à la FÉS le 20030428

ACCORD ET PERMISSION DES COAUTEURS D'UN ARTICLE¹

IDENTIFICATION DE L'ETUDIANT

Nom de l'étudiant Christine Maynard		Code permanent [REDACTED]
Siège du programme M.Sc.	Titre du programme Sciences vétérinaires	Option Microbiologie

DESCRIPTION DE L'ARTICLE

Auteurs Christine Maynard, Sadjia Bekal-Si Ali, François Sanschagrin, Roger C. Levesque, Roland Brousseau, Luc Masson, Serge Larivière et Josée Harel	
Titre Genetic analysis of antimicrobial resistance among extraintestinal <i>Escherichia coli</i> isolates of animal and human origin	
Revue Soumis à The Journal of Antimicrobial Chemotherapy	Date de publication Indéterminée

DECLARATION DES COAUTEURS

Déclaration À titre de coauteur de l'article identifié ci-dessus, j'autorise le microfilmage du mémoire et je suis d'accord que Christine Maynard inclut cet article dans son mémoire de maîtrise qui a pour titre « Distribution des gènes de résistance aux agents antimicrobiens parmi des souches <i>Escherichia coli</i> entérotoxigènes et extraintestinales ».		
Coauteur Roger C. Levesque	[REDACTED]	Date 19-3-3
Coauteur François Sanschagrin	[REDACTED]	Date 19-3-3
Coauteur	Signature	Date

Envoyé à la FES le: 2003048

ACCORD ET PERMISSION DES COAUTEURS D'UN ARTICLE¹

IDENTIFICATION DE L'ETUDIANT

Nom de l'étudiant Christine Maynard		Code permanent [REDACTED]
Sigle du programme M.Sc.	Titre du programme Sciences vétérinaires	Option Microbiologie

DESCRIPTION DE L'ARTICLE

Auteurs Christine Maynard, Sadjia Bekal-Si Ali, François Sanschagrin, Roger C. Levesque, Roland Brousseau, Luke Masson, Serge Larivière et Josée Harel	
Titre Genetic analysis of antimicrobial resistance among extraintestinal <i>Escherichia coli</i> isolates of animal and human origin	
Revue Soumis à The Journal of Antimicrobial Chemotherapy	Date de publication Indéterminée

DECLARATION DES COAUTEURS

Déclaration A titre de coauteur de l'article identifié ci-dessus, j'autorise le microfilmage du mémoire et je suis d'accord que Christine Maynard inclut cet article dans son mémoire de maîtrise qui a pour titre « Distribution des gènes de résistance aux agents antimicrobiens parmi des souches <i>Escherichia coli</i> entérotoxigènes et extraintestinales ».		
Coauteur	Signature [REDACTED]	Date
Coauteur SERGE LARIVIERE	Signature [REDACTED]	Date 2003/04/05
Coauteur	Signature [REDACTED]	Date
Coauteur	Signature	Date

Envoyé à la FES le 20030405