

**Université de Montréal**

**Pathogénicité potentielle et résistance antimicrobienne des *Escherichia coli* isolés des  
poulets au Sénégal, au Canada (Québec) et au Vietnam**

**par Passoret Vounba**

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

Thèse présentée à la Faculté de médecine vétérinaire  
en vue de l'obtention du grade de *Philosophiae Doctor* (Ph.D.)  
en sciences vétérinaires option microbiologie

Novembre 2018

© Passoret Vounba, 2018

## Résumé

*Escherichia coli* est un hôte normal du tractus intestinal du poulet, mais ce tractus intestinal peut inclure des *E. coli* pathogènes aviaires (APEC) ou des potentiels *E. coli* pathogènes extraintestinaux (ExPEC), susceptibles de provoquer une maladie chez l'humain. Ces *E. coli* peuvent également être résistants aux antimicrobiens d'importance critique en santé humaine ou vétérinaire. La dissémination des résistances antimicrobiennes (RAM) peut être assurée par des clones ou des plasmides. Cependant, au Québec, au Sénégal et au Vietnam, le rôle des clones et des plasmides dans la résistance et la virulence des *E. coli* n'est pas encore élucidé. Au Sénégal, 68,2% et 86,2% des isolats indicateurs retrouvés chez des poulets sains et ceux récupérés d'animaux malades respectivement, étaient multirésistants (MDR); cette prévalence pour les isolats indicateurs était de 62,6% au Québec et 99,0% au Vietnam. Chez les isolats cliniques du Sénégal, la non-susceptibilité aux céphalosporines de 3<sup>ème</sup> génération (C3G) était exclusivement due aux gènes *bla<sub>CTX-M</sub>* [5 isolats (8,6%)]. S'agissant des isolats issus de poulets sains, la non-susceptibilité aux C3G était due autant aux gènes *bla<sub>CTX-M</sub>* [14 isolats (5,6%; IC95% = 1,4 – 9,8) pour le Sénégal et 37 (19,8%; IC95% = 4,3 – 35,3) pour le Vietnam] qu'au gène *bla<sub>CMY-2</sub>* [28 (11,2%; IC95% = 2,7 – 19,6) au Sénégal et 27 (14,4%; IC95% = 0,0 – 30,5) au Vietnam] tandis qu'au Québec, cette résistance relève essentiellement de *bla<sub>CMY-2</sub>* [88 (50,3%; IC95% = 34,9 – 65,7)]; seulement 3 isolats (1,7%; IC95% = 0,0 – 4,8) étant positifs à *bla<sub>CTX-M</sub>*. La prévalence de non-susceptibilité aux quinolones parmi les isolats indicateurs était très élevée au Vietnam (83,7% pour l'acide nalidixique et 59,6% pour la ciprofloxacine); moyenne au Sénégal (44,0% pour l'acide nalidixique et 22,9% pour la ciprofloxacine) et très faible au Québec (4,0% pour l'acide nalidixique et 1,0% pour la ciprofloxacine). La résistance à la ciprofloxacine avait un déterminisme chromosomique, car la double mutation sérine (*gyrA* Ser83Leu et *parC* Ser80Ile) était observée dans 88,2% (IC95% = 81,8 – 94,5) d'isolats testés au Sénégal et 82,0% (IC95% = 69,9 – 94,1) au Vietnam. Autant les plasmides que les clones semblaient impliqués dans la dissémination des résistances aux C3G. En effet, les gènes *bla<sub>CTX-M</sub>*/*bla<sub>CMY-2</sub>* étaient, quel que soit le pays, portés majoritairement par le plasmide II et accessoirement par d'autres plasmides tels que K/B, FIB, A/C, B/O, etc. et certains isolats provenant des fermes différentes au Sénégal et au Vietnam étaient étroitement apparentés. Quant à la résistance à la colistine, aucun isolat

n'était résistant à cet antimicrobien au Québec. En revanche au Vietnam, 11 isolats (8,7%; IC95% = 0,0 – 34,4) producteurs d'ESBL/AmpC et tous positifs au gène *mcr-1* étaient résistants à la colistine, tandis qu'au Sénégal, 2 (2,2%; IC95% = 0,0 – 5,4) isolats fécaux positifs à *bla<sub>CTX-M</sub>*, mais négatifs aux gènes *mcr-1* et *mcr-2*, étaient résistants à la colistine. Les deux isolats du Sénégal étaient négatifs pour *mcr-1* et *mcr-2*, mais avaient des mutations dans le système à deux composantes *pmrA/pmrB*. Enfin, certains isolats cliniques du Sénégal et d'autres parmi ceux provenant des poulets sains au Sénégal, au Québec et au Vietnam, étaient définis comme étant potentiellement capables d'infecter les humains. Ces résultats suggèrent que les poulets constituent un réservoir à la fois de *E. coli* résistants aux antimicrobiens et potentiellement pathogènes pour les humains.

**Mots clés :** *Escherichia coli* aviaires, résistance antimicrobienne, virulence, clones, plasmides.

## Abstract

*Escherichia coli* is a normal inhabitant of the intestinal microbiota of chickens, a small proportion of which may be avian pathogenic *E. coli* (APEC) or potential extraintestinal pathogenic *E. coli* (ExPEC), capable of causing disease in humans. These *E. coli* may also be resistant to antimicrobials of critical importance for human or veterinary health. The dissemination of antimicrobial resistance (AMR) can be mediated by clones or plasmids. However, in Québec, Senegal and Vietnam, the role of clones and plasmids in the resistance and virulence of avian *E. coli* is still to be elucidated. In Senegal, 68.2% and 86.2% of *E. coli* isolated from healthy chickens (indicator isolates) and clinical isolates, respectively, were multidrug-resistant (MDR); this prevalence for indicator isolates was 62.6% in Québec and 99.0% in Vietnam. In clinical isolates from Senegal, non-susceptibility to 3rd generation cephalosporins (3GC) was exclusively due to *bla*<sub>CTX-M</sub> genes [5 isolates (8.6%)]. For isolates from healthy chickens, non-susceptibility to 3GC was due to both *bla*<sub>CTX-M</sub> genes [14 isolates (5.6%, 95%CI = 1.4 - 9.8) for Senegal and 37 (19.8%, 95%CI = 4.3-35.3) for Vietnam] and *bla*<sub>CMY-2</sub> gene [28 (11.2%, 95%CI = 2.7 - 19.6) in Senegal and 27 (14, 4%, 95%CI = 0.0 - 30.5) in Vietnam] whereas in Québec, this resistance is mainly due to *bla*<sub>CMY-2</sub> [88 (50.3%, 95%CI = 34.9 - 65.7%)]; only three isolates (1.7%, 95%CI = 0.0 - 4.8) were positive for *bla*<sub>CTX-M</sub>. The prevalence of quinolone-resistance was very high in indicator isolates in Vietnam (83.7% for nalidixic acid and 59.6% for ciprofloxacin); medium in Senegal (44.0% for nalidixic acid and 22.9% for ciprofloxacin) and very low in Quebec (4.0% for nalidixic acid and 1.0% for ciprofloxacin). Ciprofloxacin resistance had chromosomal determinism, as the double serine mutation (*gyrA* Ser83Leu and *parC* Ser80Ile) was observed in 88.2% (95%CI = 81.8 - 94.5) of tested isolates in Senegal and 82.0% (95%CI = 69.9 - 94.1) in Vietnam. Both plasmids and clones appear to be involved in the spread of 3GC resistance. In fact, the *bla*<sub>CTX-M</sub>/*bla*<sub>CMY-2</sub> genes were, whatever the country, carried mainly by the plasmid II and incidentally by other plasmids such as K/B, FIB, A/C, B/O, etc. and some isolates from different farms in Senegal and Vietnam were closely related. With respect to resistance to

colistin, no isolates were resistant to this antimicrobial in Quebec. On the other hand, 11 (8.7%, 95%CI = 0.0-34.4) *bla*<sub>CTX-M</sub>/*bla*<sub>CMY-2</sub>-producer-isolates from Vietnam, all positive for the *mcr-1* gene, and 2 (2.2%, 95%CI = 0.0 - 5.4) faecal *bla*<sub>CTX-M</sub>-producer isolates from Senegal were resistant to colistin. These two isolates from Senegal did not carry the *mcr-1* gene, but rather mutations in the two-component system *pmrA*/*pmrB*. Finally, certain clinical isolates from Senegal and from healthy chickens in Senegal, Quebec and Vietnam were, on the basis of their virulence profile, defined as potentially capable of infecting humans. These results suggest that chickens are a reservoir of *E. coli* resistant to antimicrobials and are potentially pathogenic to humans.

**Keywords:** Avian *Escherichia coli*, antimicrobial resistance, virulence, clones, plasmids.

## Table des matières

Résumé.....	ii
Abstract.....	iv
Table des matières.....	vi
Liste des tableaux.....	xi
Liste des figures .....	xiv
Liste des abréviations.....	xvi
Dédicace.....	xxi
Remerciements.....	xxii
INTRODUCTION .....	1
CHAPITRE I. REVUE DE LITTÉRATURE.....	5
1. Généralités sur <i>Escherichia coli</i> .....	6
1.1 Définition.....	6
1.2 <i>E. coli</i> pathogènes.....	7
1.2.1 Les sérotypes des <i>E. coli</i> pathogènes.....	9
a) Sérotypes des <i>E. coli</i> pathogènes pour la volaille.....	9
b) Sérotypes des <i>E. coli</i> pathogènes pour les humains .....	9
c) Sérotypes des <i>E. coli</i> pathogènes pour les ruminants et porcins .....	11
1.2.2 Pathotypes des <i>E. coli</i> .....	11
a) <i>E. coli</i> pathogènes extraintestinaux (ExPEC).....	11
b) <i>E. coli</i> pathogènes intestinaux .....	13
3. Diversité génétique et écologie des <i>E. coli</i> .....	13
3.1 Diversité génétique .....	13

3.2	Méthodes de typage des <i>E. coli</i> .....	16
3.2.1	Méthodes conventionnelles.....	16
a)	Sérotypage .....	16
b)	Phylotypage par PCR.....	16
3.2.2	Méthodes moléculaires avancées basées sur les empreintes génétiques .....	17
a)	Méthodes basées sur la restriction .....	17
b)	Méthodes basées sur le séquençage.....	19
c)	Méthodes basées sur l'amplification du matériel génétique.....	20
3.3	Écologie des <i>E. coli</i> .....	23
3.3.1	Habitat.....	23
3.3.2	Cycle biologique des <i>E. coli</i> .....	23
3.3.3	Risque zoonotique potentiel des <i>E. coli</i> aviaires.....	24
3.3.4	Survie des <i>E. coli</i> dans les principales sources de contamination de fermes.....	25
a)	Survie et croissance dans le sol.....	25
b)	Survie et croissance dans les eaux.....	26
4.	Les <i>E. coli</i> pathogènes aviaires (APEC) .....	27
4.1	Facteurs de virulence.....	27
4.1.1	Adhésines .....	27
a)	Adhésines fimbriaires .....	28
b)	Adhésines afimbriaires .....	32
4.1.2	Systèmes d'acquisition du fer ou sidérophores.....	33

b) Salmochélines.....	34
4.1.3 Capsules.....	34
4.1.4 Lipopolysaccharide (LPS).....	37
4.1.5 Toxines.....	37
4.1.6 Mécanismes de résistance au sérum.....	38
4.1.7 Production de biofilms.....	39
5. Colibacilloses aviaires.....	40
5.1 Pathogénèse.....	40
5.2 Formes cliniques.....	41
5.2.1 Colisepticémie et complexe respiratoire chronique.....	41
5.2.2 Mortalités embryonnaires et du jeune poussin.....	42
5.2.3 Cellulite ou dermatite nécrotique.....	42
5.2.4 Coligranulome ou maladie de Hjarre.....	43
5.2.5 Syndrome de la grosse tête ou "swollen-head disease".....	43
5. Utilisation des antimicrobiens chez la volaille et développement des résistances chez les <i>E. coli</i> aviaires.....	43
5.1 Utilisation des antimicrobiens.....	44
5.2 Résistance antimicrobienne chez les <i>E. coli</i> aviaires.....	46
5.2.1 Rappel sur le mécanisme d'action générale des antimicrobiens.....	46
5.2.2 Mécanismes généraux de la résistance antimicrobienne.....	47
5.2.3. Résistance des APEC aux antimicrobiens.....	48
a) Résistance des <i>E. coli</i> aviaires aux différents antimicrobiens.....	48



5.2.4 Rôle des BLSE dans la multirésistance des souches de <i>E. coli</i> aux antimicrobiens	56
.....	.....
a) Multirésistance associée à la production des BLSE de type CTX-M.....	56
b) Multirésistance associée à la production des BLSE de type AmpC.....	57
c) Multirésistance associée à la production des carbapénémases .....	58
5.2.5 Rôle des plasmides dans la virulence et la résistance antimicrobienne des APEC	60
.....	.....
a) Modalités de transferts des de la virulence et de la résistance antimicrobienne...	60
b) Rôle des plasmides dans la virulence et la résistance antimicrobienne.....	61
5.2.6 Résistance aux antimicrobiens des <i>E. coli</i> aviaires et risque encouru par les humains	64
.....	.....
5.2.7 Facteurs de risque de la résistance antimicrobienne et échecs thérapeutiques des infections à <i>E. coli</i> chez le poulet .....	64
CHAPITRE II. CONTEXTES JUSTIFICATIFS ET OBJECTIFS.....	66
CHAPITRE III. ARTICLES SCIENTIFIQUES.....	70
Article 1.....	71
Article 2.....	106
Article 3.....	160
Article 4.....	192
Article 5.....	228
CHAPITRE IV. DISCUSSION ET CONCLUSION.....	254
1. Profils de résistance antimicrobienne.....	255
2. Pathogénicité potentielle des <i>E. coli</i> isolés des poulets .....	265
3. Clonalité des isolats potentiellement pathogènes et/ou producteurs d'ESBL/AmpC .....	266

4. Conclusions .....	268
Références bibliographiques .....	270

## Liste des tableaux

### Dans la revue de littérature

Tableau I. Sérogroupes O de <i>E. coli</i> isolés d'espèces aviaires. ....	9
Tableau II. Sérotypes des <i>E. coli</i> pathogènes pour les humains .....	10
Tableau III. Comparaison de quelques méthodes de caractérisation bactériennes les plus utilisées. ....	22
Tableau IV. Classification des capsules de <i>E. coli</i> . ....	36
Tableau V. Types d'utilisation des antimicrobiens chez les animaux de rente. ....	44
Tableau VI. Antimicrobiens homologués pour utilisation chez la volaille au Canada.....	45
Tableau VII. Principaux modes d'action des grandes familles d'antimicrobiens. ....	47
Tableau VIII. Prévalence de résistance aux antimicrobiens bêta-lactames chez les isolats AFEC et APEC de quelques pays.....	51
Tableau IX. Classification des carbapénémases et leurs spectres de résistance aux antimicrobiens.....	59

### Dans l'article 1

Table 1. Relationship between quinolone resistance and presence of mutations in <i>gyrA/parC</i> genes, and of <i>qnrB</i> gene in <i>Escherichia coli</i> isolated from diseased chickens in Senegal. ....	84
Supplementary Table 1. Primers, thermal conditions, amplicon sizes and control strains used in PCR.....	98
Supplementary Table 2. Primers and amplicon sizes used in the phylogenetic typing PCR assays described by Clermont et al. (2000, 2013). ....	103

### Dans l'article 2

Table 1. Prevalence at the isolate and farm levels of antimicrobial nonsusceptibility in indicator <i>Escherichia coli</i> from healthy chickens in the region of Dakar, Senegal.....	119
---	-----

Table 2. Prevalence at the isolate and farm levels of presumptive ESBL/AmpC-producer <i>Escherichia coli</i> isolated from healthy chickens in the region of Dakar, Senegal following supplementation with ceftriaxone. ....	122
Table 3. Prevalence at the isolate and farm levels of AMR genes in 127 indicator <i>Escherichia coli</i> isolated from healthy chickens in the region of Dakar, Senegal.....	124
Table 4. Presence of mutations in the <i>gyrA</i> and <i>parC</i> genes in 76 ciprofloxacin-resistant <i>Escherichia coli</i> isolated from 20 healthy chicken farms in the region of Dakar, Senegal. ....	126
Table 5. Potential risk factors associated with third-generation cephalosporin-resistant <i>Escherichia coli</i> isolates on chicken farms in the region of Dakar, Senegal.....	135

### **Dans l'article 3**

Table 1. Prevalence in isolates and farms of nonsusceptibility in indicator <i>Escherichia coli</i> isolates from healthy broiler chickens in St-Hyacinthe region, Quebec, Canada.....	168
Table 2. Prevalence of antimicrobial resistance genes in 71 indicator <i>Escherichia coli</i> isolates from healthy broiler chickens in St-Hyacinthe region, Quebec, Canada.....	170
Table 3. Characteristics of <i>Escherichia coli</i> isolates from healthy broiler chickens in Quebec carrying ESBL/AmpC genes that were transferred to recipient strains.....	176

### **Dans l'article 4**

Table 1. Prevalence of antimicrobial resistance at isolate and farm level of indicator <i>Escherichia coli</i> isolated from healthy chickens in Vietnam.....	199
Table 2. Prevalence of presumptive ESBL/AmpC-producers in <i>Escherichia coli</i> isolated from healthy chickens in Vietnam following supplementation with ceftriaxone.....	202
Table 3. Prevalence of AMR genes and the 95%CI in 80 indicator <i>Escherichia coli</i> isolates from healthy chickens in Vietnam. ....	203
Table 4. Presence of mutations in <i>gyrA</i> and <i>parC</i> genes of ciprofloxacin-resistant <i>Escherichia coli</i> isolated from broilers in Vietnam. ....	208
Table 5. Characteristics of 20 ESBL/AmpC transformants showing their transferred ESBL/AmpC genes and replicon plasmids, co-transferred AMR and Phylogroup/serogroup, PFGE group and farms origin of the wild-type strains. ....	210

## Dans l'article 5

Table 1. Prevalence of colistin resistance and <i>mcr-1</i> gene among potential ESBL/AmpC-producing <i>Escherichia coli</i> isolates recovered from chicken feces in Canada (Quebec), Senegal and Vietnam. ....	237
Table 2. Prevalence of colistin resistance and <i>mcr-1</i> gene among potential ESBL/AmpC-producing <i>Escherichia coli</i> isolates in chicken farms in Canada (Quebec), Senegal and Vietnam. ....	239
Table 3. Antimicrobial susceptibility of <i>mcr-1</i> -positive <i>Escherichia coli</i> isolates from healthy chickens in Vietnam. ....	241
Table 4. Antimicrobial phenotypes and molecular analysis of colistin resistant <i>Escherichia coli</i> isolates from healthy chickens in Senegal in absence of <i>mcr</i> (1-2) genes. ....	243

## Liste des figures

### Dans la revue de littérature

Figure 1. Morphologie et structure de <i>E. coli</i> .....	8
Figure 2. Contribution des éléments génétiques mobiles dans la virulence des <i>E. coli</i> .....	15
Figure 3. Cycle biologique des <i>E. coli</i> .....	24
Figure 4. Pathogénèse des APEC.....	41
Figure 5. Modalités de transfert horizontal de gènes.....	61

### Dans l'article 1

Figure 1. Results of clustering analysis of 58 <i>Escherichia coli</i> isolated from diseased chickens in Senegal.....	79
Figure 2. Prevalence of AMR in 58 clinical <i>Escherichia coli</i> isolated from chickens in Senegal.....	81
Figure 3. Multidrug resistance (MDR) definitions of 58 clinical <i>Escherichia coli</i> isolated from disease chickens from Senegal, according to definition of Magiorakos et al. (2012). ....	83
Figure 4. Biofilm formation of 58 clinical <i>Escherichia coli</i> isolates in M9 with glucose (0.4% wt/vol) in relation with major phylogroups. ....	85
Figure 5. Pie map showing the distribution of clinical <i>Escherichia coli</i> isolates forming the main PFGE groups of at least 80% similarity in the regions of Dakar and Thiès.. ....	86

### Dans l'article 2

Fig 1. Distribution (%) of indicator (n=193) potential ExPEC (n=90) and potential ESBL/AmpC (n=130) isolates from healthy chickens in the region of Dakar, Senegal according to nonsusceptibility profiles.....	121
Fig 2. Virulence and antimicrobial resistance characteristics of isolates defined as potential human ExPEC based on their virulence profiles. ....	128
Fig 3. Clustering analysis of genetic variation of 39 blaCTX-M/blaCMY-2-positive <i>Escherichia coli</i> isolates from healthy chickens in the region of Dakar, Senegal.....	131

Fig 4. Dendrogram of 29 CTX-M or CMY-2 transformants, showing antimicrobial nonsusceptibility, antimicrobial resistance genes, and virulence genes co-transferred with ESBL/AmpC genes and replicon plasmids carrying these genes. ....	133
S1 Fig. Methodological approach used in this study. ....	146

### Dans l'article 3

Figure 1. Multidrug resistance prevalence in indicator (n=99 isolates), potential ExPEC (n=69), and potential ESBL/AmpC (n=108) <i>Escherichia coli</i> isolated from 7 broiler chickens farms in St-Hyacinthe region, Quebec, Canada. ....	169
Figure 2. Virulence and AMR profiles of potential human ExPEC isolated from healthy broiler chickens in St-Hyacinthe region, Québec, Canada. ....	172
Figure 3. Clustering analysis of genetic variation among 38 <i>bla</i> <sub>CMY-2</sub> -positive <i>Escherichia coli</i> isolates in St-Hyacinthe region, Québec, Canada. ....	173
Supplementary Figure 1. Methodological approach used in this study. ....	183

### Dans l'article 4

Figure 1. Distribution (%) of indicator (n=203), potential ExPEC (n=48) and potential ESBL/AmpC (n=126) <i>Escherichia coli</i> isolates from healthy chickens in Vietnam according to nonsusceptibility profiles. ....	201
Figure 2. Virulence, phylogenetic groups and AMR profiles of potential ExPEC isolates from healthy chickens in Vietnam. ....	205
Figure 3. Dendrogram showing the relatedness of 47 <i>bla</i> <sub>CTX-M</sub> / <i>bla</i> <sub>CMY-2</sub> -producing <i>Escherichia coli</i> isolates from healthy chickens in Vietnam, based on pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) patterns. ....	206
Supplementary Figure 1. Methodological approach used in this study. ....	218

## Liste des abréviations

% : pour cent

°C : degré Celsius

µm : micromètre

3GC : third-generation cephalosporins (céphalosporines de troisième génération)

ADN : Acide désoxy-ribonucléiques

AFEC: Avian fecal *E. coli* (*E. coli* fécaux aviaires)

AFLP : amplified fragment length polymorphism (Polymorphisme de longueur de fragments amplifiés)

Ag : antigène

AIDA : adhesin involved in diffuse adhesion (adhésine impliqué dans l'adhérence diffuse)

AmpC : céphamycinases

APEC : Avian Pathogenic *E. coli* (*E. coli* pathogènes aviaires)

ARNr: ARN ribosomal

ARNt: ARN de transfert

BLSE : bêta-lactamases à spectre étendu

C3G : céphalosporines de troisième génération

cm: centimètre

Cnf: cell necrotising factor (facteur nécrosant des cellules)

DHF : acide dihydrofolique



DHFR : dihydroptéroate réductase

DHPS : dihydroptéroate synthétase

*E. coli* : *Escherichia coli*

EAF : EPEC adherence factor (Facteur d'adhésion des EPEC)

EcL : Laboratoire de référence de l'OIE pour *E. coli*

ECVF: *E. coli* vacuolating factor (Facteur vacuolisant des *E. coli*)

EHEC : Enterohemorragic *E. coli* (*E. coli* entéro-hémorragiques)

Ent : entérobactine

EPEC : Enteropathogenic *E. coli* (*E. coli* entéropathogènes)

ESBL : Extended-spectrum beta-lactamases

etc. : etcetera

ETEC : Enterotoxigenic *E. coli* (*E. coli* entérotoxinogènes)

ExPEC : Extraintestinal Pathogenic *E. coli* (*E. coli* pathogènes extraintestinaux)

g : gramme

h : heure

Hly: hémolysine

IL: interleukine

incP : plasmide d'incompatibilité

IS : Insertion sequence (séquence d'insertion)

iuc: iron uptake chelate (facteur chélateur du fer)

Kb : kilobase

kDa: kilo Dalton

Kg : kilogramme

LCR : liquide céphalo-rachidien

LEE : locus d'effacement des entérocytes

LPS : lipopolysaccharide

*mcr* : gène plasmidique de résistance à la colistine

Mg<sup>2+</sup>: ion magnésium

min : minute

mL: millilitre

MLST : Multi locus sequence typing (Typage par séquençage multilocus)

MLVA : multi locus variable number tandem analysis (Analyse multilocus du nombre d'éléments répétés en tandem)

mm: millimètre

NaCl : chlorure de sodium

nm: nanomètre

NMEC : Neonatal meningitis *E. coli* (*E. coli* causant les méningites néonatales)

PABA : acide para-aminobenzoïque

PAI : îlot de pathogénicité

Pap : pyelonephritis associated pili (pili associés aux pyélonéphrites)

PCR : réaction de polymérisation en chaîne

PFGE : Pulsed-field gel electrophoresis (Électrophorèse du gel en champ pulsé)

pH : potentiel d'hydrogène

PLP : protéines liant les pénicillines

pMLST : Plasmid MultiLocus Sequence Typing (Typage multilocus des plasmides)

prf : pap related fimbriae (fimbriae relatif à pap)

Prs : pap related sequence (séquence relative à l'opéron pap)

RAPD: random amplified polymorphism DNA (Amplification aléatoire d'ADN polymorphique)

RFLP : restriction fragment length polymorphism (Profil de restriction de l'ADN génomique total)

SHU : syndrome hémorragique et urémique

SNP : Single nucleotide polymorphism (polymorphisme d'un seul nucléotide)

ST : séquence type

STEC : Shigatoxin-producing *E. coli* (*E. coli* producteurs de shigatoxines)

Stx : shigatoxines

T3SS : système de sécrétion de type 3

THF : tétrahydrofolate

TLR: toll like receptor (récepteur Toll-Like)

Tn : transposon

TNF: tumor necrotising factor (Facteur nécrosant des tumeurs)

UFC : unités formant cellule

UPEC : Uropathogenic *E. coli* (*E. coli* uropathogènes)

USA : United States of America (États-Unis d'Amérique)

UTI : Urinary Tract Infections (infections du tractus urinaires)

UV : rayons ultra-violets

VNTR : variable number of tandem repeats analysis (analyse multilocus du nombre d'éléments répétés en tandem)

VTEC : Verotoxin-producing *E. coli* (*E. coli* producteurs de vérotoxines).

## **Dédicace**

Je dédie ce travail à :

- Mon épouse, Claire Magnah, pour sa patience et son affection
- Mes filles, Bryanna et Sandrine Koyabé Vounba. Que ce travail soit pour vous un exemple de persévérance à suivre.

## **Remerciements**

Il me fait un très grand plaisir d'exprimer, en ces quelques lignes, toute ma gratitude à tous ceux, de près ou de loin, ont contribué au couronnement de ce travail.

Je remercie très sincèrement mon directeur de recherches, Dr John Morris Fairbrother, grâce auquel j'ai débuté cette thèse, pour m'avoir fait confiance, et pour avoir constamment été disponible quand je le sollicitais. Les nombreuses, longues et cordiales discussions que nous avons eues tout au long de ces années de thèse ont été très enrichissantes.

Je remercie mes co-directrices les Dres. Rianatou Bada-Alambédji et Julie Arsenault pour leurs conseils et leurs immenses contributions dans la réalisation de ce travail.

Je remercie les membres de mon comité conseil, particulièrement Dr. André Ravel et Dre. Marie Archambault, ainsi qu'aux membres du jury d'évaluation de cette thèse.

Aux membres du Laboratoire EcL. Ce travail est le vôtre car sans vous, il n'aurait été possible.

A mes parents.

A mes frères et sœurs.

## **INTRODUCTION**

*Escherichia coli* est une bactérie à Gram négatif, anaérobie facultative qui prédomine dans la microflore normale du tube digestif des animaux à sang chaud et des humains. Chez son hôte, cette bactérie participe à la digestion des aliments en fournissant des cofacteurs, stimule le système de défense immunitaire et joue un rôle de barrière à la colonisation de la muqueuse digestive par les agents pathogènes (1). Mais *E. coli* doit aussi être considéré comme potentiellement pathogène, car il existe de nombreuses souches capables de provoquer des maladies. Ces souches deviennent pathogènes par acquisition de certains gènes de virulence. Chez les *E. coli* pathogènes aviaires [APEC pour Avian Pathogenic *E. coli*, un sous-groupe des *E. coli* pathogènes extraintestinaux (ExPEC)], les facteurs de virulence les plus connus à ce jour sont les adhésines, les toxines, l'aérobactine, les capsules, l'hémagglutinine sensible à la température, la colicine et le système de résistance au sérum (2, 3). Les APEC sont responsables d'affections aviaires communément appelées colibacilloses qui causent d'importantes pertes économiques en aviculture (4). Les APEC peuvent aussi être portés de manière asymptomatique pendant longtemps par la volaille et être excrétés à travers les matières fécales, constituant non seulement un risque potentiel de contamination des élevages avoisinants, mais également un risque pour la santé publique car ces souches peuvent se révéler pathogènes pour les humains (5). Ce risque est d'autant plus élevé que dans certains cas, les *E. coli* isolés des produits avicoles destinés à la consommation humaine peuvent correspondre davantage aux APEC qu'aux *E. coli* commensaux (6). Les sérotypes des APEC les plus répandus au monde sont O1:K1, O2:K1 et O78:K80 (7) et ils appartiennent, dans leur grande majorité, au groupe phylogénétique A (8). Dans certains cas, les souches pathogènes aviaires ne peuvent pas, sur la base de leurs profils de virulence, être clairement distinguées des ExPEC pathogènes pour les humains, suggérant leur potentiel zoonotique (5).

L'utilisation des antimicrobiens chez les animaux de production peut contribuer à augmenter la résistance chez les humains (9). Dans le cas particulier de la production avicole, l'administration orale d'antimicrobiens exerce une très forte pression de sélection non seulement sur les souches pathogènes de *E. coli*, mais également sur la microflore normale du tractus digestif (10), la transformant en réservoir potentiel de transmission de la résistance antimicrobienne aux souches pathogènes pour les humains (11). Afin de réduire cette pression de sélection, de nouvelles réglementations ont été adoptées par certains pays pour limiter ou



prohiber l'usage de certains antimicrobiens en production animale. C'est le cas des fluoroquinolones qui ont été interdites d'utilisation chez la volaille aux États-Unis et qui ne sont utilisées chez la volaille au Danemark que lorsqu'elles constituent un dernier recours et que leur efficacité est prouvée (9). La diffusion des résistances antimicrobiennes est amplifiée par les éléments génétiques mobiles comme les plasmides qui sont impliqués dans environ 90% des cas de transmission d'antibiorésistance (12). Le risque est aussi augmenté par l'émergence des souches de *E. coli* résistantes aux antimicrobiens d'importance critique en santé humaine comme les céphalosporines de 3<sup>ème</sup> génération (C3G, comme le ceftiofur et le ceftriaxone) ou la colistine. Le mécanisme le plus important de résistance aux C3G est la production de bêta-lactamases à spectre étendu (BLSE) et de céphamycinases (AmpC). Ces ESBL/AmpC confèrent aux bactéries la résistance aux bêta-lactamines et à d'autres catégories d'antimicrobiens comme les quinolones, du fait que les gènes de résistance aux C3G sont localisés sur les mêmes plasmides que ceux codant la résistance aux quinolones (13). Certains clones spécifiques semblent aussi contribuer considérablement à leur dissémination. Parmi les souches humaines contribuant à la diffusion de ces ESBL/AmpC à travers le monde, se trouve le clone pandémique humain ST131 appartenant au sérotype O25 :H4, au phylogroupe B2 et produisant la BLSE CTX-M-15 (14, 15) dont la présence chez les poulets a déjà été rapportée (16). Quant aux souches aviaires, les clones qui jouent un rôle prépondérant dans cette dissémination sont, entre autres, les clones O25b: H4:ST131-B2, produisant la BLSE CTX-M-9, O25a-ST648-D produisant CTX-M-32 et la ST10 produisant les BLSE CTX-M-1, 2, 14, 15 (17, 18).

Au Sénégal, l'aviculture est essentiellement pratiquée sous un mode semi-moderne et le respect des règles de biosécurité n'est pas systématiquement observé (19). Ce manque d'hygiène peut favoriser l'éclosion et la dissémination des agents pathogènes. Parmi les pathologies aviaires au Sénégal, la colibacillose figure en bonne place (19). Les aviculteurs utilisent le plus souvent diverses classes d'antimicrobiens pour traiter et prévenir certaines pathologies ou comme facteurs de croissance (20). En ce qui concerne le Vietnam où l'aviculture est pratiquée aussi bien sous forme moderne que semi-moderne (21), la prévalence de résistance à la ciprofloxacine est de 32,5% et significativement associée à l'utilisation de cet antimicrobien (22). En outre, dans ce pays, les antimicrobiens peuvent,

comme au Sénégal, être achetés sans ordonnance vétérinaire (23). De plus, des cas de résistance des *E. coli* aviaires à la colistine avec la présence du gène *mcr-1* ont déjà été rapportés (24). Au Québec, les prévalences de résistance au ceftiofur sont passées de 6% en 2006 à 25% en 2012 consécutivement à l'utilisation systématique de cet antimicrobien en aviculture (25). Depuis le retrait définitif du ceftiofur en production avicole en 2014, une baisse importante de la résistance aux C3G a été notée, passant de plus de 30% en 2013 à moins de 10% en 2016 (26). Le rôle des clones et des plasmides dans la résistance des *E. coli* aviaires aux C3G est encore à élucider.

## **CHAPITRE I. REVUE DE LITTÉRATURE**

## 1. Généralités sur *Escherichia coli*

---

### 1.1 Définition

*E. coli* est une entérobactérie commensale du tube digestif des animaux à sang chaud, y compris les humains. Les bactéries du genre *Escherichia* mesurent 1,1-1,5  $\mu\text{m}$  x 2,0-6,0  $\mu\text{m}$ . Les cellules se présentent seules ou groupées par deux. En plus de *E. coli*, ce genre compte cinq autres espèces : *Escherichia albertii*, *Escherichia blattae*, *Escherichia fergusonii*, *Escherichia hermannii* et *Escherichia vulneris*. *E. coli* mesure en moyenne 0,6  $\mu\text{m}$  de diamètre sur 2-3  $\mu\text{m}$  de long. La plupart des souches sont mobiles et se déplacent grâce à une ciliature péritriche.

Plusieurs caractéristiques biochimiques permettent de distinguer *E. coli* des autres espèces du genre dont :

- production d'indole à partir du tryptophane
- fermentation du mannitol (mannitol+), du lactose (lactose+) et du glucose (glucose+)
- production de gaz en gélose glucosée.

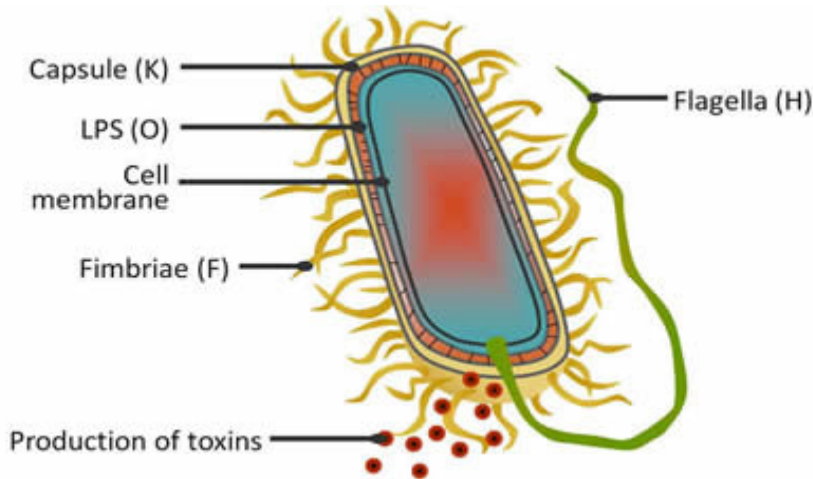
*E. coli* est une bactérie non exigeante. Elle croît facilement sur gélose ordinaire à des températures comprises entre 18 et 44°C avec un temps de génération de 30 min (6). Ce temps de génération dépend cependant du milieu de culture et de la virulence de la souche. Mises en culture sur de la gélose au sang, les souches virulentes ont un temps de génération moyen de 17,3 min par rapport aux souches non virulentes dont le temps de génération moyen est de 18,2 min (27). Les colonies en gélose ordinaire peuvent être lisses (colonies *smooth*), légèrement convexes, moelleuses, grises avec une surface polie, un bord régulier et faciles à disperser en solution saline ou bien, elles peuvent être rugueuses (colonies *rough*), sèches et difficiles à disperser en solution saline (28). Sur des milieux lactosés additionnés d'un indicateur coloré, les colonies paraissent roses suite à la fermentation du lactose (colonies lactose positives).

Sur gélose au sang, elles peuvent présenter une  $\beta$ -hémolyse, une caractéristique souvent associée à la virulence. En effet, certaines souches de *E. coli* peuvent être pathogènes pour leurs hôtes.

## 1.2 *E. coli* pathogènes

La pathogénicité est la capacité d'un microorganisme à causer la maladie chez son hôte. Chez *E. coli*, cette capacité résulte de l'expression d'un ou de plusieurs facteurs de virulence qui permettent de distinguer les souches pathogènes des souches commensales. Le préalable à l'expression de la pathogénicité est le franchissement d'un certain nombre d'étapes classiques dans l'interaction du pathogène avec son hôte. Ces étapes sont (29) : i) la colonisation des surfaces des muqueuses, ii) le franchissement de ces muqueuses, iii) la résistance aux défenses internes de l'hôte et iv) la production d'un effet toxique. Les étapes i et iv sont réalisées par les *E. coli* pathogènes entériques, entérotoxémiques, urinaires et mammaires alors que les étapes ii et iii sont indispensables pour les souches pathogènes envahissantes. En général, la relation que le pathogène établit avec son hôte aboutit au détournement, à son profit, de certains éléments essentiels à la survie de l'hôte et l'exportation de substances nocives pour les cellules hôtes.

Les *E. coli* possèdent trois principaux types d'antigènes de surface qui comptent parmi les attributs de base de leur pouvoir pathogène : l'antigène somatique (Ag O), l'antigène flagellaire (Ag H) et l'antigène de surface (Ag K) (Figure 1).



## Figure 1. Morphologie et structure de *E. coli*.

Source : <http://www.ecl-lab.ca/fr/ecoli/index.asp>.

Avec l'autorisation du Dr. John Morris Fairbrother.

**Antigène somatique** : l'antigène somatique est présent chez toutes les formes lisses (*smooth*) des *Enterobacteriaceae* (30). Il est lié à l'endotoxine pour former le lipopolysaccharide (LPS), ce qui lui confère un rôle dans la pathogénicité des *E. coli*. Il est composé d'un complexe polysaccharide-phospholipide et d'une fraction protéique résistante à la chaleur (31). Parmi les quelques 200 antigènes O répertoriés, certains sont plus fréquemment associés que d'autres à des pathologies.

**Antigène flagellaire** : l'antigène H est un appendice de nature protéique qui n'existe que chez les bactéries mobiles. En conséquence, sa détermination chez une bactérie nécessite que celle-ci soit cultivée dans des conditions qui rendent possible cette mobilité. L'antigène H est dénaturé à la température de 100°C.

**Antigène K ou antigène capsulaire** : l'antigène capsulaire (K) est de nature polysaccharidique. Le plus connu chez les *E. coli* est l'antigène K1 fréquemment mis en évidence dans les souches responsables des méningites néonatales. L'antigène K est généralement détruit en une heure (1 h) à une température de 100°C, mais chez certaines souches, il faut porter cette température à 121°C pendant 2 h 30 min. Sur la base de cette différence de stabilité thermique, l'antigène K est subdivisé en trois sous-types L, A et B (32) :

- ✓ les antigènes L sont thermolabiles : après 1 h à 100°C, la suspension bactérienne perd sa capacité à agglutiner avec le sérum spécifique;
- ✓ les antigènes A ne sont pas affectés par l'ébullition et gardent leur pouvoir agglutinant même après un chauffage à 121°C pendant 2 h;
- ✓ les antigènes B perdent leur pouvoir antigénique à 100°C pendant 1 h, mais leur pouvoir à complexer des anticorps spécifiques reste intact même après un chauffage à 121°C pendant 2 h.

**Antigène fimbriaire F (Ag F) :** cet antigène est une structure appendiculaire intervenant dans l'adhérence des bactéries aux cellules hôtes. Les plus connus sont les antigènes F4 et F5 qui permettent aux souches pathogènes de *E. coli* d'adhérer aux cellules intestinales et de coloniser l'intestin.

Les différents antigènes s'associent pour former des combinaisons appelées « sérotypes » dont l'étude a un intérêt épidémiologique. Ainsi, dans les années 1950, de nombreuses souches de *E. coli* appartenant à des sérotypes particuliers ont été répertoriées aussi bien chez les humains que chez les animaux pour leur association aux pathologies.

### 1.2.1 Les sérotypes des *E. coli* pathogènes

#### a) Sérotypes des *E. coli* pathogènes pour la volaille

Chez la volaille, les *E. coli* les plus pathogènes et les plus fréquemment impliqués dans les colibacilloses aviaires sont ceux appartenant aux sérogroupes O1, O2 et O78 qui représentent à eux seuls de 15 à 61% des souches isolées (33). Le Tableau I présente quelques sérotypes pathogènes ou commensaux chez la volaille.

**Tableau I. Sérogroupes O des *E. coli* isolés d'espèces aviaires.**

Sources ou pathologies associées	Sérogroupes O
Lésions de péricardites, d'aérosacculites	O1, O2, O8, O71, O73, O78
Cellulites	O2, O78, O115
Maladie de Hjarre	O8, O9, O16
Matière fécale	O3, O8, O9, O18, O44, O77, O83, O103, O114.

Source: (34)

#### b) Sérotypes des *E. coli* pathogènes pour les humains

La première implication du sérotype de *E. coli* O157 : H7 dans les colites hémorragiques chez l'humain a été rapportée en 1975 aux États-Unis (35) et dès lors, ce sérotype est fréquemment

incriminé dans les syndromes hémorragique et urémique. En 2011, en Allemagne, une épidémie de diarrhée hémolytique a été attribuée au sérotype O104 : H4. Une étude réalisée en Afrique du Sud rapporte l'implication des *E. coli* O104 : H4 et O104 : non-H4 dans des diarrhées colibacillaires sans lien apparent avec l'épidémie allemande (36). Outre ces sérotypes, il existe d'autres sérotypes qui sont aussi associés aux syndromes hémolytiques et urémiques (SHU) et à divers types de diarrhées, aux infections urinaires ou aux méningites chez les humains (Tableau II).

**Tableau II. Sérotypes des *E. coli* pathogènes pour les humains**

Affections	Sérotypes et sérogroupe les plus associés	Sources
Diarrhée aqueuse aiguë	O6, O8, O15, O20, O25, O27, O78, O86, O126, O127, O128, O146, O159, O169	
Diarrhée aqueuse et syndrome dysentérique	O28, O124, O152, O164, O159	
Diarrhée aqueuse aiguë, colite hémorragique et SHU	O157 :H7, O104 :H4, O103:H25, O111, O8, O91	(35-39)
Diarrhée aiguë ou persistante	O6, O18, O26, O55, O114, O119, O125, O127, O128, O153, O166	
Diarrhée chronique	O6, O8, O15, O18, O25, O27, O44, O86, O119, O126, O127, O146, O153, O158, O159, O166, O168, O169	
Diarrhée aqueuse, colique abdominale, vomissement et/ou fièvre	O55 :H27, O128 :H12, O78 :H11, O86, O25 :H1, O34, O92 :H33, O86 :H18, O99 :H4, O95, O86 :H11, O3 :H2, O92	(40)
Cystites et pyélonéphrites	O1, O2, O4, O6, O7, O8, O9, O16, O25, O75, O18:K1:H7, O6:K2:H1, O6:K15:H31	(41-43)



---

Méningites néonatales	O18:K1:H7 et plus généralement les souches (41, 42) portant l'antigène capsulaire K1
-----------------------	---

---

### **c) Sérotypes des *E. coli* pathogènes pour les ruminants et porcins**

L'implication du sérotype O78 dans la colisepticémie des bovins a été confirmée en 1976 par Smith et Huggins (44) qui rapportèrent que ce sérotype est doté de la capacité à produire la colicine V, un facteur de virulence qui permet à la bactérie de déjouer le système de défense immunitaire de l'hôte. Hormis ce sérotype, plusieurs autres sérogroupe dont O1, O2, O8, O9, O26, O101, etc. sont capables de causer des diarrhées, des septicémies et des mammites chez les bovins (45). En outre, les bovins sont des réservoirs majeurs des STEC, aussi bien le sérotype O157 : H7 que les sérotypes non-O157 en raison de l'absence de récepteurs à Shiga toxines au niveau leur muqueuse digestive (46-52). Cependant, la non susceptibilité des bovins aux *E. coli* O157 : H7 ne concerne que les sujets de plus de trois semaines d'âge. Les veaux nouveau-nés de moins de 36 h développent des diarrhées entérocoliques avec des lésions intestinales de type attachant et effaçant suite à l'infection par ce sérotype (53). Quant aux petits ruminants, les sérogroupe O8, O20, O9, O64 et O101 sont souvent isolés des cas de colisepticémie du mouton (54) et chez les caprins, le sérotype O103 : H2 est un redoutable agent de diarrhées sévères (55).

Chez les porcins, le laboratoire pour *E. coli* (EcL) de l'Université de Montréal (<http://www.ecl-lab.com/fr/ecoli/virulence.asp>) a répertorié les *E. coli* de sérogroupe O8, O9, O20, O45, O64, O101, O138, O141, O147, O149 et O157 comme étant pathogènes chez les porcelets nouveau-nés et les *E. coli* de sérotypes O8, O138, O139, O141, O147, O149 et O157 comme pathogènes chez les porcelets post-sevrage.

#### **1.2.2 Pathotypes des *E. coli***

Les *E. coli* pathogènes peuvent être distingués en deux grands groupes selon qu'ils soient à tropisme extraintestinal ou intestinal.

##### **a) *E. coli* pathogènes extraintestinaux (ExPEC)**

Ces *E. coli* ont acquis des facteurs de virulence leur permettant d'envahir, de coloniser et d'induire la maladie dans des compartiments extraintestinaux de l'hôte. Ce groupe comprend entre autre les *E. coli* pathogènes aviaires (*Avian Pathogenic E. coli*, APEC), les *E. coli* uropathogènes (*Uropathogenic E. coli*, UPEC) et les *E. coli* causant des méningites néonatales (*Neonatal Meningitis E. coli*, NMEC).

- ***E. coli* pathogènes aviaires (APEC)** : Les APEC sont les agents étiologiques des colibacilloses aviaires, principale cause de baisse de production en élevage avicole (56). Ces pertes sont dues soit à la mortalité des volailles, soit à la chute de production d'œufs de consommation ou encore aux saisies d'abattoirs. Les colibacilloses se caractérisent par diverses manifestations comprenant aérosacculites, péritonites, péricardites, omphalites, colisepticémie, etc. La colisepticémie constitue la forme la plus sévère des colibacilloses aviaires en industrie avicole (7). La survenue de la maladie chez la volaille est favorisée par un stress, un manque d'hygiène ou une co-infection bactérienne ou virale (57).

- ***E. coli* uropathogènes (UPEC)** : les *E. coli* uropathogènes (UPEC) sont des agents d'infection urinaire chez les humains et les carnivores. Chez les humains, ils sont impliqués dans plus de 70 à 95% des infections urinaires acquises dans la communauté et dans 50% des cas d'infections nosocomiales du tractus urinaire aux États-Unis, avec des coûts de traitements antimicrobiens estimés en 1995 à 659 millions de dollars américains (58). Les UPEC sont normalement inoffensifs dans le tractus digestif, mais deviennent pathogènes lorsqu'ils gagnent les voies urinaires (59). La migration des UPEC le long des voies urinaires requiert l'attachement des fimbriae (ou pili) sur des récepteurs présents à la surface de cellules épithéliales. En outre, les UPEC possèdent des facteurs de virulence non liés à l'adhésion. Il s'agit de toxines comme l'hémolysine codée par le gène *hly* ou le facteur nécrosant des cellules codé par le gène *cnf* et des systèmes de captation du fer tels que les gènes *ent* (enterobactin siderophore), *iroN* (salmochelin siderophore), *chu* (chemin uptake system), *sit* (iron/manganese transport), *iutA* (aerobactin siderophore) et *fyuA* (yersiniabactin siderophore) (42). Les gènes de virulence des UPEC sont regroupés en blocs de virulence dénommés « îlots de pathogénicité » ou PAI et la perte ou l'acquisition d'un PAI transforme une bactérie pathogène en une bactérie non pathogène et inversement (60).

- ***E. coli* responsables des méningites néonatales ou NMEC** : les NMEC arrivent en deuxième position après les streptocoques du groupe B pour leur implication dans les méningites néonatales chez les humains (61). Le facteur majeur de virulence des NMEC est la capsule K1 qui est retrouvée chez 80% des souches isolées du liquide céphalo-rachidien (LCR) des nouveau-nés atteints de méningites. On estime que 4 à 7% des femmes enceintes sont colonisées au niveau vaginal par des *E. coli* exprimant K1 et que la transmission mère-enfant intervient dans 50 à 70 % des naissances (62). La physiopathologie de cette infection comporte i) la colonisation des muqueuses oropharyngées et intestinales par le pathogène, ii) la translocation de la muqueuse intestinale vers le sang, iii) la résistance aux défenses de l'hôte puis la multiplication dans le sang et iv) la traversée de la barrière hémato-méningée et la multiplication dans le LCR (63). Les autres facteurs de virulence des NMEC sont les adhésines de type S codées par l'opéron *sfa* à 9 gènes (*sfa A* à *H* et *sfaS*) qui permettent aux bactéries d'adhérer aux cellules hôtes et les protéines de membranes OmpA (codée par le gène *OmpA*) et IbeA (codée par *ibeA*) qui favorisent la traversée de la barrière hémato-méningée (63).

#### **b) *E. coli* pathogènes intestinaux**

Les *E. coli* pathogènes intestinaux sont regroupés en trois pathotypes majeurs chez les animaux (<http://www.ecl-lab.ca/fr/ecoli/classification.asp>): les *E. coli* enteropathogènes (EPEC pour *Enteropathogenic E. coli*), les *E. coli* entérotoxigènes (ETEC pour *Enterotoxigenic E. coli*) et les *E. coli* entérohémorragiques (EHEC pour *Enterohemorrhagic E. coli*) un sous-groupe des *E. coli* producteurs de shiga toxines (STEC). De plus, chez les humains, on trouve les *E. coli* entéro-invasifs (EIEC pour *enteroinvasive E. coli*) et les *E. coli* entéro-aggrégatifs (EAEC pour *enteroaggregative E. coli*).

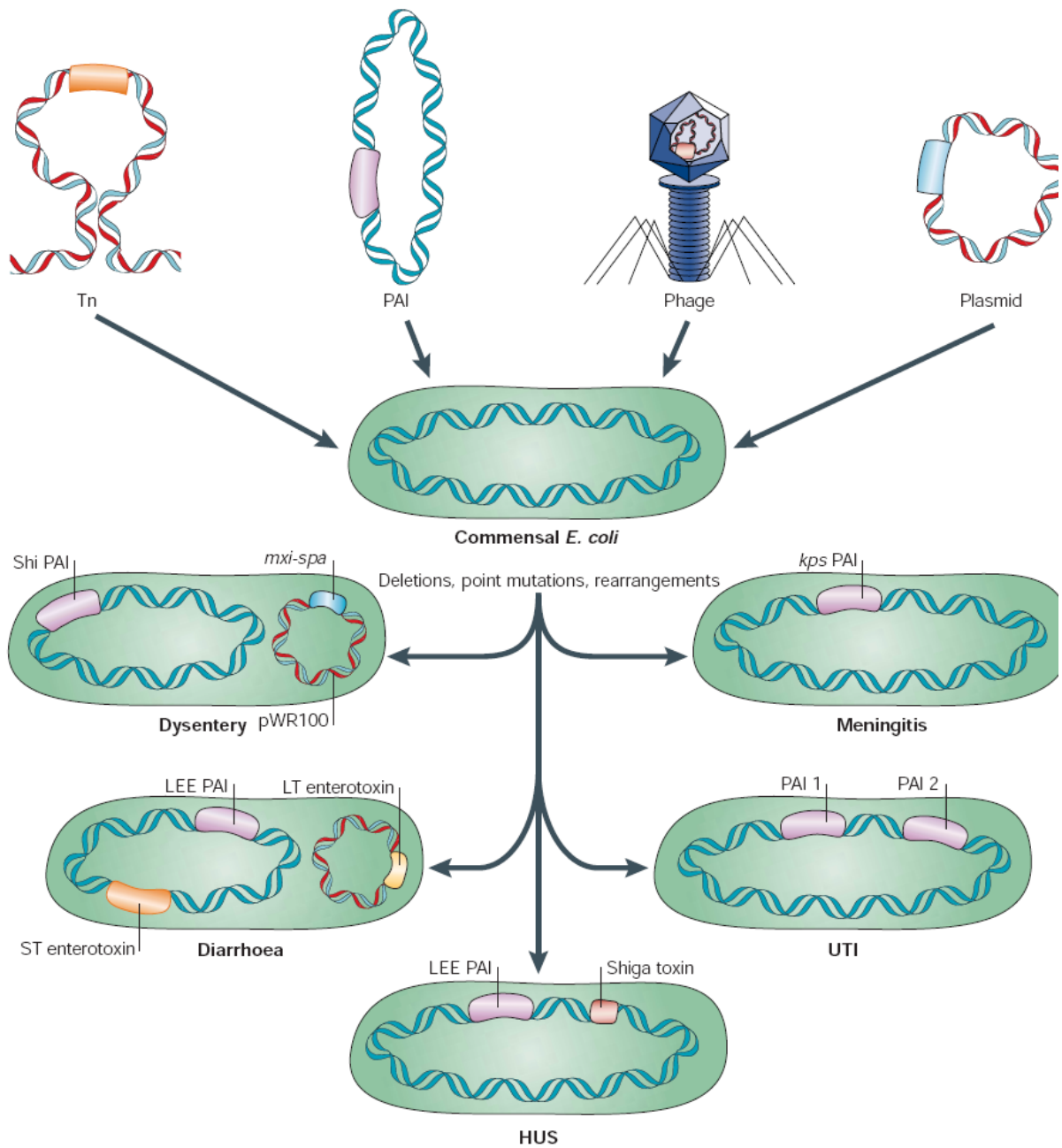
### **3. Diversité génétique et écologie des *E. coli***

---

#### **3.1 Diversité génétique**

Le génome des souches pathogènes de *E. coli* diffère de celui des souches commensales par addition de régions supplémentaires qui peuvent représenter jusqu'à 20% de l'information génétique (29). Le supplément d'information génétique est susceptible de varier, en fonction

des souches, dans des proportions allant de 10 à 30% (64). Ce supplément de matériel génétique résulte du transfert horizontal de structures génétiques mobiles. Nombre de ces gènes nouvellement acquis sont à localisation chromosomique (intercalés entre des régions partagées avec les souches commensales), mais beaucoup d'autres le sont sur des fragments mobiles capables de s'intégrer aussi bien sur le chromosome que sur le plasmide. Au cours de la dynamique évolutive des *E. coli*, ces gènes peuvent en effet s'intégrer parfaitement dans des structures indépendantes comme les transposons, les phages, les plasmides ou se regrouper sur le chromosome pour former des blocs de gènes de virulence appelés îlots de pathogénicité (PAI) (29). Ainsi, des souches commensales de *E. coli*, en subissant des modifications du génome, c'est-à-dire des délétions, des mutations ponctuelles et des réarrangements de leur matériel génétique, peuvent devenir pathogènes (Figure 2) et acquérir des caractéristiques d'un type particulier de pathotype. C'est notamment le cas des transposons (Tn) des entérotoxines thermostables (ST) des ETEC, des plasmides chez les entérotoxines thermolabiles (LT) des ETEC, des bactériophages chez les shiga toxines des STEC et des îlots de pathogénicité (PAI) du LEE des EPEC EHEC et des PAI 1 et 2 des UPEC (46). Inversement, les souches pathogènes en subissant ces différentes modifications génétiques peuvent redevenir avirulentes. Toutefois, l'acquisition et l'expression de ces nouveaux éléments génétiques peuvent dépendre de leurs interactions avec le fond génétique de la bactérie (65).



**Figure 2. Contribution des éléments génétiques mobiles dans la virulence des *E. coli*.**

Avec la permission (46).

L'acquisition des éléments génétiques mobiles rend le chromosome instable de sorte que leur incorporation dans le génome d'une bactérie est contrebalancée par une réduction du matériel génétique original, permettant l'adaptation à une nouvelle niche écologique. La présence de

nombreuses séquences d'insertion (IS), de séquences bactériophagiques, ainsi que d'autres plages de séquences inusuelles dans le génome de plusieurs souches de *E. coli* témoigne de l'extraordinaire plasticité du génome qui crée la variabilité génétique au sein de l'espèce *E. coli*. Quant au patrimoine génétique de l'espèce *E. coli* (pan-génome), Touchon et al. (66) ont estimé à 17 838 le nombre total de gènes, avec une moyenne de gènes d'environ 4721 et un fond commun ou « *core* génome », c'est-à-dire la fraction commune à toutes les souches, de 1976 soit seulement 11% du total de gènes. Plus récemment, Salipante et al. (67) ont séquencé 283 souches d'ExPEC et rapporté un pan-génome de 16 236 gènes. Après élimination des IS et prophages, le pan-génome est de 14 877 gènes pour un core génome de 3039 gènes. En outre, ces auteurs ont constaté qu'aucun gène commun à tous les ExPEC ne semble essentiel à la pathogénèse des maladies qu'ils causent.

## **3.2 Méthodes de typage des *E. coli***

### **3.2.1 Méthodes conventionnelles**

#### **a) Sérotypage**

Le sérotypage des *E. coli* se fait en déterminant les antigènes O, K et H. Le plus souvent, ce sont seulement les antigènes O (faisant référence au séro groupe) et H (se référant au sérotype) qui sont déterminés (56). Cette méthode est coûteuse, subjective et se solde parfois par des réactions croisées surtout lorsqu'un sérum polyclonal est utilisé (68). Toutefois, elle demeure encore la méthode la plus utilisée dans les laboratoires du fait que le sérotypage par PCR n'est applicable qu'à un nombre très limité de sérogroupes O.

#### **b) Phylotypage par PCR**

Cette méthode d'étude phylogénétique a été proposée en l'an 2000 pour caractériser les *E. coli* (69). Basée sur la détection par PCR de trois marqueurs génétiques que sont : *chuA*, un gène impliqué dans le transport de l'hème, *yjaA*, un gène aux fonctions non encore élucidées, et un fragment anonyme d'ADN désigné *TSPE4.C2*. Cette méthode permet de distinguer 4 principaux groupes phylogénétiques A, B1, B2 et D. La répartition des *E. coli* dans les principaux phylogroupes semble dépendre de leurs pathotypes. En effet, les ExPEC

appartiennent majoritairement aux groupes phylogénétiques B2 et D, tandis que les *E. coli* responsables des infections intestinales sont majoritaires classées dans les phylogroupes A et B1 (70). Dans le cas des ExPEC, ceux responsables des infections chez l'humain appartiennent majoritairement au phylogroupe B2 et D (69). Revisitée et améliorée plus récemment (71), la nouvelle méthode de détermination des phylogroupes est fondée sur l'exploration par PCR quadruplex des marqueurs génétiques précédents plus un nouveau gène, le gène *arpA*, et permet désormais de distinguer 7 groupes phylogénétiques au sein des populations de *E. coli* (A, B1, B2, C, D, E, F), plus un clade (le clade I). L'autre renseignement qu'apporte l'analyse phylogénétique des *E. coli* est que le phylogroupe B2 est le plus ancien et pourrait de ce fait être considéré comme une sous-espèce, alors que les groupes A et B1 sont plus proches et plus récents. Le groupe C constitue, avec les groupes A, B1 et le groupe des *Shigella* (avec lesquelles ils ont émergé au cours l'évolution), des groupes frères (72) tandis que le groupe F, initialement inclus dans le groupe D, regroupe des isolats étroitement apparentés aux phylogroupes D et B2 (73). Avec la nouvelle méthode de classification phylogénétique de Clermont et al. (71), Logue et al. (74) ont trouvé qu'aussi bien les APEC que les *E. coli* isolés de la flore commensale des poulets étaient classés dans les 7 nouveaux phylogroupes et dans le clade I. Ces auteurs rapportent cependant que 53,8% des isolats classés par l'ancienne méthode ont été reclassés dans de nouveaux phylogroupes par la nouvelle technique, notamment une reclassification des groupes phylogénétiques A dans C et D dans E et F.

### **3.2.2 Méthodes moléculaires avancées basées sur les empreintes génétiques**

#### **a) Méthodes basées sur la restriction**

- **Analyse du profil plasmidique** : l'analyse du profil plasmidique est l'une des toutes premières méthodes moléculaires utilisées pour l'étude épidémiologique d'agents pathogènes (75). Les plasmides sont des éléments génétiques extra-chromosomiques qui se distribuent équitablement aux cellules-filles lors de la division cellulaire. L'analyse plasmidique facilite donc la comparaison entre les isolats bactériens puisque les cellules appartenant à une même lignée clonale possèdent les mêmes plasmides (76). Cette analyse requiert que l'ADN plasmidique soit purifié par processus de lyse

alcaline ou un traitement thermique permettant de dénaturer l'ADN chromosomique et d'éliminer les débris cellulaires et les protéines. Les plasmides purifiés sont ensuite séparés par électrophorèse sur gel, colorés par un fluorophore puis le profil de migration plasmidique des différents isolats sont comparés entre eux afin de déterminer s'ils forment un groupe clonal (76). Cependant, des isolats génétiquement apparentés peuvent facilement afficher différents profils plasmidiques, car les plasmides sont des éléments génétiques mobiles qui peuvent être spontanément perdus ou acquis (75). Aussi, le changement de conformation plasmidique (linéaire vs super-enroulé) peut affecter la migration durant l'électrophorèse, la différence de conformation des copies d'un plasmide peut entraîner l'apparition de multiples bandes et des isolats peuvent être porteurs de différents plasmides ayant des poids moléculaires comparables (76). Pour pallier à ces problèmes et améliorer la discrimination entre les isolats, les plasmides peuvent être digérés par des enzymes de restriction avant de réaliser l'électrophorèse.

- **Polymorphisme de longueur de fragment de restriction (RFLP, *Restriction Fragment Length Polymorphism*)** : le RFLP utilise des endonucléases de restriction pour générer des séries de fragments d'ADN. Ces fragments sont ensuite séparés en fonction de leur longueur par électrophorèse sur gel d'agarose. Les fragments de restriction sont ensuite transférés par un procédé Southern blot sur une membrane et hybridés à une sonde d'ADN marquée par une membrane (76). Cette méthode fait usage des variations dans les séquences d'ADN homologues et leur environnement génétique pour caractériser les isolats (75).
- **Électrophorèse en champ pulsé (PFGE, *Pulse Field Gel Electrophoresis*)**: la PFGE est une variante de la RFLP. Elle permet de séparer des fragments d'ADN de très grande taille, de l'ordre de 30 à 2000 kb (77). Le principe repose sur la lyse *in situ* des bactéries après leur enrobage dans de l'agarose afin de préserver l'intégrité de l'ADN. Cet ADN est digéré par une enzyme de restriction à sites de coupure rares, puis le morceau d'agarose contenant l'ADN est soumis à une électrophorèse en champ pulsé. Au cours de l'électrophorèse en champ pulsé, la polarité du courant est modifiée à des



intervalles de temps qui changent durant l'électrophorèse en vue de séparer les fragments de grande taille. Le gel est ensuite coloré au fluorophore puis exposé sur une lampe aux rayons ultra-violet (UV) pour visualiser les fragments d'ADN. A l'aide d'un logiciel informatique, les profils de restriction des différents isolats sont comparés entre eux pour déterminer leur proximité génétique. Cette méthode a une reproductivité et une répétabilité moyennes et après le séquençage du génome entier, c'est la méthode la plus discriminante à ce jour (78, 79). Il s'agit aussi de la technique la plus appropriée, après le séquençage du génome entier, pour traquer des souches épidémiques.

## b) Méthodes basées sur le séquençage

- **Méthode MLST (Multi Locus Sequence Typing) :** la méthode MLST fut proposée en 1998 par Maiden et al. (80) comme une technique standardisée permettant d'examiner les séquences nucléotidiques de plusieurs gènes du métabolisme de base (housekeeping genes). Le MLST utilise les changements dans des bases nucléotidiques spécifiques plutôt que la taille des fragments d'ADN pour déterminer la parenté génétique entre les isolats (76). Le principe de cette méthode consiste à regrouper les allèles des gènes de ménage séquencés afin de classer chaque isolat étudié en Sequence-Type (ST). Ainsi, des isolats possédant un même ST sont classés comme appartenant au même groupe clonal (81). L'inconvénient majeur de cette méthode est qu'elle requiert plusieurs jours d'analyses et elle est très coûteuse. L'autre avantage de cette méthode est que toutes les souches analysées par cette méthode sont soumises dans une banque de données disponible sur le site internet <http://www.mlst.net/>. De plus, la consultation du site <http://pubmlst.org/databases.shtml> contenant les bases de données, hébergées à l'université d'Oxford (Royaume-Uni), montre qu'il existe 6 492 isolats de *E. coli* pour un répertoire de 3 954 séquences types (mise à jour du 2014-04-28). Il peut cependant arriver qu'un ST ne se trouve pas dans la base de données et dans ce cas, il est considéré comme totalement nouveau et se voit attribuer une nouvelle identité (76).

- **Whole Genome Sequencing (WGS ou Séquençage du génome complet)** : il s'agit d'une méthode qui permet de dévoiler l'ensemble des mutations dans le matériel génétique de la bactérie étudiée. Brièvement, le principe du WGS comprend (82) :
  - la fragmentation de l'ADN bactérien par un traitement enzymatique et à ligaturer ces fragments avec des adaptateurs universels,
  - l'amplification clonale de l'ADN par PCR où des amorces ciblent les adaptateurs universels bornant les fragments de la librairie
  - le séquençage massif en parallèle permettant d'obtenir des séquences nucléotidiques courtes
  - l'analyse bioinformatique des séquences qui permet d'obtenir l'information biologique pertinente (identification des gènes, des mutations par rapport au génome de référence).

### c) Méthodes basées sur l'amplification du matériel génétique

- ***Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP)***: l'AFLP est l'amplification sélective par PCR de fragments de restriction obtenus après digestion totale de l'ADN génomique. Le principe de l'AFLP consiste en la digestion enzymatique de l'ADN génomique permettant de générer plusieurs fragments, puis des séquences adaptatrices courtes contenant des séquences complémentaires des sites d'enzymes de restriction sont ligaturées aux extrémités libres correspondantes des fragments de restriction (76). Ces séquences adaptatrices sont ensuite utilisées comme cibles pour la liaison à l'amorce PCR et l'amplification subséquente des fragments de restriction. Finalement, les fragments amplifiés sont séparés par électrophorèse et les profils de migration sont utilisés pour comparer les isolats. Pour cette méthode, la plupart du temps, c'est une électrophorèse en capillaire qui est utilisée.
- ***Multi Locus Variable Number Tandem Repeats Analysis (MLVA ou VNTR)*** : l'analyse VNTR multilocus (MLVA) est une méthode qui détermine le nombre de séquences répétées en tandem à différents loci dans un génome bactérien (83). Elle

consiste à amplifier par PCR plusieurs séquences répétées en tandem (VNTR) dispersées sur le génome bactérien à l'aide d'amorces spécifiques des régions flanquantes. Après l'amplification, les produits de PCR sont séparés par électrophorèse et les tailles des produits sont déterminées pour évaluer le nombre de répétitions à un locus donné. Les différences dans le nombre de répétitions présentes sont ensuite utilisées pour distinguer différentes souches (76).

- ***Random Amplified Polymorphic DNA PCR (RAPD-PCR)***: la RAPD-PCR consiste en l'amplification parallèle d'un ensemble de fragments en utilisant des amorces aléatoires courtes qui s'hybrident avec des séquences génomiques non spécifiques (83). L'amplification est effectuée à basse température d'hybridation permettant l'hybridation de multiples séquences désappariées puis les produits amplifiés des différents isolats sont séparés par électrophorèse afin de procéder à leur comparaison (76).

Aucune de ces méthodes de caractérisation bactérienne ne permet d'atteindre, à elle seule, tous les objectifs souhaités d'une étude. Comme le montre le Tableau III, ces méthodes diffèrent les unes des autres par des aspects tels que leur objectif, leur pouvoir discriminatoire, leur reproductivité et leur coût (84).

-

**Tableau III. Comparaison de quelques méthodes de caractérisation bactériennes les plus utilisées.**

Technique de typage	Pouvoir discriminatoire	Répétabilité	Reproductivité	Diffus ou limité à certaines parties du génome	Temps requis après la culture	Coûts en équipements
PFGE	Modéré à élevé	Modéré à élevé	Modéré à élevé	Diffus	3 jours	Lourds équipements et installations
RFLP	Modéré à élevé	Modéré à élevé	Modéré	Diffus	1 à 3 jours	Modéré
AFLP	Modéré à élevé	Élevé	Modéré à élevé	Diffus	2 jours	Modéré
Profilage plasmidique	Faible	Élevé	Modéré	Limité	1 jour	Bas
RAPD	Faible	Faible	Modéré	Diffus	1 jour	Bas
MLST	Modéré à élevé	Élevé	Élevé	Diffus	1 jour	Modéré à élevé
MLVA	Modéré à élevé	Modéré à élevé	Modéré à élevé	Diffus	1 jour	Modéré à élevé
WGS	Élevé	Élevé	Élevé	Génome entier	Plusieurs jours	Modéré à élevé

Source : (84)

### **3.3 Écologie des *E. coli***

#### **3.3.1 Habitat**

L'habitat naturel des *E. coli* est le tractus digestif des animaux à sang chaud où ces bactéries vivent en symbiose avec leurs hôtes. Ils peuvent également s'abriter dans le tractus digestif des reptiles et des animaux aquatiques tels que la grenouille et le poisson (85). Les *E. coli* peuvent aussi survivre dans le sol, sur des roches volcaniques, sur des plantes et dans l'eau. Dans ce dernier cas, cette présence est considérée comme indicatrice potentielle de contamination fécale (86).

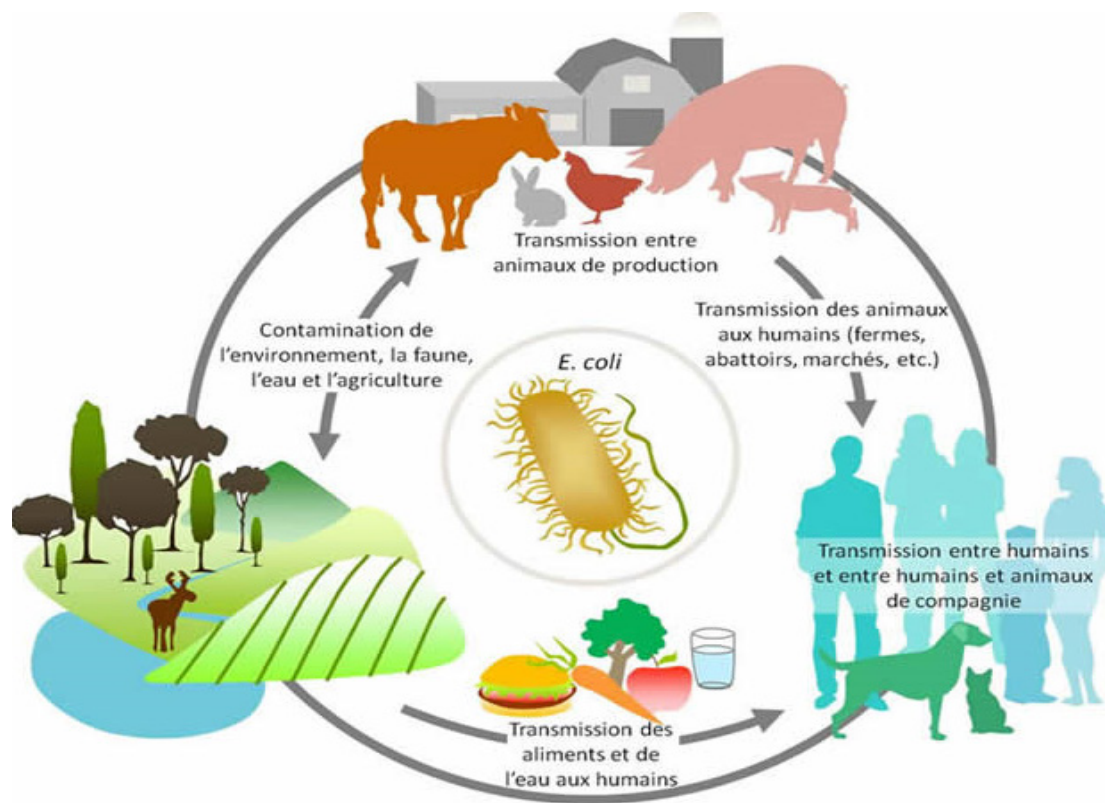
Il existe une variabilité génétique des *E. coli* en fonction de leur écotype car les *E. coli* commensaux peuvent être dotés de gènes de virulence, mais il y a une différence notable de la prévalence de ces gènes en fonction de l'origine géographique des souches (87). En outre, chez les mammifères, la concentration de *E. coli* commensaux dans le tractus digestif est faible lorsque l'hôte vit en zones désertiques et augmente au fur et à mesure que celui-ci passe des zones désertiques aux zones semi-arides, tempérées ou tropicales (87).

#### **3.3.2 Cycle biologique des *E. coli***

Du tractus intestinal de ses hôtes, *E. coli* gagne le milieu extérieur lors de l'excrétion des matières fécales. Il contamine ainsi l'environnement et se retrouve dans le sol, dans l'eau, dans les plantes, etc. Dans ce nouvel habitat, compte tenu des facteurs abiotiques (température inappropriée, salinité élevée, déficit en nutriments, etc.), les cellules entrent dans un état de dormance tout en demeurant métaboliquement actives. En fonction des facteurs édaphiques tels que la porosité du sol, les mouvements gravitationnels et la percolation, les *E. coli* peuvent migrer de la surface et atteindre les eaux souterraines (88).

Pour les *E. coli* pathogènes, la capacité de propagation peut varier en fonction de la vulnérabilité de l'hôte et du pathotype (<http://www.ecl-lab.ca/fr/ecoli/index.asp>). L'infection survient chez les mammifères lors de l'ingestion ou l'inhalation de la bactérie avec l'eau, les aliments souillés ou des particules de poussières. Chez le porc, les infections intestinales dues aux ETEC et aux STEC sont souvent contagieuses. Pour ce qui concerne les ExPEC pour

lesquels la microflore digestive est un réservoir, dans un même lot d'animaux sensibles par exemple, différentes souches peuvent affecter certains animaux, sans lien évident entre la souche ou la combinaison des souches et la maladie. Des transmissions du pathogène entre humains d'une part et entre humains et animaux de compagnies d'autre part sont également possibles (Figure 3).



**Figure 3. Cycle biologique des *E. coli*.**

Source : <http://www.ecl-lab.ca/fr/ecoli/index.asp>. Avec l'autorisation du Dr. John Morris Fairbrother.

### 3.3.3 Risque zoonotique potentiel des *E. coli* aviaires

Il n'existe pas d'études établissant une relation de cause à effet entre la contamination humaine par des *E. coli* d'origine aviaire et le développement d'une infection due à ces derniers. Toutefois, des études évoquant le caractère potentiellement zoonotique des *E. coli* isolés des poulets, que ces derniers soient sains ou malades de la colibacillose, existent à

foison dans la littérature scientifique. Les cas les plus régulièrement rapportés concernent les légendaires clones pandémiques humains O25 :H4 :ST131-B2 (16, 89) et O6- ST73- B2 qui sont isolés des colibacillooses cliniques chez le poulet (90). En outre, le clone ST624-D a déjà été isolé des humains (91) ayant des infections urinaires et des cas de colibacillose du poulet (92). Hormis ces clones, des études basées sur le profilage génétique comparant les caractéristiques des *E. coli* impliqués dans des cas cliniques de colibacillooses aviaires et des infections urinaires chez les humains (5), ou encore, des modèles animaux d'infections humaines (93, 94), ont aussi conclu à la possibilité que les *E. coli* aviaires soient potentiellement zoonotiques. En revanche, lors de leur étude des *E. coli* isolés des cellulites et aérosacculites du poulet, Caya et al. (95) ont conclu que ces bactéries n'avaient pas les attributs nécessaires pour infecter les humains.

### **3.3.4 Survie des *E. coli* dans les principales sources de contamination de fermes**

La survie d'un microorganisme potentiellement pathogène pour l'humain, comme *E. coli*, dans l'environnement peut représenter un danger pour la santé publique. Les principaux contamineurs de l'environnement par les *E. coli* sont les animaux domestiques ainsi que la faune sauvage, au premier rang desquels se trouvent les pigeons (96) ou les cerfs (97). La survie des *E. coli* dans l'environnement est conditionnée par plusieurs facteurs dont la disponibilité et la capacité d'utilisation des nutriments présents dans l'environnement (98). La survie des *E. coli* dans le sol, le fumier ou l'eau est conditionnée par des facteurs tels que les sources de carbone, la température et le pH (98). Dans ces environnements hostiles, les *E. coli* ont un faible taux de survie et leur chance de coloniser un nouvel hôte diminue avec le temps (99).

#### **a) Survie et croissance dans le sol**

Le sol est souvent considéré comme un milieu hostile pour les entérobactéries et pourtant, les *E. coli* peuvent facilement y survivre. Toutefois, cette survie est tributaire des facteurs tels que la disponibilité en carbone, la texture du sol, la température, le pH et la teneur en eau; le premier facteur étant le plus critique (98). Des études menées sur des sols argileux et sablo-argileux avec des *E. coli* d'origines diverses (porcs, poulets, bovin, sol et la souche ATCC

25922) ont montré que la texture du sol n'influence pas la survie et la croissance bactérienne lorsque la concentration cellulaire est faible, soit de 170 UFC/g (100). Cependant, lorsque la concentration atteint 2000 UFC par gramme de sol sablo-argileux, la population bactérienne augmente significativement. D'autres facteurs comme le pH et la saison influencent également la survie des *E. coli* dans le sol. Il semble que les *E. coli* survivent mieux dans des sols basiques que dans des sols acides (101, 102). Quant à la variation saisonnière, les densités cellulaires les plus élevées ( $3 \cdot 10^3$  UFC/g) s'observent en climat tempéré d'été en automne alors que les chiffres des plus bas ( $\leq 1$  UFC/g de sol) sont notés de l'hiver au printemps (103). Une autre étude a rapporté que les STEC peuvent survivre sans difficulté dans les déjections des bovins à des températures de 5 à 25°C, le record de longévité étant de 18 semaines sous une température de 15°C (104). Enfin, sur un sol fertilisé avec du fumier de volailles et contenant  $10^3$  UFC/g, indépendamment du sérotype et du pathotype, les *E. coli* peuvent survivre pendant 109 jours à 7,2°C (105).

#### **b) Survie et croissance dans les eaux**

Les *E. coli* peuvent survivre dans divers milieux aquatiques, que ce soit l'eau destinée à la consommation des animaux et des humains, les eaux de surface ou souterraines (106). Ils possèdent aussi une excellente capacité de survie dans l'eau salée, douce, potable ou usée. Dans l'eau salée stérilisée par exemple, la population de *E. coli* augmente rapidement même si le taux de salinité atteint 34 g/kg et cette croissance devient encore plus importante lorsque cette eau renferme des particules sédimentaires (107). De même, une étude portant sur des *E. coli* O157 : H7 rapporte des taux de survie assez élevés dans l'eau de mer ayant une forte salinité, laquelle survie pouvait durer au moins 15 jours accompagnée d'une croissance bactérienne dans un milieu contenant 5% de NaCl (108). Une expérience menée dans un microcosme a démontré qu'après quatre semaines de séjour dans un dispositif expérimental qui simule les conditions environnementales, 90% des coliformes qui y ont survécu étaient des *E. coli* (109). Dans l'eau douce non stérilisée, la population de *E. coli* décroît graduellement dans les cinq jours qui suivent l'inoculation. Par contre, lorsque cette eau est débarrassée du microbiote indigène (constitué par des protozoaires et d'autres bactéries), la population bactérienne reste stable (110). Ce déclin de la population de *E. coli* dans l'eau non



stérilisée serait due à une compétition entre l'espèce et le microbiote indigène présent dans le milieu. La survie des *E. coli* dans les eaux usées est également réduite comparée à l'eau stérile, à cause de l'influence négative du microbiote sur la croissance des *E. coli* (110, 111). Enfin, de nombreux travaux ont été effectués sur la survie des *E. coli* O157 : H7 dans des réservoirs d'eau potable destinée à la consommation humaine. La survie des *E. coli* O157 : H7 inoculés à la concentration de  $10^6$  cellules/mL est de 70 jours à 15°C dans l'eau minérale naturelle, l'eau minérale stérilisée avant inoculation et l'eau minérale distillée stérile (112). Cette survie s'allonge même dans l'eau minérale embouteillée et peut dépasser les 300 jours à une température de 22°C (113). En principe, les protocoles de traitements chimiques de l'eau (utilisation du chlore ou de l'ozone) permettent aisément de la débarrasser de toutes les souches de *E. coli* (114). Leur persistance dans l'eau potable résulterait d'un sous-dosage des produits utilisés, d'une fissure des canalisations ou de leur mauvais entretien (115).

#### **4. Les *E. coli* pathogènes aviaires (APEC)**

---

##### **4.1 Facteurs de virulence**

Alors que certains facteurs de virulence semblent être spécifiques aux pathotypes de *E. coli* à tropisme intestinal (par exemple intimine pour EPEC et shigatoxines pour STEC, toxines thermolabiles et thermostables pour les ETEC), ceux des *E. coli* pathogènes extraintestinaux sont nombreux et ne sont pas toujours tous présents chez l'ensemble des souches responsables d'un même type d'infection (116). Pour ce qui concerne les APEC, les principaux facteurs de virulence impliqués dans la pathogénie sont les adhésines fimbriaires et non fimbriaires, les systèmes de capture du fer (aérobactine et yersiniabactine), les hémolysines (hémolysine et hémagglutinine thermosensible), le système de résistance aux effets bactéricides du sérum, le lipopolysaccharide, les capsules, la production de la colicine ainsi que des toxines (117).

##### **4.1.1 Adhésines**

L'adhésion d'une bactérie à son hôte est un préalable important au déroulement du processus infectieux. Elle permet à la bactérie d'établir un contact étroit avec son hôte en la protégeant des défenses mécaniques de l'hôte (péristaltisme intestinal et miction, par exemple) et lui

permet de former des microcolonies (29, 118). Dans le cas des APEC, plusieurs adhésines interviennent dans la fixation du pathogène à son hôte.

Les adhésines sont des protéines fixées à la surface des bactéries. Leur structure stéréochimique leur permet de reconnaître des récepteurs, souvent constitués de glycolipides, présents à la surface des cellules hôtes (119). Ces facteurs de virulence jouent également un rôle dans la détermination de l'hôte et dans la spécificité tissulaire (120). Chez la volaille, par exemple, les structures fimbriaires sont plus fréquentes chez les *E. coli* isolés des cas de syndrome de la grosse tête (50%) et de septicémies (41,6%) que chez les souches commensales (30%) ou encore celles responsables d'omphalites (27,3%) (121).

Les adhésines se distinguent en trois principales catégories (29) :

- les adhésines du groupe I qui agglutinent les globules rouges; une agglutination inhibée par le mannose et médiée par des appendices fimbriaires;
- les adhésines de groupe II qui possèdent des activités hémagglutinantes en fonction de l'origine des hématies. Ces hémagglutinations ne sont pas inhibées par le mannose et sont médiées par deux types d'appendices telles que les appendices fimbriaires ou fimbriae de type II de structure cylindrique, creuse (0,5 à 2 nm de profondeur) et rigide, et les appendices fimbriaires de type III qui forment une structure cylindrique pleine, fine (3 à 4 nm de diamètre) et souple;
- les adhésines du groupe III qui ont des activités hémagglutinantes, résistantes au mannose et non associées à une structure fimbriaire. Il s'agit d'adhésines afimbriaires.

#### **a) Adhésines fimbriaires**

Les fimbriae sont des structures filamenteuses, de nature protéique, visibles au microscope électronique sur la surface de la plupart des bactéries. Contrairement aux flagelles qui sont longs, peu nombreux et servent à la motilité, les fimbriae sont courts, étroits et en grand nombre à la surface d'une bactérie. Quatre-vingt pourcent (80%) des souches de *E. coli* isolées de poulets malades expriment les adhésines fimbriaires (122). Les premières études portant sur la contribution des adhésines fimbriaires dans l'expression de la virulence des *E. coli* isolés d'espèces aviaires ont été effectuées dans les années 1980 par Arp et *al.* (27). Lors

de leurs études sur les dindes, ces auteurs se rendirent compte que des *E. coli* virulents et pourvus de facteurs d'adhésion persistaient plus longtemps sur l'épithélium trachéal de la dinde que les souches qui en étaient dépourvues. Chez les APEC, les principales adhésines fimbriaires décrites à ce jour sont les fimbriae de type 1, les fimbriae P, les fimbriae AC/I et les curli.

- **Fimbriae de type 1 :** les fimbriae de type 1 (Fim1) appartiennent aux adhésines de groupes I. Leurs structures sont communes à toutes les souches de *E. coli* et à la plupart des bactéries Gram-négatives. Ils se présentent sous la forme d'un filament hélicoïdal de 1 à 2 µm de long sur 7 nm de large. Ils comprennent une sous-unité majeure FimA, associée à d'autres protéines accessoires (FimF et FimG) et d'une adhésine FimH (33, 123). L'adhésine FimH, qui constitue la partie distale du fimbriae, sert à l'attachement de la bactérie à la cellule hôte. Elle est connectée à la sous-unité FimA par FimF et FimG (124). Les adhésines fimbriaires de type 1 sont codées par un locus *fim*, un opéron à huit gènes (*fimA* à *fimH*) qui codent pour les sous-unités de structure, les chaperons et les protéines régulatrices de leur expression (125). La contribution des fimbriae de type 1 dans la virulence des APEC et notamment dans l'initiation de la colonisation des voies respiratoires et dans la résistance au système immunitaire des oiseaux a été démontrée (126-130). Ces adhésines sont également dotées d'un pouvoir hémagglutinant (27). Leurs propriétés adhésives sont toutefois inhibées par un antisérum spécifique et par le D-mannose (27), un hydrate de carbone qui constitue son récepteur sur la membrane des cellules eucaryotes. Une étude expérimentale a démontré que les gènes *fimA* et *fimH* en combinaison avec les gènes *fimF* ou *fimG* sont nécessaires pour une adhésion spécifique au mannose (123). Toutefois, d'autres facteurs comme la mobilité et la production de la colicine V contribueraient également à la colonisation cellulaire, car les fimbriae de type 1 par eux-mêmes ne joueraient qu'un rôle limité dans la pathogénicité des APEC (129, 131). En effet, leur présence n'est pas nécessaire pour coloniser la trachée et les sacs aériens (128). D'ailleurs, des expériences menées *in vivo* ont montré que la perte des fimbriae de type 1 par les APEC améliore leur capacité à coloniser la muqueuse trachéale des poulets (132). A l'inverse, Dozois et *al.* (133) ont rapporté une adhésion *in vitro*, de

type mannose-sensible, des fimbriae de type 1 sur des coupes de trachées de poulets. Le rôle des fimbriae de type 1 dans l'adhésion *in vitro* à la *lamina propria* des villosités intestinales a également été observé (134). Les auteurs de cette étude ont noté en revanche que les fimbriae de type 1 n'interviennent pas dans l'adhésion des *E. coli* aux cellules caliciformes à mucus.

La prévalence d'isolats APEC porteurs des gènes qui codent pour les fimbriae de type 1 varient, selon les études, de l'ordre de 34,70 - 58% (8, 121) à 90 - 99% (135-137). Des prévalences de 100% de ces types d'adhésines chez les APEC ont également été rapportées (138). Cette prévalence peut aussi dépendre des pathologies à partir desquels les *E. coli* ont été isolés. Par exemple, Amabile de Campos et *al.* (121) rapportent que pour les fimbriae A, les prévalences sont de 16,7%, 29,2%, 50% et 27,3% respectivement pour les APEC isolés de cas de colisepticémie, de septicémie, du syndrome de la grosse tête, et d'omphalites. Cet auteur (121) rapporte aussi que 16.7% des souches commensales intestinales du poulet possèdent le gène *fimA*.

- **Fimbriae P : les fimbriae P sont des adhésines de groupe II.** Ils furent désignés ainsi en raison d'une part, de leur association aux pyélonéphrites et d'autre part pour leur affinité pour les antigènes P des érythrocytes humains. Chez les poulets, les fimbriae de type P jouent un rôle majeur dans la pathogénicité des *E. coli*. En effet, la chance d'induire la maladie chez les poussins d'un jour en utilisant les souches porteuses de pili est de 99,99% par comparaison aux souches qui n'en possèdent pas (139). Les fimbriae P protégeraient les APEC contre l'effet bactéricide des phagocytes lorsque la colonisation tissulaire a été établie au moyen des fimbriae de type 1 (140). Ils sont codés par 11 gènes *pap* (*pyelonephritis-associated pili*), de *papA* à *papK*, *papA* étant la sous-unité majeure et *papG* l'adhésine terminale. Ces gènes situés sur l'opéron *prf* (*pap-related fimbriae*) localisé sur un îlot de pathogénicité de type II de 190 kb (141). L'adhésine G possède trois variants (I, II et III) qui reconnaissent différents iso-récepteurs d'un glycolipide (33). Quatre types d'adhésines *papG* clonées à partir des souches uropathogènes ont été définis selon leurs modes d'hémagglutination. Il existe trois spécificités de liaison aux récepteurs

glycolipidiques des érythrocytes permettant la reconnaissance des variants de papG en fonction de leur capacité à adhérer spécifiquement aux iso-récepteurs de type Gal( $\alpha$ 1-4)Gal des cellules de l'hôte (142, 143). Il s'agit des adhésines de classe I (*papG*<sub>J96</sub>) qui agglutinent faiblement les globules rouges de mouton, mais fortement ceux des humains et des lapins, des adhésines G de classe II (*papG*<sub>D110</sub> ou *PapG*<sub>IA2</sub>) qui agglutinent très fortement les érythrocytes humains et faiblement les érythrocytes des moutons et enfin, des adhésines de troisième classe (*prsG*<sub>J96</sub>) qui agglutinent très fortement les érythrocytes humains et faiblement ceux des moutons. Toutefois, des expériences effectuées *in vitro* ont révélé qu'aucune adhésion à des sections de la trachée de poulet ne se produit lorsque les *E. coli* étaient cultivées dans des conditions qui permettent l'expression des fimbriae P, suggérant une absence au niveau de la trachée des poulets, des récepteurs dédiés au fimbriae P (133). Les auteurs de cette expérience n'excluent cependant pas que l'expression du fimbriae P soit régulée *in vivo* au niveau de la trachée. En effet, contrairement aux fimbriae de type 1 qui sont exprimés durant l'initiation de la colonisation des voies respiratoires supérieures, les fimbriae P sont, pour leur part, exprimés plus tardivement, précisément lorsque les bactéries sont dans les voies respiratoires basses ou même dans la circulation sanguine (133). L'expression des fimbriae P est plus fréquemment observée chez des *E. coli* isolés de poulets septicémiques que chez les souches isolées des sujets sains (144, 145). La prévalence d'isolats positifs aux gènes codant les fimbriae de type P chez les APEC varient, de façon générale, de 7,2 à 43% (135, 136).

- **Fimbriae AC/I :** Les fimbriae AC/I (*Avian E. coli* I) sont des types particuliers d'adhésines fimbriaires qui n'agglutinent pas les érythrocytes (non classés), mais qui ont le pouvoir d'adhérer à l'épithélium trachéal des volailles. La démonstration de leur implication dans l'adhésion des *E. coli* aux cellules de l'épithélium trachéal a été rapportée par plusieurs études et cette adhésion est spécifique pour les cellules trachéales aviaires (146). Cette adhésion se produit aussi bien *in vivo* qu'*in vitro*. Au niveau du côlon, riche en cellules caliciformes contenant des granules de mucine, les *E. coli* O78 expriment fortement les adhésines fimbriaires AC/I (134). Les auteurs de

cette étude rapportent que la prévalence des fimbriae AC/I chez les APEC est très faible, autour de 10%.

## **b) Adhésines afimbriaires**

Les adhésines afimbriaires sont classées constituent le groupe III des adhésines bactériennes.

Les principales sont :

- **Hémagglutinine thermosensible (TSH) :** parmi les adhésines afimbriaires, la TSH (*temperature sensitive hemagglutinin*) codée par le gène *tsH* est, de loin, la plus exprimée par les APEC (137, 147). La contribution de ce facteur de virulence à la pathogénie consiste à permettre aux bactéries d'adhérer aux hématies, à l'hémoglobine et aux protéines de la matrice extracellulaire comme la fibronectine et le collagène IV (148).
- **Curli :** les curli sont de minces filaments enroulés, présents à la surface de la plupart des souches de *E. coli* et parfois des salmonelles. Observés pour la première fois chez les souches de *E. coli* isolées des mammites des vaches, les curli sont composés d'un seul type de sous-unités (la curline) qui diffère de toutes les autres protéines connues des pili et qui sont synthétisées en l'absence d'un peptide signal clivable (149). Ces fibres de nature amyloïde (150, 151) sont impliquées dans la colonisation précoce des tissus de l'hôte ainsi que dans la survie de la bactérie dans un milieu extérieur (152). Toutefois, leur expression est affectée par des facteurs environnementaux comme la température et l'osmolarité. La régulation de l'expression des curli est assurée par deux opérons divergents *csgBAC* et *csgDEFG* (153). Le gène *csgA* code par ailleurs pour les sous-unités majeures qui sont exportées à la surface cellulaire par les produits synthétisés sous le contrôle des gènes *csgG*, *csgF* et *csgE* tandis que le gène *csgB* code pour une protéine nucléaire essentielle à la biosynthèse du curli. Le rôle du gène *csgC* dans la biosynthèse des curli n'est pas encore élucidé. Quant au gène *csgD*, il joue un rôle d'activateur de la transcription, essentielle pour l'expression des deux opérons. En outre, les curli jouent un rôle favorable pour l'attachement des cellules bactériennes au complexe majeur d'histocompatibilité de classe I, à la matrice extracellulaire et aux

protéines sériques (154). Les fonctions régulatrices codées par l'opéron *csgDEFG* sont soumises à de nombreux signaux dont la température, l'osmolarité et le pH. En outre, une troisième phase de lecture ouverte, *orfC*, positionnée en aval de *csgA* peut affecter certaines propriétés fonctionnelles des curli (153). Les curli sont fréquemment exprimés par des *E. coli* isolés des cas de colisepticémie aviaire (95,8%), de syndromes de grosse tête (64,3%) et des omphalites (54,5%) (121). Cependant, le rôle de ces appendices dans la pathogénie des APEC est encore en cours d'exploration. On pense néanmoins qu'ils soient impliqués dans la colonisation, l'invasion et la persistance des bactéries au niveau des organes infectés. Une étude a en effet démontré que des souches mutantes déficientes en *rpoS*, un gène régulateur de l'expression des curli, persistaient moins longtemps dans le caecum que les souches sauvages (155). Cette capacité qu'ont les bactéries qui expriment ce facteur de virulence à persister au niveau cœcal semble toutefois indiquer que les curli interagissent avec les protéines de l'hôte comme la fibronectine et les protéines impliquées dans la fibrinolyse et la coagulation (153, 156, 157).

#### **4.1.2 Systèmes d'acquisition du fer ou sidérophores**

Les sidérophores se distinguent en trois types : aérobactine, entérobactine et salmochéline. Ceux qui contribuent le plus à la virulence des APEC sont l'aérobactine et la salmochéline (158).

##### **a) Aérobactine**

L'aérobactine est un facteur de virulence codé par 4 gènes *iuc* (*iron uptake chelate*) A, B, C et D. Il s'agit d'un hydroxamate qui se trouve à l'intérieur de la bactérie sous la forme d'un complexe aérobactine-fer dont le transporteur est codé par le gène *iutA* porté, en même temps que les gènes *iuc*, par le plasmide colV. La présence de l'aérobactine est corrélée à la virulence de la souche puisqu'elle est plus fréquente chez les souches pathogènes que commensales (159). Des expériences ont montré sous un modèle d'infection *in vivo* que des mutants d'APEC dépourvus d'aérobactine étaient moins aptes à coloniser les sacs aériens que les souches sauvages (158). La prévalence des isolats porteurs des gènes qui codent pour

l'aérobactine varie de 49 à 88% (135, 137, 160, 161). Parmi les *E. coli* septicémiques, 98% des isolats sont positifs à l'aérobactine (144).

## **b) Salmochélines**

Les salmochélines sont des molécules sidérophores qui ont été décrites pour la première fois chez *Salmonella* spp et le nom salmochéline fut attribué à ce sidérophore par ce qu'on pensait qu'il n'était exprimé que par les salmonelles. De la famille des catécholates, les salmochélines sont des C-glycosylates dérivés de l'entérobactine et codées par un groupe de 5 gènes *iroBCDEN* (162). Le rôle des salmochélines dans la virulence des APEC a été clairement démontré puisque des mutants deviennent nettement moins pathogènes avec une forte diminution de leur capacité à coloniser *in vivo* les tissus de l'hôte (158). La prévalence des isolats de *E. coli* porteurs de gènes qui codent pour les salmochélines est le plus souvent élevée; pour le gène *iroN* par exemple, les prévalences rapportées varient de 80 à 100% pour les APEC (163).

### **4.1.3 Capsules**

Les capsules sont des structures polysaccharidiques et antigéniques (Ag K) qui entourent la paroi de certaines bactéries. Il en existe plus de 80 types différents chez les *E. coli*, mais seulement quelques-uns sont associés aux souches pathogènes extraintestinales. La capacité d'une souche de *E. coli* à exprimer un type particulier de capsule polysaccharidique et/ou l'ensemble du lipopolysaccharide est une caractéristique importante de son potentiel de pathogénicité (164). Chez les *E. coli* fécaux, de nombreux clones sont dépourvus de capsules (165).

Les capsules ont été classées en quatre groupes (Tableau IV) (166). Les capsules de premier groupe existent en au moins 16 structures différentes qui sont généralement exprimées en même temps avec certains sérogroupes tels que O8, O9, O20 ou O101 (164). Ce sont des molécules polymériques qui forment l'antigène K de plus de 100 000 kDa ou de faible poids moléculaire, déterminant un oligosaccharide du LPS avec une ou plusieurs unités répétées. Les capsules de groupe 1 et du groupe 4 partagent certaines similarités, mais les capsules de groupe 4 se distinguent de celles de groupe 1 au niveau de leurs gènes de transport et



d'assemblage et dans la régulation de leur expression génétique. En effet, les capsules de groupe 1 possèdent une région conservée contenant les gènes *orfX-wza-wzb-wzc* qui sont requis pour le transport et l'assemblage; leurs homologues *wza-wzb-wzc* n'ont à ce jour pas encore été identifiés au niveau des capsules de groupe 4. Quant aux capsules 2 et 3, elles se distinguent physiquement, génétiquement et biologiquement des capsules 1 et 4. Elles sont liées à la cellule par l'intermédiaire d'un  $\alpha$ -glycérophosphate (166). Les capsules des groupes 2 et 3 sont principalement exprimées par les ExPEC (164). Ces capsules sont aussi caractérisées par une forte charge négative, une forte hydrophilie, une teneur en eau de plus de 50% et un faible poids moléculaire (moins de 50000 kDa). De plus, elles sont chimiquement composées d'acide hexuronique, d'acide N-acétyl neuramique, de phosphate, d'acide glucuronique ou d'acide 2-keto-3-désoxy-mannosoctonique et possèdent une forte densité. Chez les APEC, les capsules les plus décrites sont K1 et K80 (2). La capsule K80 ne serait en fait pas une véritable capsule, mais plutôt un antigène capsulaire associé au lipopolysaccharide (167). L'antigène K1 confère aux APEC qui l'expriment, en l'occurrence les sérogroupes O1, O2 et O78, une résistance aux effets bactéricides du sérum. Au Canada, les *E. coli* impliqués dans la cellulite du poulet et qui expriment les antigènes K1 sont très virulents et peuvent entraîner jusqu'à 100% de mortalité (168). Au Brésil, chez les *E. coli* isolés de poulets atteints de cellulites, de 14% (169) à 31% (170) des isolats présentaient des antigènes capsulaires.

**Tableau IV. Classification des capsules de *E. coli*.**

Caractéristiques	Groupe 1	Groupe 2	Groupe 3	Groupe 4
Ancien groupe	IA	II	I/II ou III	IB (Ag O capsulaire)
Co-expression avec les sérogroupes O	Limité aux O8, O9, O20 et O101	Plusieurs	Plusieurs	Souvent O8 et O9, parfois aucun
Co-expression avec l'acide colanique	Non	Oui	Oui	Oui
Stabilité thermique	Oui	Non	Non	Oui
Locus génétique	<i>cps</i> et <i>rfb</i>	<i>kps</i>	<i>kps</i>	<i>rfb</i>
Thermorégulation (non-expression en dessous de 20°C)	Non	Oui	Non	Non
Attachements aux bactéries	KLPS : lipide A du core; Ag K : Inconnu	$\alpha$ -Glycérophosphate	$\alpha$ -Glycérophosphate	KLPS : lipide A du core; Ag K : Inconnu
Systèmes modèles	Sérotype K30 de <i>Klebsiella</i> , <i>Erwinia</i>	Sérotypes K1 et K5 de <i>Neisseria</i> , <i>Haemophilus</i>	Sérotypes K10 et K54 de <i>Neisseria</i> , <i>Haemophilus</i>	Sérotypes K40 et O111 de plusieurs genres

Source : (166)

#### 4.1.4 Lipopolysaccharide (LPS)

Le lipopolysaccharide (LPS) est un composant majeur du feuillet externe de la membrane des *E. coli* et plus généralement des bactéries à Gram négatif. Il agit comme une endotoxine et comprend trois entités distinctes: le lipide A qui, enchâssé dans la membrane externe, représente la partie proximale du LPS, le noyau ou core qui constitue la partie médiane et l'antigène O qui est la partie distale libre, en contact avec le milieu extérieur.

Chez les ExPEC, le LPS est un élément indispensable pour la survie puisque les mutants ne survivent pas (171). Il est responsable de la stimulation de la réponse immunitaire innée. Le rôle du LPS dans la pathogénie bactérienne est dévolu essentiellement à deux de ses trois composants, à savoir le lipide A et l'antigène O. Le lipide A est la partie responsable de l'induction de la réponse immunitaire non spécifique entraînant un choc endotoxinique (172). Au cours du processus infectieux, la protéine de liaison du LPS se lie au lipide A, facilitant ainsi le transfert des CD14 sur les macrophages (173). Le CD14 est une protéine de surface des macrophages et d'autres cellules, synthétisée en réponse au LPS. Cette protéine, en se liant au lipide A, interagit avec les complexes MD-2 et le *Toll-like receptor* de type 4 (TLR4). Cette interaction entraîne la translocation nucléaire de NF- $\kappa$ B et l'activation subséquente des gènes impliqués dans la réponse inflammatoire (164). L'antigène O contribuerait à la résistance à l'action bactéricide du complément, à la phagocytose (faisant également intervenir les antigènes K) et dans l'adhésion aux tissus (164, 172).

#### 4.1.5 Toxines

Peu de toxines sont excrétées par les APEC. La principale est VT2y, présente chez 72% des APEC impliqués dans le syndrome de la grosse tête (174). Il a également été rapporté que certaines souches d'APEC associées au « *Swollen Head Syndrome* », en particulier les O78, sont capables de produire une toxine ressemblant à la toxine VacA d'*Helicobacter pylori*, la « *E. coli vacuolating Factor* » ou ECVF (33). L'inoculation sous-cutanée de la toxine ECVF purifiée aux poulets de chair entraîne des lésions de cellulites caractérisées par une augmentation de l'expression des cytokines TNF- $\alpha$  dans les tissus enflammés (175). L'administration systémique d'ECVF se traduit notamment par une augmentation simultanée des taux sériques de TNF- $\alpha$  et d'IL-10 indiquant que l'ECVF joue un rôle clef dans les

inflammations médiées par le TNF- $\alpha$ , mais cette inflammation peut être régulée par la cytokine anti-inflammatoire IL-10. Enfin, il semble que les APEC soient capables de produire d'autres toxines dont des entérotoxines notamment l'entéroaggregative heat-stable toxin 1 (EAST-1), des verotoxines et des nécrotoxines (176, 177). En outre, aussi bien les APEC que les AFEC sont capables de produire un effet toxigène sur les cellules HeLa, de produire l'entérohémolysine (*Hly*) et la toxine vacuolisante ECVF (176). Ces auteurs rapportent que 73% des souches septicémiques et 58% des isolats fécaux produisent la colicine V dont la majorité (respectivement 80% et 66%) ont été reconnus comme hautement pathogènes (176).

#### **4.1.6 Mécanismes de résistance au sérum**

La résistance aux effets bactéricides du complément est l'un des mécanismes qui permettent aux *E. coli* de déjouer les systèmes de défense immunitaire de l'hôte. Cette capacité à résister aux effets lytiques du complément implique des structures cellulaires comme la capsule, le lipopolysaccharide et des protéines de la membrane externe. C'est en 1979 qu'une région du plasmide colV portant les gènes *iss* et *traT* a été étudiée pour la première fois en raison de sa possible implication dans la résistance au sérum chez les souches septicémiques humaines (178). On pense que ces gènes agiraient en empêchant le dépôt du complexe d'attaque membranaire du système complément mais le mécanisme en cause n'est pas encore clairement élucidé. Toutefois, le gène *iss* est considéré comme étant un facteur de virulence qui permet de distinguer les APEC des ExPEC humains en raison du rôle important qu'il joue dans la virulence des premiers (179). De plus, de nombreuses études ont démontré que le gène *iss* est plus fréquemment associé aux APEC qu'aux *E. coli* commensaux des volailles (170, 180). En effet, l'expression de ce gène par une souche de *E. coli* augmente de 20 fois sa résistance au complément et de 100 fois sa virulence chez les poussins d'un jour. Ellis et al. (181) ont également pu démontrer qu'il existe une corrélation positive entre la résistance au sérum et la virulence des souches inoculées par voie intraveineuse chez les dindes de trois semaines d'âge. Cette corrélation semble être spécifique à certains sérogroupes comme O1 et O2 car il n'a pas été établi une corrélation positive entre la résistance au sérum des dindes et le séro groupe O78 (182). En revanche, les études effectuées par Mellata et al. (183) ont montré que les facteurs de virulence qui contribuent à augmenter la résistance des APEC au sérum et à favoriser ensuite la colonisation des organes internes étaient le lipopolysaccharide

du sérotype O78 du mutant  $\chi$ 7122 et la capsule K1 du mutant MT78. Aussi, ces auteurs ont-ils démontré que contrairement aux autres souches chez lesquelles le gène *iss* est requis pour la résistance au complément, ce gène ne semble jouer qu'un subtil rôle dans la résistance de la souche mutante  $\chi$ 7122 au sérum.

La protéine de la membrane externe traT est codée par le gène *traT* situé sur l'opéron *tra* des plasmides de résistance à l'activité antibactérienne du sérum (184). Cette protéine provoque l'exclusion de surface à l'occasion des phénomènes de conjugaison entre des bactéries ayant des plasmides appartenant au même groupe d'incompatibilité. La protéine traT agit en interférant avec la phagocytose. Cette interférence se produit principalement avec l'opsonisation par la voie alterne du complément en restreignant et en modifiant le dépôt du complément C3 (185). Lors de leur étude sur le sérum du porc et le sérum humain, Pramoonjago et *al.* (186) ont suggéré que la protéine traT exerçait une probable action inhibitrice sur la formation du complexe C5b6 et provoquerait une modification structurale du complément le rendant non fonctionnel.

#### **4.1.7 Production de biofilms**

Donlan et Costerton (187) définissent le biofilm comme une communauté de bactéries sessiles caractérisée par des cellules attachées à un substrat noyé dans une matrice extracellulaire qu'elles ont produite et qui expriment un phénotype de croissance et de transcription génétique. Le biofilm est donc un style de vie (188) qui présente, par ailleurs, l'avantage d'offrir aux bactéries, un abri qui les protège contre les environnements hostiles (189). Le biofilm offre entre autre la protection contre le stress osmotique, la carence en fer et les effets toxiques des antimicrobiens (189). Chez les APEC, le biofilm contribuerait à la survie dans le tractus génito-urinaire et à la persistance sur des produits avicoles tels que les œufs et la viande crue (93).

Le biofilm est composé d'une substance polymérique extracellulaire incluant des protéines, des acides nucléiques, du polysaccharide et de l'eau (composant majeur). Vogeler et *al.* (190) décrivent quatre phases dans la formation de biofilm. La première phase est celle du contact initial entre la bactérie et la surface d'attachement. Cette phase dépend des forces d'attraction et de répulsion entre la bactérie et la surface et peut être influencée par des facteurs tels que la

température, le pH, la rugosité de la surface ou encore la motilité bactérienne. La deuxième phase est celle de l'attachement proprement dit qui est souvent tributaire des structures appendiculaires comme les adhésines fimbriaires ou des structures capsulaires. La troisième phase est celle de la maturation du biofilm durant laquelle les bactéries tout en se multipliant, produisent une matrice extracellulaire qui intervient dans l'adhésion cellulaire et des auto-transporteurs qui interviennent dans les interactions entre les cellules bactériennes. En outre, durant la phase de maturation, des éléments tels que la capsule, le LPS et les quorum-senseurs y joueraient un important rôle. Enfin, la quatrième phase est celle de la dispersion qui se matérialise par le détachement des cellules bactériennes du biofilm et leur dispersion, permettant leur transmission à un nouvel hôte.

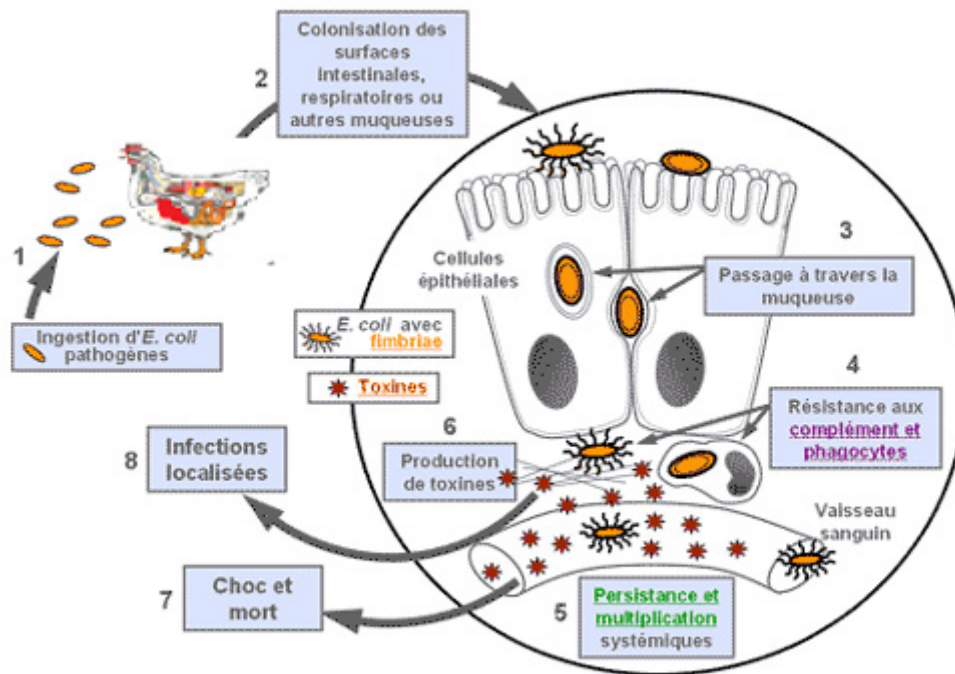
## **5. Colibacilloses aviaires**

---

### **5.1 Pathogénèse**

Les volailles se contaminent en inhalant les bactéries avec des poussières contaminées (191). La période d'incubation est généralement courte, variant de 1 à 3 jours dans des conditions expérimentales et de 5 à 7 jours lors d'infections naturelles (6). L'infection des voies respiratoires est souvent secondaire à une infection par le virus de la bronchite infectieuse, par le virus de la maladie de Newcastle ou par *Mycoplasma gallisepticum*. Les mauvaises conditions d'hygiène, l'accumulation d'ammoniac, la forte densité des oiseaux dans le bâtiment d'élevage sont autant des facteurs qui prédisposent les oiseaux à développer la colibacillose (2).

Les différentes étapes du développement de l'infection sont résumées dans la Figure 4. Brièvement, après inhalation, les bactéries adhèrent aux cellules trachéales au moyen des fimbriae (133). Elles s'y multiplient avant de gagner la circulation sanguine et divers organes tels que le foie, la rate, le cœur, etc. Dans ces organes, les *E. coli* expriment des facteurs capsulaires, antigéniques et autres, leur permettant d'échapper aux défenses immunitaires de l'hôte (130). En même temps, elles exportent des toxines qui endommagent l'intégrité tissulaire et peuvent entraîner des infections localisées à certains organes ou conduire à un choc et la mort.



**Figure 4. Pathogénèse des APEC.**

Source : adapté de <http://www.ecl-lab.com/en/ecoli/pathogenesis.asp>

Avec l'autorisation du Dr. John Morris Fairbrother.

## 5.2 Formes cliniques

### 5.2.1 Colisepticémie et complexe respiratoire chronique

La colisepticémie est la manifestation clinique la plus sévère de la colibacillose aviaire. Affectant surtout les poulets de chair, elle survient dans l'élevage lorsque les oiseaux sont élevés en surnombre dans un local peu aéré, poussiéreux et chargé d'ammoniac (2). La maladie peut aussi être consécutive à un affaiblissement des défenses de l'oiseau. Les principaux facteurs prédisposants sont une infection à *Mycoplasma gallisepticum*, certaines infections virales comme la maladie de Newcastle, la maladie de Gumboro ou la bronchite infectieuse (2). La colisepticémie peut également être consécutive à des déficiences nutritionnelles (192).

Les oiseaux de 4 à 12 semaines d'âge sont généralement les plus sensibles. La maladie débute par une chute de la consommation alimentaire. Les sujets atteints deviennent ensuite apathiques avec un plumage ébouriffé et une hyperthermie pouvant atteindre les 44°C, mais le signe le plus évocateur est la détresse respiratoire (bec ouvert, respiration haletante) (33). La mortalité et la morbidité sont variables; les pertes par mortalité se situent généralement autour de 5% de l'effectif mais la morbidité peut dépasser 50% (33). Les lésions sont souvent absentes. Dans de rares cas où elles existent, il s'agit de lésions de péricardites, périhépatites, aérosacculites et péritonites (2).

### **5.2.2 Mortalités embryonnaires et du jeune poussin**

Cette expression de la colibacillose constitue, avec les erreurs d'élevage, la cause la plus importante de mortalité chez les poussins de moins d'une semaine d'âge (33). Cette forme de la colibacillose peut se transmettre aussi bien horizontalement que verticalement. En effet, les voies génitales d'une poule pondeuse atteinte de colibacillose s'en trouvent infectées (salpingites) et les bactéries peuvent ainsi infecter l'œuf avant la formation de la coquille. L'œuf peut également être contaminé lors de son passage à travers un cloaque souillé. Les œufs contaminés présentent une fragilité de leur coquillage, sont plus chauds et leur surface est mouillée. L'infection de la membrane vitelline entraîne la mort embryonnaire. Les poussins peuvent aussi être infectés dans les 24 à 48 heures suivant leur éclosion. Cette infection entraîne des retards d'involution de la vésicule vitelline provoquant des lésions d'omphalites. Chez les jeunes poussins, la mortalité peut persister pour environ 2 à 3 semaines et atteindre 20% (6). Les poussins qui survivent à la maladie présentent des lésions de péricardites.

### **5.2.3 Cellulite ou dermatite nécrotique**

La cellulite est une affection de la peau qui constitue la deuxième cause des saisies d'abattoirs après la colisepticémie (193). Elle n'est pas toujours associée à des manifestations cliniques caractéristiques et ne semble pas non plus influencer la croissance des animaux (194). Toutefois on peut noter l'apparition de lésions inflammatoires œdémateuses et diffuses dans les tissus sous-cutanés qui peuvent parfois se localiser au niveau du pourtour cloacal et dans la partie inférieure de l'abdomen. Ces lésions sont constituées d'une masse semi-solide qui peut



mesurer 3-5 mm d'épaisseur et de 2x1cm à 10x4cm de largeur (169). Certaines de ces lésions peuvent être observées sur la face médiale de la cuisse ou sur la zone thoracique caudale. Les lésions peuvent, dans certains cas, être associées à une abcédation (193). Ces abcès ne sont pas de nature à entraîner de mortalités chez la volaille, mais sont une importante cause des saisies d'abattoirs.

#### **5.2.4 Coligranulome ou maladie de Hjarre**

Maladie des sujets adultes, le coligranulome à *E. coli* est peu fréquent chez les poulets et les dindons et présente rarement des signes cliniques. Elle ne cause la mortalité des sujets atteints que de façon sporadique, mais dans certains lots d'oiseaux, la mortalité peut avoisiner 75% de la population adulte (33). Les signes cliniques ne sont pas spécifiques. Les sujets atteints sont généralement découverts morts sans altération de leur état général. A l'examen post-mortem, on peut relever des nodules (granulomes) le long du tractus intestinal et du mésentère, et dans le foie. Les lésions nodulaires siégeant au niveau du foie sont semblables à celles d'une tuberculose. Parfois, la formation des granulomes au niveau hépatique peut être due à des bactéries du genre *Eubacterium* ou *Bacteroides* (33).

#### **5.2.5 Syndrome de la grosse tête ou "swollen-head disease"**

Cette affection est très souvent secondaire à une infection virale (pneumovirus, paramyxovirus, coronavirus) ou à des teneurs anormalement élevées en ammoniac. Il s'agit d'une forme localisée de cellulite puisqu'elle se manifeste par des nodules inflammatoires au niveau de la tête et de la région périorbitaire. Elle affecte les poulets de chair âgés de 4 à 5 semaines et les poulets reproducteurs de 24 à 36 semaines d'âge (195). Nakamura et al. (196) ont décrit dans cette affection, une tuméfaction des tissus sous-cutanés de la zone périorbitaire et submandibulaire contenant un exsudat caséux. Les espaces aériens des os du crâne et de l'oreille moyenne contiennent souvent une collection fibrino-purulente.

### **5. Utilisation des antimicrobiens chez la volaille et développement des résistances chez les *E. coli* aviaires**

---

## 5.1 Utilisation des antimicrobiens

L'utilisation des antimicrobiens vise non seulement à maintenir et améliorer la santé et le bien-être des animaux à travers la prévention et le traitement des infections bactériennes, mais aussi à augmenter la qualité des carcasses et la productivité. Un antimicrobien peut être administré aux animaux individuellement ou en groupe, à des fins thérapeutique, prophylactique, métaphylactique ou simplement comme stimulateur de croissance (Tableau V). Toutefois, la distinction entre utilisation prophylactique et l'utilisation comme stimulateur de croissance est moins claire qu'entre les utilisations prophylactique et thérapeutique. Pour cela, il est préférable d'utiliser le vocable « utilisation non-thérapeutique » qui englobe l'utilisation comme les stimulateurs de croissance et l'utilisation prophylactique (197). A noter que la métaphylaxie désigne l'administration des antimicrobiens à un troupeau d'animaux dans le but de traiter les sujets malades et de prévenir la maladie chez les individus sains. Dans les élevages de masse telle que l'aviculture, l'incorporation du médicament dans la nourriture ou l'eau destinée aux animaux est la méthode la plus pratique et la plus économique.

**Tableau V. Types d'utilisation des antimicrobiens chez les animaux de rente.**

<b>Types d'utilisations</b>	<b>But</b>	<b>Voies ou modes d'administration</b>	<b>Administration individuelle ou par groupe</b>	<b>Animaux malades</b>
Thérapeutique	Thérapie	Injection, aliments, eau	Individuelle ou groupe	Animaux malades ou certains animaux dans le groupe
Métaphylactique	Prophylaxie de la maladie, thérapie	Injection, aliments, eau	Groupe	Certains
Prophylactique	Prophylaxie de la maladie	Aliments	Groupe	Rien d'évident bien que certaines infections

				puissent être subcliniques
Stimulateurs de la croissance	Stimulation de Aliments	Groupe		Aucun
croissance	Indice de Aliments consommation	Groupe		Aucun

Source : <http://www.bape.gouv.qc.ca/sections/mandats/prod-porcine/documents/SANTE25-1.pdf> consulté le 17-10-2017.

Au Canada, plus d'une quinzaine de catégories d'antimicrobiens ont été homologués chez les animaux de productions parmi lesquelles plusieurs sont destinées aux volailles (Tableau VI). Il est à noter que depuis décembre 2018, une ordonnance vétérinaire est également requise pour accéder aux antimicrobiens de catégories 2 et 3 ; autrement dit, tous les antimicrobiens du Tableau V sont désormais soumis à une ordonnance vétérinaire. Aux États-Unis, où l'élevage des animaux et les méthodes de traitement antimicrobien sont comparables à ceux du Canada, 32 composés antimicrobiens, incluant ceux du Tableau V, ont été approuvés pour l'utilisation chez la volaille, sans prescription vétérinaire (198).

**Tableau VI. Antimicrobiens homologués pour utilisation chez la volaille au Canada.**

Classes d'antimicrobiens	Antimicrobiens	Mode d'administration		
		Nourriture	Eau	Injectable
Béta-lactamines	Ceftiofur	-	-	APV
	Pénicilline G	SPV	SPV	SPV
	Amoxicilline	-	APV	-
Sulfonamides	Sulfonamide	-	SPV	-
Tétracycline	Hydrochloride	-	SPV	-
	Chlortétracycline	SPV	-	-
	Oxytétracycline	SPV	SPV	-
Macrolides	Erythromycine	SPV	SPV	-
	Lincomycine	SPV	SPV	-
	Tylosine	-	SPV	-

Aminoglycosides	Gentamicine	-	-	APV
	Néomycine	-	SPV	-
	Spectinomycine	-	SPV	-
	Streptomycine	-	SPV	-
Streptogramines	Virginiamycine	SPV	-	-
Bacitracine	Bacitracine	SPV	-	-
Flavomycine	Bambermycine	SPV	-	-

Source : (199). SPV : utilisation sans ordonnance vétérinaire; APV : utilisation sous ordonnance vétérinaire; - : non homologué

Au Sénégal et au Vietnam, il n'existe pas de structure de contrôle de l'utilisation des antimicrobiens et donc pas de liste d'antimicrobiens homologués en aviculture. Au Sénégal, les éleveurs peuvent utiliser n'importe quel antimicrobien sans prescription vétérinaire, en s'approvisionnant tout simplement auprès des vendeurs de rue (19). De plus, des antimicrobiens tels que l'ampicilline, le triméthoprim-sulfaméthoxazole et la streptomycine sont couramment utilisés dans le traitement des infections bactériennes, aussi bien chez les humains que chez la volaille (200). Au Vietnam, les antimicrobiens tels que la colistine, l'avilamycine, la tétracycline et les lincosamides sont souvent incorporés dans l'alimentation des volailles (201).

L'utilisation des antimicrobiens chez les animaux, quel qu'en soit le but, est souvent associée au développement des résistances antimicrobiennes. Les bactéries d'origine animale résistantes aux antimicrobiens peuvent être transmises des animaux aux humains ou leurs gènes de résistance peuvent être transmis aux bactéries pathogènes pour les humains, constituant ainsi un problème de santé publique.

## **5.2 Résistance antimicrobienne chez les *E. coli* aviaires**

### **5.2.1 Rappel sur le mécanisme d'action générale des antimicrobiens**

Les antimicrobiens agissent généralement sur les fonctions vitales de la bactérie. Par cette action, ils provoquent soit la mort de la bactérie (effet bactéricide), soit l'arrêt de leur multiplication (effet bactériostatique). Si dans l'effet bactériostatique, les défenses

immunitaires de l'hôte doivent être compétentes pour permettre à l'organisme de se débarrasser de l'agent infectieux, en revanche, l'effet bactéricide ne requiert pas que l'hôte soit immunocompétent. Les principaux modes d'actions des grandes catégories d'antimicrobiens sont résumés dans le Tableau VII.

**Tableau VII. Principaux modes d'action des grandes familles d'antimicrobiens.**

<b>Mode d'action</b>	<b>Familles d'antimicrobiens impliquées</b>
Inhibition de la synthèse de la paroi bactérienne	Béta-lactamines, glycopeptides et polypeptides
Inhibition de la synthèse ou du fonctionnement de la membrane plasmique	Polymyxines
Inhibition de la synthèse des protéines	Aminosides, tétracyclines, macrolides, phenicols
Inhibition de la synthèse de l'ADN	Quinolones et certains ansamycines
Inhibition du métabolisme intermédiaire (acide folique, impliqué dans la synthèse des nucléotides)	Sulfamides, triméthoprim

Source : (202)

### **5.2.2 Mécanismes généraux de la résistance antimicrobienne**

La résistance antimicrobienne est la capacité d'une bactérie à survivre et se multiplier en présence d'une concentration thérapeutique d'antimicrobien. Cette résistance peut être naturelle ou acquise. La résistance naturelle ou résistance intrinsèque est programmée dans le génome de la bactérie. Elle relève en général de l'absence des sites de fixation de l'antimicrobien sur la cellule bactérienne ou de la faible perméabilité de la paroi bactérienne aux antimicrobiens à cause de la nature chimique de la molécule et des structures membranaires. Elle est fixe, constante à l'intérieur d'un même taxon et à transmission verticale. La résistance acquise elle, apparaît chez des souches jusqu'alors sensibles à la molécule, suite à des modifications du patrimoine génétique. Elle ne concerne que certaines souches d'une même espèce et peut se transmettre horizontalement. La résistance antimicrobienne acquise peut s'expliquer par les différents mécanismes suivants (203) : (i) la production d'une enzyme qui inactive l'antibiotique; (ii) l'utilisation par la bactérie d'une

voie alternative remplaçant celle inhibée par l'antibiotique; (iii) la mutation du site de fixation de l'antibiotique; (iv) la modification post-transcriptionnelle ou post-translationnelle du site de fixation de l'antibiotique; (v) la pénétration insuffisante de l'antimicrobien dans la bactérie; (vi) un efflux actif de l'antibiotique, (vii) l'accroissement des voies métaboliques qui ne peuvent toutes être inhibées par l'antimicrobien et (viii) la présence d'un mécanisme non identifié précédemment. Qu'elle soit acquise ou innée, l'apparition de la résistance antimicrobienne peut survenir suite à la modification de l'ADN chromosomique, l'acquisition d'un ADN extrachromosomique (par l'intermédiaire des plasmides), l'acquisition des gènes transposables (transposons) ou via l'infection par les bactériophages.

La résistance chromosomique est généralement due à une mutation au niveau de l'ADN chromosomique, affectant spécifiquement le mécanisme d'action d'un antimicrobien ou d'un groupe d'antimicrobiens. D'après Guillot (12), la résistance chromosomique est caractérisée par sa faible fréquence d'apparition, sa stabilité et sa transmission aux cellules-filles. Chez *E. coli*, la fréquence des mutations est de  $5,4 \times 10^{-10}$  par base azotée (204).

La résistance extrachromosomique est celle dont les déterminants génétiques ont pour support des éléments génétiques mobiles. Ceux-ci sont représentés par des plasmides, des séquences d'insertion, des cassettes, des îlots génomiques des intégrons et des transposons (205).

### **5.2.3. Résistance des APEC aux antimicrobiens**

#### **a) Résistance des *E. coli* aviaires aux différents antimicrobiens**

La résistance des *E. coli* aviaires aux antimicrobiens varie selon les pays et à l'intérieur des pays, incluant divers paramètres tels que la pratique d'élevage, l'accessibilité aux antimicrobiens et le système d'encadrement de l'utilisation des molécules.

- **Résistance aux aminoglycosides :** Les aminoglycosides sont des antimicrobiens bactéricides dont le mécanisme d'action peut être résumé en trois principales phases (206). Premièrement, des interactions électrostatiques s'établissent entre la molécule et les charges négatives du LPS de la bactérie. L'antibiotique polycationique déplace alors par compétition les cations bivalents essentiels comme les ions  $Mg^{2+}$  entraînant

la rupture de la membrane externe. Cette première phase est suivie de la deuxième au cours de laquelle, l'antibiotique est rapidement absorbé à l'intérieur de la bactérie avec consommation importante d'énergie. Enfin, à l'intérieur de la cellule bactérienne, le médicament se lie à la sous-unité ribosomale 30S, au site accepteur A de l'aminocyl-ARNt situé sur la sous-unité ribosomale 16S. Ceci affecte la synthèse protéique par induction d'une lecture erronée des codons et une inhibition de la translocation.

La résistance naturelle des bactéries aux aminoglycosides est due à un défaut de transport de la molécule à l'intérieur de celles-ci. Quant à la résistance acquise, elle relève essentiellement de la modification des fonctions amine et hydroxyle par acétylation, phosphorylation ou adénylation des aminoglycosides sous l'action d'enzymes bactériennes. Ces enzymes diminuent la liaison des aminoglycosides au site A de la sous-unité 16S de l'ARNr des bactéries, entraînant la perte de l'activité antimicrobienne chez les bactéries productrices de ces enzymes (207).

Les profils de résistance des *E. coli* aviaires aux aminoglycosides varient d'une étude à une autre. Pour la gentamicine, la prévalence d'isolats résistants est de 3,33% au Sénégal (208), 30% en Chine (209), 50% en Ontario au Canada (210) chez les APEC, et 17,1% chez les AFEC aux États-Unis (211). La résistance est plus élevée, à 44,7% au Vietnam (212). La prévalence d'isolats indicateurs résistants à la kanamycine est de 48,9% et 16,7% respectivement pour le Vietnam et l'Indonésie (212) chez les isolats commensaux et 18,1% chez les AFEC aux États-Unis (211) tandis qu'une prévalence de 11% a été rapportée en Ontario chez les APEC (210). Pour ce qui concerne la streptomycine, la prévalence d'isolats de *E. coli* aviaires résistants, qu'ils soient commensaux ou pathogènes, est généralement élevée. La prévalence de résistance à la streptomycine est de 44,5% pour les AFEC et 52,5% pour les APEC aux États-Unis (211), 82,9% au Vietnam et 24,4% en Indonésie chez les AFEC (212). La prévalence de résistance à la streptomycine est de 23% chez les isolats indicateurs au Canada (213). La résistance des *E. coli* aviaires à la streptomycine est codée par les gènes *strA*, *strB* et *aadA*.

- **Résistance aux bêta-lactamines :** Les bêta-lactamines, antimicrobiens bactéricides à large spectre, comprennent les pénicillines, les céphalosporines, les carbapénèmes et les monobactames. Ils agissent par blocage de la synthèse de la paroi bactérienne en interférant avec les protéines liant les pénicillines (PLP) qui catalysent les dernières étapes de la formation de la paroi bactérienne.

Les mécanismes de résistances des *E. coli* aux bêta-lactamines comprennent la production de nouvelles PLP avec une affinité réduite pour les bêta-lactamines, la diminution de la perméabilité membranaire via des mutations dans les porines, les systèmes d'efflux, et la production d'enzymes inactivant les bêta-lactamines, c'est-à-dire les bêta-lactamases. Ce dernier mécanisme (production des bêta-lactamases) est le mécanisme le plus commun pour les bactéries à Gram négatif. Les bêta-lactamases agissent en hydrolysant le noyau bêta-lactam des bêta-lactamines.

La résistance des *E. coli* aux bêta-lactamines, y compris les céphalosporines, est de plus en plus rapportée de nos jours, aussi bien les *E. coli* commensaux que pathogènes. Le Tableau VIII résume la prévalence rapportée dans quelques pays pour certains antimicrobiens de la classe des bêta-lactamines. La résistance aux pénicillines est codée par les gènes plasmidiques *bla<sub>TEM</sub>*, *bla<sub>SHV</sub>* et *bla<sub>OXA</sub>* et pour le ceftiofur et le ceftriaxone, il s'agit respectivement des gènes *bla<sub>CMY</sub>* et *bla<sub>CTX-M</sub>*.



**Tableau VIII. Prévalence de résistance aux antimicrobiens bêta-lactames chez les isolats AFEC et APEC de quelques pays.**

Pays	Sénégal	Vietnam	Canada	États-Unis		Chine		
Références	(208)	(22)	(214)	(210)	(211)	(211)	(215)	(216)
Types d'isolats	AFEC	AFEC	AFEC	APEC	AFEC	APEC	AFEC	APEC
Ampicilline	55,6	86,0	ND	44,0	26,5	34,4	74,8	ND
Céfoxitine	12,0	ND	45,1	ND	12,6	15,6	ND	ND
Ceftiofur	ND	ND	40,3	15,0	10,7	11,9	ND	ND
Ceftriaxone	ND	2,5	43,9	ND	12,6	13,6	18,2	88,5
Amoxicilline/a cide clavulanique	ND	47,9	45,6	ND	19,0	13,0	ND	ND
Triméthoprim	73,33	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Sulfamethoxa- zole	ND	ND	46,7	ND	ND	ND	78,9	ND
Trimeth.- Sulfameth*	ND	69,7	16,5	18,0	7,3	11,1	77,8	ND
Chloramph*	18,0	68,1	16,6	ND	9,2	9,5	48,3	ND
Tétracyclines	88,9	93,4	56,5	57,0	49,1	35,8	93,5	ND

AFEC : *E. coli* aviaires d'origine fécale ; APEC : *E. coli* pathogènes aviaires ; ND : Non disponible; Trimeth.-Sulfameth : Triméthoprim-Sulfaméthoxazole ; Chloramph : Chloramphénicol

- **Résistances aux sulfamides et triméthoprime :** Les sulfamides partagent une analogie structurale avec l'acide para-aminobenzoïque (PABA), un nutriment essentiel pour certaines bactéries dont *E. coli*. Ils sont en compétition avec cet acide dans la synthèse de l'acide dihydrofolique (DHF) notamment, en remplaçant le PABA sur la dihydroptéroate synthétase (DHPS) qui catalyse la synthèse de l'acide folique (217, 218). C'est cette interférence avec la synthèse de l'acide folique qui sous-tend l'action bactériostatique de ces composés synthétiques. La résistance des *E. coli* aux sulfamides a en général un support plasmidique. Ces plasmides codent pour une dihydroptéroate synthétase qui confère la résistance en présence de fortes concentrations de sulfamides. Chez *E. coli*, cette résistance peut aussi résulter des mutations du gène chromosomique *folP* de la DHPS. Des études longitudinales montrent que la résistance aux sulfamides est sans cesse croissante au cours du temps. En outre, malgré la diminution de l'utilisation des sulfamides, la proportion des souches résistantes de *E. coli* semble se maintenir voire s'accroître constamment dans le temps (219, 220). Ces études révèlent qu'entre 1950 et 2002, la résistance a augmenté de 1,11% chez les souches animales alors que cette augmentation est de seulement 0,49% chez les souches humaines. La résistance plus élevée chez les souches animales serait due à l'utilisation des sulfamides à des fins prophylactiques ou comme facteurs de croissance.

Le triméthoprime est également un antimicrobien synthétique qui interfère avec le métabolisme de l'acide folique. Il exerce une action inhibitrice en se fixant sur la dihydroptéroate-réductase (DHFR) qui transforme l'acide dihydrofolique en tétrahydrofolate (THF) ou acide folinique (218); ce dernier étant indispensable à la synthèse des acides nucléiques. Plusieurs mécanismes de résistance au triméthoprime ont été décrits dont l'imperméabilité de la paroi cellulaire, l'utilisation des voies métaboliques alternatives, la production d'enzyme DHFR à support chromosomique ou plasmidique (221).

Ces deux antibiotiques sont souvent utilisés en combinaison sous la forme triméthoprime-sulfaméthoxazole avec un effet synergique (218). Cette forme

combinée est la plus utilisée dans le traitement des infections urinaires (222) mais, en raison des allergies cutanées et des anémies qui pourraient en découler, son utilisation est restreinte chez les humains (217). La résistance des *E. coli* (et plus généralement des bactéries à Gram négatif) aux sulfamides est codée par le gène *sul* qui possède plusieurs variants codant pour d'autres formes de dihydroptéroate synthétases qui ne sont pas inhibées par l'action des sulfamides (220, 223). De 1997 à 2007, la proportion des *E. coli*, résistants aux sulfamides, isolés des infections urinaires chez les humains a augmenté de 17,4% à 21,3% (224). Chez les *E. coli* aviaires, la prévalence de résistance aux sulfamides figurent, pour la plupart des études, parmi les plus élevées (Tableau VIII).

- **Résistance au chloramphénicol :** Le chloramphénicol appartient à la famille des phénicolés qui sont des antimicrobiens bactériostatiques. Il existe sous deux principaux dérivés, le thiamphénicol utilisé en médecine humaine et le florfénicol qui est d'usage vétérinaire. Le chloramphénicol agit en inhibant la synthèse protéique. En se fixant sur la sous-unité 50S de l'ARNr, il bloque l'élongation de la chaîne polypeptidique au cours de la protéogénèse. Les mécanismes de résistance des *E. coli* au chloramphénicol incluent l'imperméabilité membranaire, la mutation ribosomale et surtout, l'acquisition du gène *cat* qui code pour une enzyme, la chloramphénicol-acétyltransférase. La résistance des *E. coli* aux phénicolés est déterminée par les gènes *flo*, *cat* et *cmlA* (225). L'utilisation du chloramphénicol est de nos jours limitée, voire proscrite chez les animaux de rente dans de nombreux pays à cause de sa forte myélotoxicité. En dépit de cette prohibition, des proportions élevées de résistance au chloramphénicol ont été rapportées dans certains pays (Tableau VIII), probablement du fait de la résistance croisée avec le florfénicol qui, lui est utilisé en médecine vétérinaire.
- **Résistance aux quinolones et fluoroquinolones :** Les quinolones sont des antimicrobiens bactéricides synthétiques dont les représentants les plus connus sont l'acide nalidixique, l'acide oxolinique et la fluméquine. Ils se caractérisent sur le plan structural par la possession d'un cycle pyridine. Les fluoroquinolones sont également

des quinolones mais qui se distinguent par la présence d'un atome de fluor dans leur structure chimique. Les représentants de ce groupe incluent entre autre la l'enrofloxacin, la ciprofloxacine, la norfloxacine et l'ofloxacine. Toutes ces molécules sont utilisées essentiellement pour traiter les infections urinaires chez les humains mais aussi pour traiter les infections chez les espèces aviaires (226). Leur emploi chez les animaux de rente est considérée comme un facteur de transfert de souches entériques résistantes aux humains (227). Les quinolones exercent une inhibition sélective de la réplication de l'ADN bactérien en agissant sur les enzymes qui catalysent cette synthèse : l'ADN topoisomérase II ou ADN gyrase et l'ADN topoisomérase IV (228). Dans les principaux mécanismes de résistance aux fluoroquinolones, on distingue d'une part des mutations chromosomiques et d'autre part des supports plasmidiques. La résistance par mutation chromosomique est due à la diminution d'affinité des cibles intracellulaires comme les complexes ADN-ADN gyrase et ADN-ADN topoisomérase IV ou encore la diminution de la pénétration intracellulaire de l'antibactérien. La résistance plasmidique médiée par trois principaux types de gènes, à savoir les gènes *qnr* qui codent pour des pentapeptides, les gènes *aac(6')-Ib-cr* qui codent pour une acétyltransférase et les gènes *oqxAB* et *qepA* qui codent pour des systèmes d'efflux. Les protéines encodées par les gènes *qnr* assurent la protection de l'ADN gyrase ou de la topoisomérase IV contre la fixation des quinolones, l'acétyltransférase encodée par le gène *aac(6')-Ib-cr* inactive les quinolones par acétylation tandis que les gènes d'efflux permettent à la bactérie d'assurer l'extrusion des quinolones (229). L'inquiétude liée à l'augmentation de la résistance des *E. coli* aux quinolones et fluoroquinolones a commencé depuis les dix dernières années (11). La résistance des APEC aux quinolones se situe à des niveaux encore plus alarmants bien que certaines études en rapportent des faibles. Au Sénégal, les proportions de résistance des APEC sont de 4,44% et 8% respectivement pour l'acide nalidixique et le ciprofloxacine (208). Au Vietnam, Huong et al. (230) rapportent que 40,70% et 32,56% des isolats d'APEC sont résistants respectivement à la ciprofloxacine et à la norfloxacine tandis que les pourcentages de résistance à l'acide nalidixique et à l'enrofloxacin dans ce pays sont respectivement de 56,8% et 48,8% (212). C'est au Canada et aux États-Unis que ces prévalences sont les plus

faibles, autour de 4% pour l'acide nalidixique et 0% pour la ciprofloxacine (211, 231). En Chine, des pourcentages de résistance respectifs de 100% et 73% pour l'acide nalidixique et le ciprofloxacine ont déjà été observés (209), des chiffres jamais égalés dans la littérature scientifique qui pourraient s'expliquer par le libre accès aux antimicrobiens et leur utilisation massive chez les animaux de rente dans ce pays.

- **Résistance aux tétracyclines :** Les tétracyclines sont des antibiotiques bactériostatiques à spectre étendu sur les bactéries Gram positives et négatives, les chlamydies, les mycoplasmes, les rickettsies, voire certains protozoaires. Ce sont des agents inhibiteurs de la synthèse protéique. Chez les bactéries à Gram négatif, les tétracyclines agissent comme chélateurs des ions  $Mg^{2+}$  et franchissent la membrane externe par l'intermédiaire des porines OmpF et OmpC (232). Les complexes tétracyclines- $Mg^{2+}$  se dissocient ensuite dans le périplasma bactérien, permettant à la molécule de traverser activement la membrane cytoplasmique. Dans le cytoplasme, il se produit à nouveau le phénomène de chélation des ions  $Mg^{2+}$ , les tétracyclines atteignent alors leur cible ultime qu'est la sous-unité 30S ribosomale sur laquelle ils se fixent pour empêcher la fixation de l'aminoacyl ARNt, inhibant ainsi l'élongation de la chaîne peptidique.

Les tétracyclines sont les antimicrobiens les plus largement utilisés au monde, à la fois en thérapeutique humaine et animale et comme stimulateurs de croissance chez les animaux (233). Cette large utilisation est à l'origine de l'accroissement des résistances bactériennes. Chez les *E. coli*, les prévalences de résistance à cette molécule sont des plus élevées au monde (Tableau VIII). La résistance aux tétracyclines est en général codée par les gènes *tet*.

- **Résistance à la colistine :** la colistine ou polymyxine E est un antimicrobien polypeptide cationique de la classe des Polymyxines, qui comprend également la polymyxine B. Son spectre d'activité dirigé vers les bactéries à Gram négatif. La colistine agit par interférence avec les charges anioniques des lipopolysaccharides entraînant la bactériolyse par hyperméabilité membranaire (234). La colistine est

utilisée comme antibiotique de dernier ressort dans le traitement des infections dues aux entérobactéries multirésistantes chez les humains (235). En médecine vétérinaire, et plus particulièrement chez la volaille, elle est utilisée à but préventif ou thérapeutique dans plusieurs pays dont le Vietnam et le Sénégal (236). Les bactéries à Gram négatif peuvent devenir résistantes à la colistine aussi bien par mutation chromosomique que par acquisition d'éléments génétiques mobiles. En effet, la résistance à la colistine était, jadis, attribuée à la mutation chromosomique uniquement avant qu'en 2015, un gène plasmidique, *mcr-1*, médiant la résistance à cet antibiotique soit rapporté en Chine chez une souche de *E. coli* (237). Depuis lors, sept autres gènes *mcr* ont été détectés; le dernier en date étant *mcr-8* qui a été identifié en 2018 chez des souches *Klebsiella pneumoniae* et qui est transférable par conjugaison à des souches de *E. coli* (238). La résistance chromosomique à la colistine est le plus souvent due un remodelage des lipopolysaccharides causé par des changements dans les systèmes de régulation à deux composantes *PhoPQ* et *PmrAB* (239). Ces changements se traduisent par une diminution des charges négatives du LPS réduisant la fixation de la colistine sur la membrane bactérienne. Quant à la résistance plasmidique, elle résulte de la production par la bactérie d'une phosphoéthanolamine transférase. Cette enzyme catalyse l'addition de phosphoéthanolamine au lipide A, entraînant également une baisse d'affinité entre la colistine et le LPS (240). Globalement, la prévalence des résistantes de *E. coli* aviaires à la colistine dans le monde varie de 0 à 28%, les maxima étant rapportés de la Chine avec la présence du gène *mcr-1* (236).

#### **5.2.4 Rôle des BLSE dans la multirésistance des souches de *E. coli* aux antimicrobiens**

##### **a) Multirésistance associée à la production des BLSE de type CTX-M**

Les BLSE de type CTX-M ont été détectées pour la première fois chez des souches de *K. pneumoniae*. Les gènes codant ces enzymes étant portés par des plasmides conjugatifs, d'autres espèces bactériennes comme les *E. coli* ont rapidement acquis la capacité de les produire. Elles constituent la principale source de résistance aux oxyimino-céphalosporines (céfotaxime, ceftazidime, ceftriaxone, céfuroxime et céfepime). Ces enzymes n'inactivent pas des molécules telles que les céphamycines et les carbapénèmes bien qu'une diminution de la

sensibilité des *E. coli* et de *K. pneumoniae* producteurs de ces enzymes ait été récemment signalée en Europe et au Japon (241). Les BLSE de type CTX-M comptent actuellement plus de 90 variants. De nos jours, le clone pandémique humain ST131, producteurs de l'ESBL CTX-M-15 est considéré comme la principale cause de propagation des multirésistances antimicrobiennes parmi les souches ExPEC chez les humains (242). En Grande-Bretagne, 95,9% d'isolats provenant de centres hospitaliers sont producteurs de CTX-M dont la plupart, en plus de leur résistance aux bêta-lactamines non-carbapénèmes, sont résistants aux fluoroquinolones, aux aminoglycosides, au triméthoprim et à la tétracycline (243). Cette étude mentionne aussi que les isolats CTX-M-15 ont un caractère épidémique qui permet leur dissémination rapide. Au Sénégal par exemple, des isolats de *E. coli* producteurs de CTX-M-15 ont été identifiés chez des enfants apparemment sains, vivant dans un village très reculé n'ayant pas d'accès à la médecine allopathique (244).

C'est à partir des années 2000 que des *E. coli* producteurs de BLSE isolés des animaux ont commencé à émerger (245, 246). De nos jours, les animaux d'élevage dont les poulets sont potentiellement des réservoirs de *E. coli* producteurs de BLSE. En effet, les souches aviaires de *E. coli* productrices de CTX-M se sont, depuis leur première découverte en Espagne (246), répandues dans le monde bien qu'il y ait des variations temporelles et spatiales concernant leurs prévalences. En Chine, une étude effectuée sur une période allant de 1970 à 2007 sur des isolats commensaux et cliniques chez les poulets a révélé une prédominance du génotype *bla*<sub>CTX-M</sub> (75%) au sein des isolats dont les plus représentatives sont CTX-M-14 et CTX-M-15 (245). Au Royaume-Uni, Randall et al. (247) ont rapporté que 78% des isolats provenant de poulets étaient positifs au BLSE CTX-M-1 et 11,9% l'étaient pour CTX-M-15 tandis que chez les isolats issus de la dinde, CTX-M-14 (47,7%), CTX-M-1 (36,9%) et CTX-M-15 (13,8%) étaient plus fréquents. Plusieurs de ces isolats CTX-M étaient également porteurs des bêta-lactamases OXA et TEM. En Espagne, Cortés et al. (248) ont observé que CTX-M-9 était la  $\beta$ -lactamase la plus fréquente (64,9%) parmi les *E. coli* isolés de poulets. Le fait marquant de cette étude était surtout la présence du clone O25b:H4-ST131-B2 possédant le gène *bla*<sub>CTX-M-9</sub>. Les gènes qui codent pour les  $\beta$ -lactamases CTX-M sont localisés sur les plasmides d'incompatibilité tels que II, A/C, P et F (247).

## **b) Multirésistance associée à la production des BLSE de type AmpC**

Les  $\beta$ -lactamases de type AmpC ont un spectre d'activité dirigé contre les pénicillines, les céphamycines, les oxyimino-céphalosporines, les monobactames et l'acide clavulanique. Cette famille comprend 9 enzymes différentes mais l'enzyme CMY qui compte 43 allèles différents, parmi lesquels CMY-2, est de loin la plus répandue parmi les entérobactéries (249). L'AmpC CMY-2 qui provient de *Citrobacter freundii* est codée par le gène du même nom, localisé sur des plasmides IncFII, IncA/C, IncL/M, IncN, IncK/B et IncI1 (250-252), considérés de nos jours comme des plasmides de résistance antimicrobienne à allure épidémique à cause de leur distribution mondiale. Très souvent, les isolats qui possèdent ces plasmides sont résistants à la fois aux aminoglycosides, au chloramphénicol, aux quinolones, aux sulfamides, aux tétracyclines et au triméthoprim (249, 252).

Au Canada, la prévalence des *E. coli* aviaires positifs à CMY-2 est basse à modérée. En Espagne, lors d'une investigation visant 5 isolats de *E. coli* provenant des échantillons fécaux de poulets sains et résistants au cefotaxime et/ou au ceftazidime, Briñas et al. (246) ont trouvé un isolat porteur du gène *bla*<sub>CMY-2</sub>. C'était la première découverte du gène *bla*<sub>CMY-2</sub> dans des souches de *E. coli* provenant des poulets sains. Plus tard, Cortés et al. (248) en examinant des *E. coli* issus de la flore digestive de poulets sains dans ce même pays, obtinrent une prévalence de 17,5% pour le gène *bla*<sub>CMY-2</sub>. En Chine, les souches aviaires positives à CMY-2 ont commencé à être signalées durant les années 2000-2003 et sur la période allant de 2004 à 2007, une prévalence globale de 6,6% a été enregistrée (245).

### **c) Multirésistance associée à la production des carbapénémases**

Les carbapénémases sont des enzymes qui sont produites par les bactéries telles que les *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas* spp. et *Acinetobacter* spp (253). Catégorisées en trois classes (A, B et D), ces enzymes sont capables d'hydrolyser la quasi-totalité des  $\beta$ -lactamines, y compris les carbapénèmes (Tableau IX).



**Tableau IX. Classification des carbapénémases et leurs spectres de résistance aux antimicrobiens.**

Classes	Nom commun	Spectre de résistance	Exemples
A	Serine carbapénémases	Carbapénèmes, pénicillines, céphalosporines, aztreonam	KPC, GES, SME1
B	Métallo-carbapénémases	Toutes les $\beta$ -lactamines à l'exception de l'aztreonam	IPM, NDM, VIM, IND
D	Carbapénémases	Carbapénèmes, pénicillines, céphalosporines, aztreonam	OXA

Source : (253)

Les carbapénémases sont codées par des gènes aussi bien chromosomiques que plasmidiques (254). Les carbapénémases de classe A sont codées par des gènes chromosomiques à l'exception de KPC chez les entérobactéries et GES chez les entérobactéries et *Pseudomonas aeruginosa*. Les enzymes de classe B sont majoritairement des IMP et VIM. Les enzymes IMP sont essentiellement produites par des souches infectieuses. Le gène *bla<sub>IMP-4</sub>* identifié est porté par le plasmide IncA/C. Quant aux enzymes VIM, elles sont principalement produites par des souches non-fermentaires et les gènes codant pour cette enzyme, comme *bla<sub>VIM-1</sub>* sont localisés sur les plasmides IncN et IncW. La dissémination des carbapénémases-oxacillinases est assurée, chez les entérobactéries, par les plasmides IncL/M (255).

La prévalence des souches de *E. coli* exprimant les gènes de production des carbapénémases est plutôt faible. Aux États-Unis, cette prévalence serait d'environ 4% pour les *E. coli* d'origine humaine (253), les carbapénémases KPC étant les plus répandues dans ce pays. Ces enzymes dont la production semblait autrefois limitée aux souches de *E. coli* humaines ont récemment été identifiées chez des souches porcines en Allemagne, notamment le gène *bla<sub>VIM-1</sub>*, localisé sur différents intégrons (*In31*, *In70*, *In110* et *In450*) et/ou transposons (*Tn3*, *Tn402* et *Tn21*) (256). Durant la dernière décennie, les gènes *bla<sub>IMP</sub>*, *bla<sub>VIM-1</sub>* et *bla<sub>NDM-1</sub>* ont été détectés chez des *E. coli* isolés des poulets en Allemagne et au Pakistan (257, 258).

## 5.2.5 Rôle des plasmides dans la virulence et la résistance antimicrobienne des APEC

### a) Modalités de transferts des de la virulence et de la résistance antimicrobienne

Les plasmides sont des éléments génétiques, constitués d'ADN bicaténaire extrachromosomique, circulaire, dotés d'une autonomie de réplication. Ces éléments génétiques qui peuvent être échangés entre des bactéries de même espèce ou d'espèces différentes augmentent considérablement la diversité génétique et permettent aux bactéries de s'adapter à un nouvel environnement. Lorsqu'une bactérie les acquiert, elle les transmet de façon stable aux générations suivantes. Guillot (12) leur reconnaît quatre propriétés essentielles que sont i) leur petite taille (de 1 à 400 kb), ii) leur réplication autonome assurant la répartition égale des copies dans les cellules-filles, iii) la possibilité de leur transfert entre bactéries de la même espèce ou d'espèces différentes et iv) leur incompatibilité permettant leur classification en groupes d'incompatibilité. Le concept d'incompatibilité de ces plasmides est basé sur le fait que deux plasmides de même groupe sont incompatibles dans une même cellule. Autrement dit, lorsqu'on transfère un plasmide de groupe d'incompatibilité inconnu à une bactérie possédant un plasmide de groupe connu et qu'à la prochaine génération le plasmide résident est éliminé, le plasmide entrant se voit attribuer le groupe du plasmide éliminé (259). L'incompatibilité des plasmides est ainsi liée aux gènes *inc* et se traduit par l'incapacité ou non pour deux plasmides de coexister dans une même cellule selon qu'ils portent ou non les mêmes gènes *inc*. Il existe trois modalités de transfert d'ADN (Figure 5) (260): i) la transformation, ii) la transduction et iii) le transfert conjugatif.

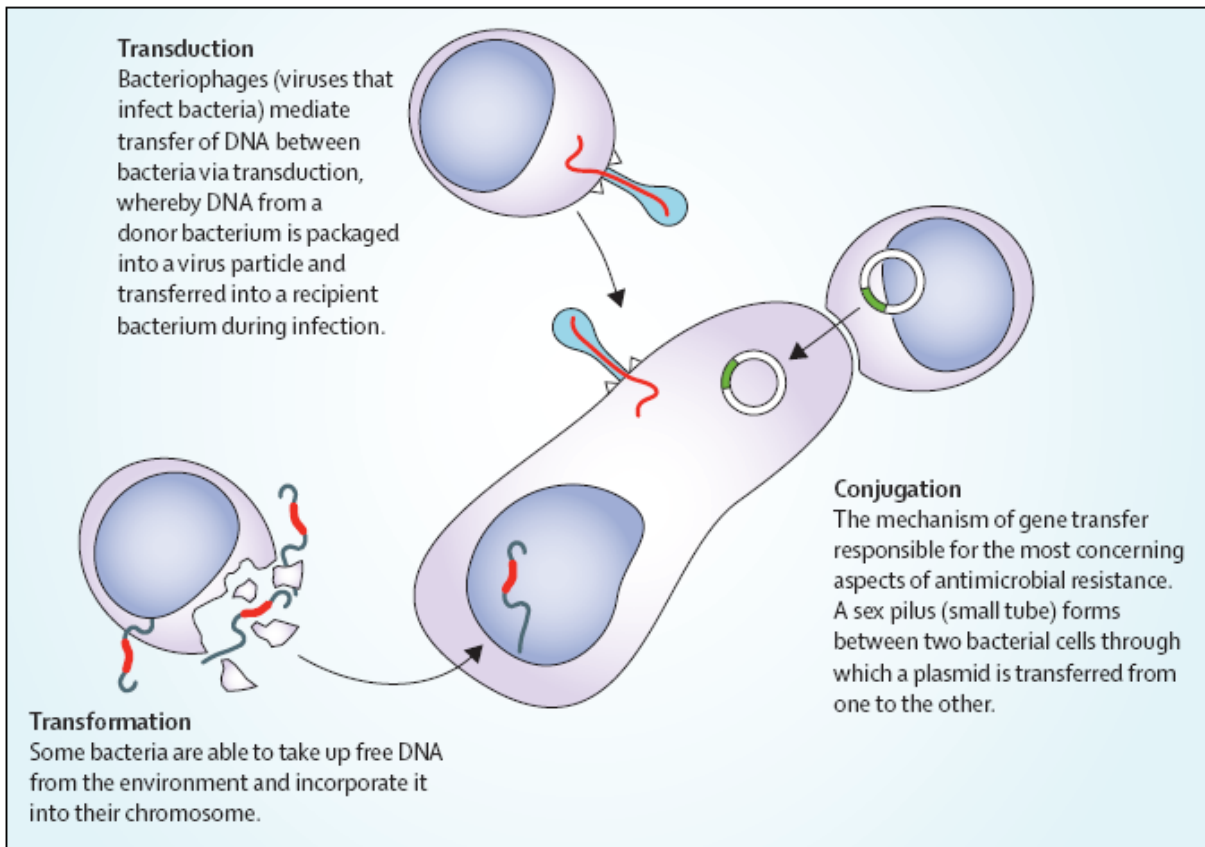


Figure 5. Modalités de transfert horizontal de gènes.

Avec permission (260).

- **La transformation** : elle implique la lyse cellulaire et la libération de l'ADN dans le milieu extérieur qui peut être récupéré et intégré dans le chromosome ou le plasmide d'une cellule vivante;
- **La transduction** : elle implique un bactériophage qui, en infectant une bactérie, lui transfère son matériel génétique qui peut s'intégrer dans le chromosome bactérien;
- **La conjugaison** : elle fait intervenir les pili sexuels des deux bactéries permettant un échange de matériel génétique.

## b) Rôle des plasmides dans la virulence et la résistance antimicrobienne

La presque totalité des résistances antimicrobiennes sont codées par des gènes plasmidiques (12). Pour certains de ces plasmides, on note en leur sein, la coexistence de gènes de virulence

et des gènes de résistance antimicrobienne. Le plasmide de résistance antimicrobienne le plus connu est le plasmide R qui code pour la résistance à plusieurs familles d'antibiotiques à la fois (12, 261). pCVM29188\_146 (porteur des gènes d'antibiorésistance *strAB* et *tetRA*) et pCVM29188\_101 (porteur des gènes d'antibiorésistance *bla<sub>CMY-2</sub>* et *sugE*) sont deux plasmides isolés d'une souche de *Salmonella* Kentucky. Ils sont génétiquement proches des plasmides d'APEC pAPEC1, pAPEC-O1-ColBM et pAPEC-O2-ColV et possèdent à la fois un îlot de pathogénicité (où sont portés les gènes de virulence) et un autre porteur de gènes de résistance antimicrobienne (262). En outre, par conjugaison, des phénotypes de résistance ont été transférés avec succès d'une *S. Kentucky* à une souche de *E. coli* sensible. Le plasmide pAPECO103-ColBM est également un exemple de plasmide porteur à la fois, d'un îlot de pathogénicité et d'un autre îlot codant pour des gènes de résistance antimicrobienne (263).

Un fragment de 30 kb du plasmide pTJ100 a fait l'objet d'un séquençage (264). Cette analyse a révélé qu'il contient une mosaïque de gènes de virulence, des séquences d'insertions et des gènes codant pour la résistance aux métaux lourds (*silP*), aux tétracyclines (*tetA*), aux aminoglycosides (*aadA4* et *aadB*), au chloramphénicol (*catB*), aux composés d'ammonium quaternaire (*qacEΔ1*), aux sulfonamides (*sulI*) et aux bêta-lactamines (*bla*). Aussi, il y aurait une potentielle corrélation entre la virulence des souches de *E. coli* et leur potentiel de résistance antimicrobienne puisque l'îlot de pathogénicité des plasmides ColV est un moyen de sélection des souches hautement virulentes par l'utilisation des antimicrobiens (263). Un autre plasmide de 76635 kb portant quatre gènes de résistance antimicrobienne *rmtB*, *foA3*, *bla<sub>TEM-1</sub>* et *bla<sub>CTX-M-24</sub>*, codant respectivement pour la résistance aux aminoglycosides, à la fosfomycine, à l'ampicilline et au ceftriaxone a été identifié chez des souches APEC impliquées dans les colibacilloses du poulet (265). Ce fut la première fois qu'un plasmide de résistance aux aminoglycosides est porteur du gène *foA3*. Plus récemment, une région contenant les gènes *bla<sub>CTX-M-65</sub>*, *fosA3* et *rmtB* a été découverte sur le plasmide d'incompatibilité incFII de la souche aviaire ST117 isolée d'un poulet (266). De manière générale, les plasmides des groupes d'incompatibilité sont connus pour leur richesse en déterminants génétiques de résistance antimicrobienne. Ils sont porteurs de la plupart des gènes codant pour les ESBLs/AmpC, particulièrement les plasmides II, N, A/C and P/F, et II-

$\gamma$  (267). De ce fait, leur typage constitue un excellent moyen pour faire leur suivi épidémiologique (268).

Chez les APEC, plusieurs grands plasmides sont impliqués dans la virulence. Par conséquent, leur acquisition ou leur perte par une souche peut profondément modifier la virulence de celle-ci. Wooley et al. (269) ont démontré que l'acquisition d'un plasmide de virulence de 56 kb par la souche avirulente de *E. coli* DH5 $\alpha$  la rendait virulente. Grâce à l'acquisition de ce plasmide, le taux de létalité embryonnaire de la souche chez le poulet passait de 0% à 45%. De même, le rôle déterminant des plasmides pAPEC-1 (103 kb), pAPEC (90 kb) et pAPEC-3 (60 kb) dans la virulence des APEC a été établi par Mellata et al. (270). L'élimination de ces trois plasmides chez une souche virulente entraîne une réduction significative de sa virulence. Inversement, leur introduction dans le génome de la souche commensale K-12 la rendait très virulente puisque ces trois plasmides rassemblent au total 16 gènes de virulence. Certains plasmides des groupes d'incompatibilité ont également un réel rôle dans la virulence des *E. coli* (263). Par ordre d'importance, il s'agit des plasmides IncFIB, IncI1, IncFIIA, incP, incB/O, IncN et IncFIC (271).

Les plasmides IncA/C, IncFIB, IncFIC, IncI1, and IncHI2 sont plus fréquemment trouvés chez les APEC isolés des cas de cellulites tandis que ceux impliqués dans des cas de septicémie sont plutôt porteurs du plasmide incB/O. En plus de ces plasmides, ColV (272) et ColBM (263) comptent parmi les plasmides qui contribuent dans la virulence des APEC. ColV est un plasmide de 80 à 180 kb (273) et son séquençage complet chez la souche APEC O2 (plasmide pAPEC-O2-colV) (274) a mis en exergue une région de 93 kb où de nombreux gènes codant pour des facteurs de virulence sont localisés. De plus, ce séquençage a révélé la présence d'une région dédiée à la virulence qui peut être divisée en deux parties. La première est une partie dite 'conservée' qui s'étend, sur la carte, des gènes *sitA* à *cvaB* et dont les gènes ont été confirmés chez plus de 67% des isolats. La deuxième partie, comprise entre les gènes *cvaB* et *eitA*, est qualifiée de variable parce que les gènes qui s'y trouvent sont moins fréquents chez les *E. coli*.

### **5.2.6 Résistance aux antimicrobiens des *E. coli* aviaires et risque encouru par les humains**

Des bactéries résistantes aux antimicrobiens chez le poulet peuvent être transmises aux humains via des contacts directs ou indirects. En effet, des cas de transmission des *E. coli* résistants aux antimicrobiens, des poulets aux humains, ont été rapportés (275, 276). L'autre voie de contamination humaine est la manipulation ou la contamination des produits avicoles contaminés tels que la viande ou les œufs. En lien avec cette voie, des preuves de la contamination des humains par des *E. coli* résistants aux antimicrobiens issus de ces denrées ont été apportées par des études basées sur les similarités génétiques entre des *E. coli* résistants isolés des deux hôtes (277). Enfin, il a été suggéré que les *E. coli* commensaux des animaux sont une source importante d'acquisition intra- et interspécifique des gènes de résistance aux antimicrobiens, y compris des échanges avec des pathogènes humains (278).

### **5.2.7 Facteurs de risque de la résistance antimicrobienne et échecs thérapeutiques des infections à *E. coli* chez le poulet**

La communauté scientifique reconnaît unanimement l'utilisation des antimicrobiens comme principal facteur de risque de développement des résistances. En élevage de masse comme l'aviculture le développement de cette résistance est encore exacerbé du fait que ces antimicrobiens sont administrés, le plus souvent, à tous les animaux par voie orale. Par cette voie, l'antimicrobien agit non seulement sur les entérobactéries pathogènes, mais aussi la flore commensale, et augmente considérablement la pression de sélection (22, 279). Certains facteurs de régie peuvent également favoriser l'introduction des bactéries résistantes aux antimicrobiens dans un élevage. Par exemple, il a été rapporté en Norvège que le statut du précédent lot dans le poulailler, le nombre de parents reproducteurs d'où proviennent les poussins d'un jour et les mouvements du personnel sont des facteurs qui augmentent le risque de détection des *E. coli* résistants aux céphalosporines (280). Parmi les autres facteurs de risque d'introduction de bactéries résistantes aux antimicrobiens, l'on peut citer entre autres, l'utilisation d'eau de puits contaminée comme eau de boisson et la présence d'insectes ou de rongeurs pouvant servir de vecteurs mécaniques (281, 282).

Quant aux échecs thérapeutiques suite aux infections à *E. coli*, il n'existe, à notre connaissance, pas d'étude qui en apporte la preuve formelle en médecine vétérinaire, la plupart les mentionnant comme une possibilité au vu de la résistance élevée qui a été observée. En médecine humaine en revanche, des cas d'échecs suite au traitement d'infections dues aux entérobactéries, dont des *E. coli* producteurs de bêta-lactamases, ont été documentés (283, 284).

## **CHAPITRE II. CONTEXTES JUSTIFICATIFS ET OBJECTIFS**



Les APEC sont un sous-groupe d'ExPEC avec lesquels ils partagent les déterminants génétiques de virulence. De plus, des *E. coli* isolés des poulets, qu'ils soient sains ou affectés par la colibacillose aviaire, peuvent combiner des facteurs de virulence les rendant potentiellement capables d'infecter les humains. Le danger pour les humains est encore amplifié par le développement, qui survient suite à l'utilisation des antimicrobiens, des résistances antimicrobiennes. Celles-ci peuvent toucher des antimicrobiens de très haute importance en santé humaine tels que les céphalosporines de troisième génération (exemple : ceftriaxone et ceftiofur) ou la colistine qui est utilisée en santé humaine pour combattre les bactéries résistantes aux céphalosporines de troisième génération et aux carbapénems.

Le mécanisme le plus important de résistance des *E. coli* aux céphalosporines de troisième génération est la production de bêta-lactamases à spectre étendu (ESBL) de type CTX-M et des AmpC-bêta-lactamases de type CMY. La production de ces enzymes est contrôlée par des gènes de mêmes noms qui sont le plus souvent localisés sur des éléments génétiques mobiles tels que les plasmides. Ces plasmides sont en même temps porteurs de gènes de résistance à d'autres antimicrobiens. La conséquence de cette co-localisation est que l'utilisation d'un seul antimicrobien peut conduire à la sélection des résistances à d'autres. Quant à la résistance à la colistine, elle est médiée par des mécanismes aussi bien chromosomiques que plasmidiques. Les plasmides porteurs de gènes *mcr* de résistance à la colistine sont parfois les mêmes qui portent les gènes d'ESBL/AmpC ; de ce fait, l'on se retrouve totalement démuné d'options thérapeutiques face aux bactéries qui possèdent un plasmide porteur à la fois de gènes d'ESBL/AmpC et *mcr*.

Au Québec, l'usage des antimicrobiens est strictement réglementé. Les céphalosporines de troisième génération ainsi que la colistine ne sont pas homologués en aviculture. Aucune étude n'a encore évalué la présence de *E. coli* aviaires résistants à la colistine au Québec, mais la présence des souches productrices de d'ESBL/AmpC a déjà été rapportée. En outre, peu d'études ont été effectuées sur l'identification des plasmides porteurs des gènes d'ESBL/AmpC. Au Sénégal et au Vietnam, aussi bien les céphalosporines de troisième génération que la colistine peuvent être utilisées en production avicole car l'utilisation d'antimicrobiens en production animale n'est pas réglementée dans ces pays. Des études ont

déjà rapporté la présence de gènes d'ESBL/AmpC et du gène *mcr-1* chez des *E. coli* aviaires au Vietnam, mais aucune étude de ce genre n'a été effectuée au Sénégal.

La présence des *E. coli* pathogènes et multirésistants dans des animaux et produits animaux destinés à la consommation humaine telle que la volaille représente un danger pour les humains. En effet, ceux-ci peuvent être transmis aux humains via des contacts directs ou lors de la consommation des produits contaminés. Pour estimer ce risque, il est important de mener des études pour estimer la prévalence de tels pathogènes dans les élevages. Il est aussi primordial de maintenir l'efficacité des antimicrobiens en entravant les voies de propagation de la RAM et pour y arriver, il faut préalablement connaître les mécanismes génétiques à la base de ces résistances.

Hypothèses :

- Les *E. coli* isolés des poulets sains et ceux provenant des poulets malades au Sénégal ont des profils comparables de RAM et de virulence;
- Les *E. coli* isolés de poulets de fermes au Canada (Québec), au Sénégal, et au Vietnam sont potentiellement capables d'infecter les humains et/ou résistants aux antimicrobiens d'importance critique pour les humains.
- La résistance aux antimicrobiens d'importance critiques en médecine humaine (C3G, fluoroquinolones et colistine) est plus élevée au Sénégal et au Vietnam comparativement au Canada (Québec);
- Il n'y a pas d'implication de clone pandémique de type ST131 dans la RAM des *E. coli* isolés des poulets dans les trois pays.

Objectifs

L'objectif de cette étude est de caractériser des *E. coli* isolés des poulets de fermes au Sénégal, au Québec et au Vietnam du point de vue de leur virulence et de leur résistance antimicrobienne.

Plus spécifiquement, il s'agit de :

1. Caractériser les *E. coli* isolés de poulets suspects de colibacilloses au Sénégal: identifier, sur la base de leurs profils de virulence et de résistance antimicrobienne, les isolats potentiellement à risque pour les humains.
2. Caractériser les *E. coli* isolés de poulets cliniquement sains au Sénégal : déterminer les profils de virulence et de résistance antimicrobienne, identifier les isolats potentiellement pathogènes pour les humains, les plasmides porteurs de gènes d'ESBL/AmpC ainsi que les facteurs de risque associés à la présence d'isolats résistants aux C3G dans les fermes.
3. Caractériser les *E. coli* isolés de poulets cliniquement sains au Québec : déterminer les profils de virulence et de résistance antimicrobienne, identifier les isolats potentiellement pathogènes pour les humains ainsi que les plasmides porteurs de gènes d'ESBL/AmpC.
4. Caractériser les *E. coli* isolés de poulets cliniquement sains au Vietnam : déterminer les profils de virulence et de résistance antimicrobienne, identifier les isolats potentiellement pathogènes pour les humains ainsi que les plasmides porteurs de gènes d'ESBL/AmpC.
5. Tester la susceptibilité à la colistine des isolats potentiels producteurs d'ESBL/AmpC isolés de fèces de poulets au Québec, au Sénégal et au Vietnam et déterminer si les gènes d'ESBL/AmpC de résistance aux céphalosporines de 3<sup>ème</sup> génération et *mcr-1* et *mcr-2* de résistance à la colistine coexistent dans ces isolats.

### **CHAPITRE III. ARTICLES SCIENTIFIQUES**

**Article 1.**

---

*Foodborne Pathogens and Disease*, 2018; 15(8):517-525. doi: [10.1089/fpd.2017.2394](https://doi.org/10.1089/fpd.2017.2394).

**Molecular characterization of *Escherichia coli* isolated from chickens with colibacillosis in Senegal**

Passoret Vounba<sup>1,2</sup>, Kane Yaghoub<sup>3</sup>, Cheikh Ndiaye<sup>4</sup>, Julie Arsenault<sup>1</sup>, John Morris Fairbrother<sup>1,2</sup>, and Rianatou Bada Alambédji<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Département de Pathologie et Microbiologie, Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Montréal, Saint-Hyacinthe, Canada ;

<sup>2</sup> Institut de recherche en santé publique de l'université de Montréal (IRSPUM) ;

<sup>3</sup> Ecole Inter-Etats des Sciences et Médecine Vétérinaires de Dakar (Sénégal) ;

<sup>4</sup> Cabinet et pharmacie vétérinaires du Stade Latdior de Thiès, Route de Mbour, Thiès (Sénégal).

**Keywords:** *Escherichia coli*, virulence, antimicrobial resistance, biofilm, clusters, sequence type, Senegal.

**Implication de l'auteur dans l'article:**

**Je suis le premier auteur de cet article. J'ai effectué toutes les analyses de laboratoire (sauf les séquençages). J'ai aussi activement participé à la conception de l'article par la rédaction initiale du manuscrit et aux analyses statistiques des données.**

## Abstract

Avian Pathogenic *Escherichia coli* (APEC), a subset of Extraintestinal Pathogenic *E. coli* (ExPEC), is the etiologic agent of avian colibacillosis, one of the main causes of economic losses in the poultry industry. The aim of this study was to characterize *E. coli* isolated from diseased chickens in Senegal in order to elucidate their virulence potential and antimicrobial resistance (AMR). A total of 58 isolates, each from a separate farm, were characterized for AMR, virulence and AMR genes, phylogroup, serogroup, biofilm formation, pulsed-field gel electrophoresis and for two isolates, whole genome sequencing.

Fifty isolates (86.2%) were multidrug-resistant (MDR). Many AMR genes were detected, including variants of *bla<sub>CTX-M</sub>* encoding resistance to third generation cephalosporins [5 isolates (8.6%)]. Most fluoroquinolone non-susceptible isolates (21/26) were carriers of mutations in *gyrA* (Ser83Leu, Asp87Asn and/or Asp87Tyr) and/or *parC* (Ser80Ile) genes. Forty-nine (84.5%) isolates exhibited at least one of the virulence markers of APEC among which 23 (39.7%) were defined as potential virulent APEC. In addition, ten isolates, of which nine were defined as APEC, carried virulence profiles corresponding to ExPEC. Seven isolates, of which six were classified as ExPEC, belonged to phylo-serogroup F-O25, and following whole genome sequencing of two of these isolates, were found to belong to the serotype O25:H1 and to the sequence type ST624. Some isolates classified as ExPEC, including F-O25, were found to strongly produce biofilm suggesting their capability to persist for long time in the environment. F-O25-isolates, although found in different widely separated farms, formed a single cluster which included clones, suggesting that these isolates may have originate from a common source. Taken together, these results suggest that some *E. coli* involved in chicken colibacillosis in Senegal may pose a human health risk.

## **Introduction**

Avian Pathogenic *Escherichia coli* (APEC), a subgroup of Extraintestinal Pathogenic *E. coli* (ExPEC), is the etiologic agent of avian colibacillosis which is responsible for huge economic losses in the poultry industry worldwide (Stacy et al., 2014). In some cases, APEC strains cannot be clearly distinguished from ExPEC associated with human infections based on their genome content suggesting their zoonotic potential (Mellata, 2013). It has recently been found that chicken fecal *E. coli* isolates possessing ExPEC-associated genes can cause ExPEC-associated illnesses in animal models for human infections (Stromberg et al., 2017), reinforcing this suggestion.

Antimicrobial resistance (AMR) is becoming more and more worrying both in human and animal medicine due to the increasing number of ineffective antimicrobial agents. A growing prevalence in resistance to critically important antimicrobials in human medicine, such as third-generation cephalosporins and fluoroquinolones, is also observed in *E. coli* isolated from chickens. Fluoroquinolone resistance in *E. coli* is mainly due to mutations in quinolone resistance-determining regions (QRDR) of *gyrA* and *parC* genes whereas cephalosporin resistance is mostly linked to production of Extended-Spectrum Beta-Lactamases/Cephamycinases (ESBL/AmpC). *E. coli* producing ESBL/AmpC are associated with multidrug-resistance (MDR) because of co-harboring several other resistance genes (Mathers et al., 2015).

Production of biofilm is a pathogenic mechanism in many bacteria (Costerton et al., 1999). It confers a great advantage to producer strains by allowing them to persist in the environment or preserving them against iron deprivation, osmotic stress or therapeutic doses of antimicrobials (Watnick and Kolter, 2000; Vogeleer et al., 2015).

In Senegal, no data is available on virulence and AMR profiles of *E. coli* isolated from chickens. Since most farms are located in residential areas (FAO, 2014), this study aimed to characterize *E. coli* associated with chicken colibacillosis in order to determine its potential human health hazard.

## **Materials and methods**



## **Bacterial isolates**

Fifty-eight *E. coli* isolates, each from a separate farm with problems of colibacillosis in the regions of Dakar and Thiès, where more than 80% of commercial poultry farms in Senegal are located (FAO, 2014), were used in this study. Chicks originated from one of four local hatcheries. Isolates were collected at post-mortem examination from diverse organs (liver, heart, intestines and spleen) showing typical lesions of colibacillosis of 15- to 45-day-old chickens in 2010. Isolates were confirmed as *E. coli* by biochemical reactions using API20E system (Bio Mérieux S.A, France).

## **O serotyping**

Isolates were tested for 86 O-serogroups described at [www.ecl-lab.com/en/products/serotyping.asp](http://www.ecl-lab.com/en/products/serotyping.asp) by standard agglutination methods (Orskov et al., 1977).

## **Detection of virulence and antimicrobial resistance genes and determination of phylogroups**

Isolates were tested by PCR for ExPEC (Johnson et al., 2003a, 2003b) and APEC (Johnson et al., 2008) virulence genes and other virulence-associated genes that may be used to further discriminate APEC isolates (Ewers et al., 2007), and for 15 AMR genes. The ExPEC virulence genes used in this study were identified as predictive of ExPEC status based on statistical analyses of virulence typing results from different strain collections and epidemiological sources such as symptomatic urinary tract infection versus fecal or observed extraintestinal virulence in animal model of infection (Johnson et al., 2003a). Furthermore, *bla*<sub>CTX-M</sub>-positive isolates were tested by PCR for CTX-M-1, -2, -8 and -9 groups. PCR amplicons were purified using QIAquick<sup>®</sup> PCR purification kit (Qiagen, Germany), then sequenced in Applied Biosystems (3500 Genetic Analyser) using the same PCR primer sets. Sequences were compared to known sequences using the resistance determinants data base (<http://www.fibim.unisi.it/REDDB/BlastInterface.asp>).

PCR procedures were performed according to the protocol available on the APZEC website (<http://apzec.ca/en/Protocols>) and in Supplementary Table S1.

Phylogenetic grouping was performed using a multiplex PCR-based assay (Clermont et al., 2000). Isolates of phylogroup D underwent further phylotyping using the revised method (Clermont et al., 2013) in Supplementary Table S2.

### **Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE)**

Isolates were subtyped by the standardized rapid PFGE using *XbaI* enzyme (Ribot et al., 2006). The similarities of fragments were compared using a Dice coefficient at 1% tolerance and 0.5% optimization, and a dendrogram was generated in BioNumerics (Applied Maths) software (v. 6.6) under the UPGMA clustering method. Clusters were defined as isolates sharing at least 65% of similarity (cut-off value) and PFGE groups (*i.e.* subclusters) were defined as isolates sharing at least 80% of similarity (McLellan et al., 2003).

### **Antimicrobial susceptibility testing**

Susceptibility of isolates was tested for 14 antimicrobials belonging to 9 classes as used in the Canadian Integrated Program for Antimicrobial Resistance Surveillance (CIPARS, 2009), using the disk diffusion (Kirby–Bauer) assay as previously described (CLSI, 2008). Breakpoints were those recommended by the Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI) in 2016 (CLSI, 2016) for most of the antimicrobials and in 2015 for ceftiofur (CLSI, 2015).

### **Detection of mutations in the quinolone resistance-determining regions (QRDR)**

The regions of *parC* and *gyrA* analogous to the QRDR were amplified by PCR in 26 quinolone non-susceptible isolates, as described previously (Everett et al., 1996). PCR amplicons were purified as described above, and the forward strand of each gene was sequenced in Applied Biosystems (3500 Genetic Analyser) using the same PCR primer sets. Sequences of *gyrA* and *parC* genes were compared, for each isolate, with the respective reference sequences (with *E. coli* K-12 used as reference) using the Molecular Evolutionary Genetics Analysis software (<http://www.megasoftware.net/>).

### ***In vitro* biofilm formation assay**

Biofilm formation was evaluated in M9 minimum medium (Tremblay et al., 2015). Each isolate was tested in triplicate in two experiments and results were averaged. On the base of the optical density (OD), the cut-off OD (OD<sub>c</sub>) was defined as three standard deviations above the mean of OD of the negative control (Stepanović et al., 2004). Isolates were classified as non-producers (OD<OD<sub>c</sub>); weak producers (OD<sub>c</sub><OD<2xOD<sub>c</sub>); moderate producers (2xOD<sub>c</sub><OD<4xOD<sub>c</sub>) and strong producers (4xOD<sub>c</sub><OD) of biofilm.

#### Whole genome sequencing (WGS) and *In Silico* analysis

DNA of two isolates (EcL17 and EcL73) was purified using QIAamp DNA minikit (Qiagen) according to the manufacturer's instructions. WGS and assembly reads were performed, on an Illumina MiSeq (Illumina, San Diego, CA) using a Nextera XT library, as previously described (Mohsin et al., 2017). Isolates EcL17 and EcL73 were selected for WGS because each belong to one clone and both were included in the major PFGE 13 group of which isolates were mostly classified as ExPEC. *In silico* analysis was performed for multilocus sequence types (MLST), serotypes, and plasmid replicon types using the Bacterial Analysis Pipeline Tool (GoSeqIt and Center for Genomic Epidemiology (<http://www.genomicepidemiology.org/>)) available via [Illumina BaseSpace Sequence Hub](#).

#### Statistical analysis

Descriptive statistics were used to present the data. A linear regression model was used to compare the natural logarithm of biofilm formation (measured by optical density) between three major phylogroups with Tukey post-hoc adjustment for multiple-comparisons. All statistical analyses were performed using SAS 9.4. P-values < 0.05 were considered statistically significant.

#### Results

##### ***E. coli* isolated from chicken colibacillosis possess ExPEC virulence factors**

Isolates belonged to phylogroups A [30 (51.7%)], B1 [15 (25.9%)], and D [13 (22.4%)]. When isolates of phylogroup D were tested by the revised phylotyping method (Clermont et al., 2013), they were re-assigned to phylogroups F (11 isolates), E and B1 (1 isolate each). Serogroups O25 [8 (13.8%)], O15 [6 (10.3%)], O23 and O113 [3 (5.2% each)] were the most

prevalent. PFGE analysis showed a high degree of genetic diversity. Based on  $\geq 65\%$  similarity, 13 major clusters (I-XIII), each including at least two isolates, were observed and 39 PFGE groups (1-39) were found when the similarity cut-off between isolates was set at 80% (Figure 1). Certain multi-isolate clusters were well correlated with phylogroups and serogroups. Indeed, the seven isolates of cluster IV (PFGE groups 13 and 14) all belonged to serogroup O25 and phylogroup F, group 13 even including two pulsotypes (each consisting of two isolates sharing 100% genetic similarity). In addition, the five isolates of cluster VIII belonged to serogroup O15 and were mostly phylogroup A, three of four isolates of cluster IX belonged to phylogroup A and serogroup O23, the three isolates of cluster XIII belonged to phylogroup A and serogroup O113 and the two isolates of cluster III belonged to phylogroup B1 and serogroup O88. Whole genome sequencing of two isolates (ECL17 and ECL73) of the F-O25 group revealed that they belonged to the O25: H1 serotype and sequence type ST624, and carried the incompatibility plasmids *incFII*, *incFIA*, *incFIB* and *colRNAI*. In addition, isolates of PFGE groups 34 and 38 were isolated from chickens originating from the same hatchery, and four isolates of the F-O25 PFGE group 13, including those of one pulsotype, were from chickens originating from a single hatchery. Using the genetic criteria that define APEC isolates (Johnson *et al.*, 2008), we classified isolates that had at least four of the five virulence genes *iucD*, *iroN*, *iss*, *hlyF* and *ompT* as potentially highly virulent APEC, and thus, 23 (39.7%) isolates met this definition. Both isolates belonging to serogroup O88 (cluster III) and most of the group F-O25 isolates (cluster IV) were classified as potentially highly virulent APEC. The presence of these potential highly virulent APEC was also observed sporadically in other clusters. On the basis on criteria defining ExPEC, *i.e.* exhibited  $>2$  of *pap* (P fimbriae), *sfa/foc* (S/F1C fimbriae), *afa/dra* (Dr binding adhesins), *iutA* (aerobactin receptor), and *kpsMIII* (group 2 capsule synthesis) (Johnson *et al.* (2003a, 2003b)), one isolate of serogroup O18 / phylogroup B1, and almost all isolates of the group F-O25 were classified as ExPEC. These isolates were frequently positive for the *kpsMIII* gene. However, isolates of serogroup O23 which were not classified as ExPEC were also frequently positive for the *kpsMIII* gene.

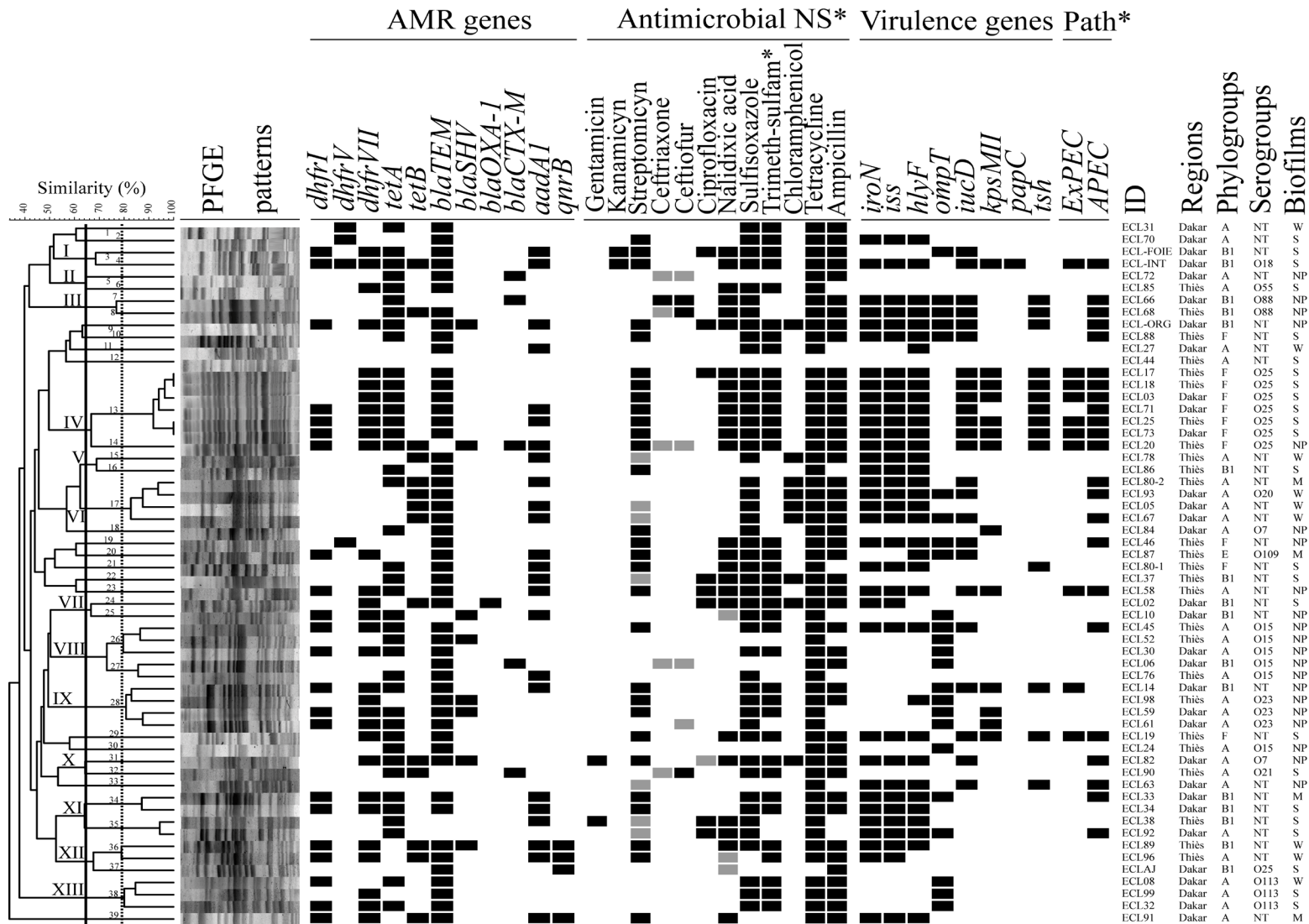


Figure 1. Results of clustering analysis of 58 *Escherichia coli* isolated from diseased chickens in Senegal.

The dendrogram was generated using Dice coefficient and the UPGMA. Based on a similarity index of  $\geq 65\%$  (continuous line), 13 major clusters (I–XII) were found, inside which 39 PFGE groups (in Arabic numerals) were identified when the similarity was set at 80% (discontinued line). antimicrobial NS\*, antimicrobial nonsusceptibility; Path\*, pathotypes; ExPEC, potential ExPEC; APEC, virulent APEC; Trimeth-sulfam\*, trimethoprim–sulfamethoxazole; ID, identity of isolates; NT, nontypeable. Black boxes indicate phenotypical antimicrobial resistance, the presence of virulence genes, the presence of antimicrobial resistance genes, or a potential ExPEC isolate or virulent APEC. Gray boxes symbolize isolates with intermediate susceptibility to antimicrobials. No isolate was nonsusceptible to amoxicillin/clavulanate or cefoxitin and they were removed. Likewise, all isolates were negative for blaCMY-2, qnrA, tetC, sfa, afa, and cnf genes. Biofilms: S, strong producer; M, moderate producer; W, weak producer; NP, nonproducer. AMR, antimicrobial resistance; APEC, Avian Pathogenic *E. coli*; ExPEC, extraintestinal pathogenic *E. coli*; PFGE, pulsed-field gel electrophoresis; UPGMA, unweighted-pair group method with arithmetic mean.

### Clinical *E. coli* isolates displayed resistance against several antimicrobials

The prevalence of AMR was highest for tetracycline, sulfisoxazole, ampicillin, trimethoprim-sulfamethoxazole and streptomycin (Figure 2). AMR was also observed at a lower level in antimicrobials critically important in animal health (ceftiofur) or human health (ciprofloxacin and ceftriaxone).

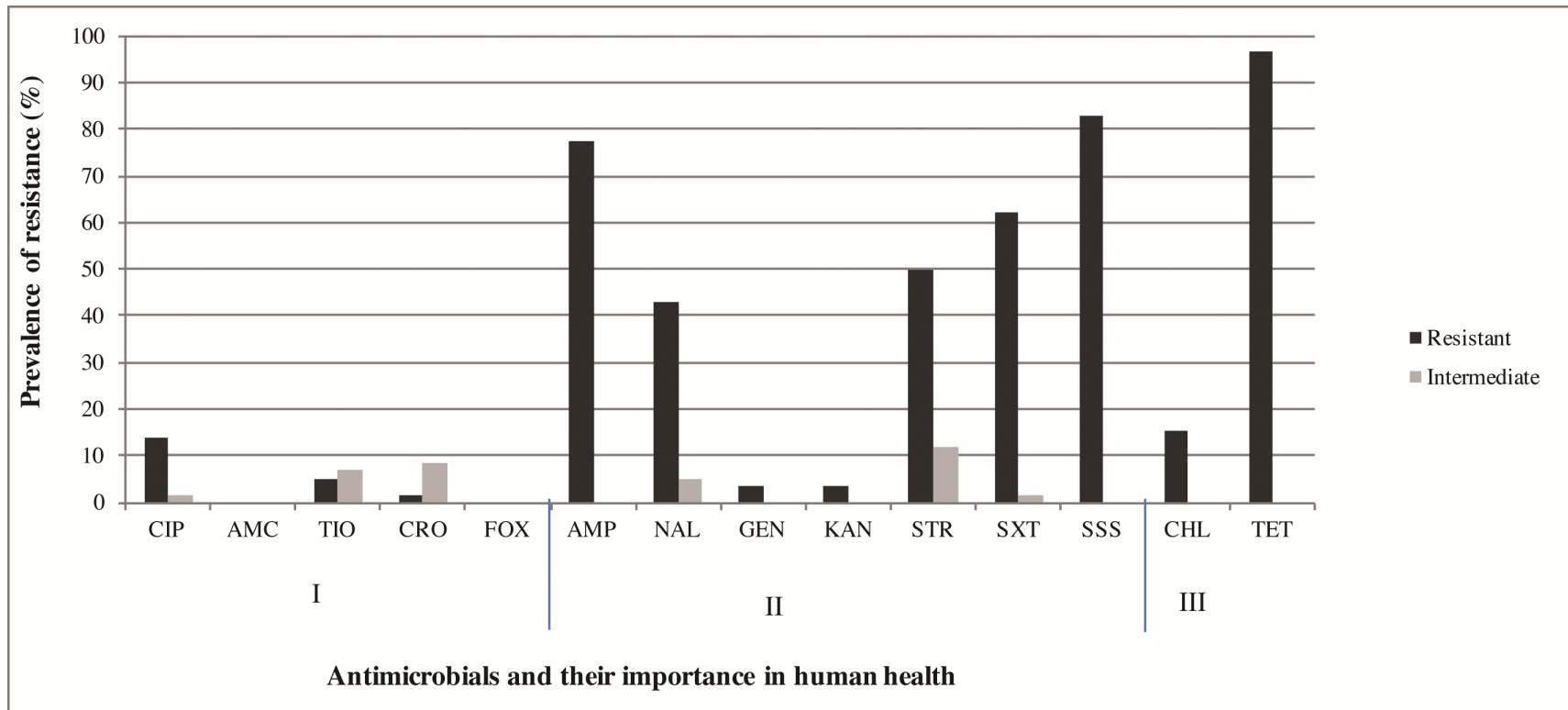
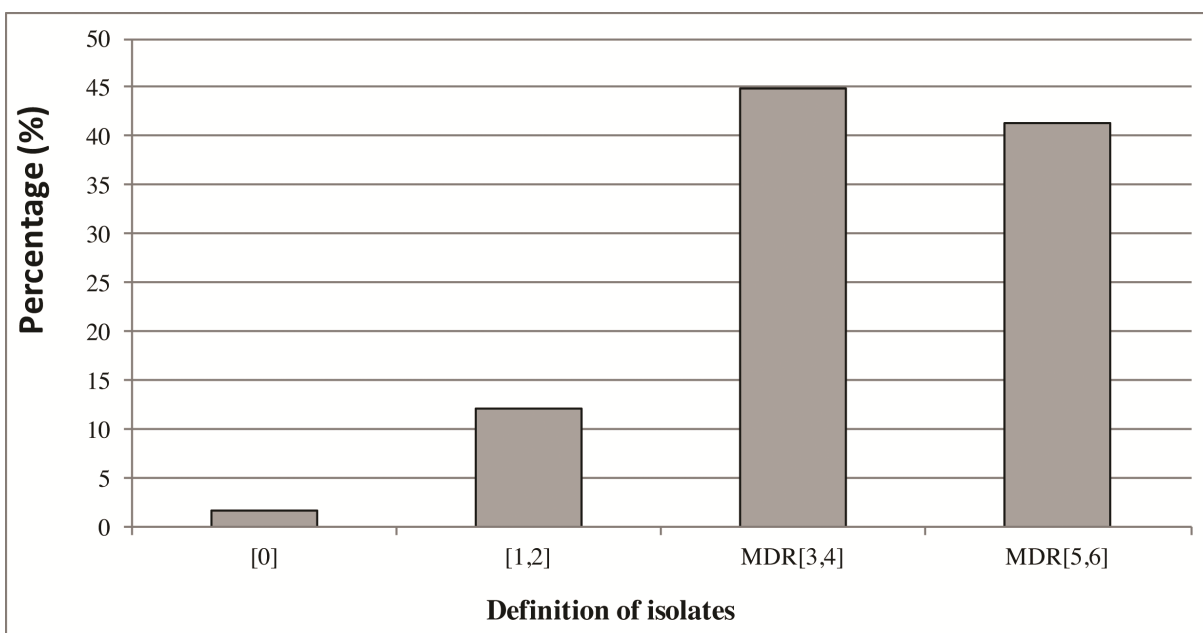


Figure 2. Prevalence of AMR in 58 clinical *Escherichia coli* isolated from chickens in Senegal.

Importance in human health (CIPARS, 2009): (I) very high importance, (II) high importance, (III) moderate importance. Antimicrobials: AMC, amoxicillin/clavulanic acid; AMP, ampicillin; CHL, chloramphenicol; CIP, ciprofloxacin; CRO, ceftriaxone; FOX, ceftiofur; GEN, gentamicin; KAN, kanamycin; NAL, nalidixic acid; SSS, sulfisoxazole; STR, streptomycin; SXT, trimethoprim– sulfamethoxazole; TET, tetracycline; TIO, ceftiofur. AMR, antimicrobial resistance.



Fifty (86.2%) isolates were non-susceptible (resistant or intermediate) to at least 3 classes of antimicrobials and thus, were defined as Multidrug-resistant (MDR), non-susceptibility being observed in up to 6 classes (Figures 1 and 3). Isolates of cluster IV were all MDR [5, 6], whereas isolates of cluster VI were all MDR [3, 4] or MDR [5, 6].



**Figure 3. Multidrug resistance (MDR) definitions of 58 clinical *Escherichia coli* isolated from disease chickens from Senegal, according to definition of Magiorakos et al. (2012).**

MDR, multidrug resistance (nonsusceptible to at least one antimicrobial for three or more antimicrobial classes).

Beta-lactamase-associated genes *bla<sub>TEM</sub>*, *bla<sub>SHV</sub>*, *bla<sub>CTX-M</sub>* and *bla<sub>OXA-1</sub>* were detected in 50 (86.2%), 8 (13.8%), 5 (8.6%), and 1 (1.7%) isolates, respectively; *bla<sub>CTX-M</sub>* being of genotypes *bla<sub>CTX-M-1</sub>* (isolate EcL66) and *bla<sub>CTX-M-8</sub>* (isolates EcL06, 20, 72 and 90). All isolates positive for *bla<sub>CTX-M</sub>* were non-susceptible to both ceftriaxone and ceftiofur. Four (6.9%) isolates were found to be positive to fluoroquinolone resistance gene *qnrB*, although none of these were ciprofloxacin-resistant. The trimethoprim-sulfamethoxazole resistance genes *dhfrI* [22 (37.9%)] and *dhfrVII* [30 (51.7%)] were detected frequently. The tetracycline resistance gene (*tetA*) and streptomycin resistance gene (*aadA1*) were also detected frequently (Figure 1).

In addition, most of the PFGE group 13 isolates, including those of group F-O25, were positive for AMR genes *tetA*, *dhfrVII* and *bla<sub>TEM</sub>*. Isolates of PFGE group 17 were mostly positive for the AMR genes *tetB*, *bla<sub>TEM</sub>* and *aadA1*, whereas those of group 38 were mostly positive for the AMR genes *dhfrI*, *dhfrVII*, *tetA* and *bla<sub>TEM</sub>*.

Of the 26 quinolone non-susceptible-isolates, 21 (80.7%) showed changes in amino acids encoded by *gyrA* and/or *parC* genes (Table 1). Three amino acid changes were detected at two positions in *gyrA* (Ser83Leu, Asp87Asn and Asp87Tyr) and a Ser80Ile mutation was observed in the *parC* gene. All isolates displaying non-susceptibility to ciprofloxacin were carriers of one or more mutations in *gyrA* and most were also carriers of a mutation in the *parC* gene whereas ciprofloxacin-susceptible, nalidixic acid resistant isolates carried only one or no mutations in these genes.

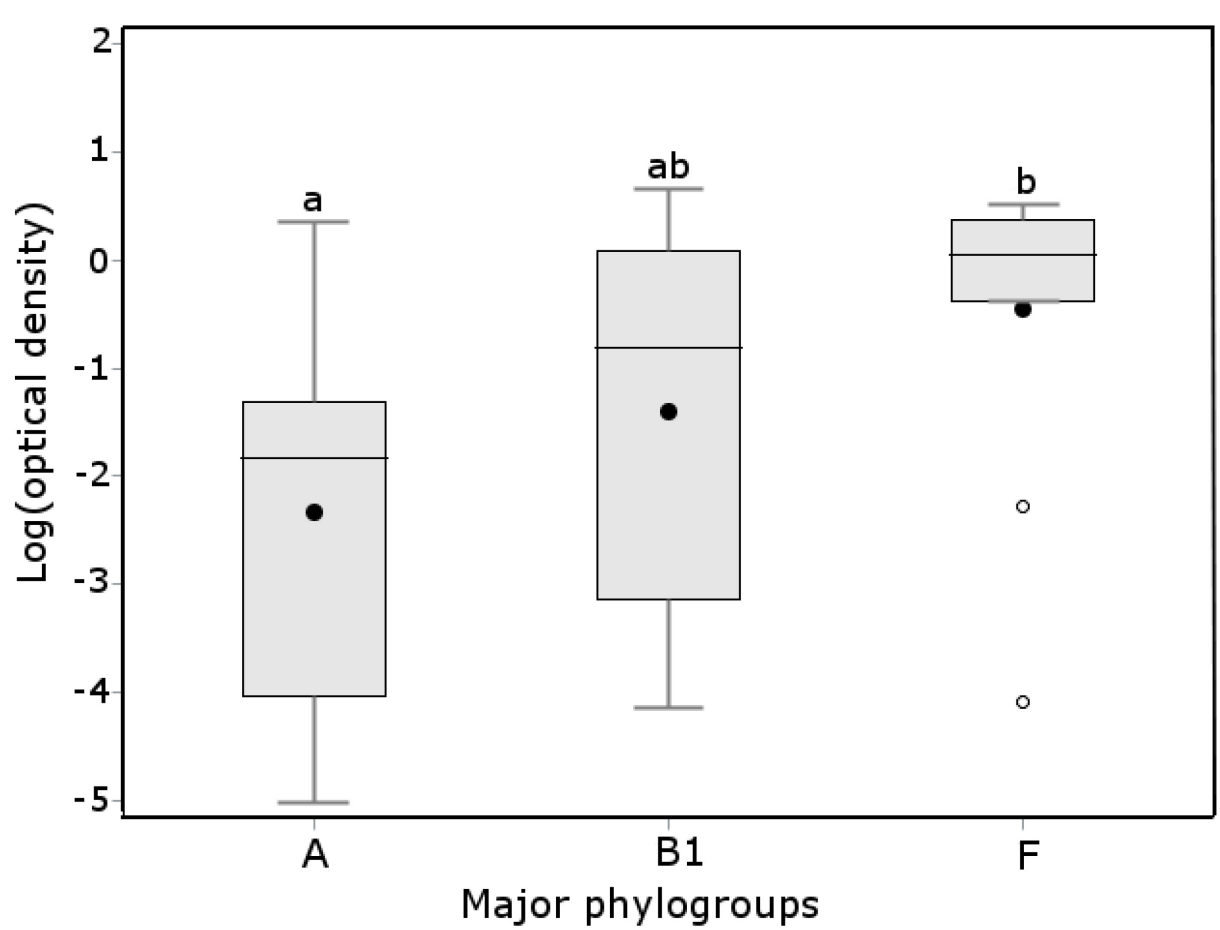
**Table 1.** Relationship between quinolone resistance and presence of mutations in *gyrA/parC* genes, and of *qnrB* gene in *Escherichia coli* isolated from diseased chickens in Senegal.

No. of isolates	Resistant to :		Amino acid substitution			Presence of :
	NAL	CIP	<i>gyrA</i>		<i>parC</i>	
Total			Ser83	Asp87	Ser80	<i>qnrB</i>
6	6	6	Leu	Asn	Ile	-
3	3	3	Leu	-	-	-
10	10	0	Leu	-	-	-
1	1	0	Leu	-	-	+
1	1	0	-	Tyr	-	-
3	3	0	-	-	-	+
2	2	0	-	-	-	-

No.: number; NAL: nalidixic acid; CIP: ciprofloxacin; Ser: serine; Asp: aspartic acid; Asn: asparagine; Tyr: tyrosine; Ile: isoleucine.

### Biofilm formation was different between phylogroups

Isolates were divided into strong [24 (41.4%)], intermediate [4 (6.9%)], weak [9 (15.5%)] and non- [21 (36.2%)] biofilm producers. Isolates of phylogroup F produced significantly stronger biofilms ( $p=0.002$ ) compared to those belonging to phylogroup A (Figure 4).

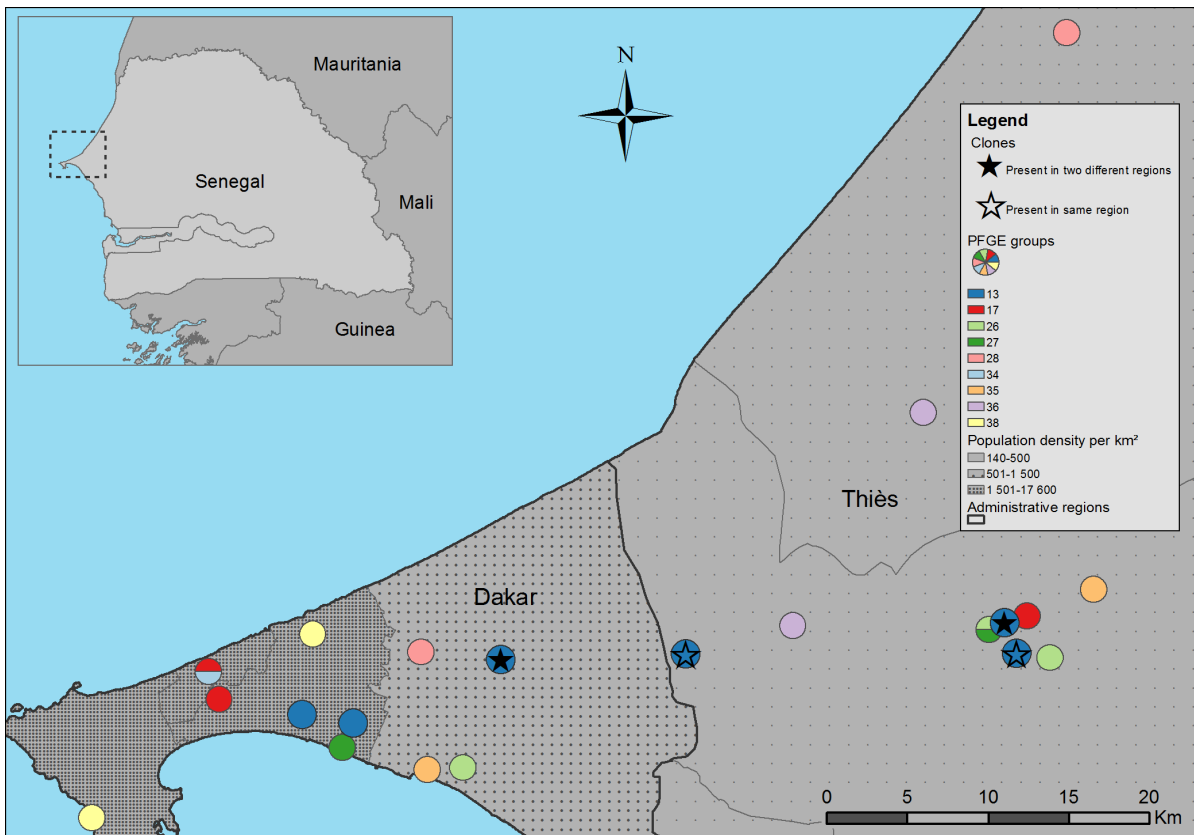


**Figure 4. Biofilm formation of 58 clinical *Escherichia coli* isolates in M9 with glucose (0.4% wt/vol) in relation with major phylogroups.**

Phylogroups with different letters produce significantly different biofilm. The box represents the interquartile range (25th to 75th percentile), the horizontal bar through the box symbolizes the median, the black dot in the box symbolizes the mean, the whiskers represent the 5<sup>th</sup> and 95<sup>th</sup> percentile values, and the circles represent the outliers. Optical density was measured at 590 nm.

**Multidrug-resistant, potential ExPEC isolates were present in densely populated areas**

For almost all PFGE groups, including PFGE group 13, isolates were located in both Dakar and Thiès regions (Figure 5). On the other hand, isolates of groups 34 and 38 were found only in Dakar and of group 36 only in Thiès. In addition, isolates of PFGE group 13 which may pose public health concerns were detected on different farms in areas with high human population density (Figure 5).



**Figure 5. Pie map showing the distribution of clinical *Escherichia coli* isolates forming the main PFGE groups of at least 80% similarity in the regions of Dakar and Thiès.** Isolates were geocoded at the centroid of the city of the chicken farm of origin. PFGE groups are showed by number. Population density per km<sup>2</sup> is illustrated based on data from ANSD (2014). This map was made using ArcGis 10.3.1. It should be noted that PFGE group 13 is potentially composed of isolates belonging to serotype O25:H1 and ST624 since the whole-genome sequencing has shown that two of the isolates of the group are O25:H1-ST624. PFGE, pulsed-field gel electrophoresis.

## Discussion

Our results clearly demonstrate that among *E. coli* isolated from chickens with colibacillosis in Senegal, some may be capable of infecting humans, based on criteria proposed by Johnson *et al.* (2003). Although cases of transmission of different food-borne zoonoses to humans through consumption or handling of contaminated food are well documented (Rangel *et al.*, 2005), there is a lack of data on the possibility of direct transmission of pathogens from diseased production animals housed in urban areas to humans. In Senegal, the poultry farming system is dominated by sectors 2 and 3 (FAO, 2014), where chickens can be sold live in markets and poultry production units can be located in inhabited houses. Some chicken farms use makeshift cages, usually installed in houses in a corner of the courtyard or on the terrace of houses (FAO, 2014). Because of this close contact between poultry and humans, it is possible that pathogenic or antimicrobial resistant bacteria may be transmitted, by direct contact, from diseased animals to humans. The risk of this transmission is probably even greater because of the presence of multidrug-resistant isolates potentially capable of infecting humans in areas of high human density. Cases of transmission of antimicrobial resistant *E. coli* from chickens to humans have been documented (Linton *et al.*, 1977) and, more recently, the strongest evidence of the ability of ExPEC isolated from chickens to infect humans has been supported by use of animal models of human infection (Stromberg *et al.*, 2017).

Our finding of isolates of closely related PFGE groups on geographically distant farms suggests a common source of infection or a transmission between farms. In Senegal, poultry farmers obtain day-old chicks from hatcheries that produce them from fertilized eggs imported from Europe (FAO, 2014). The finding of isolates from the same PFGE group or even the same clone, from chickens originating from the same hatchery could suggest that hatcheries are a possible source of contamination. However, the possibility that these potential ExPEC were transmitted from other animal species or from humans to chickens at the farm level cannot be excluded because of the management practices in farms in Senegal. In this country, as in most African countries, in addition to close proximity between farms and human residences, it is not uncommon to find other domestic animal species (ruminants, dogs, etc.) living together with chickens. Indeed, colibacillosis in birds can result from infection by isolates of a pathotype other than APEC (Collingwood *et al.*, 2014).

All isolates of serogroup O25 / phylogroup D were placed in the new phylogroup F. Phylogroup F is closely related to phylogroups B2 and D which are associated with disease in humans (Clermont *et al.*, 2013) and O25-isolates have been linked with neonatal meningitis (Bingen *et al.*, 1998). These isolates of group F-O25 were MDR with many virulence genes and WGS showed that two of these isolates are of a clonal group O25:H1-ST624. This was the first report of *E. coli* serotype O25:H1 isolated from diseased chickens that belong to ST624. These O25:H1-ST624 isolates were not resistant to cephalosporins or fluoroquinolones and they did not carry the putative fitness genes which may be involved in the ecological success of ST131 (Mathers *et al.*, 2015). Nevertheless, *E. coli* of ST624 have already been isolated from human patients (Djamdjian *et al.*, 2011; Poirel *et al.*, 2016), in addition to being identified in chickens with colibacillosis (Solà-Ginés *et al.*, 2015). Our ST624 isolates were also carriers of replicon plasmid incFII which was considered as an epidemic plasmid (Carattoli, 2009). Further studies are warranted to elucidate why these strains predominated in this study of chickens with colibacillosis in Senegal, and what role they have in causing disease.

We observed a high level of MDR, which could be explained by the lack of control on antimicrobial use in Senegal. In fact, in Senegal, antimicrobials, including those used in human medicine, may be purchased by farmers from a street vendor and used prophylactically in poultry (FAO, 2014). The high prevalence of the genes encoding resistance against ampicillin, trimethoprim-sulfamethoxazole and streptomycin observed in our study could be explained by fact that these antimicrobials are commonly employed in veterinary practices in addition to being used for treatment of different human bacterial diseases (Bada-Alamedji *et al.*, 2006; Cardinale *et al.*, 2005). Surprisingly, *bla*<sub>CTX-M-1</sub> and <sub>-8</sub>-positive isolates non-susceptible to ceftriaxone and ceftiofur were identified in this study. The limited availability and high costs of these antimicrobials would limit the probability that they would be administered to poultry. The presence of these ESBL-encoding genes in isolates could be explained by the use of other antimicrobials which could have co-selected resistance due to co-location of different AMR genes on a same mobile element leading to the selection of genes conferring resistance to non-used antimicrobials (Johnson *et al.*, 2016). These *E. coli* carrying *bla*<sub>CTX-M</sub> also may have been transmitted to chickens by wild birds that can act as

reservoirs of AMR (Hasan et al., 2012). It is also possible, given the proximity between farms and human dwellings that these ESBL-producing isolates originate from humans. However, there is need to conduct other studies to elucidate these hypotheses.

Among quinolone-non-susceptible, only four isolates carried a *qnr* gene whereas almost all had a mutation in the *gyrA* and/or *parC* genes. The mutations observed here were already reported (Minarini et al., 2012), reinforcing the findings of these authors that quinolone-resistance is mostly due to mutations in *gyrA* and *parC* genes. Although there are no recent studies showing the use of quinolones in poultry farming in Senegal which could explain these mutations, these antimicrobials were introduced to poultry farming in 1996 in order to treat respiratory and intestinal infections (Cardinale et al., 2005).

Isolates of phylogroup F, of which most were defined as ExPEC, produced more extensive biofilms compared to those of phylogroup A. Stromberg et al. (2017) also reported that isolates classified as ExPEC produced strong biofilm in comparison to non-ExPEC isolates. This capacity to produce biofilm suggests that these potential ExPEC can persist for long periods in the environment and in host tissues, thus increasing the probability that they infect animal or human hosts and cause disease.

In conclusion, some *E. coli* isolated from chickens with colibacillosis on different farms in Senegal, especially those belonging to group F-O25, are MDR, potentially highly virulent and clonally related, suggesting their circulation between farms and are present in areas highly populated by humans. Together, these results suggest that *E. coli* isolated from chickens with colibacillosis in Senegal may pose a threat to humans.

### **Acknowledgments**

We thank the Agence Universitaire de la Francophonie (AUF) for its financial support.

We also thank Moussa SENE (Microbiology Laboratory of Veterinary school of Dakar), and Dr. Ghyslaine Vanier and Gabriel Desmarais (OIE reference laboratory for *E. coli*, Université de Montreal, Canada) for their excellent technical assistance and the Senegalese private vets where the clinical cases were collected. Finally, our sincere thanks to Dr. Mario Jacques and Dr. Skander Hathroubi for the provision of technical expertise for biofilm formation assay.

Funding: This work was supported by a grant from the Centre de Recherche en Infectiologie Porcine and Aviaire (CRIPA) of the Université de Montréal and from the Institut de Recherche en Santé Publique de l'Université de Montréal (IRSPUM).

**Interest conflict:** none.



## References

- [ANSD] Agence Nationale de la Statistique et de la Démographie, Sénégal. Recensement général de la population et de l'habitat, de l'agriculture et de l'élevage (RGPHAE), 2013.
- [CLSI] Clinical and Laboratory Standard Institute. Performance standards for antimicrobial 417 disk and dilution tests for bacterial isolated from animals, CLSI document M31-A3. 418 Wayne: Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI), 2008. 116 p.
- [CLSI] Clinical and Laboratory Standard Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 26th ed. CLSI supplement M100S. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2016. 256 p.
- [CLSI] Clinical and Laboratory Standard Institute. Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated From Animals. 3rd ed. CLSI supplement VET01S. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2015. 128 p.
- Bada-Alambédi R, Fofana A, Seydi M, Akakpo AJ. Antimicrobial resistance of *Salmonella* isolated from poultry carcasses in Dakar (Senegal). *Braz J Microbiol* 2006; 37: 510-515.
- Bingen E, Picard B, Brahimi N, Mathy S, Desjardins P, Elion J, Denamur E. Phylogenetic analysis of *Escherichia coli* strains causing neonatal meningitis suggests horizontal gene transfer from a predominant pool of highly virulent B2 group strains. *J Infect Dis* 1998; 177:642-650.
- Borgogna TR, Borgogna JL, Mielke JA, Brown CJ, Top EM, Botts RT, Cummings DE. High Diversity of CTX-M Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamases in Municipal Wastewater and Urban Wetlands. *Microb Drug Resist* 2016; 22: 312–320.
- Carattoli A. Resistance plasmid families in *Enterobacteriaceae*. *Antimicrob agents Chemother* 2009; 53: 2227-2238.

- Cardinale E, Perrier Gros-Claude JD, Rivoal K, Rose V, Tall F, Mead G, Salvat G. Epidemiological analysis of *Salmonella enterica ssp. enterica* serovars Hadar, Brancaster and Enteritidis from humans and broiler chickens in Senegal using pulsed-field gel electrophoresis and antibiotic susceptibility. *J Appl Microbiol* 2005; 99: 968-977.
- CIPARS. Resistance to antimicrobials in *Escherichia coli* isolates from chickens; Abattoir Surveillance. Access online: <http://www.phac-aspc.gc.ca/cipars-picra/2009/1-eng.php> [Visited on 2016-05-12].
- Clermont O, Bonacorsi S, Bingen E. Characterization of an anonymous molecular marker strongly linked to *Escherichia coli* strains causing neonatal meningitis. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 1770-1772.
- Clermont O, Bonacorsi S, Bingen E. Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. *Appl Environ Microbiol* 2000; 66: 4555–4558.
- Clermont O, Christenson JK, Denamur E, Gordon DM. The Clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: improvement of specificity and detection of new phylo-groups. *Environ Microbiol Rep* 2013; 5:58-65.
- Clermont O, Lescat M, O'brien CL, Gordon DM, Tenailon O, Denamur E. Evidence for a human-specific *Escherichia coli* clone. *Environ Microbiol* 2008; 10: 1000-1006.
- Collingwood C, Kemmett K, Williams N, Wigley P. Is the Concept of Avian Pathogenic *Escherichia coli* as a Single Pathotype Fundamentally Flawed? *Front Vet Sci* 2014; 1:5. doi: 10.3389/fvets.2014.00005. eCollection 2014.
- Costerton JW, Stewart PS, Greenberg E. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Sci* 1999; 284:1318-1322.
- Daigle F, Harel J, Fairbrother JM, Lebel P. Expression and detection of pap-, sfa-, and afa-encoded fimbrial adhesin systems among uropathogenic *Escherichia coli*. *Can J Microbiol* 1994; 40:286-291.

- Djamdjian L, Naas T, Tandé D, Cuzon G, Hanrotel-Saliou C, Nordmann P. CTX-M-93, a CTX-M variant lacking penicillin hydrolytic activity. *Antimicrob agents Chemother* 2011; 45: 1861–1866.
- Dozois CM, Dho-Moulin M, Brée A, Fairbrother JM, Desautels C, Curtiss R. Relationship between the Tsh autotransporter and pathogenicity of avian *Escherichia coli* and localization and analysis of the Tsh genetic region *Infect Immun* 2000; 68:4145-4154.
- Everett MJ, Jin YF, Ricci V, Piddock LJV. Contributions of individual mechanisms to fluoroquinolone resistance in 36 *Escherichia coli* strains isolated from humans and animals. *Antimicrob agents Chemother* 1996; 2380–2386.
- Ewers C, Li G, Wilking H, Kießling S, Alt K, Antão E-M, Laternus C, Diehl I, Glodde S, Homeier T. Avian pathogenic, uropathogenic, and newborn meningitis-causing *Escherichia coli*: how closely related are they? *Int J Med Microbiol* 2007; 297 : 163-176.
- FAO, 2014. Secteur Avicole Senegal. Revues nationales de l'élevage de la division de la production et de la santé animales de la FAO. Rome 7, 78p.
- Gow SP, Waldner CL, Harel J, Boerlin P. Associations between antimicrobial resistance genes in fecal generic *Escherichia coli* isolates from cow-calf herds in western Canada. *Appl Environ Microbiol* 2008; 74: 3658-3666.
- Hasan B, Sandegren L, Melhus Å, Drobni M, Hernandez J, Waldenström J, Alam M, Olsen B. Antimicrobial drug-resistant *Escherichia coli* in wild birds and free-range poultry, Bangladesh. [Emerg Infect Dis](#) 2012; 18: 2055–2058.
- Herrero M, De Lorenzo V, Neilands J. Nucleotide sequence of the *iucD* gene of the pColV-K30 aerobactin operon and topology of its product studied with *phoA* and *lacZ* gene fusions. *J Bacteriol* 1988 ; 170: 56-64.
- Johnson JR, Kuskowski MA, Owens K, Gajewski A, Winokur PL. Phylogenetic Origin and Virulence Genotype in Relation to Resistance to Fluoroquinolones and/or Extended-

Spectrum Cephalosporins and Cephamycins among *Escherichia coli* Isolates from Animals and Humans. J Infect Dis 2003b; 188: 759-768.

Johnson JR, Kuskowski MA, Owens K, Gajewski A, Winokur PL. Phylogenetic origin and virulence genotype in relation to resistance to fluoroquinolones and/or extended-spectrum cephalosporins and cephamycins among *Escherichia coli* isolates from animals and humans. J Infect Dis 2003; 188:759-768.

Johnson JR, Murray AC, Gajewski A, Sullivan M, Snippes P, Kuskowski MA, Smith KE. Isolation and Molecular Characterization of Nalidixic Acid-Resistant Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli* from Retail Chicken Products. Antimicrob Agents Chemother 2003a; 47: 2161-2168.

Johnson TA, Stedtfeld RD, Wang Q, Cole JR, Hashsham SA, Looft T, Zhu Y-G, Tiedje JM. Clusters of antibiotic resistance genes enriched together stay together in swine agriculture. mBio 2016; 7(2):e02214-15. doi:10.1128/mBio.02214-15.

Johnson TJ, Wannemuehler Y, Doetkott C, Johnson SJ, Rosenberger SC, Nolan LK. Identification of minimal predictors of avian pathogenic *Escherichia coli* virulence for use as a rapid diagnostic tool. J Clin Microbiol 2008; 46:3987-3996.

Lescat M, Clermont O, Woerther PL, Glodt J, Dion S, Skurnik D, Djossou F, Dupont C, Perroz G, Picard B. Commensal *Escherichia coli* strains in Guiana reveal a high genetic diversity with host-dependant population structure. Environ Microbiol Rep 2013; 5: 49-57.

Linton AH, Howe K, Bennet PM, Richmond MH. The colonisation of the human gut by antibiotic resistant *Escherichia coli* from chickens. J Appl Microbiol 1977; 43: 465-469.

Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey R, Carmeli Y, Falagas M, Giske C, Harbarth S, Hindler J, Kahlmeter G, Olsson-Liljequist B. Multidrug- resistant, extensively drug- resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. Clinl Microbiol Infect 2012; 18:268-281.

- Mataseje L, Bryce E, Roscoe D, Boyd D, Embree J, Gravel D, Katz K, Kibsey P, Kuhn M, Mounchili A. Carbapenem-resistant gram-negative bacilli in Canada 2009–10: results from the Canadian Nosocomial Infection Surveillance program (CNISP). *J Antimicrob Chemother* 2012; 67:1359-1367.
- Mathers AJ, Peirano G, Pitout JD. The role of epidemic resistance plasmids and international high-risk clones in the spread of multidrug-resistant *Enterobacteriaceae*. *Clin Microbiol Rev* 2015; 28:565-591.
- Maynard C, Fairbrother JM, Bekal S, Sanschagrín F, Levesque RC, Brousseau R, Masson L, Larivière S, Harel J. Antimicrobial resistance genes in enterotoxigenic *Escherichia coli* O149: K91 isolates obtained over a 23-year period from pigs. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47:3214-3221.
- McLellan SL, Daniels AD, Salmore AK. Genetic characterization of *Escherichia coli* populations from host sources of fecal pollution by using DNA fingerprinting. *Appl Environ Microbiol* 2003; 69:2587-2594.
- Mellata M. Human and avian extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: infections, zoonotic risks, and antibiotic resistance trends. *Foodborne Path Dis* 2013; 10:916-932.
- Mirani LAR, Darani ALC. Mutations in the quinolone resistance-determining regions of gyra and parc in enterobacteriaceae isolates from Brazil. *Braz J Microbiol* 2012; 1309-1314 ISSN 1517-8382.
- Mohsin M, Raza S, Schaufler K, Roschanski N, Sarwar F, Semmler T, Schierack P, Guenther S. High prevalence of CTX-M-15 type ESBL-producing *E. coli* from migratory avian species in Pakistan. *Front Microbiol* 2017; 8:2476. doi: 10.3389/fmicb.2017.02476
- Orskov I, Orskov F, Jann B, Jann K. Serology, chemistry, and genetics of O and K antigens of *Escherichia coli*. *Bacteriol Rev* 1977;41:667–710.
- Paauw A, Fluit AC, Verhoef J, Leverstein-van Hall MA. *Enterobacter cloacae* Outbreak and Emergence of Quinolone Resistance Gene in Dutch Hospital. *Emerg Infect Dis* 2006; 12: 807–812.

- Poirel L, Kieffer N, Brink A, Coetze J, Jayol A, Nordmann P. Genetic features of MCR-1-producing colistin-resistant *Escherichia coli* isolates in South Africa. *Antimicrob agents Chemother* 2016; 60: 4394-4397.
- Rangel JM, Sparling PH, Crowe C, Griffin PM, Swerdlow DL. Epidemiology of *Escherichia coli* O157:H7 outbreaks, United States, 1982-2002. *Emerg Infect Dis* 2005; 11:603-609.
- Ribot EM, Fair M, Gautom R, Cameron D, Hunter S, Swaminathan B, Barrett TJ. Standardization of pulsed-field gel electrophoresis protocols for the subtyping of *Escherichia coli* O157: H7, *Salmonella*, and *Shigella* for PulseNet. *Foodborne Path Dis* 2006; 3:59-67.
- Solà-Ginés M, Cameron-Veas K, Badiola I, Dolz R, Majó N, Dahbi G, Viso S, Mora A, Blanco J, Piedra-Carrasco N, González-López JJ, Migura-García L. Diversity of Multi-Drug Resistant Avian Pathogenic *Escherichia coli* (APEC) Causing Outbreaks of Colibacillosis in Broilers during 2012 in Spain. *PLoS ONE* 2015; 10(11): e0143191. doi:10.1371/journal.pone.0143191.
- Stacy AK, Mitchell NM, Maddux JT, Migue A, Durán L, Girón JA, Curtiss 3rd R, Mellata M. Evaluation of the prevalence and production of *Escherichia coli* common pilus among avian pathogenic *E. coli* and its role in virulence. *PloS one* 2014; 9:e86565.
- Stepanović S, Ćirković I, Ranin L. Biofilm formation by *Salmonella spp.* and *Listeria monocytogenes* on plastic surface. *Letters in Appl Microbiol* 2004; 38:428-432.
- Stromberg ZR, Johnson JR, Fairbrother JM, Kilbourne J, Van Goor A, Curtiss 3<sup>rd</sup> R, Mellata M. Evaluation of *Escherichia coli* isolates from healthy chickens to determine their potential risk to poultry and human health. *Plos One* 2017; 12 (7): e0180599.
- Tóth I, Héroult F, Beutin L, Oswald E. Production of cytolethal distending toxins by pathogenic *Escherichia coli* strains isolated from human and animal sources: establishment of the existence of a new cdt variant (type IV). *J Clin Microbiol* 2003; 41:4285-4291.

- Tremblay YD, Vogeleer P, Jacques M, Harel J. High-throughput microfluidic method to study biofilm formation and host-pathogen interactions in pathogenic *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* 2015; 81:2827-2840.
- Vogeleer P, Tremblay YD, Mafu AA, Jacques M, Harel J. Life on the outside: role of biofilms in environmental persistence of Shiga-toxin producing *Escherichia coli*. *Front Microbiol* 2015 ; 5: 317 doi: 10.3389/fmicb.2014.00317.
- Watnick P, Kolter R. Biofilm, city of microbes. *J Bacteriol* 2000; 182:2675-2679.
- Yue L, Jiang H-X, Liao X-P, Liu, J-H, Li S-J, Chen X-Y, Chen C-X, Lü D-H, Liu Y-H. Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance qnr genes in poultry and swine clinical isolates of *Escherichia coli*. *Vet Microbiol* 2008; 132: 414-420.

**Supplementary Table 1.** Primers, thermal conditions, amplicon sizes and control strains used in PCR.

Product antimicrobial	or Gene	Primer	Amplicon size (bp)	Annealing temperature	Control strain	Reference
Aerobactin	<i>iucD</i>	5' AAGTGTCGATTTTATACATAAC 3' 5' CCATCCGATGTCAGTTTTCTG 3'	778	60°C	EcL17088	(Herrero et al., 1988)
Thermosensible haemagglutinin	<i>tsh</i>	5' GGTGGTGCACCTGGAGTGG 3' 5' AGTCCAGCGTGATAGTGG 3'	640	55°C	EcL17088	(Dozois et al., 2000)
P fimbriae	<i>papC</i>	5' GACGGCTGTACTGCAGGGTGTGGCG 3' 5' ATATCCTTTCTGCAGGGATGCAATA 3'	501	60°C	EcL13421	(Daigle et al., 1994)
Cytotoxin	<i>cnf</i>	5' TTATATAGTCGTCAAGATGGA 3' 5' CACTAAGCTTTACAATATTGAA 3'	446	60°C	EcL13421	(Tóth et al., 2003)
Capsule	<i>kpsMII</i>	5' GCGCATTTGCTGATACTGTTG 3' 5' AGGTAGTTCAGACTCACACCT 3'	570	60°C	EcL18147	(Johnson et al., 2003)
Adhesins	<i>afa</i>	5' GGCAGAGGGCCGGCAACAGGC 3' 5' CCCGTAACGCGCCAGCATCTC 3'	594	63°C	EcL18162	(Johnson et al., 2003)



	<i>sfa</i>	5'GTGGATACGACGATTACTGTG 3' 5'CCGCCAGCATTCCCTGTATTC 3'	410	63°C	EcL18147	(Johnson et al., 2003)
Salmochelinsiderophore	<i>iroN</i>	5' AATCCGGCAAAGAGACGAACCGCCT 3' 5' GTTCGGGCAACCCCTGCTTTGACTTT 3'	665	60°C	EcL12421	(Johnson et al., 2008)
Increased serum survival factor	<i>iss</i>	5' CAGCAACCCGAACCACTTGATG 3' 5' AGCATTGCCAGAGCGGCAGAA 3'	323	60°C	EcL12421	(Johnson et al., 2008)
Haemolysin	<i>hlyF</i>	5' GGCCACAGTCGTTTAGGGTGCTTACC 3' 5' GGCGGTTTAGGCATTCCGATACTCAG 3'	444	60°C	EcL12421	(Johnson et al., 2008)
Outer membrane protease	<i>ompT</i>	5' TCATCCCGGAAGCCTCCCTCACTACTAT 3' 5' TAGCGTTTGCTGCACTGGCTTCTGATAC 3'	559	60°C	EcL12421	(Johnson et al., 2008)

Ampicillin	<i>bla<sub>SHV</sub></i>	5' CGCCGGGTTATTCTTATTTGTCGC 3' 5' TCTTTCCGATGCCGCCGCCAGTCA 3'	1016	63°C	PMON38	(Mataseje et al., 2012)
Ampicillin	<i>bla<sub>TEM</sub></i>	5' TTGCTCACCCAGAAACGCTGGTG 3' 5' TACGATACGGGAGGGCTTACC 3'	708	63°C	EcL3482	(Mataseje et al., 2012)
Ampicillin	<i>bla<sub>OXA-1</sub></i>	5' CGCAAATGGCACCAGATTCAAC 3' 5' TCCGCACCAGTTTTCCCATACAG 3'	464	63°C	EcLCTX-M	(Mataseje et al., 2012)
Ceftriaxone	<i>bla<sub>CTX-M</sub></i>	5' ATGTGCAGYACCAGTAARGTKATGGC 3' 5' TGGGTRAARTARGTSACCAGAAAYCAGCG G 3'	593	63°C	EcLCTX-M	(Mataseje et al., 2012)
Ceftriaxone	<i>bla<sub>CTX-M</sub></i> group 1	5' TTCGTCTCTTCCAGAATAAGG 3' 5' CAGCACTTTTGCCGTCTAAG 3'	968	55°C	18772	(Borgogna et al., 2016)

Ceftriaxone	<i>bla<sub>CTX-M</sub></i> group 2	5' CGTTAACGGCACGATGAC 3' 5' CGATATCGTTGGTGGTRCCAT 3'	404	55°C	18771	(Borgogna et al., 2016)
Ceftriaxone	<i>bla<sub>CTX-M</sub></i> group 8/25	5' AACRCRCAGACGCTCTAC 3' 5' TCGAGCCGGAASGTGTYAT 3'	326	55°C	18773	(Borgogna et al., 2016)
Ceftriaxone	<i>bla<sub>CTX-M</sub></i> group 9	5' TGGTGACAAAGAGAGTGCAACG 3' 5' CACAGGCCTTCGGCGAT 3'	875	55°C	18774	(Paauw et al., 2006)
Ceftiofur	<i>bla<sub>CMY-2</sub></i>	5' TGATGCAGGAGCAGGCTATTCC 3' 5' CTAACGTCATCGGGGATCTGC 3'	323	63°C	EcL3482	(Mataseje et al., 2012)
Streptomycin Spectinomycin	<i>aadA1</i>	5' CATCATGAGGGAAGCGGTG 3' 5' GACTACCTTGGTGATCTCG 3'	786	50°C	ECL3482	(Gow et al., 2008)
Tetracycline	<i>tetA</i>	5'GTGAAACCCAACATACCCC 3' 5'GAAGGCAAGCAGGATGTAG 3'	888	55°C	ECL3482	(Maynard et al., 2003)
Tetracycline	<i>tetB</i>	5' CCTTATCATGCCAGTCTTGC 3' 5' ACTGCCGTTTTTTCGCC 3'	774	55°C	EcL12400	(Maynard et al., 2003)
Tetracycline	<i>tetC</i>	5' ACTTGGAGCCACTATCGAC 3' 5' CTACAATCCATGCCAACCC 3'	881	55°C	PBR322	(Maynard et al., 2003)

Trimethoprim-sulfamethoxazol	<i>dhfrI</i>	5' AAGAATGGAGTTATCGGGAATG 3' 5' GGGTAAAAACTGGCCTAAAATTG 3'	391	50°C	EcL3482	(Maynard et al., 2003)
Trimethoprim-sulfamethoxazol	<i>dhfrV</i>	5' CTGCAAAAGCGAAAAACGG 3' 5' AGCAATAGTTAATGTTTGAGCTAAAG 3'	432	50°C	EcL1329	(Maynard et al., 2003)
Trimethoprim-sulfamethoxazol	<i>dhfrVII</i>	5' GGTAATGGCCCTGATATCCC 3' 5' TGTAGATTTGACCGCCACC 3'	265	50°C	3BO	(Maynard et al., 2003)
Fluoroquinolones	<i>qnrA</i>	5' TCAGCAAGAGGATTTCTCA 3' 5' GGCAGCACTATTACTCCCA 3'	627	48°C	J53pMG252	(Yue et al., 2008)
Fluoroquinolones	<i>qnrB</i>	5' GATCGTGAAAGCCAGAAAGG 3' 5' ACGATGCCTGGTAGTTGTCC 3'	469	53°C	J53pMG298	(Yue et al., 2008)
Quinolone resistance-determining region (QRDR)	<i>gyrA</i>	5' ACGTACTAGGCAATGACTGG 3' 5' AGAAGTCGCCGTCGATAGAA 3'	190	55°C	EcL12421	(Everett et al., 1996)
QRDR	<i>parC</i>	5' TGTATGCGATGTCTGAACTG 3' 5' CTCAATAGCAGCTCGGAATA 3'	265	55°C	EcL12421	(Everett et al., 1996)

Supplementary Table 2. Primers and amplicon sizes used in the phylogenetic typing PCR assays described by Clermont et al. (2000, 2013).

	Primer name		PCR product size (bp)	Reference
Triplex (old)	<i>chuA.1</i>	5' GACGAACCAACGGTCAGGAT 3'	279	(Clermont et al., 2000)
	<i>chuA.2</i>	5' TGCCGCCAGTACCAAAGACA 3'		
	<i>jyaA.1</i>	5' TGAAGTGTTCAGGAGACGCTG 3'	211	(Clermont et al., 2000)
	<i>yjaA.2</i>	5' ATGGAGAATGCGTTCCTCAAC 3'		
	<i>TspE4C2.1</i>	5' GAGTAATGTTTCGGGGCATTCA 3'	152	(Clermont et al., 2000)
	<i>TspE4C2.2</i>	5' CGCGCCAACAAAGTATTACG 3'		
Quadruplex (new)	<i>chuA.1b</i>	5' ATGGTACCGGACGAACCAAC 3'	288	(Clermont et al., 2013)
	<i>chuA.2</i>	5' TGCCGCCAGTACCAAAGACA 3'		(Clermont et al., 2000)
	<i>jyaA.1b</i>	5' CAAACGTGAAGTGTTCAGGAG 3'	211	(Clermont et al., 2013)
	<i>yjaA.2b</i>	5' AATGCGTTCCTCAACCTGTG 3'		
	<i>TspE4C2.1b</i>	5' CACTATTCGTAAGGTCATCC 3'	152	(Clermont et al., 2013)
	<i>TspE4C2.2b</i>	5' AGTTTATCGCTGCGGGTCGC 3'		
	<i>AceK F</i>	5' AACGCTATTCGCCAGCTTGC 3'	400	(Clermont et al., 2013)
	<i>ArpA1 R</i>	5' TCTCCCCATACCGTACGCTA 3'		(Clermont et al., 2004)
Group E (new)	<i>ArpAgpE F</i>	5' GATTCCATCTTGTCAAATATGCC	301	(Lescat et al., 2013)

	ArpAgpE R	3' 5' GAAAAGAAAAAGAATTCCCAAGAG 3'		
Group C (new)	<i>trpAgpC.1</i>	5' AGTTTTATGCCCAGTGCGAG 3'	219	(Lescat et al., 2013)
	<i>trpagpC.2</i>	5' TCTGCGCCGGTCACGCCCC 3'		
Internal control (new)	<i>trpBA F</i>	5' CGGCGATAAAGACATCTTCAC 3'	489	(Clermont et al., 2008)
	<i>trpBA R</i>	5' GCAACGCGGCCTGGCGGAAG 3'		

PCR reactions were performed under the

following conditions: denaturation 4 min at 94°C, 30 cycles of 5 s at 94°C and 20 s at 57°C (group E) or 59°C (quadruplex and group C), and a

final extension step of 5 min at 72°C.

PCR reactions were performed under the

following conditions: denaturation 4 min at 94°C, 30 cycles of 5 s at 94°C and 20 s at 57°C (group E) or 59°C (quadruplex and group C), and a

final extension step of 5 min at 72°C.

Control strains:

In triplex PCR (Clermont et al., 2000): *chuA* (J96); *yjaA* (J96); *TspE4C2* (EcL 2015)

In Quadruplex (Clermont et al., 2013): ECOR70 (group C); EDL933 (group E); ECOR31 (group E); ECOR60 (group B2)

In group E (Clermont et *al.*, 2013): EDL933 (group E); ECOR31 (group E)

In group C (Clermont et *al.*, 2013): ECOR70 (group C).

Thermal conditions used in PCR reactions consisted of:

Triplex PCR: denaturation for 5 min at 94°C; 30 cycles of 30 s at 94°C, 30 s at 55°C, and 30 s at 72°C; and a final extension step of 7 min at 72°C;

Quadruplex, group E and group C: denaturation 4 min at 94°C, 30 cycles of 5 s at 94°C and 20 s at 57°C (group E) or 59°C (quadruplex and group C), and a final extension step of 5 min at 72°C.

PCR reactions were performed under the following conditions: denaturation 4 min at 94°C, 30 cycles of 5 s at 94°C and 20 s at 57°C (group E) or 59°C (quadruplex and group C), and a final extension step of 5 min at 72°C.

## Article 2.

---

*Plos One*. 2019; 14(3):e0214304. doi: [10.1371/journal.pone.0214304](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0214304)

### **Prevalence of antimicrobial resistance and potential pathogenicity, and possible spread of third generation cephalosporin resistance, in *Escherichia coli* isolated from healthy chicken farms in the region of Dakar, Senegal**

Vounba P<sup>1</sup>, Arsenault J<sup>1</sup>, Bada-Alambédji R<sup>2</sup>, Fairbrother JM<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Department of Pathology and Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, Université de Montréal, The Swine and Poultry Infectious Diseases Research Centre (CRIPA) and the Research Group on Zoonoses and Public Health (GREZOSP), St-Hyacinthe, Quebec, Canada

<sup>2</sup>Department of Public Health and Environment, Ecole Inter-Etats des Sciences et Médecine Vétérinaires (EISMV) de Dakar, Senegal

**Keywords:** Avian *Escherichia coli*, Antimicrobial resistance, Virulence, Plasmids, clusters, Senegal.



**Implication de l'auteur dans l'article:**

**Je suis le premier auteur de cet article. J'ai effectué toutes les analyses de laboratoire (sauf le séquençage). J'ai aussi activement participé à la conception de l'article par la rédaction initiale du manuscrit et aux analyses statistiques des données.**

## Abstract

*Escherichia coli* is a normal inhabitant of the intestinal microbiota of chickens, a small proportion of which may be avian pathogenic *E. coli* (APEC) or potential extraintestinal pathogenic *E. coli* (ExPEC), capable of causing disease in humans. These *E. coli* may also be resistant to antimicrobials of critical importance in human or veterinary health. This study aims to 1) determine the prevalence of antimicrobial resistance (AMR) and resistance genes, multidrug resistance (MDR), chromosomal mechanisms of quinolone-resistance and virulence profiles of *E. coli* isolated from healthy chicken farms in the region of Dakar, Senegal, 2) investigate the spread of third-generation cephalosporins (3GC) resistance in *E. coli* isolated from healthy chicken farms with respect to virulence and resistance genes, serogroups, Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE), phylogenetic groups, plasmid types and transferability and 3) determine whether nonsusceptibility against 3GC on farms could be linked to risk factors. More than 68% of isolates from environmental faecal and drinking water samples, carcasses and carcass washes collected on 32 healthy chicken farms were multidrug resistant (MDR), resistance to antimicrobials critical in human health (3GC or ciprofloxacin) being found in all types of samples. Ciprofloxacin resistance was due to mutations in the *gyrA* and *parC* genes, 95% of tested farms harboring isolates carrying three mutations, in *gyrA* (Ser83Ile and Asp87Asn) and *parC* (Ser80Ile). Nine of the 32 farms (28.1%) demonstrated the presence of one or more 3GC-nonsusceptible indicator isolates but none of the potential risk factors were significantly associated with this presence on farms. Following selective enrichment, presumptive extended-spectrum beta-lactamase/AmpC-beta-lactamase (ESBL/AmpC)-producer isolates were found in 17 of the 32 farms. 3GC resistance was mediated by *bla*<sub>CMY-2</sub> or *bla*<sub>CTX-M</sub> genes, *bla*<sub>CTX-M</sub> being of genotypes *bla*<sub>CTX-M-1</sub>, *bla*<sub>CTX-M-8</sub> and for the first time in chickens in Senegal, the genotype *bla*<sub>CTX-M-15</sub>. Clonally related ESBL/AmpC-producer isolates were found on different farms. In addition, *bla*<sub>CTX-M</sub> genes were identified on replicon plasmids I1 and K/B and *bla*<sub>CMY-2</sub> on K/B, I1 and B/O. These plasmids were found in isolates of different clusters. In addition, 18 isolates, some of which were ESBL/AmpC-producers, were defined as potential human ExPEC. In conclusion, *E. coli* isolates potentially pathogenic for humans and demonstrating MDR, with resistance expressed against antimicrobials of critical importance in human health were found in healthy chickens in Senegal. Our results

suggest that both clonal spreading and horizontal gene transfer play a role in the spread of 3GC-resistance and that chickens in Senegal could be a reservoir for AMR and ExPEC for humans. These results highlight the importance of raising awareness about compliance with biosecurity measures and prudent use of antimicrobials.

**Keywords:** Avian *Escherichia coli*, Antimicrobial resistance, Virulence, Plasmids, clusters, Senegal.

## Introduction

*Escherichia coli* is a normal member of the intestinal flora of warm-blooded animals including humans, but may also be a potential pathogenic agent. In birds, pathogenic strains are termed avian pathogenic *E. coli* (APEC), a sub-group of the pathotype of Extraintestinal pathogenic *E. coli* (ExPEC). APEC cause avian colibacillosis, often following a weakening of the immune defences and leading to significant economic losses [1]. *E. coli* isolates may be classified into four phylogroups A, B1, B2 and D. Isolates from phylogroups B2 and D possess more virulence genes associated with ExPEC than those of phylogroups A and B1 [2]. Several studies have demonstrated a genetic similarity between *E. coli* involved in urinary tract infections, meningitis, and septicaemia in humans and those found in poultry and poultry products for human consumption [3-6], suggesting that the chicken could act as a reservoir of human pathogenic *E. coli*.

Antimicrobial use has increased the life expectancy of humans and greatly improved the productivity of animals. However, these benefits have been compromised by the development of antimicrobial resistance (AMR) [7]. Antimicrobial agents of critical importance in human health (e.g., ceftriaxone and ciprofloxacin) and animal health (e.g., ceftiofur) are not exempt from this phenomenon. *E. coli* resistance against ceftriaxone is mediated by the *bla<sub>CTX-M</sub>* gene encoding production of Extended-spectrum  $\beta$ -lactamases (ESBLs) whereas *bla<sub>CMY</sub>* gene encoding class C  $\beta$ -lactamases (AmpC) has a spectrum of activity extended to all first-, second-, third-generation cephalosporins and to the combination of beta-lactam plus inhibitors. ESBL/AmpC-producing *E. coli* often also demonstrate resistance to a wide range of antimicrobials including fluoroquinolones, trimethoprim-sulfamethoxazole and tetracyclines [8, 9].

ESBL/AmpC genes carried by *E. coli* isolates are located mainly on incompatibility plasmid groups such as I1, N, A/C, P and II [10, 11], often together with genes for resistance to other antimicrobials, resulting in multidrug resistance (MDR) and the possibility of a transfer to other bacterial species, including those pathogenic for humans. In addition, because of the co-existence of some virulence genes on the same replicon plasmids, some studies suggest that there may be an association between AMR and virulence [12, 13]. *E. coli* resistance to

fluoroquinolones such as ciprofloxacin may involve plasmid genes such as *qnr* genes, but the most important mechanism is acquisition of mutations in quinolone resistance-determining regions (QRDR) of *gyrA* and *parC* genes [14] and this mutational quinolone resistance may be clonally spread as it has been reported in *E. coli* of sequence type 131 (ST131) [15].

Certain risk factors may be associated with the presence on farms of *E. coli* isolates resistant to antimicrobials critically important for humans. A study in Canada found that *in ovo* administration of ceftiofur and the use of hydrogen peroxide to disinfect water lines during the growing period was associated with an increase in the prevalence of *E. coli* isolates simultaneously resistant to amoxicillin/clavulanic acid, ceftiofur and cefoxitin [16]. In Norway, the risk of detection of cephalosporin-resistant *E. coli* in chickens was reported to be related to the status of the previous flock in the broiler house, the number of parent flocks supplying the broiler flock with day-old chickens, and transport personnel entering the room where broilers are raised [17]. Other factors that may promote the introduction of new clones in a farm are the use of contaminated well water as drinking water and the presence of insects or rodents which may serve as mechanical vectors [18, 19].

The use of 3<sup>rd</sup> generation cephalosporins (3GC) in chickens in Senegal has not yet been reported, although this practice cannot be excluded because antimicrobials can be purchased by farmers from street vendors [20]. In addition, we recently found that multiresistant *E. coli* isolated from chickens with colibacillosis in Senegal carried ExPEC-associated virulence genes and some isolates were carriers of *bla*<sub>CTX-M-1</sub> or *bla*<sub>CTX-M-8</sub> [21].

We hypothesized that potential human ExPEC and 3GC resistant pathogenic *E. coli* are present in healthy chickens in Senegal and that the presence of the latter strains is associated with some farm characteristics such as antimicrobial use, management practices or on-farm biosecurity. The objectives of this study were to 1) Determine the prevalence of antimicrobial resistance and resistance genes, multidrug resistance (MDR), chromosomal mechanisms of quinolone-resistance and virulence profiles of *E. coli* isolated from healthy chicken farms in the region of Dakar, Senegal at both isolate and farm levels, 2) investigate the spread of 3GC nonsusceptibility in *E. coli* isolated from healthy chicken farms with respect to virulence and resistance genes, serogroups, PFGE, phylogenetic groups, plasmid types and transferability

and 3) determine whether nonsusceptibility against 3GC on farms could be linked to specific risk factors.

## **Material and methods**

### **Sample and data collection**

A cross-sectional study was conducted on private poultry farms located in the area of Dakar, Senegal. A list of farms present in the study area was provided by the Senegal Livestock Department and was updated with private veterinarians in the study area. A total of 68 farms located in 17 boroughs around the city of Dakar were identified. These farms belong to the three commercial poultry farming sectors [20]: sector 1, integrated poultry farming with 3000 to 18000 chickens; sector 2 with 1000 to 2000 poultry head; and sector 3 with small livestock farms of 50 to 500 chickens, often integrated into residential homes.

Based on the population size of 68 farms, an expected prevalence of farms with 3GC-nonsusceptible isolates of 50%, a precision of 12% and a confidence level of 95%, the required sample size for prevalence estimation at the farm level was estimated as 34 farms using the WinEpiscope 2.0. This 50% expected prevalence was used as a conservative approach as no studies had previously estimated the prevalence of farms harbouring *E. coli* potentially pathogenic for humans and/or producers of ESBL/AmpC in Senegal. A proportional stratified sampling method was then used to select the 34 farms, with each stratum representing 4 to 5 rural communities grouped according to their geographical proximity.

When a farm consisted of one chicken house, samples were taken from this house whereas, when there were at least two houses, samples were collected in two separate houses. In each house, one sample of fresh faeces and one of drinking water were collected between May and July 2011. Each sample of faeces or drinking water consisted of a pool of five samples taken in different parts of the house or in different troughs. In addition, one rinsing water (water in which the last rinsing of the carcasses was carried out) and one carcass swab sample were collected when slaughter of birds was carried out on the farm. Since the carcasses are stacked

one on top of the other following plucking, evisceration and rinsing, several carcasses of the stack were wiped with a single cotton swab.

The collected samples were transported in a cooler to the microbiology laboratory of the École Inter-États des Sciences et Médecine Vétérinaires (EISMV) of Dakar where they were analyzed. In addition, a questionnaire developed by our team (available in French on request) was completed by each farmer at the time of sampling, to collect data relating to biosecurity measures and use of antimicrobial agents on the farm.

### **Isolation of *E. coli* and establishment of *E. coli* collections**

Each pooled faecal sample was homogenised 1/10 (weight/volume) in buffered peptone water and filtered using a Whirl-pak® sterile sample bag with pore size of 0.45 µm. The filtrate was streaked on MacConkey plates and incubated overnight at 37°C. For drinking water and rinsing water, 250 ml of each sample was centrifuged at 8000 rpm for 15 min; the pellet was seeded on MacConkey agar and incubated overnight at 37°C. Carcass swabs were directly streaked on MacConkey agar. All primary cultures were kept in plates at 4°C until shipping to the *Escherichia coli* reference laboratory (EcL, Université de Montréal, Canada).

### **Indicator *E. coli***

One (or two morphologically different colonies when detected) lactose-positive isolates on MacConkey agar, that were positive for the *uidA* gene encoding β-glucuronidase, were selected. PCR conditions used to detect *uidA* gene included initial denaturation (95°C, 2 mn), 24 cycles of denaturation (94°C, 30 s), annealing (65°C, 30 s), extension (72°C, 30 s), and final extension (4°C).

### **Specific collections**

**Potential ExPEC:** Boiled DNA of a pool of five lactose-positive colonies per sample, selected from colonies not included in the indicator *E. coli* collection, was examined by PCR [22] for detection of ExPEC-associated virulence genes *iucD*, *tsh*, *cnf* and *papC* permitting a rapid and inexpensive initial screen for a wide spectrum of possible ExPEC strains [23] including APEC considered to have zoonotic potential [6]. When the pool of five colonies was

positive, each isolate was individually tested for the four ExPEC-associated virulence genes, and then one isolate per sample was randomly selected for each virulence profile and examined by PCR for additional virulence genes associated with ExPEC or APEC [21].

**Potential ESBL/AmpC-producers:** We used the protocol described previously by Agersø and colleagues [24] with some modifications. Briefly, 50 µl of the culture stored at -80°C was inoculated in 5 ml of peptone water. After 30 minutes of incubation at 37°C, 20 µl of the broth was streaked on MacConkey agar supplemented with 1 mg/L of ceftriaxone. After overnight incubation at 37°C, five lactose-positive colonies per sample, when available, were selected and confirmed as *E. coli* by the presence of the *uidA* gene.

### **Antimicrobial susceptibility testing**

All indicator *E. coli*, potential ExPEC and potential ESBL/AmpC isolates were tested against 14 antimicrobials belonging to nine classes, using the disk diffusion method [25, 26]. *E. coli* ATCC 25922 was used as control strain. Isolates intermediate or resistant (collectively referred to as nonsusceptible) to three or more classes of antimicrobial agents were considered to be MDR [27]. In addition, isolates of the potential ESBL/AmpC collection were considered as presumptive ESBL or presumptive AmpC using the European Food Safety Authority's criteria [28].

### **Antimicrobial resistance genes**

One hundred and twenty-seven (127) isolates were randomly selected (one to two isolates per sample) from the indicator *E. coli* collection. In addition, one isolate per virulence profile was randomly selected in each sample, resulting in 74 selected potential ExPEC isolates. These indicator *E. coli* and potential ExPEC isolates were examined for 14 genes encoding for resistance against streptomycin (*aadA1*), tetracycline (*tetA*, *tetB* and *tetC*), trimethoprim-sulfamethoxazole (*dfrA1*, *dfrA5* and *dfrA7*), fluoroquinolones (*qnrB*) and β-lactams (*bla<sub>TEM</sub>*, *bla<sub>SHV</sub>*, *bla<sub>OXA-1</sub>*, *bla<sub>CTX-M</sub>* and *bla<sub>CMY-2</sub>*). In the potential ESBL/AmpC collection, 50 isolates nonsusceptible to at least one cephalosporin and originating from 15 farms, were randomly selected among 75 3GC-nonsusceptible isolates found in this study and tested for the presence of beta-lactamase genes, as previously described [21].



In addition, 14 CTX-M-positive isolates originating from six farms were tested for the CTX-M-1, -2, -8 and -9 groups by PCR. PCR amplicons were purified using QIAquick® PCR purification kit (Qiagen, Germany), then forward and reverse strands of each gene were sequenced in a 3500 Genetic Analyser (Applied Biosystems) using the same PCR primer sets. Sequences were compared to known sequences using the resistance determinants database (<http://www.fibim.unisi.it/REDDB/BlastInterface.asp>). Primers used for screening and identification of CTX-M subtypes are available in S1 Table.

### **Detection of mutations in the Quinolone-Resistance Determining Region (QRDR)**

The regions of *gyrA* and *parC* genes analogous to the QRDR were amplified by PCR as described previously [29] in 76 isolates selected among 118 ciprofloxacin-resistant isolates found in the three collections and originating from 20 farms. PCR amplicons were purified as described above, and the forward strand of each gene was sequenced in a 3500 Genetic Analyser (Applied Biosystems) using the same PCR primer sets. Sequences of *gyrA* and *parC* genes were compared for each isolate with the respective reference sequences (with *E. coli* K-12 used as reference) using the Molecular Evolutionary Genetics Analysis software ([www.megasoftware.net](http://www.megasoftware.net)).

### **Virulence genes and phylogenetic groups**

All isolates from the indicator *E. coli* and potential ExPEC collections tested above for AMR genes were also examined for the presence of human ExPEC and APEC virulence genes and other virulence-associated genes that may be used to further discriminate APEC isolates as previously described [21]. In addition, some isolates from the potential ESBL/AmpC collection, carrying ESBL/AmpC genes, were tested for the same virulence genes. Each isolate was also examined by PCR to be assigned to one of the four main phylogenetic groups A, B1, B2 and D [30]. In addition, isolates belonging to phylogroups B2 or D, producers of ESBL/AmpC and/or classified potential human ExPEC, were tested by the revised phylotyping method [31].

All primers used in the PCRs performed in this study can be found in the supplementary data of our previous study [21].

## Serotyping

Thirty-nine of the 42 *bla*<sub>CTX-M</sub> or *bla*<sub>CMY-2</sub> positive isolates detected in this study were tested by standard agglutination methods for 86 O-serogroups described at [www.ecl-lab.com/en/products/serotyping.asp](http://www.ecl-lab.com/en/products/serotyping.asp) [32].

## Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE)

The 39 *bla*<sub>CTX-M</sub>/*bla*<sub>CMY-2</sub>-positive isolates were sub-typed by PFGE using *Xba*I-restriction enzyme [33]. The similarities of fragments were compared using a Dice coefficient at 1% tolerance and 0.5% optimization, and a dendrogram was generated in BioNumerics (Applied Maths) software (v. 6.6) using the UPGMA clustering method. Clusters were defined as isolates sharing at least 60% of similarity (cut-off value) as estimated by BioNumerics from the dendrogram and PFGE groups as isolates sharing at least 80% of similarity.

## Plasmid characterization

Plasmid PCR-based replicon typing (PBRT) was performed on the 39 *bla*<sub>CTX-M</sub>/*bla*<sub>CMY-2</sub>-positive selected isolates for identification of 21 replicon plasmids as previously described [34, 35]. Plasmids were purified in wild type isolates using the QiaFilter Midi kit (Qiagen Inc.), following the manufacturer's instructions. Purified plasmid DNA of 30 ESBL/AmpC-producer isolates randomly selected (16 *bla*<sub>CMY-2</sub>-positive and 14 *bla*<sub>CTX-M</sub>-positive isolates, some of which also carried the *bla*<sub>TEM</sub> gene) was electroporated into *E. coli* DH10B Electromax™ competent cells (Invitrogen, Calsbad, CA).

Transformants were selected on Mueller Hinton agar supplemented with ceftriaxone 2 µg/ml [36]. Up to five transformants, when available, were screened by PCR for the presence of incompatibility plasmids and of all AMR and virulence genes present in the corresponding wild type strains. Transformants carrying ESBL/AmpC genes were subsequently tested for their susceptibility to the 14 antimicrobials as mentioned above.

The methodological approach that summarizes the main steps of this study can be found in S1 Fig.

## **Ethics statement**

The faecal samples derived from the birds were all taken from broiler production farms identified as 1 to 32. The farms were named in this way to respect their privacy. All faecal samples were collected from the floor. All other samples were taken from drinking water troughs, carcasses of birds slaughtered on farm by the owner of the farm, or water used to rinse the carcasses. Neither animal experiment nor handling of animals was conducted by the researchers. Such sampling is considered a normal diagnostic sampling method with a no impact on animal welfare. Therefore, approval by the ethics committee on the use of animals at the Cheikh Anta Diop University in Dakar, on which the École Inter-États des Sciences et Médecine Vétérinaires de Dakar depends, was not requested.

## **Statistical analysis**

Prevalence of AMR by antimicrobials was estimated at the isolate and farm levels. At the isolate level, prevalence estimates were adjusted for clustering by farms and presented by type of samples. Prevalence with 95% confidence intervals of potential virulent APEC, potential ExPEC, ESBL/AmpC genes in sub-collection isolates was also estimated at the isolate and farm levels. At the isolate level, estimates were adjusted for clustering by farms and sampling weights when applicable; the weights were computed according to the probability of isolate selection in each sample. For the estimation of any prevalence at the farm level, only the faeces and drinking water samples collected on farms were considered whereas all types of samples were taken into account for estimation of prevalence at isolate level. For estimation at farm level, a farm was considered positive when at least one isolate was detected for the studied characteristics (i.e. nonsusceptible to antimicrobials, defined as MDR, potential virulent APEC or positive for AMR gene, virulence gene, QRDR mutation, etc). Prevalence estimates were carried out using the freq or surveyfreq procedure of SAS software version 9.4. To evaluate if potential risk factors from the questionnaire were associated with the presence of 3GC-nonsusceptible *E. coli* on farms, a chicken farm with a 3GC-nonsusceptible isolate from faeces or drinking water was defined as a case. Univariable exact logistic regressions were first performed. Potential risk factors with a p-value<0.20 from univariate models were included in a full multivariable logistic regression model. A backward selection was used to

select the final model, using a  $p > 0.05$  as rejection criteria. Odds ratios (OR) with 95% interval confidence (95%IC) were used to present results. Logistic regressions were performed using the logistic procedure of SAS software version 9.4.

## Results

### Sampling and isolate collection

A total of 32 of the 34 selected farms were sampled, as the chickens on two farms had already been slaughtered a few days before our visit. A total of 50 chicken houses were sampled. One fresh fecal sample and one drinking water sample were collected in each chicken house. In addition, 10 rinsing water samples and 8 carcass swabs were obtained on farms with slaughter areas and in which slaughter operations took place at the time of our passage.

Two isolates were obtained from each sample that demonstrated growth on MacConkey (S1 Fig), except for one faecal sample and two drinking water samples from which only one lactose positive, *uidA* positive isolate was obtained, giving a total of 193 indicator *E. coli* isolates. In the potential ExPEC collection, a total of 90 potential ExPEC isolates positive for at least one of the targeted virulence genes were obtained in 53 samples (one to three isolates per sample) from 27 farms. Finally, in the potential ESBL/AmpC collection, up to five isolates per sample, when available, were selected resulting in a total of 130 isolates from 37 samples and 19 farms.

### ***E. coli* isolated from healthy chickens in Senegal displayed a high prevalence of AMR**

AMR was observed in the indicator *E. coli* isolates for all antimicrobials, the highest prevalence of nonsusceptibility being observed for tetracycline at both the isolate (92.2%) and farm (100%) levels (Table 1). For other antimicrobials, at the isolate level, the highest prevalence of nonsusceptibility was observed for sulfisoxazole (80.8%), trimethoprim-sulfamethoxazole (76.7%), streptomycin (47.7%) and nalidixic acid (44.0%), the lowest prevalence being observed for gentamicin (3.1%), amoxicillin and cefoxitin (5.7% each) and 3GC (ceftriaxone and ceftiofur, 7.2% each). At the farm level, similar trends in prevalence of nonsusceptibility were observed as for the isolate level (Table 1).

**Table 1.** Prevalence at the isolate and farm levels of antimicrobial nonsusceptibility in indicator *Escherichia coli* from healthy chickens in the region of Dakar, Senegal.

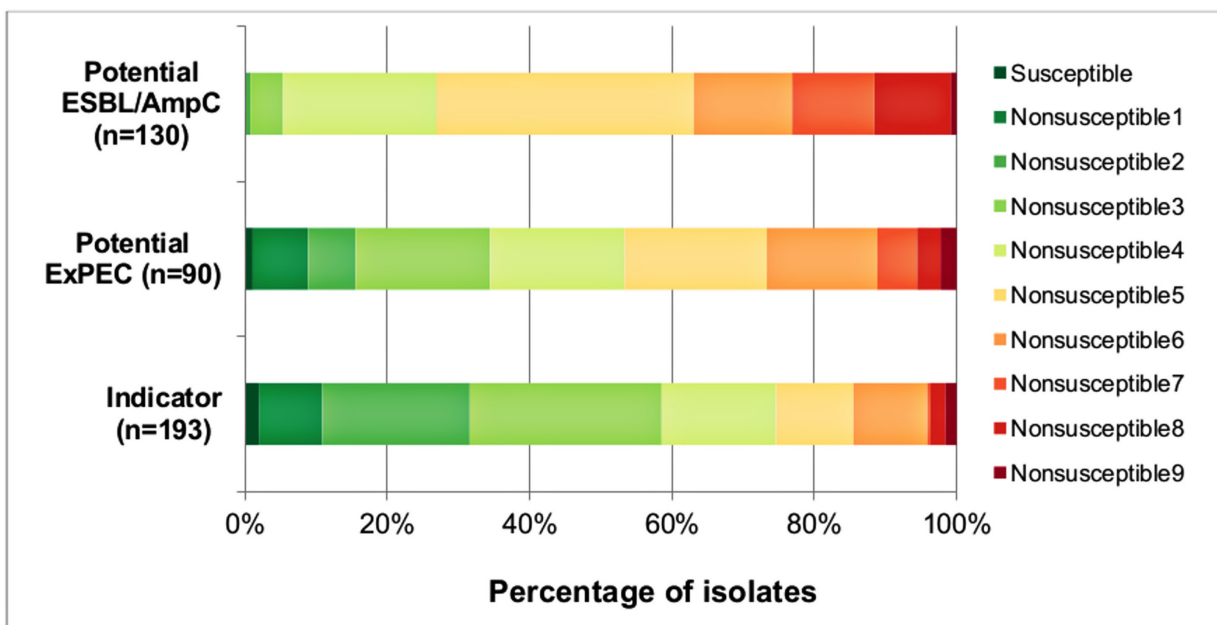
Unit of study (No. examined)	Percentage (%) of units with one or more nonsusceptible isolates per category <sup>a</sup> , antimicrobial class <sup>b</sup> and antimicrobial <sup>c</sup>													
	Critically important									Highly important				
	Highest priority				High priority									
	FLQ		CPS		PEN	PEN/I	AMG			CPM	FOL		PHE	TET
	NAL	CIP	TIO	CRO	AMP	AMC	GEN	KAN	STR	FOX	SXT	SSS	CHL	TET
<b>Isolates</b>														
Drinking water/Faeces (n=169)	44.9	27.8	8.2	8.2	37.3	6.5	3.5	13.0	49.7	6.5	77.5	81.1	15.4	91.7
Carcasses/rinsing water (n=24)	37.5	20.8	0.0	0.0	45.8	0.0	0.0	4.2	33.3	0.0	70.8	79.2	37.5	95.8
All sources (n=193)	44.0	26.9	7.2	7.2	38.3	5.7	3.1	11.9	47.7	5.7	76.7	80.8	18.1	92.2
<b>Farms (n = 32)</b>	84.4	59.4	28.1	28.1	68.7	21.8	12.5	34.4	87.5	21.8	93.7	96.8	43.7	100

<sup>a</sup>Category of human antimicrobial importance according to the World Health Organization (WHO) [37].

<sup>b</sup>Antimicrobial classes: (FLQ) Fluoroquinolones; (PEN/I) Penicillin+ $\beta$ -Lactamase inhibitors; (CPS) Cephalosporins; (PEN) Penicillin; (CPM) Cephamycin; (AMG) Aminoglycosides; (FOL) Folate inhibitors; (PHE) Phenicol; (TET) Tetracyclines.

<sup>c</sup>Antimicrobials: (NAL) Nalidixic acid; (CIP) Ciprofloxacin; (AMC) Amoxicillin/clavulanic acid; (TIO) Ceftiofur; (CRO) Ceftriaxone; (AMP) Ampicillin; (FOX) Cefoxitin; (GEN) Gentamicin; (KAN) Kanamycin; (STR) Streptomycin; (SXT) Trimethoprim-sulphamethoxazole; (SSS) Sulfisoxazole; (CHL) Chloramphenicol; (TET) Tetracycline.

Of the 98 samples, 34 (34.78%) had indicator isolates with the same antimicrobial susceptibility pattern and 46 (65.2%) with two different profiles. The prevalence of multidrug resistance (MDR, isolates nonsusceptible to at least one antimicrobial in at least three classes of antimicrobials) in the indicator *E. coli* isolates was 68.4%, with 21.2% of isolates being MDR5 or MDR6 and 3.6% of isolates classified as possible XDR (nonsusceptible to 8 or 9 antimicrobial classes, *i.e* extensively drug resistant isolates that remain susceptible to a maximum of 2 categories) (Fig 1). In all, 31 (96.9%; 95%CI = 83.8 – 99.9) farms out of the 32 investigated harbored at least one MDR indicator isolate.



**Fig 1. Distribution (%) of indicator (n=193) potential ExPEC (n=90) and potential ESBL/AmpC (n=130) isolates from healthy chickens in the region of Dakar, Senegal according to nonsusceptibility profiles.**

Susceptible: susceptible to all classes of antimicrobials; Nonsusceptible 1 to 9: nonsusceptible to 1 up to 9 classes of antimicrobials; isolates nonsusceptible to 3 up to 7 antimicrobials were considered to be multidrug resistant (MDR), isolates nonsusceptible to 8 or 9 antimicrobials were considered to be possibly extensively drug resistant (XDR).

Following ceftriaxone supplementation, presumptive ESBL/AmpC-producer isolates [78 isolates (60.0%; 95%CI = 36.1 – 80.9)], as defined by the EFSA [28], were found in 17 (53.1%; 95%CI = 34.7 – 70.9) of the 32 studied farms (Table 2). In contrast to the findings for the indicator *E. coli* collection in which isolates originating from carcasses were all 3GC-susceptible (Table 1), presumptive ESBL/AmpC isolates were observed in carcasses and carcass rinse water samples following ceftriaxone supplementation (Table 2).

**Table 2.** Prevalence at the isolate and farm levels of presumptive ESBL/AmpC-producer *Escherichia coli* isolated from healthy chickens in the region of Dakar, Senegal following selection with ceftriaxone.

Unit of study	No. examined	No. (%; 95%CI) of units with positive culture	No. (%; 95%CI) of units carrying presumptive ESBL/AmpC-producer isolates
<b>Isolates</b>			
Faeces and drinking water	123	N/A	75 (60.9; 95%CI = 38.4 – 83.5)
Carcasses and rinsing water	7	N/A	3 (42.8; 95%CI = 0.0 – 100)
All sources	130	N/A	78 (60.0; 95%CI = 36.1 – 80.9)
<b>Farms</b>	32	19 (59.4; 95%CI= 40.6 – 76.3)	17 (53.1; 95%CI = 35.8 – 70.4)



Presumptive ESBL: isolate resistant to ceftriaxone and/or ceftiofur and susceptible to amoxicillin clavulanic acid and ceftiofur; Presumptive AmpC: isolate resistant to ceftriaxone and/or ceftiofur in addition to being resistant to amoxicillin clavulanic acid and ceftiofur; Presumptive ESBL/AmpC-producers: cumulative of presumptive ESBL-producers and presumptive AmpC-producers; N/A: Not applicable.

Notably, in the potential ESBL/AmpC a lower proportion of isolates nonsusceptible to most antimicrobials, except for ceftriaxone and ceftiofur, for which 58.5% of isolates were nonsusceptible, was observed (S2 Table). In addition, almost all potential ESBL/AmpC isolates were classified as MDR; 11.5% of potential ESBL/AmpC isolates were classified as MDR7, and 11.5% were defined as possible XDR (Fig 1).

### **Prevalence of AMR genes**

One or more AMR genes were detected in 111 (87.4%) of the 127 tested indicator *E. coli* isolates. The most prevalent AMR genes were those encoding resistance against tetracycline (*tet* genes) and trimethoprim-sulfamethoxazole (*dfrA* genes) (Table 3). Genes encoding resistance against streptomycin [*aadA1* (19.7 (10.9 – 28.4)] or ciprofloxacin [*qnrB* (11.0%; 95%CI = 5.4 – 16.6)] were also detected and among beta-lactamase-encoding genes, *bla<sub>TEM</sub>* (36.2%; 95%CI = 26.3 – 46.1) was the most frequently detected  $\beta$ -lactamase gene. Most of the AMR genes were found in the four types of samples with the exception of *dfrA5* which was only found in isolates from drinking water and faeces, *bla<sub>CTX-M</sub>* which was only found in isolates from faeces and *bla<sub>SHV</sub>*, *bla<sub>OXA-1</sub>* and *bla<sub>CMY-2</sub>* which were only found in isolates from drinking water (S3 Table). At the farm level, the most prevalent AMR genes were *tetA* [27 isolates (84.4%; 95%CI = 67.2 – 96.9)], *dfrA7* [25 isolates (78.1; 60.0 – 90.9)], *bla<sub>TEM</sub>* [19 isolates (59.4; 95%CI = 40.6 – 76.3) each] and *dfrA1* [18 isolates (56.3; 95%CI = 37.7 – 73.6)].

**Table 3.** Prevalence at the isolate and farm levels of AMR genes in 127 indicator *Escherichia coli* isolated from healthy chickens in the region of Dakar, Senegal.

AMR gene	Isolate level (n=127)		Farm level (n=32)	
	No. of positive isolates	Prevalence (95% CI)	No. of positive farms	Prevalence (95% CI)
<i>tetA</i>	73	57.5 (47.8 – 67.2)	27	84.4 (67.2 – 96.9)
<i>tetB</i>	25	19.7 (12.6 – 26.8)	14	43.7 (26.4 – 62.3)
<i>dfrA1</i>	37	29.1 (17.6 – 40.7)	18	56.3 (37.7 – 73.6)
<i>dfrA5</i>	13	10.2 (3.6 – 16.9)	9	28.1 (13.7 – 46.7)
<i>dfrA7</i>	61	48.0 (35.7 – 60.3)	25	78.1 (60.0 – 90.9)
<i>qnrB</i>	14	11.0 (5.4 – 16.6)	10	31.3 (16.1 – 50.0)
<i>aadA1</i>	25	19.7 (10.9 – 28.4)	11	34.4 (18.6 – 53.2)
<i>bla<sub>TEM</sub></i>	46	36.2 (26.3 – 46.1)	19	59.4 (40.6 – 76.3)
<i>bla<sub>OXA-1</sub></i>	1	0.8 (0.0 – 2.3)	1	3.1 (0.0 – 9.2)
<i>bla<sub>SHV</sub></i>	2	1.6 (0.0 – 3.7)	2	6.3 (0.8 – 20.8)
<i>bla<sub>CTX-M</sub></i>	2	1.6 (0.0 – 4.8)	1	3.1 (0.0 – 9.2)
<i>bla<sub>CMY-2</sub></i>	1	0.8 (0.0 – 2.4)	1	3.1 (0.0 – 9.2)

AMR, antimicrobial resistance; No., Number; prevalence expressed in percentage; 95%CI, 95% confidence interval. Tetracycline resistance gene *tetC* was not detected in any isolate.

A total of 251 isolates (including all collection isolates) from 32 farms were tested for ESBL/AmpC genes. The *bla<sub>CTX-M</sub>* genes were detected in 14 isolates (5.6%, 95% CI = 1.4-9.8) and *bla<sub>CMY-2</sub>* in 28 isolates (11.2%, 95% CI = 2.7 -19.6). The *bla<sub>CTX-M</sub>* gene was detected in six

farms and *bla<sub>CMY-2</sub>* in seven farms; both genes were simultaneously present in three of these farms. In addition, *bla<sub>CTX-M</sub>* positive isolates were obtained from 13 of the 141 faecal isolates and 1 of the 16 rinsing water isolates, whereas *bla<sub>CMY-2</sub>* was detected in 6 of the 75 isolates obtained from drinking water samples and 22 faecal isolates. The 14 *bla<sub>CTX-M</sub>*-isolates detected in this study were of genotypes *bla<sub>CTX-M-1</sub>* (9 isolates found in 4 farms), *bla<sub>CTX-M-8</sub>* (3 isolates found in 2 farms), and *bla<sub>CTX-M-15</sub>* (2 isolates, each from a separate farm). The *bla<sub>CTX-M</sub>* identified in rinsing water was of genotype *bla<sub>CTX-M-1</sub>*. In addition, the *bla<sub>CTX-M-15</sub>* positive isolates belonged to phylogenetic groups A and D for which the O serogroups were non-typable and those of *bla<sub>CTX-M-8</sub>* genotype were of phylogenetic groups B1 (2 isolates) and A (1 isolate); these isolates were also non-typable. The *bla<sub>CTX-M-1</sub>* positive isolates belonged to phylogroups A (6 isolates of which 5 were of serogroup O45), D (2 isolates) and B1 (1 isolates).

#### **Mutations in the quinolone-resistance determining region (QRDR) of *gyrA* and *parC* genes**

Seventy-six of the 118 ciprofloxacin-resistant isolates found in this study, originating from 20 farms and selected from the three collections, were sequenced for the QRDR of *gyrA* and *parC* genes. Two mutation positions were observed in each QRDR gene and 74 (97.4%; 95%CI = 93.2 – 100) isolates carried one or more mutations in *gyrA* or *parC* (Table 4). In *gyrA*, the most frequent mutations were the substitution of aspartic acid (Asp) by asparagine (Asn) at position 87 (69 isolates) and the substitution of serine (Ser) by leucine (Leu) at position 83 (71 isolates). In *parC* gene, the most frequently observed mutation was the substitution of serine by isoleucine (Ile) at position 80 (69 isolates). Sixty-two isolates (82.2%; 95%CI = 76.5 – 87.9) demonstrated a combination of the 3 same mutations, Ser83Leu and Asp87Asn in *gyrA* and Ser80Ile in *parC* and these isolates originated from 19 (95.0%; 95%CI = 75.1 – 99.8) of the 20 farms. In addition, 67 (88.2%; 95%CI = 81.8 – 94.5) isolates were carriers of double-serine mutation (*gyrA* Ser83Leu and *parC* Ser80Ile).

**Table 4.** Presence of mutations in the *gyrA* and *parC* genes in 76 ciprofloxacin-resistant *Escherichia coli* isolated from 20 healthy chicken farms in the region of Dakar, Senegal.

Amino acid changes in <i>gyrA</i>		Amino acid changes in <i>parC</i>		No. of isolates carrying mutation(s) (% and 95%CI)	No. of farms of origin (% and 95%CI)
Ser83	Asp87	Ser80	Glu84		
Leu	Asn	Ile	-	62 (82.2; 76.5 – 87.9)	19 (95.0; 75.1 – 99.9)
Leu	Asn	-	Lys	1 (1.7; 0.0 – 5.3)	1 (5.0; 0.1 – 24.8)
Leu	Asn	Ile	Gly	2 (2.3; 0.0 – 5.6)	2 (10.0; 1.2 – 31.7)
Leu	Asn	Arg	-	1 (1.9; 0.0 – 5.2)	0 (0.0; 0.0 – 16.8) <sup>a</sup>
Leu	Asn	-	-	2 (2.3; 0.0 – 5.7)	2 (10.0; 1.2 – 31.7)
Tyr	Asn	-	-	1 (0.8; 0.0 – 2.2)	1 (5.0; 0.1 – 24.8)
Leu	-	Ile	-	3 (4.7; 0.0 – 9.5)	2 (10.0; 1.2 – 31.7)
-	-	Ile	-	2 (1.9; 0.0 – 5.9)	2 (10.0; 0.0 – 23.2)
-	-	-	-	2 (1.7; 0.0 – 4.5)	2 (10.0; 1.2 – 31.7)

<sup>a</sup>Prevalence at farm level was computed using faeces and drinking water sample and the isolate carrying these mutations was from rinsing water; Ser, serine; Leu, leucine; Tyr, tyrosine; Asp, aspartic acid; Asn, asparagine; Ile, isoleucine; Arg, arginine; Glu, glutamic acid; Lys, lysine.

### **Potential human ExPEC are found in *Escherichia coli* isolated from healthy chickens in Senegal**

The 127 indicator *E. coli* isolates were distributed among the four phylogroups A (n=59), B1 (n=56), B2 (n=5) and D (n=7). Overall, 73 (57.5%) of indicator *E. coli* isolates carried at least one of the virulence genes under investigation. All virulence genes associated with APEC were detected and among genes associated with human ExPEC, *iucD*, *kpsMII* and *papC* were

observed. The virulence genes *cnf*, *sfa/foc*, and *afa/dra* were not detected in any isolate. Moreover, 32 combinations of virulence genes were observed. Of these combinations, *ompT* (n=13 isolates), *iroN/iss/hlyF/ompT* (n=7 isolates), *iroN/iss/hlyF*, *iroN/iss/hlyF/ompT/iucD* and *iroN/iss/ompT/iucD/tsh* (n=6 isolates for each) were most frequently observed. Each combination originated from at least two farms and among the four phylogenetic groups. The five virulence genes associated with APEC (*iroN*, *iss*, *hlyF*, *ompT* and *iucD*) and the *tsh* gene were detected in 80% to 100% of isolates of phylogroup B2 and 71% of phylogroup D-isolates were carriers of virulence genes *iss*, *hlyF* and *ompT*.

Based on the presence of four or five of the five APEC-associated virulence genes, 22 (17.3%; 95%CI = 7.3 – 27.3) of the 127 indicator *E. coli* isolates originating from 9 farms (28.1%; 95%CI = 13.8 – 46.8), were defined as virulent APEC, of which four were also classified as potential human ExPEC. The ExPEC sub-collection of 74 isolates permitted the detection of an additional 43 (55.6%; 95%CI = 42.8 – 68.2) potential virulent APEC and 13 (15.6%; 95%CI = 5.7 – 25.4) potential human ExPEC isolates. In addition, one isolate from the potential ESBL/AmpC collection was also defined as a potential human ExPEC isolate. This results in a total of 18 potential human ExPEC isolates belonging to phylogroups A (6 isolates), B1 (2 isolates), B2 (4 isolates of which two were *bla<sub>CMY-2</sub>*-positive), D (4 isolates), F (1 isolate) and C (1 isolate) from 12 farms (Fig 2). In addition to being defined as potential human ExPEC, these isolates were mostly carriers of at least three of the genes defining APECs. In addition, almost all of these potential human ExPEC were MDR, some of which were resistant to critically important antimicrobials in human health (3GC, gentamicin and ciprofloxacin). Moreover, almost all potential human ExPEC were positive for at least one of the AMR genes investigated.

Examination of the 10 potential human ExPEC belonging to phylogroups B2 (n=3) et D (n=7) using the revisited phylotyping method [31] showed all B2-isolates remained in the same phylogroup, whereas among the seven D-isolates, 4 remained D-isolates and the others were reassigned to phylogroup B2, C and F (1 isolate, each) (Figure 2). For the 16 other isolates (all ESBL/AmpC-producers), the two B2-isolates still belonged to group B2 and the 14 D-isolates were reassigned to phylogroups E (11 isolates), B2 (2 isolates) and F (1 isolate).

Isolate identity	Phylogroup	Virulence genes							Antimicrobial nonsusceptibility											Antimicrobial resistance genes							Source*	Farm								
		<i>iroN</i>	<i>iss</i>	<i>hlyF</i>	<i>ompT</i>	<i>iucD</i>	<i>kpsMII</i>	<i>papC</i>	<i>ish</i>	Gentamicin	Kanamycin	Streptomycin	Ceftriaxone	Ceftiofur	Cefoxitin	Amoxi-Clav*	Ciprofloxacin	Nalidixic acid	Sulfisoxazole	Trimeth-Sulf*	Ampicillin	Chloramphenicol	Tetracyclin	<i>tetA</i>	<i>tetB</i>	<i>dhfrI</i>			<i>dhfrV</i>	<i>dhfrVII</i>	<i>aadA1</i>	<i>blaSHV</i>	<i>blaTEM</i>	<i>blaCMY-2</i>	<i>qnrB</i>	
ECL23296	A																																	DW	28	
ECL23297	A																																	F	31	
ECL23298	A																																	F	12	
ECL23299	A																																	C	17	
ECL23300	A																																	DW	29	
ECL23301	A																																	DW	31	
ECL23302	B1																																	F	26	
ECL23303	B1																																	F	11	
ECL23304	B2																																	F	17	
ECL23183	B2																																	F	19	
ECL23182	B2																																	F	19	
ECL23311	B2																																	DW	30	
ECL23305	D																																		F	1
ECL23308	D																																		F	11
ECL23309	D																																		RW	29
ECL23310	D																																		F	29
ECL23307	F																																		F	7
ECL23306	C																																		F	5

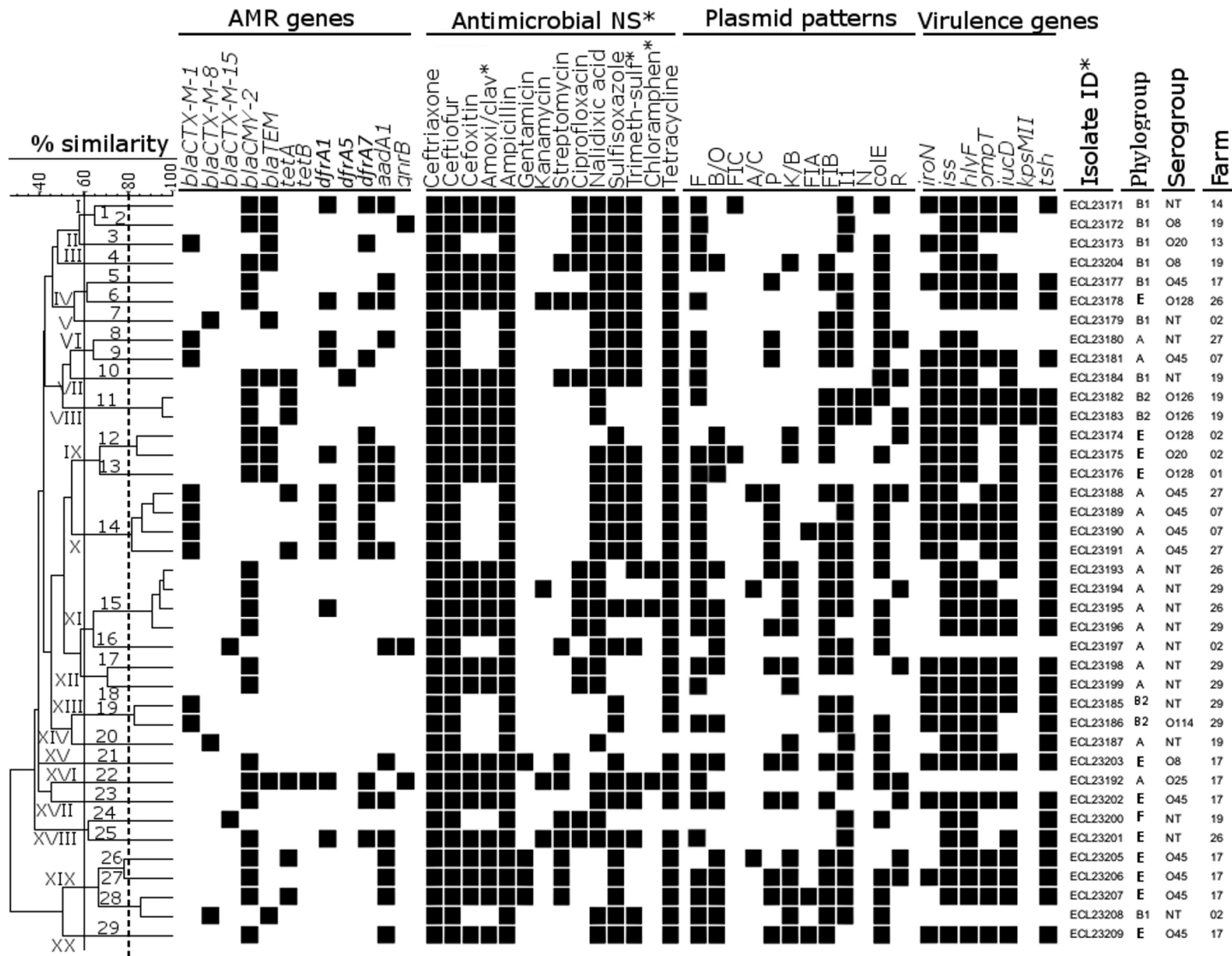
**Fig 2. Virulence and antimicrobial resistance characteristics of isolates defined as potential human ExPEC based on their virulence profiles.**

(Amoxi-clav) amoxicillin/clavulanic acid; (Trimeth-sulf) trimethoprim-sulfamethoxazole. Black boxes indicate antimicrobial nonsusceptibility, the presence of virulence genes or of AMR genes. No isolate was positive for any of the *bla<sub>CTX-M</sub>*, *bla<sub>OXA-1</sub>*, *tetC*, *afa/dra*, *sfa/foc* or *cnf* genes, hence these genes were removed. Sources of isolates: (F) faeces; (DW) drinking water; (C) carcass; (RW) rinsing water.

**Some ESBL/AmpC-producing *E. coli* from healthy chickens of different farms may be clonally related**

PFGE showed a high genetic diversity of ESBL/AmpC-producing *E. coli* isolates (Fig 3). Based on a similarity threshold set at 60%, 20 clusters (I-XX) were observed, of which 11 consisted of at least two isolates (Fig 3). Within these clusters, 29 PFGE groups (1-29) were found when the similarity between isolates was set at 80%. Among these, six (PFGE groups 11, 12, 14, 15, 19 and 28) consisted of at least two isolates and the remaining 23 were singletons. There were two major PFGE groups: group 14 (within cluster X) includes four *bla<sub>CTX-M-1</sub>*-isolates belonging to serogroup O45 and to phylogenetic group A, and group 15

(within cluster XI) includes four *bla<sub>CMY-2</sub>*-isolates belonging to phylogroup A for which the serogroup was untypeable in our system. Isolates of PFGE group 14 were from 2 distinct farms (farms 07 and 27) as were those of PFGE group 15 (farms 26 and 29) and PFGE group 28 (farms 02 and 17) (Fig 3). In addition, isolates of PFGE group 14 were all nonsusceptible to 3GC, nalidixic acid, sulfisoxazole, ampicillin, tetracycline and trimethoprim-sulfamethoxazole, and all possessed AMR genes *bla<sub>CTX-M-1</sub>*, *dfrA1* and *dfrA7*. Isolates of PFGE group 15 were nonsusceptible to all beta-lactams, nalidixic acid, ciprofloxacin and tetracycline. Most isolates of both PFGE groups 14 and 15 carried at least four virulence genes and many were defined as potential highly virulent APEC. Furthermore, the two isolates of PFGE group 11 that belonged to phylogroup B2 and produced *bla<sub>CMY-2</sub>* were multi-drug resistant and defined as potential human ExPEC.





**Fig 3. Clustering analysis of genetic variation of 39 blaCTX-M/blaCMY-2-positive *Escherichia coli* isolates from healthy chickens in the region of Dakar, Senegal.**

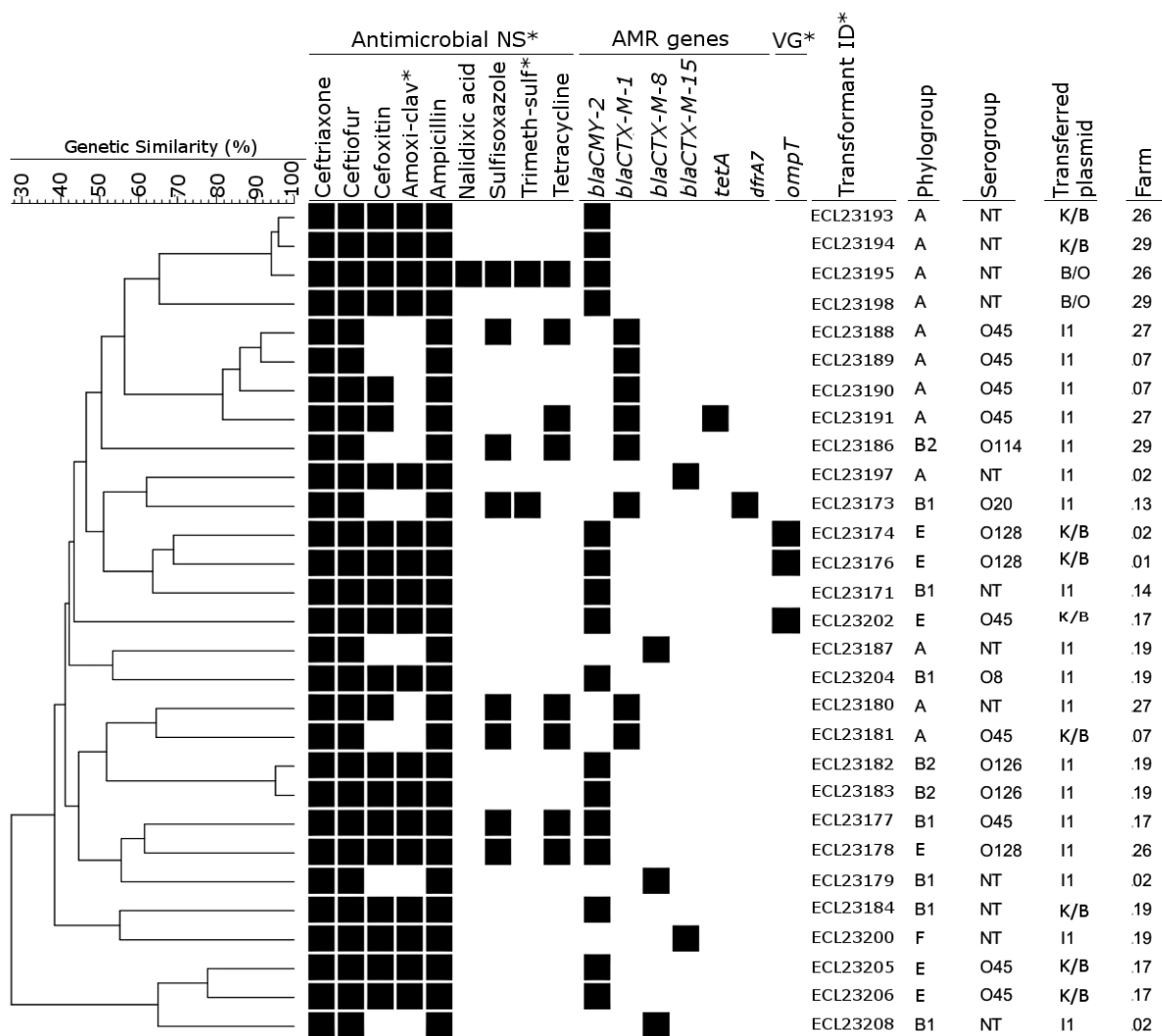
The dendrogram was generated using Dice coefficient and the unweighted pair-group method and arithmetic average (UPGMA). Based on a similarity index of  $\geq 60\%$  (continuous line), 23 major clusters (I-XXIII) were found inside which 32 PFGE groups (in arabic numerals) were identified when the similarity was set at 80% (broken line). (AMR) antimicrobial resistance; (antimicrobial NS), antimicrobial nonsusceptibility; (Amoxi/clav), amoxicillin-clavulanic acid; (Trimeth-sulf), trimethoprim-sulfamethoxazole; (Chloramphen), chloramphenicol; (Isolate ID), isolate identity. None of the ESBL/AmpC-producing isolates were positive for AMR genes *bla<sub>OXA-1</sub>* or *tetC* and as none were carriers of virulence genes *papC*, *sfa/foc*, *afa/dra* or *cnf* these genes were removed from the dendrogram.

### **ESBL/AmpC-producing *E. coli* from healthy chickens often possess several plasmid replicon types**

Plasmid replicon typing identified 12 plasmid types (Fig 3). Each isolate carried at least two markers of replicon types, with a maximum of eight. The most prevalent plasmid incompatibility groups were F (76.9%), colE (73.7%), FIB and I1 (69.2% each). In addition, plasmids of the incompatibility groups F, I1 and colE were detected in samples of faeces, drinking water and rinsing water; FIA, FIC and N in faeces only; the others (A/C, B/O, K/B, P, FIB and R) in samples of faeces and drinking water (Fig 3). Furthermore, most of the *bla*<sub>CTX-M-1</sub> positive isolates harboured plasmids of the incompatibility groups F, P, FIB, I1 and colE, those positive for genotype *bla*<sub>CTX-M-8</sub> were associated with the plasmids of the incompatibility groups FIB, I1 or colE and the isolates positive for *bla*<sub>CTX-M-15</sub> were carriers of I1 or colE (Fig 3).

### **Plasmids carrying *bla*<sub>CTX-M</sub> or *bla*<sub>CMY-2</sub> in ESBL/AmpC-producing *E. coli* from healthy chickens may be transferred and often carry resistance to other non beta-lactam antimicrobials**

Plasmids carrying ESBL/AmpC genes were successfully transferred by electroporation for 29 of the 30 examined isolates. The *bla*<sub>CMY-2</sub> gene was carried on replicon plasmids K (n=8), I1 (n=6) or B/O (n=2) and *bla*<sub>CTX-M</sub> genes were located on I1 (n=12) or K (n=1). I1 carriers of the *bla*<sub>CMY-2</sub> gene were detected on four farms and those with *bla*<sub>CTX-M</sub> on seven farms; the simultaneous presence of both types of I1 was identified on two farms. *bla*<sub>CMY-2</sub>-bearing K plasmids were present on six farms whereas the *bla*<sub>CTX-M</sub>-bearing K plasmid was identified on a separate farm. The B/O carrying *bla*<sub>CMY-2</sub> was detected in two farms in which both types of I1 and *bla*<sub>CMY-2</sub>-bearing K were identified (Fig 4). Some plasmids carrying ESBL/AmpC genes, such as B/O, I1, and K, also transferred resistance to other antimicrobials such as nalidixic acid, tetracycline, sulfisoxazole and trimethoprim-sulfamethoxazole, sometimes with corresponding tested AMR genes. In addition, three *bla*<sub>CMY-2</sub>-bearing K plasmids co-transferred the *ompT* virulence gene.



**Fig 4. Dendrogram of 29 CTX-M or CMY-2 transformants, showing antimicrobial nonsusceptibility, antimicrobial resistance genes, and virulence genes co-transferred with ESBL/AmpC genes and replicon plasmids carrying these genes.**

(Antimicrobial NS) Antimicrobial nonsusceptibility; (Amoxi-clav) amoxicillin-clavulanic acid; (Trimeth-sulf), Trimethoprim-sulfamethoxazole, (VG), Virulence gene; (Transformant ID) Transformant identity.

**Antimicrobial use and risk factors associated with presence of cephalosporin-nonsusceptible isolates on farms**

Of the 32 farms studied, five had used an anticoccidial drug for preventive purposes in the studied batch, two had used a quinolone (enrofloxacin or norfloxacin) for curative purposes, and one had used tetracycline both to prevent and cure disease; the remaining 24 farms did not report any drug use. Two of the five farmers who used the anticoccidials and the one who used tetracycline said they did not have veterinary training and did not use the services of any veterinarian or person with skills in the field. Among the potential risk factors, trained staff, farms with at least two buildings housing chickens, the lack of observance of an empty period, allowing visitors on farms, and disposing of dead chickens into the environment were selected for inclusion ( $p < 0.20$  in univariable analysis) in a multivariate logistic regression modelling the presence of 3GC-nonsusceptible indicator *E. coli* isolates on farms (Table 5). However, none was found to be significantly associated with presence of 3GC-nonsusceptible indicator *E. coli* isolates on farms in the reduced model.

**Table 5.** Potential risk factors associated with third-generation cephalosporin-resistant *Escherichia coli* isolates on chicken farms in the region of Dakar, Senegal.

Potential risk factor collected on batch under study	No. of farms	% of farms with 3GC resistant isolates detected	Odds ratio (univariable analyses)		
			Estimate	95% CI	p-value
Therapeutic use of antimicrobials					
Yes	8	25.0	0.8	0.13-5.0	0.82
No	24	29.2	Ref.		
Trained staff : staff with veterinary skills					
Yes	5	60.0	5.2	0.7–39.0	0.10*
No	27	22.2	Ref.		
Number of chicken houses (buildings on the farm in which the chickens are raised)					
≥ 2	18	38.9	3.8	0.6-22.4	0.13*
1	14	14.3	Ref.		
Presence of health problem in the cohort according to the farmer					

Yes	12	33.3	1.5	0.3-7.2	0.61
No	20	25.0	Ref.		
Use of growth promoters at least once in the cohort (according to the farmer)					
Yes	17	35.3	2.2	0.4-10.9	0.34
No	15	20.0	Ref.		
Cohabitation (chicken house is within human habitation or is shared with other animal species)					
Yes	12	33.3	1.5	0.3-7.2	0.61
No	20	25.0	Ref.		
Type of construction for the chicken "house"					
Clay	6	16.7	0.4	0.04-4.5	0.49
Concrete	26	30.7	Ref.		
Observance of an empty period between chicken batches					
No	3	66.7	6.3	0.5-80.2	0.15*
Yes	29	24.1	Ref.		

Visitors allowed on the farm					
Yes	29	24.1	0.1	0.01-2.0	0.15*
No	3	66.7	Ref.		
Contact of the staff with other farms					
Yes	10	40.0	2.3	0.4-11.3	0.31
No	22	22.7	Ref.		
Water source*					
Borehole or distribution network	14	28.6	1.0	0.2-4.9	0.96
Well water	18	27.8	Ref.		
Dead chicken carcass disposal					
In the environment	15	40.0	3.1	0.6-15.7	0.16*
Burial/cremation	17	17.7	Ref.		
Type of operation (yes when the farm only exploits broilers, not when it is a mixed farm)					

Mixed farm	8	33.3	0.3	0.03-2.7	0.27
Only broilers	24	12.5	Ref.		

\* : Variable selected for inclusion in the multivariable model ( $p < 0.20$ )



## Discussion

This study has demonstrated the presence of ESBL/AmpC-producer and potential ExPEC isolates in healthy chickens in Senegal. Given that a large proportion of the farms in the study area (32 out of 68) were randomly selected, our results are likely representative of the Dakar region of Senegal.

The observed high proportion (>68% in indicator isolates) of MDR isolates, with 96.9% of the 32 farms harboring at least one MDR indicator isolate, suggests that therapeutic options could be limited in the treatment of associated diseases. We have already reported a high (86.2%) prevalence of MDR *E. coli* isolates from diseased chicken farms in Senegal [21], and the prevalence of MDR we found here at the farm level is also in line with the 94% of MDR farms reported in Punjab, India [38].

A high percentage (58.5%) of 3GC-nonsusceptible isolates was observed in the potential ESBL/AmpC collection suggesting chickens and their environment in Senegal could act as reservoir of 3GC-resistant *E. coli*. The high prevalence of 3GC-nonsusceptible isolates is also indicative of the selection pressure that antimicrobial use in animals could generate, and underlines the importance of making a careful choice in the measures to be taken to control antimicrobial use in Senegal. In fact, it has been reported in Senegal that antimicrobials, including those of critical importance in human health, can be purchased from street vendors and used in chickens [20]. Indeed, in our field investigation, one farmer had used norfloxacin in chickens, a fluoroquinolone used in the treatment of urinary tract infections in humans. To be effective, this control must be extended to veterinary antimicrobials such as ceftiofur, for which a prevalence of nonsusceptibility similar to that of ceftriaxone was observed in all collections in the present study. Indeed, ceftiofur is a 3GC reserved for veterinary use only; nevertheless, *in ovo* use of ceftiofur has been associated with 3GC-resistant enterobacteria in human and chickens [39].

The ciprofloxacin resistance observed in this study could be due to widespread use of quinolones in chickens in Senegal to treat or prevent bacterial infections in the field. Nevertheless, therapeutic use of enrofloxacin or norfloxacin was only reported in two of the 20 farms harboring ciprofloxacin-resistant isolates in our study. Our results show the presence

of *E. coli* with at least 3 mutations in the QRDR of *gyrA* (2 mutations) and *parC* (1 mutation) in 95% of tested farms, clearly reflecting a high level of resistance to all fluoroquinolones and suggesting a widespread use of fluoroquinolones in these farms or in the chick hatcheries, two or more *gyrA* or *parC* substitutions being needed for a high level of resistance [40]. We have already described these mutations in our previous characterisation of clinical isolates in Senegal [21]. In addition, we have found in the present study amino acid changes Ser80Tyr in *gyrA* and Ser80Arg, Glu84Lys and Glu84Gly in *parC*, which were also reported in *E. coli* by other studies [15, 41]. Only two of the 68 ciprofloxacin-resistant isolates without presence of *qnrB* gene did not carry mutations in *gyrA* and/or *parC* and ciprofloxacin-resistance in these two isolates could be due to the presence of other *qnr* genes or efflux pump genes not explored in this study. Sixty-seven (88.2%) isolates were carriers of the double-serine mutations in *gyrA* (Ser83Leu) and *parC* (Ser80Ile). This double mutation has been described as a fitness factor that helps the ST131 pandemic clone to successfully spread into new ecological niches [42]. Indeed, our isolates carrying this double mutation were found in 19 out of 20 farms, suggesting that they may have spread from a single clone, but further study is needed to elucidate this hypothesis.

A discrepancy was observed between the high AMR prevalence and the low reported use of antimicrobials (24 farmers did not report any drug use). It is possible that farmers used these antimicrobials but did not report their use, resulting in an information bias. Use in previous flocks is also possible, which was not asked in our questionnaire. Farms for which the staff reported having veterinary skills demonstrated a greater tendency to have 3GC-resistant isolates compared to farms for which the staff reported having no veterinary skills, when univariable analyse was performed. This suggests that farmers with veterinary knowledge are using more antimicrobial agents. It has been reported that most farmers in Senegal have received basic training in breeding techniques and may go beyond their role by carrying out prohibited acts such as the prescription and use of antimicrobials, often being under-dosed [43]. Hence, farmers may hesitate to declare all antimicrobial use. In Senegal, antimicrobials such as quinolones, tetracyclines and sulfonamides are generally used in poultry farms as anti-stress, anti-coccidian or anti-infective drugs [44]. Therefore, the high percentage of resistance reported here for nalidixic acid, sulfonamides, and aminoglycosides may be a consequence of

the widespread use of these antimicrobials or their analogous in poultry. It has been reported that for some chicken farms in Senegal no validated program of prophylaxis is applied and some breeders acquire antibiotics often marketed for human medicine, by fraudulent means or through street vendors [20].

Apart from the potential under-reporting of antimicrobial use, another plausible explanation for the high prevalence of QRDR mutations and 3GC-resistance could be their use in local hatcheries, in hatching eggs imported from Europe or Latino America [20] or even in humans and other animal species living in close proximity with chickens. In addition, in Senegal, most poultry farmers in Senegal use Virkon as a disinfectant [45]. As Virkon has been shown to promote the selection of antimicrobial resistance through QRDR mutation in enterobacteria [46], the mutations could therefore be maintained without quinolone-exposure. Similarly, the use of hydrogen peroxide, a disinfectant of the same class as Virkon, has been reported to increase the resistance of avian *E. coli* to ceftiofur, ceftiofur, cefoxitin and amoxicillin/clavulanic acid [16]. Therefore, the widespread use of Virkon in chicken farms in Senegal may also have contributed to 3GC resistance.

The *bla<sub>CMY-2</sub>* (0.8%) and *bla<sub>CTX-M</sub>* (1.6%) genes were detected in very low proportions among indicator *E. coli* isolates in our study whereas the proportion of isolates positive for *bla<sub>TEM</sub>* was higher (36.2%). Prevalence of the *bla<sub>CTX-M</sub>* and *bla<sub>TEM</sub>* genes in indicator *E. coli* isolates is very different from that reported in chickens in another African country, Zambia [47], where *bla<sub>CTX-M</sub>* was more prevalent (18.5%) than *bla<sub>TEM</sub>* (6.0%); the authors did not examine their isolates for the presence of *bla<sub>CMY-2</sub>*. These findings may be due to a difference in antimicrobial use in Senegal compared to Zambia. The study in Zambia did not identify the antimicrobials used on the farms investigated. In addition to the use of 3GCs, the use of aminopenicillins [48], certain other antimicrobials or even feed additives such as zinc or copper [49] in chickens can lead to the selection of *E. coli* producers of the ESBL CTX-M. The *bla<sub>CTX-M</sub>* genes detected in this study were of genotype *bla<sub>CTX-M-1</sub>*, *-8* and *-15*. In our previous study on clinical isolates from chickens in Senegal [21], *bla<sub>CTX-M</sub>* genes were also found to be of genotypes *bla<sub>CTX-M-1</sub>* and *bla<sub>CTX-M-8</sub>*, but this is the first study reporting *bla<sub>CTX-M-15</sub>*-producing *E. coli* isolated from chickens in Senegal. The latter, in recent years has become the predominant *bla<sub>CTX-M</sub>* variant in human isolates in many areas of the world [50]. The

presence of isolates carrying *bla*<sub>CTX-M-15</sub> in poultry farms in Senegal, together with the fact that *bla*<sub>CTX-M-15</sub>-producing *E. coli* have also been isolated from children in a remote Senegalese village [51], suggest that this variant may be well established in enterobacteria of both human and animal origin in Senegal. In addition, the *bla*<sub>CTX-M-15</sub> genes were identified on the epidemic plasmid I1, highlighting the importance of monitoring *bla*<sub>CTX-M-15</sub>-positive *E. coli* at both the farm and community levels. Nevertheless, the *bla*<sub>CTX-M-15</sub> positive isolates identified in our study possess fewer virulence genes than the *bla*<sub>CTX-M-1</sub>-producing isolates.

Genes encoding resistance to tetracyclines and trimethoprim-sulfamethoxazole were detected in a high proportion of indicator *E. coli* isolates, as was the presence of phenotypical resistance in these isolates. Although the present study did not demonstrate significant use of these antimicrobials, previous studies in Senegal have reported their use in chickens as growth promoters or for treatment [44] and in humans for treatment of different bacterial diseases [52, 53].

The finding of ESBL/AmpC-producing isolates in faeces, drinking water and carcass rinsing water samples underlines the risk to the human population both via carcass contamination or direct contact with chickens given the proximity of poultry and humans in Senegal. In Senegal, as in many developing countries, chicken farms can be established in areas densely populated, and birds can be sold live in markets. This danger may be exacerbated by the finding of potential human ExPEC isolates, some of which produce ESBL/AmpC, as observed in several farms. Among these potential human ExPECs, were two isolates of the serogroup O126 in the PFGE group 11, belonging to phylogroup B2, being *bla*<sub>CMY-2</sub>-producers. Indeed, pathogenic *E. coli* belonging to phylogroup B2 are more frequently associated with infections in humans [54]. Thus, the presence of such isolates in an environment close to humans could facilitate their transmission through direct or indirect contact. This demonstrates the importance of compliance with biosecurity measures in poultry farms in Senegal, especially since our survey showed that visitors can freely enter the farms and that dead birds may be disposed into the immediate environment.

The finding that ESBL/AmpC-producing isolates of different farms belonged to a single PFGE group suggests their potential circulation between farms. Alternatively, these clonally related

ESBL/AmpC-producing isolates could have originated from a single source such as a same hatchery as we suggested in our previous study [21] and has been observed by several authors [48, 55, 56]. Another explanation for the spread of resistance genes could be the horizontal transmission of plasmids bearing these ESBL/AmpC genes. Effectively, the CTX-M genes were identified on plasmids of incompatibility groups I1 and K/B and CMY-2 gene on plasmids K/B, I1 and B/O. All isolates of the PFGE group 14 carried CTX-M-1 genes on the plasmid I1 and the two most closely related isolates of the PFGE group 15 carried the CMY-2 gene on K plasmids, indicating that these plasmids have spread with these clonally related isolates. However, I1 and K plasmids carrying ESBL/AmpC genes were also found in different clusters, suggesting the involvement of a horizontal dissemination as observed by Castellanos *et al.* [57], who reported the horizontal dissemination of ESBL/AmpC genes via plasmids found in highly heterogeneous avian *E. coli* strains. Nevertheless, the finding that isolates of the same PFGE group carry identical plasmids suggests that AMR is disseminated either by clones, via plasmids or by both plasmids and clones as observed by Agersø and colleagues [48]. Therefore, further experiments using whole genome sequencing are required to elucidate the mechanism of spreading of ESBL/AmpC genes. Interestingly, I1 plasmids, which were found to carry *bla*<sub>CTX-M</sub> or *bla*<sub>CMY-2</sub>, were found in almost all clusters and on different farms that used antimicrobials for therapeutic purpose or as growth promoters. It should be noted that the I1 plasmid is considered as “epidemic” with its occurrence linked to antimicrobial use [58] and therefore its spread must be monitored as well as the AMR itself. It should also be noted that other factors such as migratory birds [59] or the practice in Senegal of using intermediaries to collect live or killed chickens on farms for sale in the markets [20] may also be an important source of pathogen spread.

This study showed that O45 (20.0%) was the most prevalent O serogroup among ESBL/AmpC-producing *E. coli*. These O45-isolates belonged to phylogroup A, B1 or D and were all defined as MDR and potentially virulent APEC. Mora *et al.* [60] also reported serogroup O45 belonging to phylogroups A, B1 and D among *E. coli* isolated from diseased chickens. These authors found that the O45:D isolates were also MDR and constituted a specific clonal group in birds in contrast to O45:B2 isolates which were found in both humans and birds. Thus, the O45 isolates in our study would likely not pose a risk to humans, but

could potentially cause colibacillosis in chickens. On the other hand, none of the isolates belonged to the serogroups most frequently isolated from cases of colibacillosis in chickens, such as O1, O2 and O78 [61, 62], as we also reported in our previous study of *E. coli* isolated from cases of chicken colibacillosis in Senegal [21]. Nevertheless, based on the defining criteria [21], 22 (17.3%) indicator *E. coli* isolates included potentially virulent APEC of which 4 were potentially capable of infecting humans according to previously established criteria [63]. Some APEC isolates share certain genetic similarities with human ExPEC, thus being potentially capable of infecting humans [5]. In addition, it has been shown that chicken fecal *E. coli* isolates possessing ExPEC-associated genes can cause ExPEC-associated illnesses in animal models for human infections [23]. These findings suggest that chickens and/or their environment in Senegal, in addition to being a reservoir of AMR, are a possible reservoir of *E. coli* that are potentially pathogenic for humans.

Although some potential risk factors, including management practices, had a tendency to be associated with the presence of 3GC-resistant isolates on farms, no risk factors for presence of 3GC-nonsusceptible isolates on farms were statistically significant in the multivariate model. Studies in Vietnam [64] and in countries of the South Western Indian Ocean [65] reported that management factors such as visitors allowed on farms and environmental mismanagement were associated with presence of ESBL/AmpC-producer *E. coli* on farms. The lack of significance may be due to the low statistical power related to our small sample size (n = 32 farms). . It should be noted that the fact that in a sample, isolates with different morphologies were targeted without being considered in the calculation of sampling weights could bias the estimated prevalences. This approach, however, maximized the probability of detecting the presence of isolates with less frequent profiles or genes at the farm level. In addition, our study was conducted during a period when poultry farms were generally rare. Indeed, some breeders, especially those in sector 2, are very irregular, producing only in times of high demand that correspond to the end-of-year celebrations [20]. This study could therefore provide the basis for a future study of a larger sample size, during a period of high demand, focussing on the potential risk factors that demonstrated a tendency to be associated with the presence of 3GC-resistant isolates on farms.

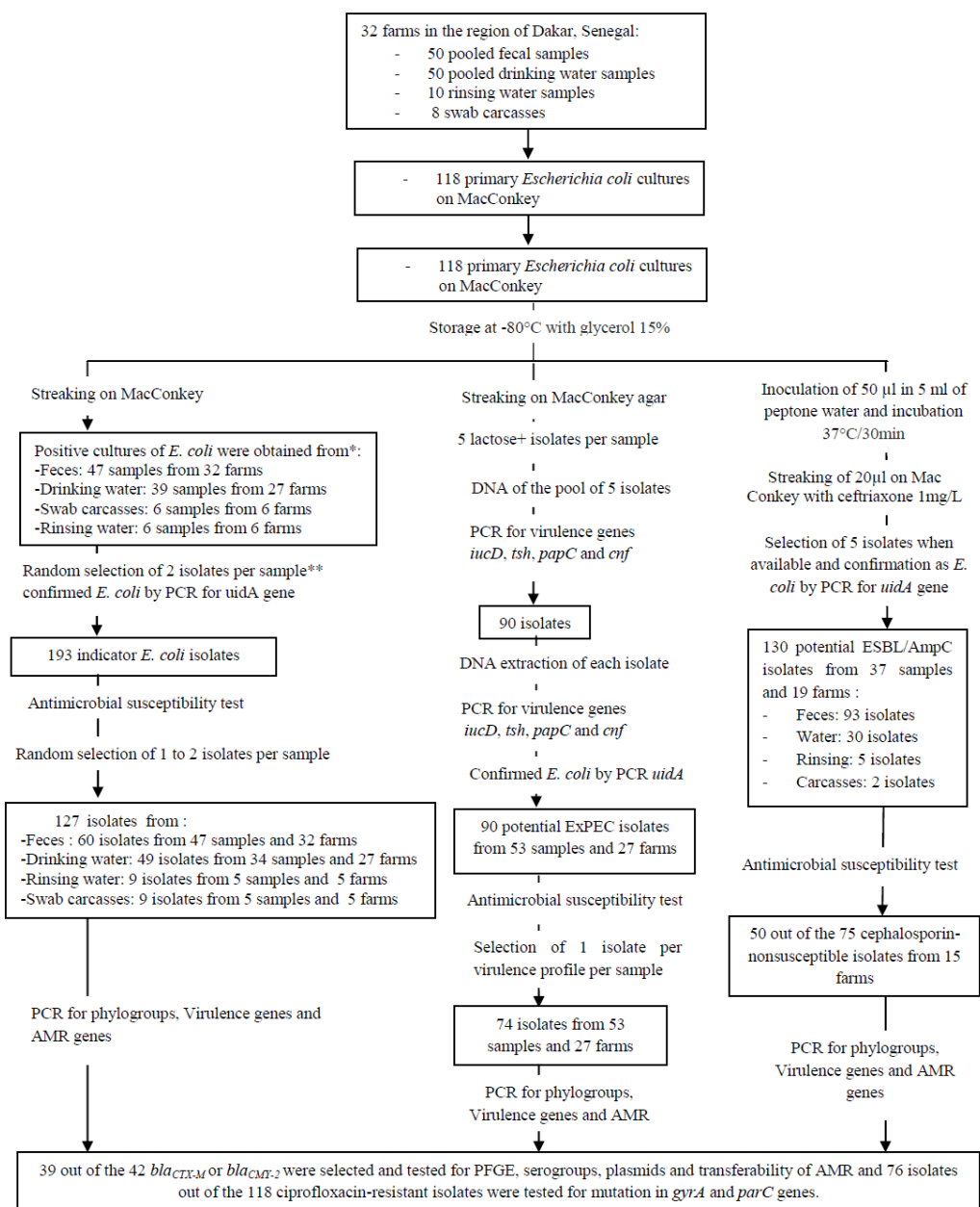
## **Conclusions**

*Escherichia coli* isolates potentially pathogenic for humans and demonstrating MDR, with resistance expressed against antimicrobials of critical importance in human health, were found in healthy chickens in Senegal. 3GC-resistance was due to the CTX-M/CMY-2 genes whereas ciprofloxacin-resistance was due to mutation in *gyrA* and *parC* genes of QRDR. Some clonally related ESBL/AmpC-producer isolates were observed, suggesting their circulation among farms. Moreover, the involvement of plasmids in the dissemination of ESBL/AmpC genes may be possible since plasmids harboring these genes were encountered in isolates of different clonal groups originating from different farms. These results highlight the importance of controlling antimicrobial use in Senegal and implementing surveillance system for AMR. This could include a network for AMR surveillance in veterinary medicine, control of the distribution of antimicrobials, combat the illegal sale of antimicrobials (black markets), sensitize breeders about the danger of self-medication, sensitize the veterinarians on the prior performance of the antibiogram before their use for therapeutic purposes and finally, fight against counterfeit medicines.

### **Acknowledgments**

We thank Dr. Ibrahima Wade and Dr. Charles Dieng, who fully invested in the collection of samples. Our sincere thanks to Mr. Moussa SENE (Microbiology Laboratory of the École Inter-États des Sciences et Médecine Vétérinaires de Dakar, Senegal), Dr. Ghyslaine Vanier and Mr. Gabriel Desmarais (OIE reference laboratory for *E. coli*, Université de Montreal, Canada) for their excellent technical assistance.

## Supporting information



### S1 Fig. Methodological approach used in this study.

\* For 3 faecal samples, 11 drinking water samples, 4 of rinsing water samples and 2 swabs, no lactose + colony growth on MacConkey agar. These samples were then inoculated into TSB + bile salt broths to remove bacteria other than *E. coli*, but no culture could be obtained. \*\*From 1 faecal sample and 2 drinking water samples, only one *uidA*+ isolate was found.



**S1 Table. PCR primers used for screening and identification of blaCTX-M subtypes.**

<b>Product or antimicrobial</b>	<b>Gene</b>	<b>Primer</b>	<b>Amplicon size (bp)</b>	<b>Annealing temperature</b>	<b>Control strain</b>	<b>Reference</b>
Ceftriaxone	<i>bla</i> <sub>CTX-M</sub> group 1	5' TTCGTCTCTTCCAGAATAAGG 3' 5' CAGCACTTTTGCCGTCTAAG 3'	968	55°C	18772	(Borgogna et al., 2016)
Ceftriaxone	<i>bla</i> <sub>CTX-M</sub> group 2	5' CGTTAACGGCACGATGAC 3' 5' CGATATCGTTGGTGGTRCCAT 3'	404	55°C	18771	(Borgogna et al., 2016)
Ceftriaxone	<i>bla</i> <sub>CTX-M</sub> group 8/25	5' AACRCRCAGACGCTCTAC 3' 5' TCGAGCCGGAASGTGTYAT 3'	326	55°C	18773	(Borgogna et al., 2016)
Ceftriaxone	<i>bla</i> <sub>CTX-M</sub> group 9	5' TGGTGACAAAGAGAGTGCAACG 3' 5' CACAGGCCTTCGGCGAT 3'	875	55°C	18774	(Paauw et al., 2006)

**S2 Table. Prevalence of nonsusceptibility at the sample and farm levels in potential ESBL/AmpC-producer *Escherichia coli* from healthy chickens in the region of Dakar, Senegal.**

Unit of study (No. examined)	Percentage (%) of units with one or more nonsusceptible isolates per category <sup>a</sup> , antimicrobial class <sup>b</sup> and antimicrobial <sup>c</sup>													
	Critically important									Highly important				
	Highest priority				High priority									
	FLQ		CPS		PEN	PEN/I	AMG			CPM	FOL		PHE	TET
	NAL	CIP	TIO	CRO	AMP	AMC	GEN	KAN	STR	FOX	SXT	SSS	CHL	TET
Drinking water/Faeces (n=123)	54.5	28.5	58.5	58.5	100	43.1	8.1	20.3	26.8	43.9	40.6	77.2	34.1	95.1
Carcasses/rinsing water (n=7)	100	85.7	42.8	42.8	100	14.3	0.0	57.1	42.8	14.3	85.7	85.7	14.3	71.4
All sources (n=130)	56.9	31.5	58.5	58.5	100	41.5	7.9	22.3	27.7	42.3	43.1	77.7	33.1	93.8
Farms (n = 18)	100	44.4	77.8	77.8	100	72.2	16.7	44.4	55.6	72.2	72.2	94.4	50.0	100

<sup>a</sup>Category of human antimicrobials importance according to the World Health Organization (WHO) [37]: (I) Very High Importance, (II) High Importance, (III) Moderate Importance. <sup>b</sup>Antimicrobial classes: (FLQ) Fluoroquinolones; (PEN/I) Penicillin+ $\beta$ -Lactamase inhibitors; (CPS) Cephalosporins; (PEN) Penicillin; (CPM) Cephamycin; (AMG) Aminoglycosides; (FOL) Folate inhibitors; (PHE) Phenicol; (TET) Tetracyclines. <sup>c</sup>Antimicrobials: (NAL) Nalidixic acid; (CIP) Ciprofloxacin; (AMC) Amoxicillin/clavulanic acid; (TIO) Ceftiofur; (CRO) Ceftriaxone; (AMP) Ampicillin; (FOX) Cefoxitin; (GEN) Gentamicin; (KAN) Kanamycin; (STR) Streptomycin; (SXT) Trimethoprim-sulphamethoxazole; (SSS) Sulfisoxazole; (CHL) Chloramphenicol; (TET) Tetracycline.

**S3 Table. Prevalence of AMR genes by samples of origin.**

AMR gene	No. (%) of positive isolates by types of samples			
	Faeces (60)	Drinking water (n=49)	Rinsing water (n=9)	Carcasses (n=9)
<i>tetA</i>	36 (60.0)	27 (55.1)	4 (44.4)	6 (66.7)
<i>tetB</i>	13 (21.7)	7 (14.3)	1 (11.1)	4 (44.4)
<i>dfrA1</i>	22 (36.7)	10 (20.4)	1 (11.1)	4 (44.4)
<i>dfrA5</i>	6 (10.0)	7 (14.3)	0 (0.0)	0 (0.0)
<i>dfrA7</i>	34 (56.7)	21 (42.8)	2 (22.2)	4 (44.4)
<i>qnrB</i>	4 (6.7)	8 (16.3)	1 (11.1)	1 (11.1)
<i>aadA1</i>	17 (28.3)	3 (6.1)	2 (22.2)	3 (33.3)
<i>bla<sub>TEM</sub></i>	17 (28.3)	20 (40.8)	1 (11.1)	8 (88.9)
<i>bla<sub>OXA-1</sub></i>	0 (0.0)	1 (2.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
<i>bla<sub>SHV</sub></i>	0 (0.0)	2 (4.1)	0 (0.0)	0 (0.0)
<i>bla<sub>CTX-M</sub></i>	2 (3.3)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
<i>bla<sub>CMY-2</sub></i>	0 (0.0)	1 (2.0)	0 (0.0)	0 (0.0)

AMR, antimicrobial resistance; No., Number; %, prevalence expressed in percentage; Tetracycline resistance gene *tetC* was not detected in any isolate.

## References

1. Stacy AK, Mitchell NM, Maddux JT, Miguel A, Durán L, Girón JA, et al. Evaluation of the prevalence and production of *Escherichia coli* common pilus among avian pathogenic *E. coli* and its role in virulence. Plos One 9(1): e86565. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0086565>.
2. Johnson JR, Delavari P, Kuskowski M, Stell AL. Phylogenetic distribution of extraintestinal virulence-associated traits in *Escherichia coli*. J Infect Dis. 2001;183(1):78-88.
3. Laube H, Friese A, von Salviati C, Guerra B, Käsbohrer A, Kreienbrock L, et al. Longitudinal monitoring of extended-spectrum-beta-lactamase/AmpC-producing *Escherichia coli* at German broiler chicken fattening farms. Appl Environ Microbiol. 2013;79(16):4815-20.
4. Vincent C, Boerlin P, Daignault D, Dozois CM, Dutil L, Galanakis C, et al. Food reservoir for *Escherichia coli* causing urinary tract infections. Emerg Infect Dis. 2010;16(1):88-95.
5. Mellata M. Human and avian extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: infections, zoonotic risks, and antibiotic resistance trends. Foodborne Pathog Dis. 2013;10(11):916-32.
6. Johnson TJ, Wannemuehler Y, Johnson SJ, Stell AL, Doetkott C, Johnson JR, et al. Comparison of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strains from human and avian sources reveals a mixed subset representing potential zoonotic pathogens. Appl Environ Microbiol. 2008;74(22):7043-50.
7. Erb A, Stürmer T, Marre R, Brenner H. Prevalence of antibiotic resistance in *Escherichia coli*: overview of geographical, temporal, and methodological variations. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2007;26(2):83-90.
8. Woodford N, Ward M, Kaufmann M, Turton J, Fagan E, James D, et al. Community and hospital spread of *Escherichia coli* producing CTX-M extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in the UK. J Antimicrob Chemother. 2004;54(4):735-43.

9. Denisuk AJ, Lagacé-Wiens PR, Pitout JD, Mulvey MR, Simner PJ, Taylor F, et al. Molecular epidemiology of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-, AmpC  $\beta$ -lactamase- and carbapenemase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolated from Canadian hospitals over a 5 year period: CANWARD 2007–11. *J Antimicrob Chemother.* 2013; 68 Suppl 1:i57-65. doi: 10.1093/jac/dkt027.
10. Randall L, Clouting C, Horton R, Coldham N, Wu G, Clifton-Hadley F, et al. Prevalence of *Escherichia coli* carrying extended-spectrum  $\beta$ -lactamases (CTX-M and TEM-52) from broiler chickens and turkeys in Great Britain between 2006 and 2009. *J Antimicrob Chemother.* 2010; 66(1):86-95.
11. Bortolaia V, Larsen J, Damborg P, Guardabassi L. Potential pathogenicity and host range of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* isolates from healthy poultry. *Appl Environ Microbiol.* 2011;77(16):5830-3.
12. Clermont O, Lavollay M, Vimont S, Deschamps C, Forestier C, Branger C, et al. The CTX-M-15-producing *Escherichia coli* diffusing clone belongs to a highly virulent B2 phylogenetic subgroup. *J Antimicrob Chemother.* 2008;61(5):1024-8.
13. Pitout JD, Laupland KB, Church DL, Menard ML, Johnson JR. Virulence factors of *Escherichia coli* isolates that produce CTX-M-type extended-spectrum  $\beta$ -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005;49(11):4667-70.
14. Minarini LA, Darini ALC. Mutations in the quinolone resistance-determining regions of *gyrA* and *parC* in *Enterobacteriaceae* isolates from Brazil. *Braz J Microbiol.* 2012;43(4):1309-14.
15. McDonald LC, Chen F-J, Lo H-J, Yin H-C, Lu P-L, Huang C-H, et al. Emergence of Reduced Susceptibility and Resistance to Fluoroquinolones in *Escherichia coli* in Taiwan and Contributions of Distinct Selective Pressures. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001;45(11):3084-91.

16. Caffrey N, Nekouei O, Gow S, Agunos A, Checkley S. Risk factors associated with the A2C resistance pattern among *Escherichia coli* isolates from broiler flocks in Canada. *Prev Vet Med.* 2017;148:115-20.
17. Mo SS, Kristoffersen AB, Sunde M, Nødtvedt A, Norström M. Risk factors for occurrence of cephalosporin-resistant *Escherichia coli* in Norwegian broiler flocks. *Prev Vet Med.* 2016;130:112-8.
18. Vanderkerchove D, de Herdt P, Laevens H, Pasmans F. Risk factors associated with colibacillosis outbreaks in caged layer flock. *Avian Pathol.* 2004;33:337-42.
19. dos Santos Alves T, Lara GHB, Maluta RP, Ribeiro MG, da Silva Leite D. Carrier flies of multidrug-resistant *Escherichia coli* as potential dissemination agent in dairy farm environment. *Sci Total Environ.* 2018;633:1345-51.
20. FAO [Food and Agriculture Organisation of the United Nations]. Secteur Avicole Senegal. Revues nationales de l'élevage de la division de la production et de la santé animales de la FAO. 2014; Rome 7. Available from : <http://www.fao.org/docrep/019/i3659f/i3659f.pdf>.
21. Vounba P, Yaghouba K, Ndiaye C, Arsenault J, Fairbrother JM, Bada-Alamedji R. Molecular Characterization of *Escherichia coli* Isolated from Chickens with Colibacillosis in Senegal. *Foodborne Pathog Dis.* 2018;15(8):517-525.
22. Maluta RP, Fairbrother JM, Stella AE, Rigobelo EC, Martinez R, de Avila FA. Potentially pathogenic *Escherichia coli* in healthy, pasture-raised sheep on farms and at the abattoir in Brazil. *Vet Microbiol.* 2014;169(1-2):89-95.
23. Stromberg ZR, Johnson JR, Fairbrother JM, Kilbourne J, Van Goor A, Curtiss 3rd R, et al. Evaluation of *Escherichia coli* isolates from healthy chickens to determine their potential risk to poultry and human health. *PLoS ONE* 12(7):e0180599. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0180599>
24. Agersø Y, Aarestrup FM, Pedersen K, Seyfarth AM, Struve T, Hasman H. Prevalence of extended-spectrum cephalosporinase (ESC)-producing *Escherichia coli* in Danish slaughter

pigs and retail meat identified by selective enrichment and association with cephalosporin usage. *J Antimicrob Chemother.* 2011;67(3):582-8.

25. [CLSI]. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. . 26th ed CLSI supplement M100S Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute. 2016. 256 p.

26. [CLSI]. Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated From Animals. 3rd ed CLSI supplement VET01S Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute. 2015:128 p.

27. Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey R, Carmeli Y, Falagas M, Giske C, et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect.* 2012;18(3):268-81.

28. EFSA (European Food Safety Authority) and ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control). The European Union summary report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2015. *EFSA Journal* 2017;15(2):4694, 212 pp. doi:10.2903/j.efsa.2017.4694.

29. Everett MJ, Jin YF, Ricci V, Piddock L. Contributions of individual mechanisms to fluoroquinolone resistance in 36 *Escherichia coli* strains isolated from humans and animals. *Antimicrob Agents Chemother.* 1996;40(10):2380-6.

30. Clermont O, Bonacorsi S, Bingen E. Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. *Appl Environ Microbiol.* 2000;66(10):4555-8.

31. Clermont O., Christenson JK, Denamur E, Gordon DM. The Clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: improvement of specificity and detection of new phylo-groups. *Environ Microbiol Rep.* 2013; 5(1): 58 -65.

32. Orskov I, Orskov F, Jann B, Jann K. Serology, chemistry, and genetics of O and K antigens of *Escherichia coli*. *Bacteriol Rev.* 1977;41(3):667–710.



33. Ribot EM, Fair M, Gautom R, Cameron D, Hunter S, Swaminathan B, et al. Standardization of pulsed-field gel electrophoresis protocols for the subtyping of *Escherichia coli* O157: H7, *Salmonella*, and *Shigella* for PulseNet. Foodborne Pathog Dis. 2006;3(1):59-67.
34. Carattoli A, Bertini A, Villa L, Falbo V, Hopkins KL, Threlfall EJ. Identification of plasmids by PCR-based replicon typing. J Microbiol Methods. 2005;63(3):219-28.
35. García-Fernández A, Fortini D, Veldman K, Mevius D, Carattoli A. Characterization of plasmids harbouring *qnrS1*, *qnrB2* and *qnrB19* genes in *Salmonella*. J Antimicrob Chemother. 2008;63(2):274-81.
36. Mnif B, Harhour H, Jdidi J, Mahjoubi F, Genel N, Arlet G, et al. Molecular epidemiology of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in Tunisia and characterization of their virulence factors and plasmid addiction systems. BMC Microbiol. 2013;13(1):147. doi: [10.1186/1471-2180-13-147](https://doi.org/10.1186/1471-2180-13-147).
37. WHO [World Health Organization]. Antimicrobial Resistance: Global report on Surveillance. Available from : <http://www.who.int/drugresistance/documents/surveillancereport/en/>.
38. Brower CH, Mandal S, Hayer S, Sran M, Zehra A, Patel SJ, et al. The prevalence of extended-spectrum beta-lactamase-producing multidrug-resistant *Escherichia coli* in poultry chickens and variation according to farming practices in Punjab, India. Environ Health Perspect. 2017;125(7):077015. doi: 10.1289/EHP292.
39. Dutil L, Irwin R, Finley R, King Ng L, Avery B, Boerlin P, Bourgault A-M, Cole L, Daignault D, Desruisseau A, Demczuk W, Hoang L, Horsman GB, Ismail J, Jamieson F, Maki A, Pacagnella A, and Pillai DR. Ceftiofur resistance in *Salmonella enterica* serovar Heidelberg from chicken meat and humans, Canada. Emerg Infect Dis. 2010; 16(1): 48-54.
40. Vanni M, Meucci V, Tognetti R, Cagnardi P, Montesissa C, Piccirillo A, et al. Fluoroquinolone resistance and molecular characterization of *gyrA* and *parC* quinolone

resistance-determining regions in *Escherichia coli* isolated from poultry. Poultry Sci. 2014;93(4):856-63.

41. Fu Y, Zhang W, Wang H, Zhao S, Chen Y, Meng F, et al. Specific patterns of gyr A mutations determine the resistance difference to ciprofloxacin and levofloxacin in *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*. BMC Infect Dis. 2013;13(1):8. doi: 10.1186/1471-2334-13-8.

42. Fuzi M, Szabo D, Cserecsik R. Double-Serine Fluoroquinolone Resistance Mutations Advance Major International Clones and Lineages of Various Multi-Drug Resistant Bacteria. Front Microbiol. 2017;8:2261. doi: [10.3389/fmicb.2017.02261](https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02261).

43. Paul MCB. Sénégal, un système de santé animale en voie de privatisation. Thesis, École vétérinaire d'Alfort. 2005. Available from : <http://theses.vet-alfort.fr/telecharger.php?id=745>.

44. Niyibizi B. Etude préliminaire sur l'utilisation des antibiotiques dans les élevages de poules pondeuses de la région de Dakar et la présence de résidus d'antibiotiques dans les œufs. M. Sc. École Inter-États des Sciences et Médecine Vétérinaires (EISMV) de Dakar, Sénégal. 2012. Available from : <http://www.beep.ird.fr/collect/eismv/index/assoc/MEM12-2.dir/MEM12-2.pdf>.

45. Oulon E. États des lieux sur les mesures de biosécurité dans les fermes avicoles au Sénégal : cas des départements de Rufisque et Thiès. Thesis, École Inter-États des Sciences et Médecine Vétérinaires de Dakar (EISMV). 2010. Available from : <http://www.beep.ird.fr/collect/eismv/index/assoc/TD10-11.dir/TD10-11.pdf>.

46. Webber MA, Whitehead RN, Mount M, Loman NJ, Pallen MJ, Piddock LJ. Parallel evolutionary pathways to antibiotic resistance selected by biocide exposure. J Antimicrob Chemother. 2015; 70(8):2241-8.

47. Chishimba K, Hang'ombe B, Muzandu K, Mshana S, Matee M, Nakajima C, et al. Detection of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in market-ready chickens in Zambia. Int J Microbiol. 2016; 2016:5275724. doi: 10.1155/2016/5275724.

48. Agersø Y, Jensen JD, Hasman H, Pedersen K. Spread of extended spectrum cephalosporinase-producing *Escherichia coli* clones and plasmids from parent animals to broilers and to broiler meat in a production without use of cephalosporins. *Foodborne Pathog Dis.* 2014;11(9):740-6.
49. Saliu E-M, Vahjen W, Zentek J. Types and prevalence of extended-spectrum beta-lactamase producing *Enterobacteriaceae* in poultry. *Anim Health Resh Rev.* 2017;18(1):46-57.
50. Bevan ER, Jones AM, Hawkey PM. Global epidemiology of CTX-M  $\beta$ -lactamases: temporal and geographical shifts in genotype. *J Antimicrob Chemother.* 2017;72(8):2145-55.
51. Ruppé E, Woerther P-L, Diop A, Sene A-M, Da Costa A, Arlet G, et al. Carriage of CTX-M-15-producing *Escherichia coli* isolates among children living in a remote village in Senegal. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009;53(7):3135-7.
52. Bada-Alambédi R, Fofana A, Seydi M, Akakpo AJ. Antimicrobial resistance of *Salmonella* isolated from poultry carcasses in Dakar (Senegal). *Brazil. J Microbiol.* 2006;37(4):510-5.
53. Cardinale E, Perrier Gros-Claude J, Rivoal K, Rose V, Tall F, Mead G, et al. Epidemiological analysis of *Salmonella enterica* ssp. *enterica* serovars Hadar, Brancaster and Enteritidis from humans and broiler chickens in Senegal using pulsed-field gel electrophoresis and antibiotic susceptibility. *J Appl Microbiol.* 2005;99(4):968-77.
54. Chakraborty A, Saralaya V, Adhikari P, Shenoy S, Baliga S, Hegde A. Characterization of *Escherichia coli* phylogenetic groups associated with extraintestinal infections in South Indian population. *Ann Med Health Sci Res.* 2015;5(4):241-6.
55. Projahn M, Daehre K, Roesler U, Friese A. Extended-spectrum-beta-lactamase-and plasmid-encoded cephamycinase-producing enterobacteria in the broiler hatchery as a potential mode of pseudo-vertical transmission. *Appl Environ Microbiol.* 2017;83(1):e02364-16. DOI: 10.1128/AEM.02364-16

56. Nilsson O, Börjesson S, Landén A, Bengtsson B. Vertical transmission of *Escherichia coli* carrying plasmid-mediated AmpC (pAmpC) through the broiler production pyramid. *J Antimicrob Chemother.* 2014;69(6):1497-500.
57. Castellanos LR, Donado-Godoy P, León M, Clavijo V, Arevalo A, Bernal JF, et al. High heterogeneity of *Escherichia coli* sequence types harbouring ESBL/AmpC genes on Inc11 plasmids in the Colombian poultry chain. *PloS One.* 2017;12(1):e0170777. doi:10.1371/journal.pone.0170777.
58. Carattoli A. Resistance plasmid families in *Enterobacteriaceae*. *Antimicrob agents Chemother.* 2009;53(6):2227-38.
59. Hasan B, Sandegren L, Melhus Å, Drobni M, Hernandez J, Waldenström J, et al. Antimicrobial drug-resistant *Escherichia coli* in wild birds and free-range poultry, Bangladesh. *Emerg Infect Dis.* 2012; 18(12):2055-8.
60. Mora A, Viso S, López C, Alonso MP, García-Garrote F, Dabhi G, et al. Poultry as reservoir for extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* O45: K1: H7-B2-ST95 in humans. *Vet Microbiol.* 2013;167(3):506-12.
61. Moulin-Schouleur M, Répérant M, Laurent S, Brée A, Mignon-Grasteau S, Germon P, et al. Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strains of avian and human origin: link between phylogenetic relationships and common virulence patterns. *J Clin Microbiol.* 2007;45(10):3366-76.
62. Dho-Moulin M, Fairbrother JM. Avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC). *Vet Res.* 1999;30(2-3):299-316.
63. Johnson JR, Kuskowski MA, Owens K, Gajewski A, Winokur PL. Phylogenetic origin and virulence genotype in relation to resistance to fluoroquinolones and/or extended-spectrum cephalosporins and cephamycins among *Escherichia coli* isolates from animals and humans. *J Infect Dis.* 2003;188(5):759-68.
64. Nguyen VT, Carrique-Mas JJ, Ngo TH, Ho HM, Ha TT, Campbell JI, et al. Prevalence and risk factors for carriage of antimicrobial-resistant *Escherichia coli* on household and

small-scale chicken farms in the Mekong Delta of Vietnam. *J Antimicrob Chemother.* 2015;70(7):2144-52.

65. Gay N, Leclaire A, Laval M, Miltgen G, Jégo M, Stéphane R, et al. Risk Factors of Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase Producing *Enterobacteriaceae* Occurrence in Farms in Reunion, Madagascar and Mayotte Islands, 2016–2017. *Vet Sci.* 2018;5(1):22. doi: 10.3390/vetsci5010022.

### **Article 3.**

---

Accepté le 1<sup>er</sup> avril 2019 pour publication dans *Microbial Drug Resistance*.

## **Antimicrobial resistance and potential pathogenicity of *Escherichia coli* isolates from healthy broilers in Québec, Canada**

Vounba P.<sup>1</sup>, Arsenault J.<sup>1</sup>, Bada-Alambédji R.<sup>2</sup> and Fairbrother J. M.<sup>1</sup>

1- Department of Pathology and Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, Université de Montréal and The Swine and Poultry Infectious Diseases Research Centre (CRIPA), St-Hyacinthe, Québec, Canada

2- Ecole Inter-Etats des Sciences et Médecine Vétérinaires (EISMV) de Dakar-Sénégal

**Running title:** Antimicrobial resistance and virulence in *E. coli*

**Keywords:** *Escherichia coli*, chickens, antimicrobial resistance, beta-lactamases, virulence, Québec, Canada.

## Abstract

Antimicrobial resistance (AMR) is a global health issue, particularly when it affects critically important antimicrobials such as third-generation cephalosporins (3GC). The objective of this study was to characterize *E. coli* isolates from healthy chickens in Québec in farms where ceftiofur has been administered to chickens *in ovo* over a long period with regard to their AMR, multidrug resistance (MDR), potential virulence, clonality, and possession of plasmids of the incompatibility groups carrying ESBL/AmpC genes. More than 62% of indicator isolates were MDR with resistance observed for each of the nine classes of antimicrobials tested by disk diffusion. 3GC-resistance was encoded by the *bla<sub>CMY-2</sub>* gene (26.7% in indicator isolates), whereas *bla<sub>CTX-M</sub>* was only detected in isolates following selective enrichment with ceftriaxone (3 *bla<sub>CTX-M-1</sub>* isolates). Examination of *bla<sub>CMY-2</sub>*-positive isolates by pulse-field gel electrophoresis showed clustering of isolates originating from different floors of the livestock building within farms. The *bla<sub>CMY-2</sub>* gene was carried on replicon plasmids FIB, I1, K/B and B/O, whereas *bla<sub>CTX-M-1</sub>* gene was located on I1 as demonstrated by transformation experiments; some of these plasmids co-transferred resistance against tetracycline or sulfonamides. In addition, six isolates, of which four were ESBL/AmpC-producers, were defined as potential human ExPEC. In summary, this study showed that ESBL/AmpC-producing *E. coli* isolates from apparently healthy chickens in Québec, Canada predominantly possess *bla<sub>CMY-2</sub>* rather than *bla<sub>CTX-M</sub>* maybe because of the *in ovo* use of ceftiofur to prevent omphalitis and may be spread via clones or plasmids, and that some of these isolates could be capable of infecting humans.

## Introduction

*Escherichia coli* is a part of the normal intestinal microflora of animals and humans; however, some strains are able to cause intestinal and extraintestinal infections in their hosts. Extraintestinal pathogenic *E. coli* (ExPEC) consist of strains possessing virulence factors allowing them to cause extraintestinal infections. ExPEC are subgrouped as human pathogenic strains, namely uropathogenic *E. coli* (UPEC), neonatal meningitis *E. coli* (NMEC), and sepsis-associated *E. coli* (SEPEC) which causes urinary tract infections, neonatal meningitis and sepsis infections, respectively; and avian pathogenic *E. coli* (APEC), the etiological agents of avian colibacillosis. APEC is responsible for major economic losses due to morbidity, mortality and carcass condemnations worldwide [1]. Several virulence factors are associated with APEC isolated from chickens with colibacillosis including adhesins (F1- and P-fimbriae), iron acquisition systems (aerobactin and yersiniabactin), hemolysins (hemolysinE/F and temperature sensitive hemagglutinin), resistance to the bactericidal effects of serum and phagocytosis (outer membrane protein, iss protein, lipopolysaccharide, capsule and colicin production) [2, 3]. Isolates associated with avian colibacillosis mostly belong to serogroups O1, O2, O5, O8, O18, and O78 [4]. Increasing infection pressure in the environment, infection with Newcastle virus or *Mycoplasma*, and excess of ammonia or dust in the environment are factors that predispose birds to develop colibacillosis [5]. Studies based on genetic similarities [6] or animal models of human infection [7] have suggested that certain ExPECs found in the digestive tract of the chicken may also cause human infections.

Spread of antimicrobial resistant (AMR) *E. coli* from chickens to humans has been documented [8, 9]. In enterobacteria, AMR mainly occurs as a result of the oral use of antimicrobials. These bacteria acquire resistance genes and/or mutations in their chromosomal DNA in order to survive and maintain their microbial homeostasis in the host intestinal tract [10]. AMR in avian *E. coli* has reached high levels, affecting antimicrobials critically important in human health, such as third-generation cephalosporins (3GC) and fluoroquinolones. The most common mechanism of resistance to 3GC is the production of extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs) and AmpC-beta-lactamases. *E. coli* producing these enzymes, namely ESBL type CTX-M and AmpC type CMY-2, were first reported in chickens by Briñas et al. [11] before their detection worldwide. The prevalence of *bla*<sub>CTX-M</sub> and



*bla<sub>CMY-2</sub>* genes varies greatly from one country to another, possibly depending on the types of antimicrobials used and on geographic differences [12].

Ceftiofur, a 3GC was systematically administered *in ovo* in Canada from 2003 poultry to prevent omphalitis, with a brief voluntary ban between 2005 and 2007 [13]. This preventive use of ceftiofur in hatcheries has been definitely banned since May, 2014 [14] and prevalence of ceftiofur resistance in *E. coli* isolated from chickens in Québec was 20% in 2016 [15], This *in ovo* use has been associated with an increase in ceftriaxone-resistance in *E. coli* and *Salmonella enterica* serovar Heidelberg in both chicken and humans [16]. However, little is known about the relative role of clones and plasmids in the spreading of AMR and the association of these clones and plasmids with virulence. Our hypothesis is that, due to the systematic *in ovo* use of ceftiofur, ESBL/AmpC genes are highly prevalent among *E. coli* isolated from chickens in Québec and that certain plasmids and clones are involved in 3GC resistance and bacterial virulence.

The objective of this study was to characterize *E. coli* isolates from healthy chickens in Québec in farms where ceftiofur has been administered to chickens *in ovo* over a long period with regard to their AMR, MDR, virulence, clonality, and possession of replicon plasmids carrying ESBL/AmpC genes.

## **Materials and methods**

### **Sampling method**

Chicken fecal samples collected from a previous study were used [17]. These samples originated from chicken houses practicing thinning (i.e. partial depopulation of a flock over the course of raising to optimize space when producing heavy birds) and located in the region of Saint-Hyacinthe, Québec, Canada. A list of farms practicing thinning was obtained from the Québec association of chicken farmers. The first 12 farmers who agree to participate were recruited. Study farms housed 20,000 to 30,000 chickens aged from 35 to 40 days at the time of sampling. These farms were all family businesses; the chicks came from three hatcheries and were supplied by three different mills. A total of 35 fresh fecal samples from the pen floor, each consisting of 5 samples taken in different parts of the house, were collected just

before thinning and transported in a cooler at the OIE reference laboratory for *E. coli* (EcL) and stored at -70°C before processing.

### **Isolation of *E. coli* and establishment of *E. coli* collections**

Each pooled faecal sample was homogenised 1/10 (weight/volume), after thawing, in buffered peptone water, filtrated and the filtrate streaked on MacConkey plates and incubated overnight at 37°C to obtain *E. coli* primary cultures. We used 29 samples from the 7 farms which were studied previously [7, 17] to establish the following three collections of isolates (Supplementary Figure 1).

**Indicator *E. coli* collection:** Four morphologically different lactose-positive isolates on MacConkey agar, that were positive for the *uidA* gene encoding  $\beta$ -glucuronidase, a housekeeping gene in *E. coli*, were selected. PCR conditions used to detect *uidA* gene included initial denaturation (95°C, 2 mn), 24 cycles of denaturation (94°C, 30 s), annealing (65°C, 30 s), extension (72°C, 30 s), and final extension (4°C).

### **Specific collections:**

**Potential ExPEC collection:** a pool of five lactose-positive isolates on MacConkey agar was screened by PCR for each of the 29 samples for the presence of *iucD*, *tsh*, and *papC* virulence genes. When the pool was positive for at least one of these virulence genes, each isolate was individually tested for the same virulence genes. Positive isolates were selected, tested for *uidA* gene and considered as potential ExPEC isolates [7].

**Potential ESBL/AmpC-producer collection:** We used the protocol described previously by Agersø and colleagues [18] with some modifications. Briefly, 50  $\mu$ l of the culture stored at -80°C was inoculated in 5 ml of peptone water. After 30 minutes of incubation at 37°C, 20  $\mu$ l of the broth was streaked on MacConkey agar supplemented with 1 mg/L of ceftriaxone. After overnight incubation at 37°C, four lactose-positive colonies per sample, when available, were selected and confirmed as *E. coli* by the presence of the *uidA* gene.

### **Characterization of *E. coli* isolates**

### **Antimicrobial susceptibility test**

All isolates from the indicator *E. coli*, potential ExPEC and potential ESBL/AmpC collections were tested against 14 antimicrobials of 9 classes using the disk diffusion (Kirby–Bauer) assay as previously described [19-21]. The antimicrobials tested are the same used in the Canadian Integrated Program for Antimicrobial Resistance Surveillance [22]. The *E. coli* ATCC 25922 was used as quality control strain. Nonsusceptible isolates (intermediate or resistant) to three or more classes of antimicrobials were considered to be Multidrug resistant (MDR) [23]. In addition, the potential ESBL/AmpC collection was used to classify isolates as presumptive ESBL or presumptive AmpC using the European Food Safety Authority's criteria [24].

### **Antimicrobial resistance genes**

Seventy-one randomly selected indicator *E. coli* isolates and 45 potential ExPEC isolates (representing the different virulence profiles in each sample) were examined for 13 AMR genes. These AMR genes included those encoding resistance against streptomycin (*aadA1*), tetracycline (*tetA*, *tetB* and *tetC*), trimethoprim (*dfrA1*, *dfrA5* and *dfrA7*), quinolones (*qnrB*) and  $\beta$ -lactams (*bla<sub>TEM</sub>*, *bla<sub>SHV</sub>*, *bla<sub>OXA-1</sub>*, *bla<sub>CTX-M</sub>* and *bla<sub>CMY-2</sub>*). In addition, 59 isolates were selected among the 99 potential ESBL/AmpC isolates which were resistant or intermediate to at least one cephalosporin and tested for the presence of beta-lactamase genes (*bla<sub>TEM</sub>*, *bla<sub>SHV</sub>*, *bla<sub>OXA-1</sub>*, *bla<sub>CTX-M</sub>* and *bla<sub>CMY-2</sub>*). All of these tests were performed by PCR as described previously [25].

### **Virulence genes and phylogenetic groups**

All isolates from the indicator *E. coli* and potential ExPEC collections tested above for AMR genes, in addition to some potential ESBL/AmpC which were positive to the *bla<sub>CTX-M</sub>* or *bla<sub>CMY-2</sub>* gene, were examined by PCR for the presence of 10 virulence genes encoding for siderophores (*iucD* and *iroN*), toxins (*hlyF*), adhesins (*papC*, *tsh*, *afa* and *sfa*) and protectins (*kpsMII*, *ompT* and *iss*). Each isolate was also tested to be assigned to one of the seven phylogenetic groups A, B1, B2, C, D, E, and F [26].

All primers used in this study are summarised in our previous study [25].

## Serotyping

Thirty-eight *bla<sub>CMY-2</sub>*-producing isolates randomly selected and three *bla<sub>CTX-M</sub>*-positive isolates were tested for 86 O-serogroups described at [www.ecl-lab.com/en/products/serotyping.asp](http://www.ecl-lab.com/en/products/serotyping.asp) by standard agglutination methods as previously described [27].

## Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE)

In order to estimate their clonal relationship, the 38 *bla<sub>CMY-2</sub>*-producer isolates were sub-typed by PFGE using *Xba*I-restriction enzyme as described previously [28]. The similarities of profiles were compared using a Dice coefficient at 1% tolerance and 0.5% optimization, and a dendrogram was generated in BioNumerics (Applied Maths) software (v. 6.6) with the UPGMA clustering method. Clusters were defined as isolates sharing at least 60% of similarity (cut-off value) [29] as estimated by BioNumerics from the dendrogram, PFGE groups were defined as isolates sharing at least 80% of similarity and pulsotypes as isolates sharing 100% identity [30].

## Plasmid characterization

Plasmid PCR-based replicon typing (PBRT) was performed in isolates serotyped for identification of 21 replicon plasmids as previously described [31, 32]. Plasmids were purified in wild type isolates using the QiaFilter Midi kit (Qiagen Inc.), following the manufacturer's instructions. Purified plasmid DNA of 30 *bla<sub>CMY-2</sub>* and three *bla<sub>CTX-M</sub>*-producing isolates was used to examine transferability of plasmids carrying ESBL/AmpC genes into *E. coli* DH10B Electromax™ competent cells (Invitrogen, Calsbad, CA) using electroporation. Transformants were selected on Mueller Hinton agar supplemented with ceftriaxone 2 µg/ml as described by Mnif et al. [33]. Up to five Transformants per transformation experiment, when available, were screened by PCR for the presence of replicon plasmids and ESBL/AmpC genes. Selected transformants were thereafter tested for their susceptibility to the 14 antimicrobials using the disk diffusion method as described above.

## Statistical analysis

Prevalence of AMR by antimicrobials was estimated at the isolate and farm levels. At the isolate level, prevalence estimates were adjusted for clustering by farms and presented by type of samples. Prevalence with 95% confidence intervals of potential virulent APEC, potential ExPEC, ESBL/AmpC genes in sub-collection isolates was also estimated at the isolate and farm levels. At the isolate level, estimates were adjusted for clustering by farms and sampling weights when applicable; the weights were computed according to the probability of isolate selection in each sample. Prevalence estimates were carried out using the freq or surveyfreq procedure of SAS software version 9.4. For estimation at farm level, a farm was considered positive when at least one isolate nonsusceptible to antimicrobials, defined as MDR, potential virulent APEC or positive for AMR gene, virulence gene, QRDR mutation, etc. was detected.

## **Results**

### **Isolate collections**

In the indicator *E. coli* collection, four morphologically different isolates were obtained from each sample except for five samples from which only two lactose-*uidA* positive isolates were obtained and seven from which three isolates were obtained, giving a total of 99 indicator *E. coli* isolates recovered from the 29 samples (Supplementary Figure 1). In the potential ExPEC collection, after testing five isolates per sample, one to three isolates per sample positive for at least one of the five virulence genes *iucD*, *tsh*, and *papC* were obtained, resulting in 69 potential ExPEC isolates recovered from 28 samples. Finally, In the potential ESBL/AmpC collection, 21 samples each yielded four morphologically different isolates and the eight others each provided 3 isolates, resulting in 108 potential ESBL/AmpC isolates.

### **Prevalence of antimicrobial nonsusceptibility in isolates and farms**

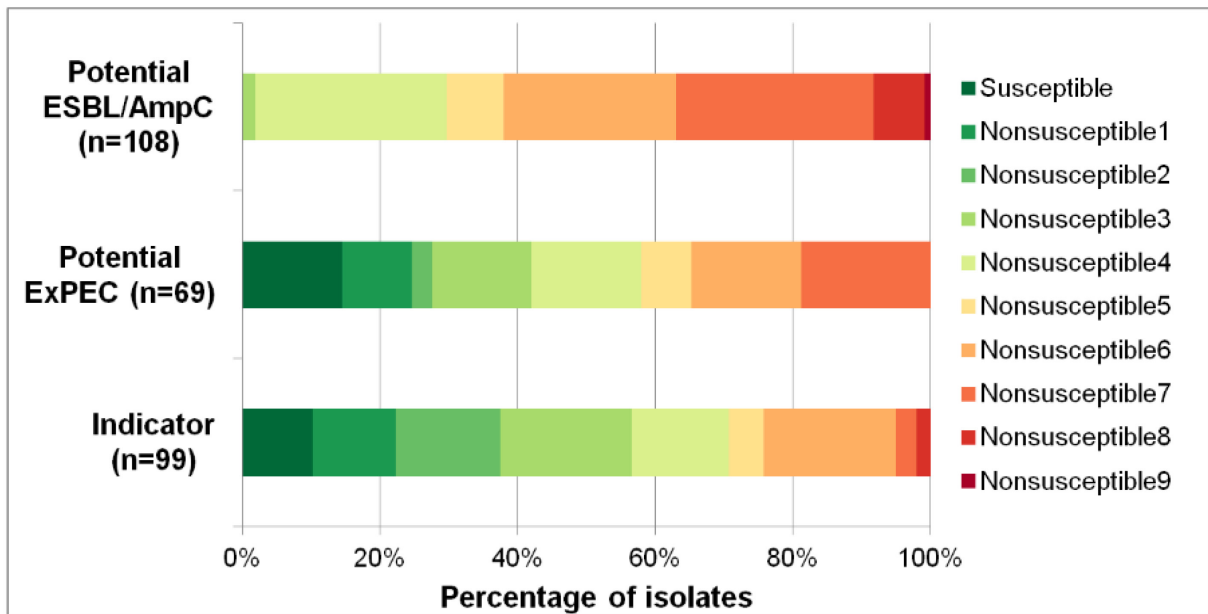
At the isolate level, the highest level of nonsusceptibility was observed for tetracycline, followed by streptomycin, sulfisoxazole, ampicillin and trimethoprim-sulfamethoxazole. The lowest level of nonsusceptibility was observed for amoxicillin-clavulanic acid, ceftriaxone, ceftiofur; gentamicin, ciprofloxacin and nalidixic acid (Table 1).

**Table 1.** Prevalence in isolates and farms of nonsusceptibility in indicator *Escherichia coli* isolates from healthy broiler chickens in St-Hyacinthe region, Quebec, Canada.

Unit of study (No. examined)	Percentage (%) of units with one or more nonsusceptible isolates per category <sup>a</sup> , antimicrobial class <sup>b</sup> and antimicrobial <sup>c</sup>															
	Critically important									Highly important						
	Highest priority				High priority											
	FLQ		CPS		PEN	PEN/I		AMG			CPM	FOL		PHE	TET	
NAL		CIP		TIO	CRO		AMP	AMC	GEN	KAN	STR	FOX	SXT	SSS	CHL	TET
Isolates (n = 99)	4.0	1.0	31.3	31.3	54.5	31.3	29.3	8.1	54.5	29.3	53.5	65.6	6.1	71.7		
Farms (n = 7)	42.8	14.3	57.1	57.1	71.4	57.1	71.4	42.8	85.7	57.1	71.4	85.7	42.8	85.7		

<sup>a</sup>Category of human antimicrobials importance according to the World Health Organization (WHO) [57]: (I) Very High Importance, (II) High Importance, (III) Moderate Importance; <sup>b</sup>Antimicrobial classes: (FLQ) Fluoroquinolones; (PEN/I) Penicillin+ $\beta$ -Lactamase inhibitors; (CPS) Cephalosporines; (PEN) Penicillin; (CPM) Cephamycin; (AMG) Aminoglycosides; (FOL) Folate inhibitors; (PHE) Phenicol; (TET) Tetracyclines; <sup>c</sup>Antimicrobials: NAL, Nalidixic acid; CIP, Ciprofloxacin; AMC, Amoxicillin/clavulanic acid; TIO, Ceftiofur; CRO, Ceftriaxone; AMP, Ampicillin; FOX, Cefoxitin; GEN, Gentamicin; KAN, Kanamycin; STR, Streptomycin; SXT, Trimethoprim-sulphamethoxazole; SSS, Sulfisoxazole; CHL, Chloramphenicol; TET, Tetracycline.

Of the 29 samples, 4 (13.8%) had indicator isolates with the same antimicrobial susceptibility pattern, 9 (31.0%) had isolates with two profiles, 11 (37.9%) with three profiles and 5 (17.2%) with four different profiles. Sixty-two (62.6%) indicator *E. coli* isolates were nonsusceptible to at least one antimicrobial in at least three classes of antimicrobials, thus classified as MDR. Multidrug resistance against 3 or 6 antimicrobial classes (MDR3 or MDR6) was more frequently observed (19.2% each) followed by MDR4 (14.1%); XDR isolates (*i.e* extensively drug resistant, isolates that remain susceptible to a maximum of 2 categories) was also observed (Figure 1). In the specific collections, the prevalence of MDR isolates could reach 100%, especially in potential ESBL/AmpC collection, with a significant increase in possible XDR (Figure 1).



**Figure 1. Multidrug resistance prevalence in indicator (n=99 isolates), potential ExPEC (n=69), and potential ESBL/AmpC (n=108) *Escherichia coli* isolated from 7 broiler chickens farms in St-Hyacinthe region, Quebec, Canada.**

Susceptible: susceptible to all classes of antimicrobials; Nonsusceptible 1 to 9: nonsusceptible to 1 up to 9 classes of antimicrobials; isolates nonsusceptible to 3 up to 7 antimicrobials were considered to be multidrug resistant (MDR), isolates nonsusceptible to 8 or 9 antimicrobials were considered to be possibly extensively drug resistant (XDR).

Using the ECDC's criteria [24], presumptive ESBL/AmpC-producer isolates were detected in 100% (95%CI = 59.0 – 100) of farms and in 90.7% (95%CI = 84.0 – 97.5) of potential ESBL/AmpC isolates.

At the farm level, the highest prevalence of farms with at least one nonsusceptible isolate was observed for streptomycin, sulfisoxazole and tetracycline and the lowest prevalence was observed for ciprofloxacin (Table 1).

### Prevalence of antimicrobial resistance genes

In all, 48 (67.6%) of the indicator *E. coli* isolates were positive for at least one AMR gene. Of the 13 AMR genes investigated, 9 were detected, with *aadA1*, *tetA*, *dfrA7*, *tetB* and *bla<sub>CMY-2</sub>* the most frequently detected (Table 2). Of the 19 *bla<sub>CMY-2</sub>* positive indicator *E. coli* isolates, 17 originating from seven farms though, belonged to the single phylogenetic group B1 and the remaining two belonged to phylogroups A and C.

**Table 2.** Prevalence of antimicrobial resistance genes in 71 indicator *Escherichia coli* isolates from healthy broiler chickens in St-Hyacinthe region, Quebec, Canada.

AMR genes	No. (%) of positive isolates	95% CI	Target antimicrobials
<i>tetA</i>	29 (40.8)	0.0 – 85.6	Tetracycline
<i>tetB</i>	19 (26.8)	0.0 – 62.1	
<i>dfrA1</i>	10 (14.1)	5.6 – 22.6	Trimethoprim
<i>dfrA5</i>	2 (2.8)	0.0 – 10.3	
<i>dfrA7</i>	22 (31.0)	0.0 – 62.3	
<i>aadA1</i>	39 (54.9)	26.3 – 83.5	Streptomycin
<i>bla<sub>TEM</sub></i>	14 (19.7)	3.6 – 35.8	



<i>bla<sub>SHV</sub></i>	5 (7.0)	0.0 – 20.8	Ampicillin
<i>bla<sub>CMY-2</sub></i>	19 (26.7)	0.0 – 61.3	Ceftiofur

*qnrB*, *bla<sub>OXA-1</sub>*, *bla<sub>CTX-M</sub>* and *tetC* genes were not detected in any isolate.

In contrast to the generic or potential ExPEC collections in which there was a relative diversity of virulence and AMR genes in a same sample, for the potential ESBL/AmpC collection, isolates of a same sample were either all positive for a gene, either all negative. Following selective enrichment, 54 (91.5%; 95%CI = 82.7 - 100) potential ESBL/AmpC isolates were *bla<sub>CMY-2</sub>*-positive and 3 (5.1%; 95%CI = 0.0 – 14.7) were *bla<sub>CTX-M</sub>*-positive. The *bla<sub>CMY-2</sub>*-positive isolates were found in the seven farms whereas *bla<sub>CTX-M</sub>*-positive isolates were from two farms. Sequencing of these *bla<sub>CTX-M</sub>* genes showed that they were all of the genotype *bla<sub>CTX-M-1</sub>*. In the potential ExPEC collection, 15 (33.3%; 95%CI = 6.6 – 60.0) of the tested isolates were *bla<sub>CMY-2</sub>*-positive and none were *bla<sub>CTX-M</sub>*-positive.

### Distribution of virulence genes and phylogroups

Indicator *E. coli* isolates belonged to phylogroups A [31 (43.7%; 95%CI = 17.4 – 69.9)], B1 [35 (49.3%; 95%CI = 23.7 – 74.9)], B2 [1 (1.4%; 95%CI = 0.0 – 5.1)], C [3 (4.2; 95%CI = 0.0 – 9.7)] and D [1 (1.4%; 95%CI = 0.0 – 5.1)]. Seven out of the eleven virulence genes examined were detected with 65 (91.5%; 95%CI = 85.2 – 97.8) of isolates harbouring at least one virulence gene; the maximum being six. The most prevalent virulence genes were *hlyF* [47 (66.2%; 95%CI = 33.1 – 99.3)], *iss* [46 (64.8%; 95%CI = 24.0 – 100)], *iroN* [36 (50.7%; 95%CI = 13.8 – 87.6)], *ompT* [36 (50.7%; 95%CI = 24.1 – 77.3)] and *iucD* [34 (47.9%; 95%CI = 12.7 – 83.1)]. The other virulence genes that were also detected were *tsh* [13 (18.3%; 95%CI = 6.8 – 29.7)] and *kpsMII* [1 (1.4%; 95%CI = 0.0 – 5.4)]. Sixty-five (91.5%; 95%CI = 85.2 – 97.8) isolates were carriers of one or more virulence genes defined as minimal predictors of APEC isolates [34] of which 26 (representing 36.6% (95%CI = 0.0 – 76.9) of all tested indicator *E. coli* isolates) belonging to the three phylogroups possessed four or five virulence genes and were defined as potential highly virulent isolates [25]. Based on virulence criteria [35], 1 (1.4%; 95%CI = 0.0 – 5.4) indicator *E. coli* isolate of phylogroup A and 2 (4.4%; 95%ci = 0.0 – 12.8) isolates from the potential ExPEC collection, belonging to

phylogroups D or B2, originating from two farms, were classified as potential human ExPEC. In addition, three potential ESBL/AmpC isolates (ECL23314-phylogroup B1, ECL23259-phylogroup A and ECL23257-phylogroup F, each from a different farm, Figure 2), all possessing *bla<sub>CMY-2</sub>* in association with other AMR genes, were also defined as potential human ExPEC.

Isolate ID	Farm ID	Phylogroup	Antimicrobial nonsusceptibility							Antimicrobial resistance genes							Virulence genes									
			Gentamicin	Streptomycin	Ceftriaxone	Ceftiofur	Cefoxitin	Amoxi-Clav*	Sulfisoxazole	Ampicillin	Tetracyclin	<i>bla<sub>CMY-2</sub></i>	<i>bla<sub>SHV</sub></i>	<i>bla<sub>TEM</sub></i>	<i>aadA1</i>	<i>tetA</i>	<i>dhfrI</i>	<i>dhfrVII</i>	<i>aadA1</i>	<i>iroN</i>	<i>iss</i>	<i>hlyF</i>	<i>ompT</i>	<i>kpsMII</i>	<i>iucD</i>	<i>papC</i>
ECL23312	1	A																								
ECL23259	1	A																								
ECL23257	5	F																								
ECL23313	8	B2																								
ECL23314	9	B1																								
ECL23315	9	D																								

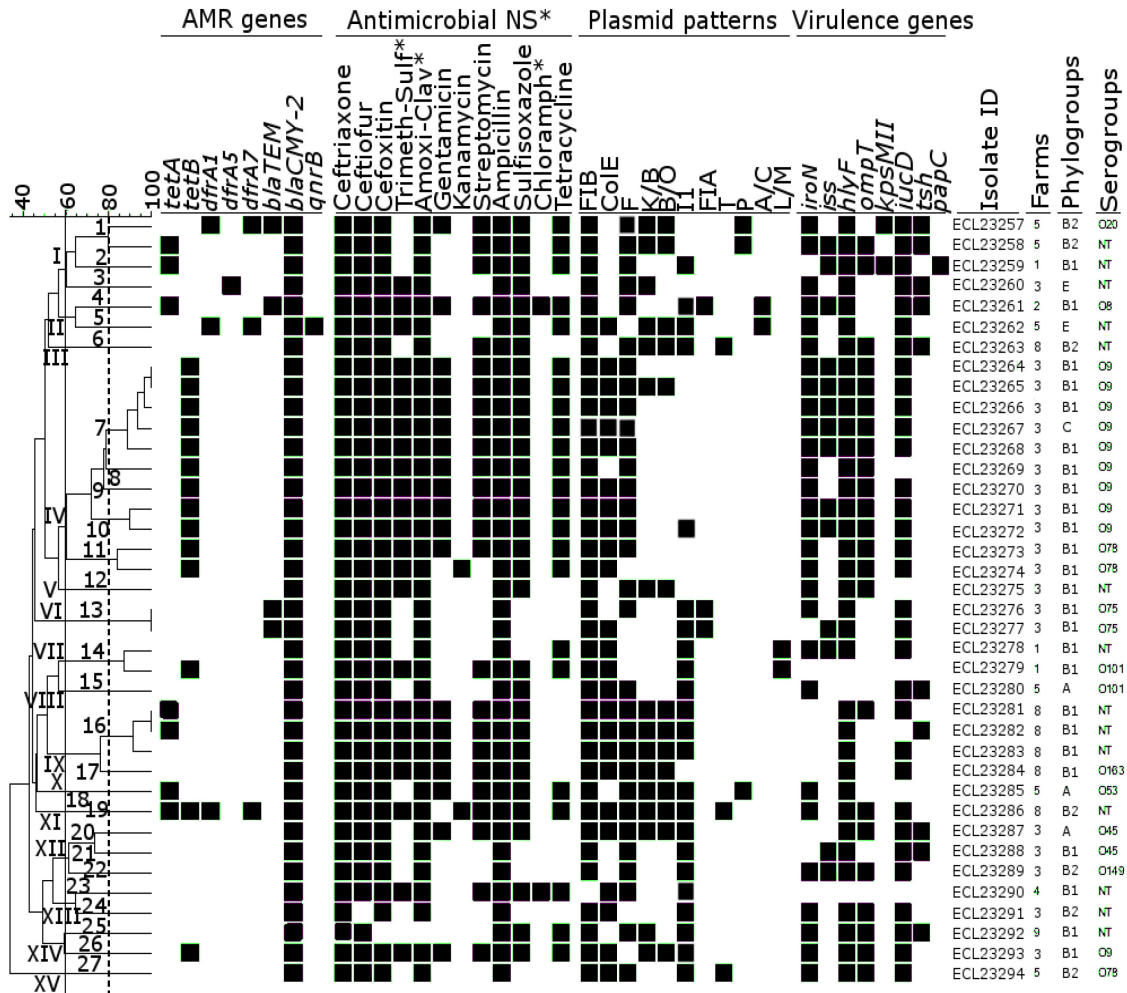
**Figure 2. Virulence and AMR profiles of potential human ExPEC isolated from healthy broiler chickens in St-Hyacinthe region, Québec, Canada.**

Amoxi/clav, Amoxicillin/clavulanic acid; Trimeth-sulf, Trimethoprim-sulfamethoxazole.

### Clonal relationship among *bla<sub>CMY-2</sub>*-positive isolates

Among the 38 *bla<sub>CMY-2</sub>*-positive isolates, 24 could be assigned to an O serogroup, with 10 different serogroups detected (Figure 3). Serogroups O9 (10 isolates), O78 (3 isolates) and O75, O101, O45 (2 isolates each) were frequently observed; the other serogroups being each detected in one isolate. Clustering based on PFGE profiles showed that isolates were polyclonal, with 15 clusters (I-XV) observed based on  $\geq 60\%$  similarity between isolates (Figure 3). Nine of these clusters consisted of at least two isolates and the remaining six only comprised one isolate each. The cluster IV with 11 isolates was the major one followed by clusters IX (4 isolates) and XII (3 isolates). Within the clusters, 27 PFGE groups (1-27) were

observed when the similarity was set at  $\geq 80\%$  (Figure 3) and of these, seven included at least 2 isolates.



**Figure 3. Clustering analysis of genetic variation among 38 *bla<sub>CMY-2</sub>*-positive *Escherichia coli* isolates in St-Hyacinthe region, Québec, Canada.**

The dendrogram was generated using Dice coefficient and the unweighted pair-group method and arithmetic average (UPGMA). Based on a similarity index of  $\geq 60\%$  (continuous line), 15 major clusters (I-XV) were found inside which 27 PFGE groups (in arabic numerals) were identified when the similarity was set at 80% (discontinued line). AMR, antimicrobial resistance; antimicrobial NS\*, antimicrobial nonsusceptibility; CRO, Ceftriaxone; TIO,

Ceftiofur; FOX, Cefoxitin; SXT, trimethoprim-sulfamethoxazole; AMC, Amoxicillin-clavulanic acid; GEN, Gentamicin; KAN, Kanamycin; STR, Streptomycin; AMP, Ampicillin; SSS, Sulfisoxazole; CHL, Chloramphenicol; TET, Tetracycline. None of the ESBL/AmpC-producing isolates were positive to AMR genes *bla<sub>OXA-1</sub>*, *bla<sub>SHV</sub>*, *aadA1* and *tetC* and none was carrier of virulence genes *sfa* or *afa*, then these genes were removed from the dendrogram.

The cluster IV was divided into five PFGE groups of which three included two or more isolates: the PFGE group 7 including 4 isolates belonging to phylogroup B1 and serogroup O9 (group B1-O9), the PFGE group 10 which includes two B1-O9 isolates and the PFGE group 11 consisting of two isolates of group B1-O78. PFGE groups 7, 13 and 16 even included pulsotypes (isolates sharing 100% similarity). Isolates of cluster IV were all MDR [7] and almost all were also carriers of at least four of the APEC virulence markers and thus, were defined as potential highly virulent APEC. All B1-O9- and B1-O78-isolates of the cluster IV were from the same farm but from samples collected at different floors and locations on the farm. Each of the PFGE groups 13 (group B1-O75) and 16 (phylogroup B1 but nontypeable with our antisera) were also each from a single farm but different floors. Isolates of PFGE group 13 were MDR [3, 4] and those of PFGE group 16 were MDR [7] with a nonsusceptibility profile identical to that of B1-O9 isolates mentioned above in cluster IV (Figure 3). Nevertheless, isolates of both PFGE groups 13 and 16 were less often carriers of virulence genes compared to other PFGE groups.

### **Prevalence of markers plasmids and transferability of plasmids among *bla<sub>CMY-2</sub>*-positive isolates**

The 38 *bla<sub>CMY-2</sub>*-positive isolates were each carrier of at least two replicon plasmids with a maximum of 7. Eleven plasmids among the 21 screened were detected. The most prevalent incompatibility groups were FIB [37 (97.3%; 95%CI = 89.5 - 100)], F [30 (78.9%; 95%CI = 64.7 - 93.2)], colE [26 (68.4%; 95%CI = 58.7 - 78.1)], II [23 (60.5%; 95%CI = 28.8 - 92.2)], K/B [16 (42.1%; 95%CI = 5.2 - 79.1)], and B/O [14 (36.8%; 95%CI = 0.0 - 75.3)] (Figure 3). The other replicon plasmids were FIA [3 (7.9%; 95%CI = 0.0 - 16.5)], T [3 (7.8%; 95%CI = 0.0 - 23.7)], P [3 (7.8%; 95%CI = 0.0 - 28.9)], A/C [2 (5.2%; 95%CI = 0.0 - 16.5)] and L/M [2 (5.2%; 95%CI = 0.0 - 20.4)].

The transfer of ESBL/AmpC genes was successful for 19 of the 30 tested *bla<sub>CMY-2</sub>*- and two of the three tested *bla<sub>CTX-M</sub>*-positive isolates. The beta-lactam-resistance profiles of transformants were identical to those of the wild-type strains; being nonsusceptible to ceftiofur, ceftriaxone, amoxicillin/clavulanic acid, cefoxitin and ampicillin for *bla<sub>CMY-2</sub>*-positive transformants and to ceftiofur, ceftriaxone and ampicillin for *bla<sub>CTX-M</sub>*-positive transformants. The *bla<sub>CMY-2</sub>* genes was carried on FIB (4 isolates of which 3 co-transferred tetracycline resistance), I1 (9 isolates), K/B (5 isolates) and B/O (1 isolate), whereas *bla<sub>CTX-M</sub>* genes were located on I1 (n=2, both co-transferred resistance to sulfisoxazole and tetracycline) (Table 3). Among wild-type carriers of *bla<sub>CMY-2</sub>*, three were also positive for *bla<sub>TEM</sub>* but none of their transformants were found to be positive to *bla<sub>TEM</sub>*. In addition, FIB, I1 and K/B carriers of ESBL/AmpC were each found in at least two farms.

**Table 3.** Characteristics of *Escherichia coli* isolates from healthy broiler chickens in Quebec carrying ESBL/AmpC genes that were transferred to recipient strains.

Strain ID	Farm ID	Collection of origin	Phylogroup/ serogroup	PFGE group	ESBL/AmpC genes transferred	Co-transferred AMR <sup>a</sup>	Plasmid of incompatibility group carrying ESBL/AmpC genes
ECL23317	9	pESBL/AmpC	B2/NT	ND	<i>bla<sub>CTX-M-1</sub></i>	SSS, TET	I1
ECL23316	5	pESBL/AmpC	B2/NT	ND	<i>bla<sub>CTX-M-1</sub></i>	SSS, TET	I1
ECL23264	3	Indicator	B1/O9	7	<i>bla<sub>CMY-2</sub></i>	TET	FIB
ECL23267	3	Indicator	C/O45	7	<i>bla<sub>CMY-2</sub></i>	TET	FIB
ECL23269	3	pESBL/AmpC	B1/O9	8	<i>bla<sub>CMY-2</sub></i>	-	FIB
ECL23285	5	pESBL/AmpC	A/O53	18	<i>bla<sub>CMY-2</sub></i>	-	FIB
ECL23272	3	Indicator	B1/O9	10	<i>bla<sub>CMY-2</sub></i>	-	I1
ECL23288	3	Indicator	B1/O45	21	<i>bla<sub>CMY-2</sub></i>	-	I1
ECL23277	3	Indicator	B1/O75	13	<i>bla<sub>CMY-2</sub></i>	-	I1
ECL23261	2	pESBL/AmpC	B1/O8	4	<i>bla<sub>CMY-2</sub></i>	-	I1
ECL23278	1	pESBL/AmpC	B1/O141	14	<i>bla<sub>CMY-2</sub></i>	-	I1
ECL23294	5	pESBL/AmpC	B2/O78	27	<i>bla<sub>CMY-2</sub></i>	-	I1
ECL23290	4	Indicator	B1/NT	23	<i>bla<sub>CMY-2</sub></i>	-	I1
ECL23289	3	pESBL/AmpC	B2/O149	22	<i>bla<sub>CMY-2</sub></i>	-	I1
ECL23293	3	pESBL/AmpC	B1/O9	26	<i>bla<sub>CMY-2</sub></i>	-	I1
ECL23275	3	pESBL/AmpC	B1/NT	12	<i>bla<sub>CMY-2</sub></i>	-	K/B

ECL23260	3	pESBL/AmpC	E/NT	03	<i>bla</i> <sub>CMY-2</sub>	-	K/B
ECL23284	8	pESBL/AmpC	B1/O163	17	<i>bla</i> <sub>CMY-2</sub>	-	K/B
ECL23286	8	pESBL/AmpC	B2/NT	19	<i>bla</i> <sub>CMY-2</sub>	-	K/B
ECL23263	8	pESBL/AmpC	B2/NT	06	<i>bla</i> <sub>CMY-2</sub>	-	K/B
ECL23262	5	pESBL/AmpC	E/NT	05	<i>bla</i> <sub>CMY-2</sub>	-	B/O

<sup>a</sup>all transformant carrying *bla*<sub>CTX-M-1</sub> were resistant to ampicillin, ceftiofur and ceftriaxone et those carrying *bla*<sub>CMY-2</sub> were resistant to ampicillin, ceftiofur, ceftriaxone and amoxicillin-clavulanic acid. ID, identity; pESBL/AmpC, potential ESBL/AmpC; GEN, gentamicin; STR, streptomycin, SSS, sulfisoxazole; SXT, trimethoprim-sulfamethoxazole; TET, tetracyclin; KAN, kanamycine; CHL, chloramphenicol; ND, non-determined.

## Discussion

This study showed a high prevalence of MDR (62.6%) in indicator *E. coli* isolated from 7 chicken farms practicing thinning in Saint-Hyacinthe region in Québec. This prevalence is higher than the prevalence of 46% reported in clinical chicken *E. coli* from Ontario [36]. Whereas prevalence of nonsusceptibility to quinolones at both farm and sample levels was very low, resistance to 3GC was at a much higher level (31.3%) in indicator isolates. The high prevalence of resistance against cephalosporins was confirmed by a similar prevalence of *bla*<sub>CMY-2</sub> gene encoding ceftiofur-resistance in indicator *E. coli* isolates (26.7%) and in specific isolates (91.5%), in addition to the presence of other beta-lactamases genes such as *bla*<sub>CTX-M</sub>, *bla*<sub>TEM</sub> or *bla*<sub>SHV</sub>. In fact, three isolates were *bla*<sub>CTX-M-1</sub>. Chalmers and colleagues [13] also reported in their study of clinical *E. coli* from broiler chickens with colibacillosis in Québec that *bla*<sub>CTX-M</sub> gene was of genotype CTX-M-1.

Ceftiofur was still systematically used at the hatchery to prevent omphalitis in broiler chicken farms during the period of our sample collection, which could therefore explain the high prevalence of cephalosporin resistance, as it has been demonstrated by a previous study from France [12]. Our results are also in line with those of a previous study carried in Québec, which reported a relationship between ceftiofur use and resistance to this antimicrobial [14], as we demonstrate the ubiquity of ceftiofur resistance and the predominance of *bla*<sub>CMY-2</sub> gene over *bla*<sub>CTX-M</sub> in 3GC-resistant *E. coli* isolates. However, Baron et al. [12] reported in their study that 3GC-resistant *E. coli* isolated from one-week-old chicks from eggs injected *in ovo* with ceftiofur were predominantly positive for *bla*<sub>CTX-M</sub> rather than for *bla*<sub>CMY-2</sub>. It is possible that a long-term *in ovo* extra-labeled use of ceftiofur as practiced in Québec could have promoted the predominance of *bla*<sub>CMY-2</sub>. The difference in relative predominance of the *bla*<sub>CTX-M</sub> and *bla*<sub>CMY-2</sub> genes could also be explained in part by differences in geographical distribution of these genes [12]. For instance, we found both genes in almost similar proportions in 3GC-resistant *E. coli* isolates from healthy broiler chickens in both Vietnam and Senegal (unpublished results). In contrast, the very low prevalence of resistance against ciprofloxacin and nalidixic acid we observed here could be due to the fact that this antimicrobial is not used in poultry production in Canada [37].



Other AMR genes found in high proportions in our study were those encoding resistance to tetracyclines (*tetA* and *tetB*) and aminoglycosides (*aadA1*) reinforcing the finding of previous studies that these genes are widely distributed among animal enterobacteria [38-40]. In addition, the high prevalence of these resistance genes could be explained by the fact that these antimicrobials are registered for use in poultry in Canada (<http://www.bape.gouv.qc.ca/sections/mandats/prod-porcine/documents/SANTE25-1.pdf>) and usually, these drugs are in use for long time in animals. However, gentamicin-nonsusceptibility **was** highly prevalent even though it is not used in poultry in Québec. A study from Ontario also has reported an increase in prevalence of gentamicin-resistance in *E. coli* isolates from broiler chickens [41]. This high prevalence may be due to a co-selection through the use of other antimicrobials. Indeed, it has been suggested that the use of spectinomycin-lincomycin as a replacement for ceftiofur in Québec chickens could have selected resistance to gentamicin [13]. These authors also observed that the *aadA* and *bla<sub>CMY</sub>* genes were regularly co-located on the plasmid A/C, although this was not observed in the present study.

The finding that almost all indicator *E. coli* isolates carrying the *bla<sub>CMY-2</sub>* gene (17/19) belonged to the single phylogroup B1, suggests that these isolates of phylogroup B1 could have another attribute allowing them to acquire *bla<sub>CMY-2</sub>* gene and predominate under selection pressure due to ceftiofur use. In fact, most of these isolates were positive for the *ompT* gene which was considered as a putative fitness gene allowing the pandemic clone ST131 to predominate [42], although further studies are needed to elucidate why our indicator *E. coli* isolates producing *bla<sub>CMY-2</sub>* are all phylogroup B1.

The study of clonal relationship between isolates did not demonstrate any evidence of clones circulating between the farms studied. However, related isolates, including clones, were found within farms, at separate locations on different floors of the poultry house, suggesting these clonal isolates have disseminated on farm or originated from the same source. This dissemination could result from the movement of chickens and workers, through contaminated feed or even through ambient air as previously reported [43, 44]. When collecting the samples on the farms, a questionnaire was administered to the farmers, revealing a great variability in

the respect of the biosecurity measures [17]. Strict enforcement of biosecurity measures was observed on some farms, whereas biosecurity measures were non-existent on others, other bird species being present nearby. The lack of biosecurity in some farms could explain the possible dissemination of these clonal isolates. ESBL/AmpC-producing strains may have also been transmitted vertically from breeding flocks to chicks and established in the poultry environment. Importantly, we found that the most prevalent incompatibility groups among the plasmids carrying ESBL/AmpC genes were FIB, F, colE, I1, K/B and B/O, as we also observed in our studies of *E. coli* derived from healthy chickens in Senegal and Vietnam (unpublished data), and was also reported in a previous study on APEC in China [45]. Because of their high prevalence, these plasmids may have contributed in the dissemination ESBL/AmpC genes in farms. The presence of these various plasmids, often mediating resistance to several antimicrobials, could also explain the high prevalence of MDR mentioned above.

Transformation experiments demonstrated that, although selected isolates were of different PFGE groups and farms, the *bla<sub>CTX-M-1</sub>* gene was located on plasmids of the I1 incompatibility group whereas *bla<sub>CMY-2</sub>* was carried by I1, K/B, FIB and B/O plasmids. These plasmids harboring *bla<sub>CTX-M-1</sub>* or *bla<sub>CMY-2</sub>* were found on different farms. Similarly, we found that the *bla<sub>CTX-M-1</sub>* and *bla<sub>CMY-2</sub>* genes were located on I1, B/O or K/B in *E. coli* isolated from healthy chickens in Senegal and Vietnam, (unpublished data). The presence of the I1 incompatibility groups should be monitored since it is one of the plasmids with the ability to spread on a large-scale [46, 47]. The presence of *bla<sub>CTX-M-1</sub>* on I1 and of *bla<sub>CMY-2</sub>* on I1 and B/O has also been reported in clinical *E. coli* isolates from chickens in Québec [13]. Similarly, a Colombian study identified *bla<sub>CMY-2</sub>* on incompatibility plasmids K/B, I1, A/C and B/O [48].

Although our isolates of serogroup O9 were not classified as potential human ExPEC based on their virulence genes, *E. coli* belonging to this serogroup have been isolated from acquired urinary tract infections in humans and avian cellulitis [49, 50], underlining their potential to be pathogenic for both humans and birds. Isolates of PFGE group 7/serogroup O9 were present at different locations on one farm, suggesting their ability to disseminate on the same farm and possibly to other farms in the presence of appropriate vectors. These isolates of serogroup O9

may also come from same sources such as chicks, food, water, etc. In addition to these O9 isolates, some potential human ExPEC, belonging to phylogroups A, B1, B2, D and F were found in different farms. These potential ExPEC could constitute a threat for humans. *E. coli* of phylogroups B2 and D are associated with disease in humans [26] and some *E. coli* isolates of phylogroup A have also been classified as potential human ExPEC in another study [51]. Among these potential human ExPEC, one belonged to serotype O-:H4:ST117-phylogroup F. Mora et al.[52], reported an emergence of a clonal group of APEC O111:H4:ST117, belonging to phylogroup D using the old phylotyping method, with high virulence-gene content and zoonotic potential. It should be noted that some of the potential human ExPEC isolates originated from farms mentioned above that did not comply with biosecurity measures, which implies a higher risk of dissemination of these isolates.

Isolates of serogroups O45, O75 and O78 were also frequently observed. O78, with O1 and O2, are the most frequently identified serogroups among APEC isolates worldwide [53]. In addition, *E. coli* of serogroups O45 have been isolated from both human urinary tract infections and chickens with colibacillosis [54], and isolates of serogroup O75 have been associated with human sepsis [55]. All these findings suggest that healthy chickens in the region of Québec, Canada, may act as reservoir for pathogenic *E. coli* in humans as it was previously reported by other studies [49, 56].

Although we have examined a large number of isolates obtained by different selection techniques, the inference of our results at the farm level is limited by the small number of farms ( $n = 7$ ) sampled, which were all located in the same area. . The fact that in a sample, isolates with different morphologies were targeted without being considered in the calculation of sampling weights could bias the estimated prevalences. This approach, however, maximized the probability of detecting the presence of isolates with less frequent profiles or genes at the farm level. Moreover, all these farms were practicing thinning, which might have increased their risk of carrying pathogenic strains due to the presence of a catching team travelling from farm to farm, etc. This study is therefore preliminary to a large-scale study that could include more farms from different regions of Québec and could be conducted using more sophisticated tools such as whole genome sequencing.

In summary, this study showed a high prevalence of MDR *E. coli* isolated from apparently healthy chickens in Québec. In view of the absolute predominance of the AmpC *bla*<sub>CMY-2</sub> over the ESBL *bla*<sub>CTX-M</sub>, there is strong evidence that the resistance to 3GC observed in this study is due, at least partly, to the *in vivo* use of ceftiofur during the period of data collection. Clonally related *bla*<sub>CMY-2</sub>-positive isolates were found in different floors of farms suggesting their spread on farm. In addition, the ESBL/AmpC genes were located on plasmids that have contributed to spreading of AMR. Furthermore, potential human ExPEC isolates showing MDR were detected. These results suggest that *E. coli* isolated from healthy chickens are reservoir for AMR and virulence capable of being spread to humans.

### **Acknowledgments**

We thank Dr. Martine Boulianne and Dr. Benoît Lanthier for providing the samples from chickens We also thank Dr. Ghyslaine Vanier and Mr. Gabriel Desmarais (OIE reference laboratory for *E. coli*, Université de Montreal, Canada) for their excellent technical assistance.

### **Author Disclosure Statement**

JMF is co-founder of Prevtect Microbia Inc. (Saint-Hyacinthe, QC, Canada).

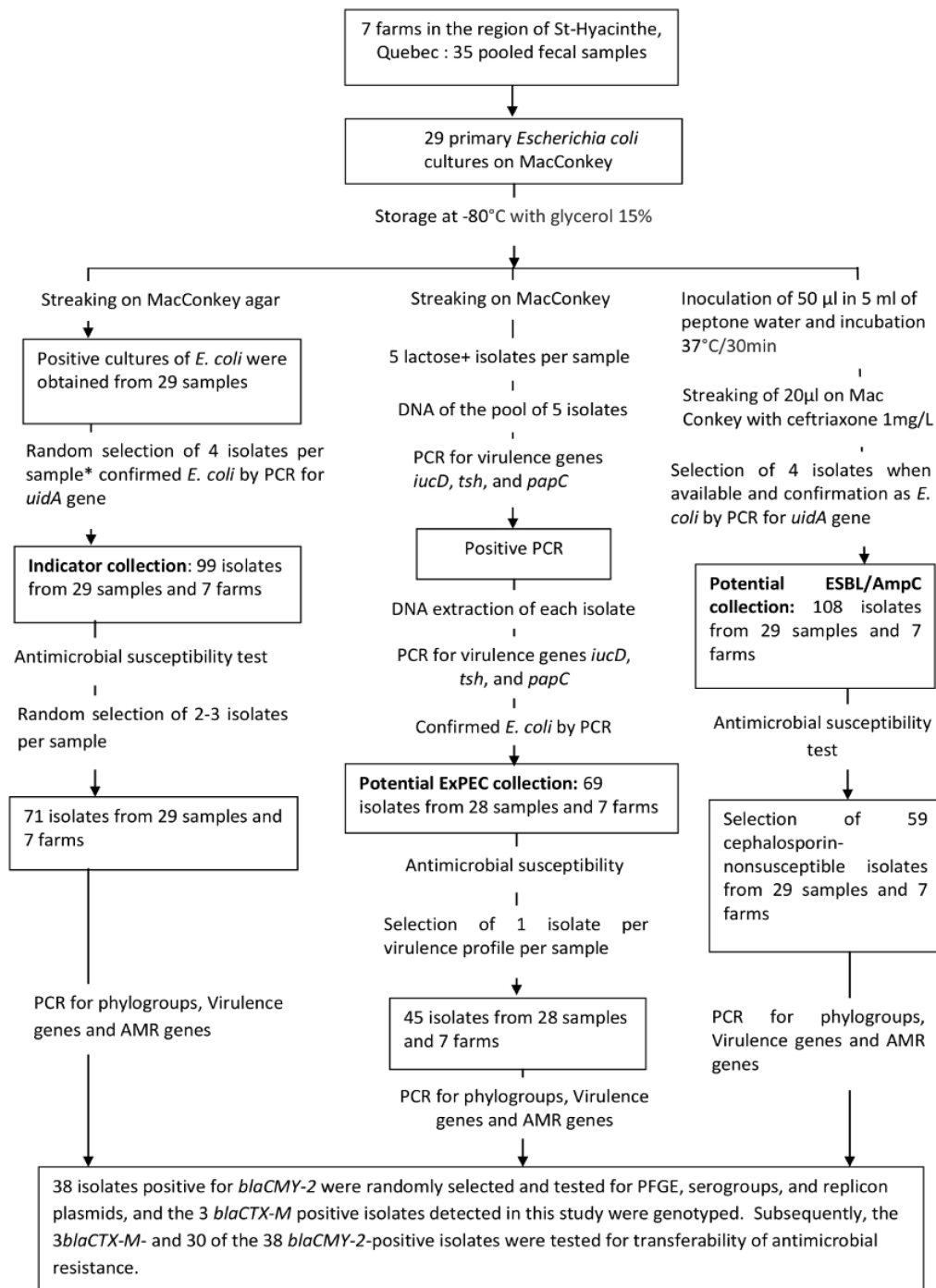
All other authors: No competing financial interests exist.

### **Funding**

This work was supported in part by a grant from

- Fonds de Recherche du Québec - Nature et Technologies [CRIP Regroupements stratégiques 111946], which financially supports the Centre de recherche en infectiologie porcine et aviaire (CRIPA) of the Université de Montréal,
- Groupe de Recherche en Zoonoses et Santé Publique (GREZOSP) of the Université de Montréal.

*Ethical approval:* Not required.



**Supplementary Figure 1. Methodological approach used in this study**

\* For 5 faecal samples, only 2 *uidA* positive isolates were recovered and for 7 other faecal samples, 3 isolates were recovered.

## References

1. Ahmed, A. M., T. Shimamoto, and T. Shimamoto. 2013. Molecular characterization of multidrug-resistant avian pathogenic *Escherichia coli* isolated from septicemic broilers. *Int J Med Microbiol.* **303**: 475-483.
2. Dho-Moulin, M. and J. M. Fairbrother. 1999. Avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC). *Vet Res.* **30**: 299-316.
3. Ewers, C., T. Janßen, and L. Wieler. 2003. Avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC). *Berl Munch Tierarztl Wochenschr.* **116**: 381-395.
4. Schouler, C., B. Schaeffer, A. Brée, A. Mora, G. Dahbi, F. Biet, E. Oswald, J. Mainil, J. Blanco, and M. Schouler. 2012. Diagnostic strategy for identifying avian pathogenic *Escherichia coli* based on four patterns of virulence genes. *J Clin Microbiol.* **50**: 1673-1678.
5. Kabir, S. 2010. Avian colibacillosis and salmonellosis: a closer look at epidemiology, pathogenesis, diagnosis, control and public health concerns. *Intl J Environ Res Pub health.* **7**: 89-114.
6. Mellata, M. 2013. Human and avian extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: infections, zoonotic risks, and antibiotic resistance trends. *Foodborne Pathog Dis.* **10**: 916-932.
7. Stromberg, Z. R., J. R. Johnson, J. M. Fairbrother, J. Kilbourne, A. Van Goor, R. Curtis 3<sup>rd</sup>, and M. Mellata. 2017. Evaluation of *Escherichia coli* isolates from healthy chickens to determine their potential risk to poultry and human health. *PloS one.* **12**: e0180599. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0180599>.
8. Linton, A. H., C. Howe, P. M. Bennett, M. H. Richmond, and E. J. Whiteside 1977. The colonization of the human gut by antibiotic resistant *Escherichia coli* from chickens. *J Appl Microbiol.* **43**: 465-469.
9. Levy, S. B., G. B. Fitzgerald, and A. B. Macone. 1976. Spread of antibiotic-resistant plasmids from chicken to chicken and from chicken to man. *Nature.* **260**: 40-42.
10. Szmolka, A. and B. Nagy. 2013. Multidrug resistant commensal *Escherichia coli* in animals and its impact for public health. *Front Microbiol.* **4**: 258. doi: [[10.3389/fmicb.2013.00258](https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00258)].

11. Brinas, L., M. A. Moreno, M. Zaraga, C. Porrero, Y. Sáenz, M. García, L. Dominguez, and C. Torres. 2003. Detection of *CMY-2*, *CTX-M-14*, and *SHV-12*  $\beta$ -lactamases in *Escherichia coli* fecal-sample isolates from healthy chickens. *Antimicrob Agents Chemother.* **47**: 2056-2058.
12. Baron, S., E. Jouy, E. Larvor, F. Eono, S. Bougeard, and I. Kempf. 2014. Impact of third-generation cephalosporin administration in hatcheries on fecal *E. coli* antimicrobial resistance in broilers and layers. *Antimicrob Agents Chemother.* **58**:5428-34.
13. Chalmers, G., A. C. Cormier, M. Nadeau, G. Côté, R. T. Reid-Smith, and P. Boerlin. 2017. Determinants of virulence and of resistance to ceftiofur, gentamicin, and spectinomycin in clinical *Escherichia coli* from broiler chickens in Québec, Canada. *Vet Microbiol.* **203**: 149-157.
14. Boulianne M., J. Arsenault, D. Daigneault, M. Archambault, A. Letellier and L. Dutil. 2016. Drug use and antimicrobial resistance among *Escherichia coli* and *Enterococcus* spp. isolates from chicken and turkey flocks slaughtered in Quebec, Canada. *Can J Vet Res.* **80**(1): p. 49-59
15. Programme québécois d'antibiosurveillance vétérinaire. 2016. Résultat de la surveillance passive de l'antibiorésistance. Rapport 2016, 2016: 48 p. Available at : <https://oaq.qc.ca/wp-content/uploads/2017/07/rapport-2016-surveillance-passive-antibioresistance.pdf>.
16. Dutil, L., R. Irwin, R. Finley, L. King Ng, B. Avery, P. Boerlin, A.-M. Bourgault, L. Cole, D. Daignault, A. Desruisseau, W. Demczuk, L. Hoang, G. B. Horsman, J. Ismail, F. Jamieson, A. Maki, A. Pacagnella, and R. R. Pillai. 2010. Ceftiofur resistance in *Salmonella enterica* serovar Heidelberg from chicken meat and humans, Canada. *Emerg Infect Dis.* **16**: 48–54.
17. Lanthier, B. 2016. Variabilité des souches de *Escherichia coli* provenant de divers poulaillers au Québec. M. Sc. Université de Montréal. Available at : <https://papyrus.bib.umontreal.ca/xmlui/handle/1866/13367>.
18. Agersø, Y., F. M. Aarestrup, K. Pedersen, A. M. Seyfarth, T. Struve, and H. Hasman. 2012. Prevalence of extended-spectrum cephalosporinase (ESC)-producing *Escherichia coli* in Danish slaughter pigs and retail meat identified by selective



- enrichment and association with cephalosporin usage. *J Antimicrob Chemother.* **67**:582-588.
19. CLSI [Clinical and Laboratory Standards Institute]. Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals. 3rd Ed. CLSI supplement VET01S. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute. 2015.
  20. CLSI [Clinical and Laboratory Standards Institute]. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 26th Ed. CLSI supplement M100S. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute. 2016.
  21. CLSI [Clinical and Laboratory Standards Institute]. Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals. 5th Ed. CLSI standard VET01. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute. 2018.
  22. CIPARS [Canadian Integrated Program for Antimicrobial Resistance Surveillance]. 2009. Resistance to antimicrobials in *Escherichia coli* isolates from chickens; Abattoir Surveillance. Access online: <http://www.phac-aspc.gc.ca/cipars-picra/2009/1-eng.php>. [Archived page visited on 2018-08-22].
  23. Magiorakos, A. P., A. Srinivasan, R. B. Carey, Y. Carmeli, M. E. Falagas, C. G. Giske, S. Harbarth, J. F. Hindler, G. Kahlmeter, B. Olsson-Liljequist, D. L. Paterson, L. B. Rice, J. Stelling, M. J. Struelens, A. Vatopoulos, J. T. Weber, and D. L. Monnet. 2012. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect.* **18**: 268-281.
  24. EFSA [European Food Safety Authority] and ECDC [European Centre for Disease Prevention and Control]. 2017. The European Union summary report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2015. *EFSA Journal* **15**: 4694 212.
  25. Vounba, P., Y. Kane, C. Cheikh, J. Arsenault, J. M. Fairbrother, R. Bada Alambédji. 2018. Molecular Characterization of *Escherichia coli* Isolated from Chickens with Colibacillosis in Senegal. *Foodborne Pathog Dis.* **15**:517-525.

26. Clermont O, Christensen JK, Denamur E, Gordon DM. The Clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: improvement of specificity and detection of new phylo-groups. *Environ Microbiol Rep.* 2013; 5: 58 -65.
27. Orskov, I., F. Orskov, B. Jann, and K. Jann. 1977. Serology, chemistry, and genetics of O and K antigens of *Escherichia coli*. *Bacteriol Rev.* **41**: 667–710.
28. Ribot, E. M., M. A. Fair, R. Gautom, D. N. Cameron, S. B. Hunter, B. Swaminathan, and T. J. Barrett. 2006. Standardization of pulsed-field gel electrophoresis protocols for the subtyping of *Escherichia coli* O157: H7, *Salmonella*, and *Shigella* for PulseNet. *Foodborne Pathog Dis.* **3**: 59-67.
29. Barbieri, NL, A. L. de Oliveira, T. M. Tejkowski, D. B. Pavanelo, L. B. Matter, S. R. Pinheiro, T. M. Vaz, L. K. Nolan, C. M. Logue, B. G. de Brito and F. Horn. 2015. Molecular characterization and clonal relationships among *Escherichia coli* strains isolated from broiler chickens with colisepticemia. *Foodborne Pathog Dis.* **12**: 74-83.
30. McLellan, S. L., A. D. Daniels and A. K. Salmore. 2003. *Genetic characterization of Escherichia coli* populations from host sources of fecal pollution by using DNA fingerprinting. *Appl. Environ Microbiol.* **69**: 2587-2594.
31. Carattoli, A., A. Bertini, L. Villa, V. Falbo, K. L. Hopkins, and E. J. Threlfall. 2005. Identification of plasmids by PCR-based replicon typing. *J Microbiol Methods.* **63**: 219-228.
32. García-Fernández, A., D. Fortini, K. Veldman, D. Mevius, and A. Carattoli. 2008. Characterization of plasmids harbouring *qnrS1*, *qnrB2* and *qnrB19* genes in *Salmonella*. *J Antimicrob Chemother.* **63**: 274-281.
33. Mnif, B., H. Harhour, J. Jdidi, F. Mahjoubi, N. Genel, G. Arlet, and A. Hammami. 2013. Molecular epidemiology of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in Tunisia and characterization of their virulence factors and plasmid addiction systems. *BMC Microbiol.* **13**: 147. doi: [[10.1186/1471-2180-13-147](https://doi.org/10.1186/1471-2180-13-147)].
34. Johnson, T.J., Y. Wannemuehler, C. Doetkott, S. J. Johnson, S. C. Rosenberger, and L. K. Nolan. 2008. Identification of minimal predictors of avian pathogenic *Escherichia coli* virulence for use as a rapid diagnostic tool. *J Clin Microbiol.* **46**: 3987-3996.
35. Johnson, J. R., M. A. Kuskowski, K. Owens, A. Gajewski, P. L. Winokur. 2003. Phylogenetic origin and virulence genotype in relation to resistance to

- fluoroquinolones and/or extended-spectrum cephalosporins and cephamycins among *Escherichia coli* isolates from animals and humans. *J Infect Dis.* **188**: 759-768.
36. Varga, C., M. L. Brash, D. Slavic, P. Boerlin, R. Ouckama, R. Weis, M. Petrik, C. Philippe, M. Barham, M. T. Guerin. 2018. Evaluating Virulence-Associated Genes and Antimicrobial Resistance of Avian Pathogenic *Escherichia coli* Isolates from Broiler and Broiler Breeder Chickens in Ontario, Canada. *Avian Dis.* **62**(3): 291-299
  37. Agunos, A., D. Léger, B. P. Avery BP, E. J. Parmley, A. Deckert, C. A. Carson, and L. Dutil. 2013. Ciprofloxacin-resistant *Campylobacter spp.* in retail chicken, western Canada. *Emerg Infect Dis.* **19**: 1121-1124.
  38. Shin, S. W., M. K. Shin, M. Jung, K. M. Belaynehe, and H. S. Yoo. 2015. Prevalence of antimicrobial resistance and transfer of tetracycline resistance genes in *Escherichia coli* isolated from beef cattle. *Appl Environ Microbiol.* **81**:5560-5566.
  39. Seifi, S. and R. Khoshbakht. 2016. Prevalence of tetracycline resistance determinants in broiler isolated *Escherichia coli* in Iran. *British Poultry Sci.* **57**: 729-733.
  40. Younis, G., A. Awad, and N. Mohamed. 2017. Phenotypic and genotypic characterization of antimicrobial susceptibility of avian pathogenic *Escherichia coli* isolated from broiler chickens. *Vet World.* **10**: 1167-1172.
  41. Agunos, A., R. K. Arsenault, B. P. Avery, A. E. Deckert, S. P. Gow, N. Jeneko, D. F. Léger, E. J. Parmeley, R. J. Reid-Smith, S. A. McEwen. 2018. Changes in antimicrobial resistance levels among *Escherichia coli*, *Salmonella*, and *Campylobacter* in Ontario broiler chickens between 2003 and 2015. *Can J Vet Res.* **82**(3): 163-177.
  42. Mathers, A. J., G. Peirano, and J. D. Pitout. 2015. The role of epidemic resistance plasmids and international high-risk clones in the spread of multidrug-resistant *Enterobacteriaceae*. *Clin Microbiol Rev.* **28**: 565-591.
  43. Laube, H., A. Friese, C. Von Salviati, B. Guerra, and U. Rösler. 2014. Transmission of ESBL/AmpC-producing *Escherichia coli* from broiler chicken farms to surrounding areas. *Vet Microbiol.* **172**: 519-527.
  44. Agersø, Y., J. D. Jensen, H. Hasman, and K. Pedersen. 2014. Spread of extended spectrum cephalosporinase-producing *Escherichia coli* clones and plasmids from

- parent animals to broilers and to broiler meat in a production without use of cephalosporins. *Foodborne Pathog Dis.* **11**: 740-746.
45. Li, Y., L. Chen, X. Wu, and S. Huo. 2015. Molecular characterization of multidrug-resistant avian pathogenic *Escherichia coli* isolated from septicemic broilers. *Poultry Sci.* **94**: 601-611.
  46. Carattoli, A. 2011. Plasmids in Gram negatives: molecular typing of resistance plasmids. *Int J Med Microbiol.* **301**: 654-658.
  47. Carattoli, A. 2009. Resistance plasmid families in *Enterobacteriaceae*. *Antimicrob Agents Chemother.* **53**: 2227-2238.
  48. Castellanos, L. R., P. Donado-Godoy, M. Leon, V. Clavijo, A. Arevalo, J. F. Bernard, A. J. Timmerman, D. J. Mevius, J. A. Wagenaar, and J. Hordijk. 2017. High heterogeneity of *Escherichia coli* sequence types harbouring ESBL/AmpC genes on IncII plasmids in the Colombian poultry chain. *PloS one.* **12**: e0170777. doi:10.1371/journal.pone.0170777.
  49. Bergeron, C. R., C. Prussing, P. Boerlin, D. Daignault, L. Dutil, R. J. Reid-Smith, G. G. Zhanel, and A. R. Manges. 2012. Chicken as reservoir for extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* in humans, Canada. *Emerg Infect Dis.* **18**: 415-421.
  50. Caya, F., J. M. Fairbrother, L. Lessard, and S. Quessy. 1999. Characterization of the risk to human health of pathogenic *Escherichia coli* isolates from chicken carcasses. *J Food Prot.* **62**: 741-746.
  51. Ewers, C., G. Li, H. Wilking, S. Kiessling, K. Alt, E.-M. Antão, C. Laturnus, I. Diehl, S. Glodde, T. Homeier, U. Böhnke, H. Steinrück, H. C. Philipp, and L. H. Wieler. 2007. Avian pathogenic, uropathogenic, and newborn meningitis-causing *Escherichia coli*: how closely related are they? *Int J Med Microbiol.* **297**: 163-176.
  52. Mora, A., C. Lopez, A. Herrera, S. Viso, R. Mamani, G. Dhahi, M. P. Alonso, M. Blanco, J. E. Blanco, J. Blanco. 2012. Emerging avian pathogenic *Escherichia coli* strains belonging to clonal groups O111: H4-D-ST2085 and O111: H4-D-ST117 with high virulence-gene content and zoonotic potential. *Veterinary microbiology*, 2012. **156**(3-4): p. 347-352.

53. Dozois, C. M., J. M. Fairbrother, J. Harel, and M. Bossé. 1992. pap-and pil-related DNA sequences and other virulence determinants associated with *Escherichia coli* isolated from septicemic chickens and turkeys. *Infect Immun.* **60**: 2648-2656.
54. Mora, A., S. Viso, C. López, M. P. Alonso, F. García-Garrote, and G. Dabhi. 2013. Poultry as reservoir for extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* O45: K1: H7-B2-ST95 in humans. *Vet Microbiol.* **167**: 506-512.
55. Ananias, M. and T. Yano. 2008. Serogroups and virulence genotypes of *Escherichia coli* isolated from patients with sepsis. *Braz J Med Biol Res.* **41**: 877-883.
56. Aslam, M., M. Toufeer, C. N. Bravo, V. Lai, H. Rempel, A. Manges and M. S. Diarra. 2014. Characterization of Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli* isolated from retail poultry meats from Alberta, Canada. *Int J Food Microbiol.* **177**: 49-56.
57. WHO [World Health Organization]. Critically important antimicrobials for human medicine – 5th rev. Geneva: World Health Organization 2017 (Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.).

#### **Article 4.**

---

*BMC Veterinary Research*. 2019; 15: 106. <https://doi.org/10.1186/s12917-019-1849-1>

### **Pathogenic potential and the role of clones and plasmids in beta-lactamase-producing *E. coli* from chicken faeces in Vietnam**

Passoret Vounba<sup>1</sup>, Julie Arsenault<sup>1</sup>, Rianatou Bada-Alambédji<sup>2</sup> and John Morris Fairbrother<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Pathology and Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, Université de Montréal, the Swine and Poultry Infectious Diseases Research Centre (CRIPA) and the Research Group on Zoonoses and Public Health (GREZOSP), St-Hyacinthe, Quebec, Canada

<sup>2</sup>Department of Public Health and Environment, Ecole Inter-Etats des Sciences et Médecine Vétérinaires (EISMV) de Dakar, Senegal

**Keywords:** Avian fecal *Escherichia coli*, Antimicrobial resistance, Virulence, clusters, plasmids, Vietnam.

## Abstract

### Background

Antimicrobial resistance (AMR) in food-producing animals is a global public health issue. This study investigated AMR and virulence profiles of *E. coli* isolated from healthy chickens in Vietnam. *E. coli* were isolated from fecal samples collected in five chicken farms located in the provinces of Hoa Binh, Thai Nguyen and Bac Giang in the North of Vietnam. These isolates were examined by disk diffusion for their AMR, PCR for virulence and AMR genes, pulsed-field gel electrophoresis for relatedness between *bla*<sub>CMY-2</sub>/*bla*<sub>CTX-M</sub>-positive isolates, electroporation for transferability of *bla*<sub>CMY-2</sub> or *bla*<sub>CTX-M</sub> genes and sequencing for mutations responsible for ciprofloxacin resistance.

### Results

Up to 99% of indicator isolates were multidrug resistant. Resistance to third-generation cephalosporins (3GC) was encoded by both *bla*<sub>CTX-M</sub> and *bla*<sub>CMY-2</sub> genes; *bla*<sub>CTX-M</sub> genes being of genotypes *bla*<sub>CTX-M-1</sub>, -14, -15, -17, -57 and -85, whereas ciprofloxacin resistance was due to mutations in the *gyrA* and *parC* genes. Some isolates originating from farms located in different provinces of Vietnam were found to be closely related, suggesting they may have been disseminated from a same source of contamination. Plasmids may also have played a role in the diffusion of 3GC-resistance as the *bla*<sub>CMY-2</sub> gene was located on plasmids A/C and I1, and the *bla*<sub>CTX-M</sub> gene variants were carried by I1, FIB, R and HI1. Plasmids carrying the *bla*<sub>CMY-2</sub>/*bla*<sub>CTX-M</sub> genes also co-transferred resistance to other antimicrobials. In addition, isolates potentially capable of infecting humans, of which some produced *bla*<sub>CMY-2</sub>/*bla*<sub>CTX-M</sub>, were identified in this study.

### Conclusions

Both clones and plasmids could be involved in the dissemination of 3GC-resistant *E. coli* within and between chicken farms in Vietnam. These results demonstrate the necessity to monitor AMR and control antimicrobial use in poultry in Vietnam.

## Background

The use of antimicrobials for therapeutic, prophylactic or growth promotion purposes has greatly contributed to improved animal health, welfare and productivity. However, use of antimicrobials promotes antimicrobial resistance (AMR). *E. coli* is known as a bacterial species in which selection for resistance following the use of antimicrobials appears rapidly [1]. In poultry, the level of AMR is further accentuated by the oral administration of drugs. AMR was first observed for the oldest antibiotics that have been used the longest in human or veterinary medicine and which are now recording very high levels of resistance [2]. This resistance now extends to drugs critically important in humans such as third-generation cephalosporins (i.e. ceftriaxone in human health or ceftiofur in veterinary medicine) or fluoroquinolones, severely limiting therapeutic options. The production of Extended-spectrum  $\beta$ -lactamases (ESBLs) or class C  $\beta$ -lactamases (AmpC) is the most important mechanism of *E. coli* resistance against cephalosporins. With more than 600 variants [3], ESBLs/AmpC are associated with resistance to a wide range of antibiotics including fluoroquinolones, trimethoprim-sulfamethoxazole and tetracyclines [4]. In poultry, CTX-M-14 and CMY-2 ESBLs were first reported in Spain [5] before their detection worldwide in chicken farms [6-9]. However, CTX-M-15 is, to date, the most widely distributed ESBL in *E. coli* worldwide [10]. Genes encoding these enzymes are located on transferable genetic elements such as plasmids which may facilitate their spread to other pathogenic enterobacteria. Important incompatibility groups include I1, N, A/C and P/F, and I1 [6, 11].

Avian Pathogenic *E. coli* (APEC), a subset of Extraintestinal pathogenic *E. coli* (ExPEC), are responsible for substantial economical losses in the poultry industry worldwide [12]. The gastro-intestinal tract of apparently healthy chickens can also act as reservoir for ExPEC potentially pathogenic for humans [13, 14]. Therefore, the development of AMR in the intestinal microflora of chickens could be a source of multi drug resistant (MDR) pathogens for humans.

In Vietnam, many classes of antimicrobials, including those of critical importance in human health, are used in high amounts in poultry, often without veterinary prescription [15, 16]. This extensive use of antimicrobials could explain the very high levels of resistance reported for *E. coli* isolated from poultry in this country in several studies [17-



19]. However, the role of clones and plasmids in the spread of this AMR is not yet elucidated. The aim of this study was to characterize *E. coli* isolates from chicken faecal samples collected in farms in Vietnam with regard to their virulence and AMR in order to elucidate the role of clones and replicon plasmids in spreading of AMR between and within farms.

## **Methods**

### **Sample collection and processing**

Faecal samples were collected from five chicken farms, without colibacillosis cases, chosen by convenience and located in the provinces of Hoa Binh, Thai Nguyen and Bac Giang, in the North of Vietnam. Faecal swabs were randomly collected from five points on each pen floor using sterile cotton swabs (Nam Khoa Biotek Company, Ho Chi Minh city, Vietnam) and pooled together by pen. Depending on the number of pens on farms, 4 to 15 pooled samples per farm were obtained, for a total of 51 pooled feces samples.

All samples were transported to the laboratory at the National Veterinary Institute in Hanoi, Vietnam. After enriching in peptone water at 37°C, overnight, samples were cultured on MacConkey agar, and incubated at 37°C, overnight. All primary cultures were kept at 4°C on Mac Conkey plates until shipping to the OIE reference laboratory for *E. coli* (EcL) in Canada.

### **Establishment of *E. coli* collections**

Collections of indicator (*i.e* isolates selected on MacConkey without selective enrichment), potential ExPEC (isolates selected on the basis of the possession of at least one of the virulence genes *iucD*, *tsh*, *papC* and *cnf* [13]) and potential ESBL/AmpC isolates (isolates selected on MacConkey agar supplemented with ceftriaxone 1 mg/L [20]) were established using the primary cultures (Supplementary Figure 1). All isolates selected were confirmed as *E. coli* by the detection, using PCR, of the *uidA* housekeeping gene. PCR conditions used to detect *uidA* gene included initial denaturation (95°C, 2 mn), 24 cycles of denaturation (94°C, 30 s), annealing (65°C, 30 s), extension (72°C, 30 s), and final extension (4°C).

### **Antimicrobial susceptibility testing**

Isolates of the three collections were examined for their susceptibility against 14 antimicrobials of nine classes using the disk diffusion method (Kirby-Bauer) [21]. Breakpoints were those recommended by the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) in 2016 [22] for most of the antimicrobials and in 2015 for ceftiofur [23]. The *E. coli* strain ATCC 25922 was used as quality control strain.

### **Antimicrobial resistance genes**

Eighty (80) isolates randomly selected from the indicator collection and originating from the 51 samples and all potential ExPEC isolates were examined by PCR for 13 AMR genes including streptomycin (*aadA1*), tetracycline (*tetA*, *tetB* and *tetC*), trimethoprim-sulfamethoxazole (*dfrA1*, *dfrA5* and *dfrA7*), fluoroquinolones (*qnrB*) and  $\beta$ -lactams (*bla<sub>TEM</sub>*, *bla<sub>SHV</sub>*, *bla<sub>OXA-1</sub>*, *bla<sub>CTX-M</sub>* and *bla<sub>CMY-2</sub>*). In addition, 59 potential ESBL/AmpC randomly selected per sample among 108 3GC-nonsusceptible isolates were tested for the presence of beta-lactamase genes (*bla<sub>TEM</sub>*, *bla<sub>SHV</sub>*, *bla<sub>OXA-1</sub>*, *bla<sub>CTX-M</sub>* and *bla<sub>CMY-2</sub>*). All of these tests were performed as described in our a previous study [24]. In addition, 30 *bla<sub>CTX-M</sub>*-positive isolates, originated from the five farms, were randomly selected and tested by PCR for CTX-M-1, -2, -8 and -9 groups [25, 26]. DNA of these isolates was purified, sequenced and the sequence analysis was performed as described in our previous study [24].

### **Detection of mutations in the Quinolone-Resistance Determining Region (QRDR)**

The regions of *gyrA* and *parC* genes in QRDR were amplified by PCR as described previously [27], in 50 ciprofloxacin-resistant (one randomly selected isolate in each of the 50 samples harboring ciprofloxacin resistant isolates). DNA purification, sequencing and sequence analysis were performed as described in our previous study [24].

### **Virulence genes and phylogenetic groups**

All isolates tested above for AMR genes also were examined by PCR for 11 virulence genes including those associated with APEC [28] or human ExPEC isolates [29]. Each isolate was also examined by PCR to be assigned to one of the four main phylogenetic groups A, B1, B2 and D [30]. In addition, isolates belonging to phylogroups B2 or D, producers of ESBL/AmpC and/or classified potential human ExPEC, were tested by the

revised phylotyping method [31]. Primers used for the PCRs performed in this study and the thermal conditions are available in our previous study [24].

### **Serotyping**

Forty-seven randomly selected *bla*<sub>CTX-M</sub>- or *bla*<sub>CMY-2</sub>-positive isolates, originating from the five farms, were tested by standard agglutination methods [32] to detect 86 O-serogroups described on the EcL website [33].

### **Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE)**

In order to estimate their clonal relationship, the 47 isolates previously screened for serogroups were sub-typed by PFGE using *Xba*I-restriction enzyme [34]. The similarities of fragments were compared using a Dice coefficient at 1% tolerance and 0.5% optimization, and a dendrogram was generated in BioNumerics (Applied Maths) software (v. 6.6) using the unweighted pair group method with arithmetic mean (UPGMA) clustering method. Clusters were defined as isolates sharing at least 60% of similarity (cut-off value) [35] as estimated by BioNumerics from the dendrogram and PFGE groups as isolates sharing at least 80% of similarity [36].

### **Replicon typing and AMR transferability**

The presence of plasmids of the different incompatibility groups was examined in the 47 isolates using PCR based replicon typing as described [37]. Purified plasmid DNA of 30 randomly selected ESBL/AmpC-producer isolates was electroporated into *E. coli* DH10B Electromax<sup>TM</sup> competent cells (Invitrogen, Calsbad, CA).

Transformants were selected on Mueller Hinton agar supplemented with ceftriaxone 2 µg/ml [38]. Up to five transformants, when available, were screened by PCR for the presence of incompatibility plasmid and for all AMR genes present in the corresponding wild type strains. Transformants carrying ESBL/AmpC genes were subsequently tested for their susceptibility to the 14 antimicrobials as mentioned above.

### **Statistical analysis**

Prevalence of AMR was estimated at the isolate and farm levels. A farm was considered as resistant for an antimicrobial when at least one resistant isolate was detected for this

antimicrobial. In addition, prevalence of virulence and AMR genes, phylogenetic groups, serogroups and plasmids were estimated in indicator and potential ExPEC isolates, whereas the prevalence of *bla*<sub>CMY-2</sub>- and *bla*<sub>CTX-M</sub>-positive isolates was estimated in selected potential ESBL/AmpC isolates. All prevalence estimates and 95% confidence limits at the isolate level were adjusted for potential clustering within farms and, when a subset of isolates was selected, for sampling weights. At the farm level, exact confidence limits were estimated. Statistical analyses were performed in SAS version 9.4. using the Freq or Surveyfreq procedure.

## **Results**

### **Isolate collections**

In the indicator collection, four morphologically different isolates were obtained from each sample except one from which only three lactose-*uidA* positive isolates were obtained. Thus, this selection method yielded a total of 203 indicator isolates recovered from the 51 samples. In the potential ExPEC collection, 48 isolates, originating from 30 samples from the five farms, were positive for at least one of the tested virulence genes; the number of isolates per sample ranged from 1 to 3 with a median of 1. In the potential ESBL/AmpC collection, a maximum of five isolates morphologically different per sample, when available, were selected, giving a total of 126 potential ESBL/AmpC isolates originating from 31 samples; the number of isolates per sample ranged from 1 to 5 with a median of 5.

### **Prevalence of antimicrobial resistance**

In order for the presentation of our results to be consistent with the definitions proposed in the literature by an expert panel [39, 40], resistant and intermediate isolates were grouped together (nonsusceptible isolates) to define multidrug resistance. At the isolate level, the highest prevalence of nonsusceptibility was observed for tetracycline (97.5%), ampicillin (95.6%), sulfisoxazole (94.6%) and trimethoprim-sulfamethoxazole (94.1%) and the lowest prevalence was for ceftriaxone, ceftiofur and ceftiofuran (3.9% each) and amoxicillin-clavulanic acid (3.4%) (Table 1). Prevalence of nonsusceptibility was also high for antimicrobials belonging to the class of aminoglycosides (54.2% to 68.5%) and ciprofloxacin (59.6%).

**Table 1.** Prevalence of antimicrobial resistance at isolate and farm level of indicator *Escherichia coli* isolated from healthy chickens in Vietnam.

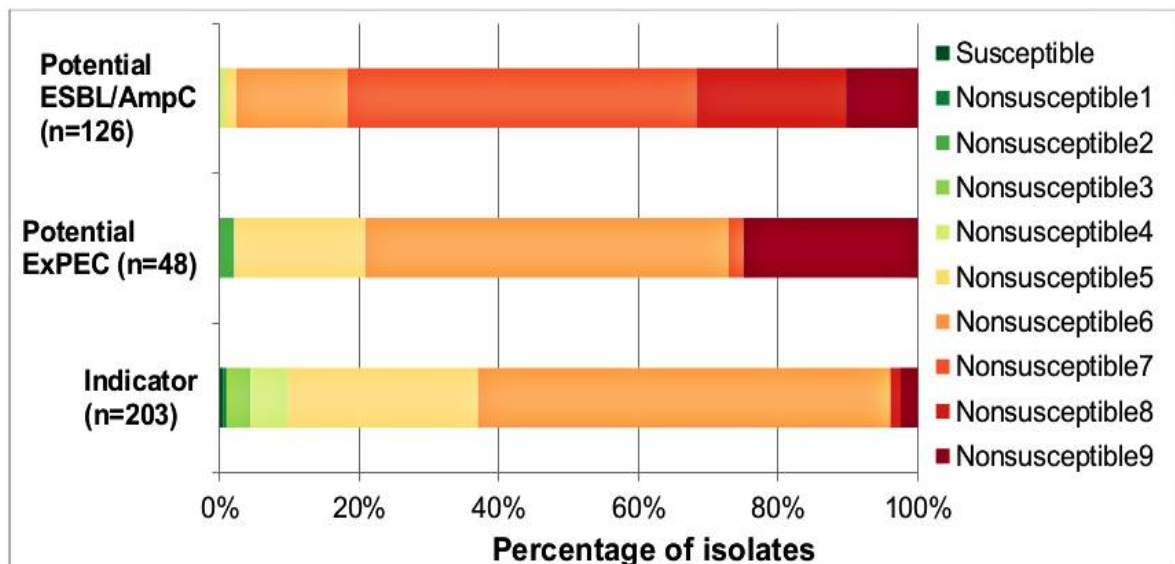
Unit of study (No. examined)	Percentage (%) of units with one or more nonsusceptible isolates per category <sup>a</sup> , antimicrobial class <sup>b</sup> and antimicrobial <sup>c</sup>													
	Critically important							Highly important						
	Highest priority				High priority									
	FLQ		CPS		PEN	PEN/I	AMG	CPM		FOL	PHE		TET	
NAL		CIP	TIO	CRO	AMP	AMC	GEN	KAN	STR	FOX	SXT	SSS	CHL	TET
Isolates (n = 203)	83.7	59.6	3.9	3.9	95.6	3.4	54.2	65.5	68.5	3.9	94.1	94.6	86.2	97.5
Farms (n = 5)	100	100	80.0	80.0	100	60.0	100	100	100	80.0	100	100	100	100

<sup>a</sup>Category of human antimicrobial importance according to the World Health Organization (WHO) [65].

<sup>b</sup>Antimicrobial classes: (FLQ) Fluoroquinolones; (PEN/I) Penicillin+ $\beta$ -Lactamase inhibitors; (CPS) Cephalosporines; (AMG) Aminoglycosides; (CPM) Cephamycin; (PEN) Penicillin; (FOL) Folate inhibitors; (PHE) Phenicol; (TET) Tetracyclines.

°Antimicrobials: NAL, Nalidixic acid; CIP, Ciprofloxacin; AMC, Amoxicillin/clavulanic acid; TIO, Ceftiofur; CRO, Ceftriaxone; AMP, Ampicillin; FOX, Cefoxitin; GEN, Gentamicin; KAN, Kanamycin; STR, Streptomycin; SXT, Trimethoprim-sulphamethoxazole; SSS, Sulfisoxazole; CHL, Chloramphenicol; TET, Tetracycline.

Of the 51 samples, 1 (2.0%) had indicator isolates with the same antimicrobial susceptibility pattern, 10 (19.6 %) with two different profiles, 14 (27.5%) with three profiles and 26 (51.0%) with four different profiles. All farms carried at least one indicator isolate nonsusceptible for each of the antimicrobials tested, except for ceftriaxone, ceftiofur and ceftiofur (each 80.0% of farms) and amoxicillin-clavulanic acid (60.0% of farms) (Table 1). Almost all indicator isolates [201 (99.0%; 95%CI = 97.2 - 100)] were multidrug-resistant (MDR, nonsusceptible to three or more antimicrobial classes). Nonsusceptibility to five or six classes of antimicrobials (MDR5 or MDR6) was the most frequent (86.2%); some indicator isolates were even considered as possible XDR (*i.e* extensively drug resistant, isolates that remain susceptible to a maximum of only two classes of antimicrobials) (Figure 1).



**Figure 1. Distribution (%) of indicator (n=203), potential ExPEC (n=48) and potential ESBL/AmpC (n=126) *Escherichia coli* isolates from healthy chickens in Vietnam according to nonsusceptibility profiles.**

Susceptible: susceptible to all classes of antimicrobials; Nonsusceptible 1 to 9: nonsusceptible to 1 up to 9 classes of antimicrobials; isolates nonsusceptible to 3 up to 7 antimicrobials were considered to be multidrug resistant (MDR), isolates nonsusceptible to 8 or 9 antimicrobials were considered to be possibly extensively drug resistant (XDR).

In the specific collections, isolates were almost all nonsusceptible to more than four classes of antimicrobial, with 31.7% and 25.0% of potential ESBL/AmpC and potential ExPEC isolates being possible XDR, respectively (Figure 1).

Based on the ECDC's criteria [41], presumptive ESBL/AmpC-producer isolates were found in 80.0% of the studied farms and 76.2% of potential ESBL/AmpC isolates (Table 2). 3GC-nonsusceptible potential ESBL/AmpC isolates were found in 31 samples whereas 3GC-nonsusceptible indicator *E. coli* isolates were only found in 8 samples.

**Table 2.** Prevalence of presumptive ESBL/AmpC-producers in *Escherichia coli* isolated from healthy chickens in Vietnam following supplementation with ceftriaxone.

Unit of study	No. examined	No. of units with positive culture	No. (%; 95%CI) of units carrying presumptive ESBL/AmpC-producer isolates
Isolates	126	N/A	96 (76.2%; 67.8 – 84.5)
Farms	5	4	4 (80.0%; 28.4 – 99.4)

No.: Number; 95%CI: 95% confidence interval; Presumptive ESBL: isolate resistant to ceftriaxone and/or ceftiofur and susceptible to amoxicillin clavulanic acid and ceftiofur; Presumptive AmpC: isolate resistant to ceftriaxone in addition to being resistant to amoxicillin clavulanic acid and ceftiofur; Presumptive ESBL/AmpC-producers: cumulative of presumptive ESBL-producers and presumptive AmpC-producers; N/A: Not applicable as no culture was done.

### Prevalence of antimicrobial resistance genes

All tested indicator isolates (n = 80) were carriers of at least one AMR gene with the maximum of 5 AMR genes. The most prevalent AMR genes were *bla<sub>TEM</sub>* (100%; 95%CI = 95.5 - 100), *tetA* (87.5%; 95%CI = 71.4 – 100), *aadA1* (71.3%; 95%CI = 56.4 – 86.1), and *dfrA5* (32.5%; 95%CI = 11.9 – 53.1) (Table 3). In addition, 36 (61.0%; 95%CI = 34.3 – 87.7) of potential ESBL/AmpC isolates and 1 (2.1%; 95%CI = 0.0 – 8.5) potential ExPEC



isolate were *bla<sub>CTX-M</sub>*-positive; these frequencies for *bla<sub>CMY-2</sub>* were 23 (39.0%; 95%CI = 12.2 – 65.7) in potential ESBL/AmpC isolates and 4 (8.3%; 95%CI = 0.0 – 25.6) in potential ExPEC isolates. Sequencing of 30 *bla<sub>CTX-M</sub>*-positive isolates showed that this gene was of genotypes *bla<sub>CTX-M-1</sub>* (4 isolates), *bla<sub>CTX-M-14</sub>* (6 isolates), *bla<sub>CTX-M-15</sub>* (5 isolates), *bla<sub>CTX-M-17</sub>* (6 isolates), *bla<sub>CTX-M-57</sub>* (8 isolates) and *bla<sub>CTX-M-85</sub>* (1 isolate). Except for *bla<sub>CTX-M-1</sub>* that was only detected in isolates from farms 4 and 5, the other major genotypes were each found in 3 farms, 1, 4 and 5.

**Table 3.** Prevalence of AMR genes and the 95%CI in 80 indicator *Escherichia coli* isolates from healthy chickens in Vietnam.

AMR gene	No. (%) of positive isolates	95% CI	Target antimicrobials
<i>tetA</i>	70 (87.5)	71.4 – 100	Tetracycline
<i>tetB</i>	7 (8.8)	0.0 – 21.1	
<i>dfrA1</i>	3 (3.8)	0.0 – 8.1	Trimethoprim-
<i>dfrA5</i>	26 (32.5)	11.9 – 53.1	sulfamethoxazole, sulfamethoxazole
<i>dfrA7</i>	7 (8.8)	0.0 – 20.3	
<i>aadA1</i>	57 (71.3)	56.4 – 86.1	Streptomycin
<i>bla<sub>TEM</sub></i>	80 (100)	95.5 - 100	Ampicillin
<i>bla<sub>OXA-1</sub></i>	3 (3.8)	0.0 – 10.2	
<i>qnrB</i>	2 (2.5)	0.0 – 6.9	Quinolones

*bla<sub>CMY-2</sub>*, *bla<sub>SHV</sub>*, *bla<sub>CTX-M</sub>* and *tetC* genes were not detected in any indicator isolate; AMR: Antimicrobial resistance; No.: Number; %, percentage; 95%CI: 95% confidence interval;.

### Distribution of virulence genes and phylogroups

The 80 tested indicator isolates were of phylogroups A [32 (40.0%; 95%CI = 20.4 – 59.5)], B1 [36 (45.0%; 95%CI = 21.4 – 68.6)], B2 [4 (5.0%; 95%CI = 0.0 – 14.5)] and D [8 (10.0%; 95%CI = 0.0 – 26.2)]. Of the 11 tested virulence genes, 8 were detected. In all, 45

(56.3%; 95%CI = 40.2 – 72.3) indicator *E. coli* isolates were positive to one or more virulence genes; with a maximum of 5 genes. All APEC-associated virulence genes were detected with the prevalence in descending order, *ompT* [23 (28.7%; 95%CI = 11.5 – 46.0)], *iss* [18 (22.5%; 95%CI = 5.5 – 39.5)], *hlyF* [15 (18.7%; 95%CI = 1.3 – 36.2)], *iucD* [14 (17.5%; 95%CI = 0.0 – 35.8)], *iroN* [10 (12.5%; 95%CI = 4.6 – 20.4)], and among ExPEC virulence markers, *kpsMIII* [5 (6.3%; 95%CI = 0.0 – 15.4)] and *papC* [2 (2.5%; 95%CI = 0.0 – 6.4)] were detected. The virulence gene *tsh* [4 (5.0; 95%CI = 0.0 – 11.9)] was also detected, whereas *cnf*, *sfa/foc* and *afa/dra* were not detected in any isolate. APEC-associated virulence genes were found amongst all of the four phylogroups whereas the *kpsMIII* gene associated with ExPEC was mostly detected in isolates of phylogroups B2 and D (data not shown). Twenty-three virulence profiles were found of which the most frequently observed were *ompT* (12 isolates belonging to phylogroup A, B1 and B2), *hlyF* and *iss* (4 isolates each, each mostly of phylogroup B1), *iucD/iss* (3 isolates of phylogroups B1 and D) followed by *iucD/iss/hlyF/ompT*, *iucD* and *iroN/iss/hlyF/ompT* (2 isolates each). Based on genetic criteria proposed by Johnson et al. [28] to define APEC isolates, 44 (55.0%; 95%CI = 38.0 – 71.9) isolates were positive for at least one of the APEC predictors of which 7 representing 8.8% (95%CI = 2.6 – 14.9) of the total tested indicator isolates, originating from 4 farms, had four or five of these predictors and thus, were classified as potential virulent APEC. Three (3.7%; 95%CI = 0.0 – 9.7) indicator isolates, of phylogroups B2 and D, from two farms met criteria defining potential human ExPEC [42]. In the potential ExPEC collection, 17 (35.4%; 95%CI = 0.9 – 69.9) isolates belonging to phylogroups A, B1 and D were defined as potential virulent APEC and 7 (14.6%; 95%CI = 0.0 – 31.5), mostly of phylogroup D, were classified as potential human ExPEC. In addition, 4 potential human ExPEC ESBL/AmpC-producers were found in the enriched collection, resulting in a total of 14 isolates potentially capable of infecting humans. Examination of 9 potential human ExPEC belonging to phylogroups B2 (n=1) et D (n=8) using the revisited phylotyping method [31] showed the B2-isolate remains in the same phylogroup, whereas isolates of phylogroup D were reassigned to phylogroup F (n=4) and E (n=4) (Figure 2). For the other tested isolates (all ESBL/AmpC-producers), for the two B2-isolates, one still belonged to group B2 and the other reassigned to group E, whereas the 9 isolates of phylogroup D were reassigned to phylogroups A (1 isolate), C (1 isolate), E (3 isolates), F (1 isolate) and B2 (3 isolates).

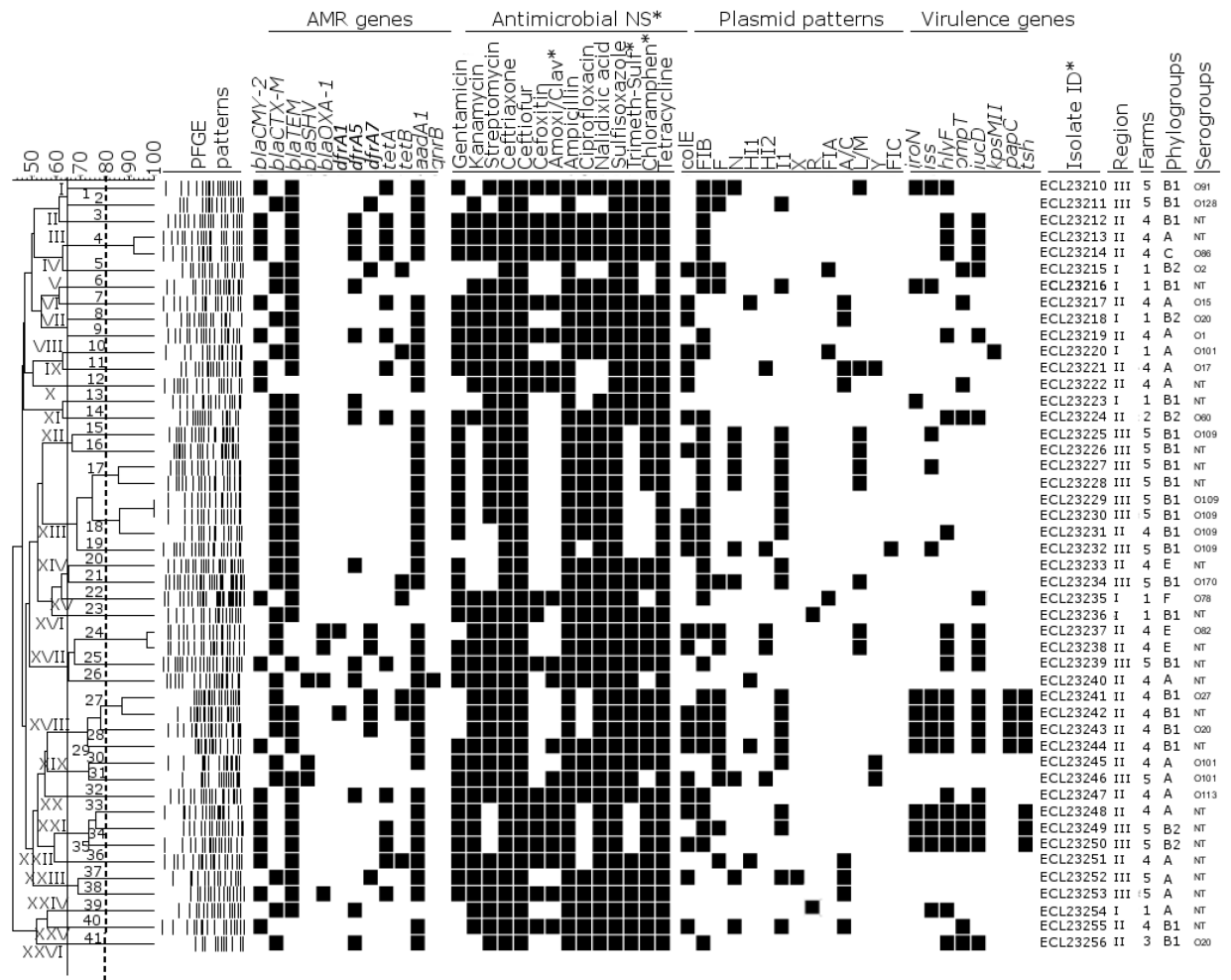
Isolate identity	Farms of origin	Phylogroups	AMR genes							Antimicrobial nonsusceptibility											Virulence genes													
			<i>bla</i> TEM	<i>bla</i> CTX-M	<i>bla</i> CMY-2	<i>aadA1</i>	<i>tetA</i>	<i>tetB</i>	<i>dfxA1</i>	<i>dfxA5</i>	<i>dfxA7</i>	Gentamicin	Kanamycin	Streptomycin	Ceftriaxone	Ceftiofur	Amoxi/clav*	Ampicillin	Ciprofloxacin	Nalidixic acid	Sulfisoxazole	Trimeth-sulf*	Chloramph*	Tetracycline	<i>iroN</i>	<i>iss</i>	<i>hlyF</i>	<i>ompT</i>	<i>IucD</i>	<i>kpsMII</i>	<i>papC</i>	<i>tsh</i>		
ECL23318	2	A																																
ECL23319	2	F																																
ECL23320	2	E																																
ECL23321	3	F																																
ECL23322	4	B2																																
ECL23323	5	F																																
ECL23324	5	E																																
ECL23325	3	E																																
ECL23365	5	F																																
ECL23366	5	E																																
ECL23241	4	B1																																
ECL23242	4	B1																																
ECL23243	4	B1																																
ECL23244	4	B1																																

**Figure 2. Virulence, phylogenetic groups and AMR profiles of potential ExPEC isolates from healthy chickens in Vietnam.**

Amoxi/clav: Amoxicillin/clavulanic acid; Trimeth-sulf: Trimethoprim-sulfamethoxazole.

### Prevalence of O serogroups and replicon plasmids, and relationship among ESBL/AmpC-producers

Of the 47 ESBL/AmpC-producers tested, only 24 could be assigned to an O-serogroup, with a total of 16 different serogroups observed (Figure 3).



**Figure 3. Dendrogram showing the relatedness of 47 *bla*<sub>CTX-M</sub>/*bla*<sub>CMY-2</sub>-producing *Escherichia coli* isolates from healthy chickens in Vietnam, based on pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) patterns.**

The dendrogram was generated using Dice coefficient and the unweighted pair-group method and arithmetic average (UPGMA). Based on a similarity index of  $\geq 60\%$  (continuous line), 26 major clusters (I-XXVI) were found inside which 41 PFGE groups (in arabic numerals) were identified when the similarity was set at 80% (discontinued line). AMR: antimicrobial resistance; antimicrobial NS\*: antimicrobial nonsusceptibility; Trimeth-sulf: trimethoprim-sulfamethoxazole; Amoxi/clav: Amoxicillin-clavulanic acid; Chloramphen: Chloramphenicol. None of the ESBL/AmpC-producing isolates were positive to AMR gene *tetC* and none was carrier of virulence genes *sfa*, *afa* or *cnf*, then these genes were removed from the dendrogram.

The most frequently observed O serogroups were O109 [5 (10.6%; 95%CI = 0.0 – 28.8)], followed by O20 [3 (6.4%; 95%CI = 0.0 – 16.4)] and O101 [3 (6.4%; 95%CI = 2.4 – 10.4)]. The other serogroups, including O1, O2 and O78, were each observed in one isolate (Figure 3).

Of the 21 replicon types tested, 14 were detected. All isolates harboured at least one replicon marker, and the number of replicon markers in isolates ranged from 1 to 5. Of these, the most frequently observed were FIB [32 (68.1%; 95%CI = 48.9 – 87.2)], colE [22 (46.8%; 95%CI = 28.1 – 65.5)], I1 [20 (42.6%; 95%CI = 15.8 – 69.2)], and F [15 (31.9%; 95%CI = 22.1 – 41.7)] (Figure 3).

PFGE of the 47 ESBL/AmpC-producer isolates typed revealed their high diversity. Based on similarity level set up 60%, 26 clusters (I - XXVI) were found of which, 11 consisted in at least two isolates and the remaining consisted, each, of only one isolate (Figure 3). By setting the similarity between isolates at 80%, 41 PFGE groups (1 - 41), of which five (PFGE groups 4, 17, 18, 24 and 27) included at least two isolates, were observed within the clusters. Only the PFGE group 18, which includes 3 isolates, the largest number of isolates per group, consisted of isolates from the same phylogroup / serogroup (B1 / O109) and from different farms (Farms 4 and 5) located in two separate regions (Figure 3). The other major PFGE groups each consisted of two isolates originating from the same farm. In addition, isolates from some clusters shared some similarities in AMR and/or virulence profiles. This was the case for cluster XVIII (which includes the PFGE group 27) of which isolates were positive for AMR genes *bla<sub>CTX-M</sub>*, *bla<sub>TEM</sub>*, *aadA1*, being nonsusceptible to kanamycin, streptomycin, ceftriaxone, ceftiofur, ampicillin, nalidixic acid, sulfisoxazole, trimethoprim-sulfamethoxazole, chloramphenicol and tetracycline. These XVIII cluster isolates were also positive for replicon plasmids colE, FIB, F and I1 and the virulence genes *iucD*, *papC*, *iroN*, *iss* and *hlyF*, permitting these isolates to be considered both potential virulent APEC and potential human ExPEC. Cluster XXI includes *bla<sub>CMY-2</sub>*-, *bla<sub>TEM</sub>*- and *aadA1*-positive isolates nonsusceptible to gentamicin, kanamycin, ceftriaxone, ceftiofur, cefoxitin, amoxicillin/clavulanic acid, ampicillin, nalidixic acid, sulfisoxazole, chloramphenicol and tetracycline and positive for the *iroN*, *iss*, *hlyF*, *ompT*, *iucD* and *tsh* virulence genes (Figure 3) and have been defined as potential virulent APEC.

### Mutations in the Quinolone Resistance-Determining Region (QRDR) of *gyrA* and *parC* genes

Two mutation positions were observed in each QRDR gene (Table 4). In *gyrA*, the most prevalent mutation was the substitution of Serine (Ser) by Leucine (Leu) at position 83 [45 (90.0; 95%CI = 84.2 – 95.7)] and the substitution of Aspartic acid (Asp) by Asparagine (Asn) at position 87 [34 (68.0; 95%CI = 57.5 – 78.5)]. In *parC* gene, the most frequently observed mutation was the substitution of serine by isoleucine (Ile) at position 80 [42 (84.0; 95%CI = 72.5 – 95.5)]. Twenty-eight (56.0%; 95%CI = 43.8 – 68.2) isolates demonstrated a combination of the 3 same mutations, Ser83Leu and Asp87Asn in *gyrA* and Ser80Ile in *parC* and these isolates were from the five farms. In addition, 41 (82.0%; 95%CI = 69.9 – 94.1) isolates were carriers of double-serine mutation (*gyrA* Ser83Leu and *parC* Ser80Ile), whereas 38 (76.0%; 95%CI = 65.6 – 86.41) isolates were carriers of at least two mutations in *gyrA* and one in *parC*.

**Table 4.** Presence of mutations in *gyrA* and *parC* genes of ciprofloxacin-resistant *Escherichia coli* isolated from broilers in Vietnam.

Amino acid changes in <i>gyrA</i>	Amino acid changes in <i>parC</i>	No. of isolates carrying mutation(s) (% and 95%CI)	No. of farms of origin		
Ser83	Asp87	Ser80	Glu84		
Leu	Asn	Ile	-	28 (56.0; 43.8 – 68.2)	5
Leu	Asn	Ile	Gly	4 (8.0; 0.0 – 17.3)	3
Leu	-	Ile	-	3 (6.0; 0.0 – 13.0)	3
Leu	Gly	Ile	-	3 (6.0; 0.0 – 16.4)	2
Leu	-	-	-	2 (4.0; 0.0 – 13.9)	1
Leu	Tyr	Ile	-	2 (4.0; 0.0 -11.2)	2
Leu	His	Ile	-	1 (2.0; 0.0 – 6.9)	1
Leu	Arg	-	-	1 (2.0; 0.0 – 7.4)	1

Leu	Asn	-	-	1 (2.0; 0.0 – 8.6)	1
-	Asn		-	1 (2.0; 0.0 – 7.4)	1
-	-	Ile	-	1 (2.0; 0.0 – 6.9)	1
-	-	-	-	3 (6.0; 0.0 – 15.5)	3
<i>Total of tested isolates and farms</i>				50	5

---

Ser : serine; Leu : leucine; Tyr : tyrosine; Asp : aspartic acid; Asn : asparagine; Ile : isoleucine; Arg : arginine; Glu : glutamic acid; Lys : lysine.

### **Transferability of ESBL/AmpC genes**

The AMR gene transfer experiments were successful for 20 isolates including 3 *bla<sub>CMY-2</sub>* and 17 *bla<sub>CTX-M</sub>* isolates. The *bla<sub>CMY-2</sub>* gene was located on plasmids of the replicon types A/C (2 isolates) and I1 (1 isolate) whereas *bla<sub>CTX-M</sub>* genes were found on replicon plasmids I1 (12 isolates), FIB (3 isolates), R and HI1 (1 isolate each) (Table 5). A/C plasmids carrying *bla<sub>CMY-2</sub>* co-transferred resistance to gentamicin, chloramphenicol, sulfisoxazole and tetracycline; I1 plasmid-carrying *bla<sub>CTX-M</sub>* co-transferred resistance to tetracycline, sulfisoxazole, trimethoprim-sulfamethoxazole, tetracycline or gentamicin, and the plasmids FIB, R and HI1 carrying *bla<sub>CTX-M</sub>* co-transferred resistance to gentamicin, chloramphenicol, trimethoprim-sulfamethoxazole, sulfisoxazole or tetracycline (Table 5). In addition, in 2 isolates, the *bla<sub>CTX-M</sub>* gene was co-transferred with the *bla<sub>TEM</sub>* gene and in one isolate, *bla<sub>CTX-M</sub>* was co-transferred with *bla<sub>SHV</sub>* (Table 5).

**Table 5.** Characteristics of 20 ESBL/AmpC transformants showing their transferred ESBL/AmpC genes and replicon plasmids, co-transferred AMR and Phylogroup/serogroup, PFGE group and farms origin of the wild-type strains.

Transformant ID	Phylogroup/serogroup of the wild-type strains	PFGE group of the wild-type strains	ESBL/AmpC genes*	Co-transferred AMR <sup>a</sup>	Plasmid replicon types	Farms origin of the wild-type strains
ECL23217	A/O15	7	<i>bla<sub>CMY-2</sub></i>	CHL, SSS, TET	A/C	4
ECL23356	B1/NT	NA	<i>bla<sub>CTX-M-17</sub></i> , <i>bla<sub>TEM</sub></i>	-	I1	5
ECL23216	B1/NT	6	<i>bla<sub>CTX-M-57</sub></i>	-	I1	1
ECL23241	B1/O27	27	<i>bla<sub>CTX-M-57</sub></i>	-	I1	4
ECL23242	B1/NT	27	<i>bla<sub>CTX-M-57</sub></i>	-	I1	4
ECL23243	B1/O20	28	<i>bla<sub>CTX-M-57</sub></i>	-	I1	4
ECL23244	B1/NT	29	<i>bla<sub>CMY-2</sub></i>	-	I1	4
ECL23240	A/NT	26	<i>bla<sub>CTX-M-15</sub></i>	-	FIB	4
ECL23237	D/O82	24	<i>bla<sub>CTX-M-15</sub></i>	-	I1	4
ECL23233	D/NT	20	<i>bla<sub>CTX-M-1</sub></i>	SSS, TET	I1	4



ECL23234	B1/O170	21	<i>bla<sub>CTX-M-1</sub></i>	SSS, TET	I1	5
ECL23254	A/NT	39	<i>bla<sub>CTX-M-57</sub></i> , <i>bla<sub>TEM</sub></i>	TET	R	1
ECL23236	B1/NT	23	<i>bla<sub>CTX-M-57</sub></i>	SSS, TET	HI1	1
ECL23229	B1/O109	18	<i>bla<sub>CTX-M-17</sub></i>	GEN	I1	5
ECL23220	A/O101	10	<i>bla<sub>CTX-M-17</sub></i>	GEN, CHL, SSS, TET	FIB	1
ECL23221	A/O17	11	<i>bla<sub>CMY-2</sub></i>	GEN, CHL, SSS, TET	A/C	4
ECL23223	B1/NT	13	<i>bla<sub>CTX-M-57</sub></i>	-	I1	1
ECL23245	A/O101	30	<i>bla<sub>CTX-M-15</sub></i> , <i>bla<sub>SHV</sub></i>	-	I1	4
ECL23252	A/NT	37	<i>bla<sub>CTX-M-57</sub></i>	SXT, SSS	I1	5
ECL23256	B1/O20	41	<i>bla<sub>CTX-M-1</sub></i>	TET	FIB	5

---

<sup>a</sup>*bla<sub>CTX-M</sub>* transformants were nonsusceptible to ceftriaxone, ceftiofur and ampicillin, and *bla<sub>CMY-2</sub>* transformants were nonsusceptible to ceftriaxone, ceftiofur, amoxicillin/clavulanic acid and ampicillin.\* *bla<sub>TEM</sub>* and *bla<sub>SHV</sub>* variants were not determined and then we cannot know if the TEM and SHV genes identified are ESBL or not.

## Discussion

This study showed a very high proportion of MDR (99%) in indicator isolates. A likely explanation to this high level of nonsusceptibility could be the extensive use of antimicrobial in chickens in Vietnam, often without veterinary prescription, as reported in many studies [17-19]. Other studies have reported similar levels of AMR in *E. coli* from poultry in Vietnam [43, 44]. In contrast, the level of nonsusceptibility to 3GC was very low (3.9%) in indicator isolates, agreeing with the prevalence of 3.1% of resistance previously reported in 3GC in Vietnam [44]. However, following selective enrichment on MacConkey supplemented with ceftriaxone, a high prevalence (76.2%) of presumed ESBL/AmpC isolates was observed. It should be noted that in both indicator and potential ESBL/AmpC isolates, 3GC-nonsusceptible isolates were found in 4 out of the 5 studied farms. However, these isolates were recovered from eight samples in the indicator *E. coli* collection whereas they were detected in 31 samples in the enriched collection, clearly demonstrating higher sensitivity of detection of the protocol used in the later case. The significant increase in nonsusceptibility to 3GC, observed in the potential ESBL/AmpC isolates, is indicative of the extent of selection of resistance that may be induced by the use of antimicrobials. A similar prevalence of 89.7% of potential ESBL/AmpC isolates resistant to cefotaxime has also been previously reported in Vietnam [43]. This nonsusceptibility to 3GC could also be due to the use of antimicrobials other than 3GC. For instance, the selection of ESBL-producer *E. coli* following aminopenicillin use has been reported [45], hence the prudent use of any antimicrobials.

Of the beta-lactamase genes examined in indicator isolates, *bla<sub>TEM</sub>* (100%) was the most frequently observed gene whereas neither *bla<sub>CTX-M</sub>* nor *bla<sub>CMY-2</sub>*-positive isolates were detected (Table 3). Likewise, *bla<sub>TEM</sub>* (83.6%) was also the predominant the beta-lactamase gene in the potential ESBL/AmpC isolates, followed by the ESBL gene *bla<sub>CTX-M</sub>* and the AmpC gene *bla<sub>CMY-2</sub>* which were detected in 61.0% and 39.0% of these isolates, respectively. In Brazil, 72% of potential ESBL/AmpC recovered from fecal chicken samples in two farms were found to be *bla<sub>CMY-2</sub>*-producers [46]. However, these authors only tested for the presence of AmpC genes among *E. coli* presumed ESBL/AmpC-producers. Our results show a predominance of the CTX-M gene among 3GC-resistant isolates, consistent with the results we obtained for *E. coli* isolates from carcasses in Vietnam (unpublished results). In contrast, in another study on chicken fecal *E. coli* from

Quebec (Canada), we found that 3GC-resistance was mainly due to *bla*<sub>CMY-2</sub> rather than *bla*<sub>CTX-M</sub> (unpublished results), and a study in Sweden [47] also found that *bla*<sub>CMY-2</sub> predominated among fecal *E. coli* isolated from broilers. These differences between countries could be related to differences in the types of antimicrobials used in poultry or to differences in the geographical distribution of resistance genes and their variants [48]. In our study, *bla*<sub>CTX-M</sub> genes were of the genotypes *bla*<sub>CTX-M-1</sub>, *bla*<sub>CTX-M-15</sub>, *bla*<sub>CTX-M-14</sub>, *bla*<sub>CTX-M-17</sub>, *bla*<sub>CTX-M-57</sub>, and *bla*<sub>CTX-M-87</sub>. Chicken fecal *E. coli* isolates harbouring *bla*<sub>CTX-M-1</sub> and -9 groups have already been reported in Vietnam [43]. Likewise, *bla*<sub>CTX-M</sub> of genotypes -1, -15, -14, -17 have been detected in *E. coli* isolated from chickens in Vietnam and China [49, 50]. In addition, *bla*<sub>CTX-M-55</sub>, which is identical to *bla*<sub>CTX-M-57</sub> [51], was reported in *E. coli* isolated from Vietnamese chicken farms [49]. The genotype *bla*<sub>CTX-M-87</sub> was first described in an *E. coli* strain isolated from inpatient in China in 2009 [52] and in the best of our knowledge, this is the first report of this variant in *E. coli* isolated from chickens. In our screening of potential ESBL/AmpC isolates of Vietnam for carriage of *mcr-1* or *mcr-2* genes mediating colistin-resistance, we did not detect *mcr-2*, whereas some isolates carried *mcr-1* in association with *bla*<sub>CTX-M</sub> or *bla*<sub>CMY-2</sub> genes (unpublished data). *bla*<sub>CTX-M-14</sub>, -15 and -55 have also been identified in Vietnam, sometimes in association with *mcr-1* gene, from chicken farm workers or community individuals [49] or in postsurgical infections from patients [53]. Although the former study [49] did not find any relationship between the *bla*<sub>CTX-M</sub> producing isolates from chickens and humans, our findings demonstrate that further investigation into the possible links between human and poultry isolates is warranted.

Very high prevalence of nonsusceptibility against ciprofloxacin (59.6%) was observed in indicator isolates, all farms harbouring ciprofloxacin resistant isolates. Nguyen et al. [44] also reported high prevalence of resistance to ciprofloxacin in farms (91.8%). These authors also reported that ciprofloxacin resistance was significantly associated with the use of commercial feeds containing antimicrobials, non-compliance with biosecurity measures or the use of quinolones. All ciprofloxacin-resistant isolates tested, except three, had at least one mutation in *gyrA* or *parC*. Resistance in isolates lacking mutation may be due to the presence of plasmid genes that we have not examined. The sequencing of isolates demonstrated two mutation positions in both *gyrA* and *parC* with all amino acid changes described elsewhere [24, 54, 55]. The presence of isolates carrying two mutations in *gyrA*

gene and one in *parC* has been suggested as indicative of the high level of resistance demonstrating the widespread use of quinolones [56]. In the other hand, 82.0% of ciprofloxacin-resistant isolates originating from the five farms carried the double-serine mutation in *gyrA* (Ser83Leu) and *parC* (Ser80Ile). This double mutation has been described as a fitness factor that has helped the ST131 pandemic clone to successfully spread into new ecological niches [57].

It should be noted, however, that the small size of our sample ( $n = 5$ ) and the sampling method used (convenience), the prevalence we report here cannot be inferred to all farms in Vietnam. Nevertheless, prevalence estimates are probably representative of *E. coli* present in these 5 farms at the time of the study. In addition, isolates with different morphologies were targeted without being considered in the statistics; that could bias the observed prevalences. This approach, however, increases the probability of detecting a gene at the farm level. This study is therefore preliminary to a large-scale study that could include more farms from different regions of Vietnam and could be conducted using more sophisticated tools such as whole genome sequencing. The indicator *E. coli* isolates, as well as isolates producing ESBL/AmpC, in this study were found in the four phylogenetic groups A, B1, B2 and D, although the ESBL-producer isolates were mostly of phylogroup B1. Le et al. [58] also found that ESBL-producer *E. coli* isolated from poultry in Vietnam were mostly of the phylogroup B1. In addition, some MDR isolates of phylogroups B2 and F were carriers of at least two virulence genes associated with human ExPEC, suggesting their potential to cause infections in humans, *E. coli* of phylogroups B2 and F being associated with ExPEC causing infections in humans [31, 59]. In our previous study on clinical chicken *E. coli* isolates from Senegal [24] and in our study on chicken carcasses collected on Vietnamese markets (unpublished data), potential human ExPEC isolates expressing nonsusceptibility to several antimicrobials and belonging to phylogroup F were also observed.

Our PFGE analysis revealed a high genetic diversity among ESBL/AmpC-producing isolates, as already shown by other studies [60, 61]. This could suggest that dissemination of ESBL/AmpC genes occurs via plasmids rather than by clones. However, some closely related isolates were observed, as for the PFGE group 18 in cluster XIII, which included three *bla<sub>CTX-M</sub>*-producing isolates belonging to phylogroup B1 and serogroup O109 and originating from two farms located in different two regions. This could suggest a single

source of contamination or spread between farms. A common source of contamination could be hatcheries that supply farms with day-old chicks, whereas spread between farms could be linked to movement of workers between farms. In fact, the proximity of poultry farms to human settlements in Vietnam has already constituted a major threat to the transmission of zoonotic diseases [62].

The AMR transfer experiments clearly demonstrated the potential role of plasmids in the spreading of AMR within and between farms. The *bla<sub>CMY-2</sub>* gene was carried by the A/C and I1 plasmids whereas the *bla<sub>CTX-M</sub>* genes were located on the I1, FIB, R and HI1. This is the first study identifying plasmids carrying ESBL/AmpC genes in *E. coli* isolated from fecal chicken samples in Vietnam. Our studies of *E. coli* isolates from fecal samples in healthy chickens from Senegal and Quebec (unpublished data) also demonstrated the location of both *bla<sub>CMY-2</sub>* and *bla<sub>CTX-M</sub>* on I1, although A/C, R and HI1 plasmids carrying these genes were not observed in our studio in Senegal or Quebec, which could be partly due to a different geographical distribution of some plasmids. Some plasmids carrying the ESBL/AmpC genes co-transferred resistance to other antimicrobials and it is possible that this co-localization may have contributed to the high prevalence of AMR through co-selection following the use of these antimicrobials. Moreover, certain plasmids carrying the same beta-lactamase gene were identified in isolates genetically very heterogeneous and originating from different farms, suggesting the spread of these plasmids between farms. I1, carrying either *bla<sub>CTX-M</sub>* or *bla<sub>CMY-2</sub>*, was most frequently observed in unrelated isolates, supporting this hypothesis as it is one of the plasmid families capable of successfully spreading on a large-scale [63, 64].

In conclusion, *E. coli* isolated from healthy chicken farms in Vietnam were highly MDR and expressed resistance against critically important antimicrobials in humans such as 3GC and ciprofloxacin. Ciprofloxacin resistance was mainly due to mutations in the *gyrA* and *parC* genes whereas 3GC-resistance was mediated by replicon plasmids bearing *bla<sub>CTX-M</sub>*/*bla<sub>CMY-2</sub>*. The results demonstrated the potential role of plasmids in the spreading of AMR within and between farms. In addition, some ESBL/AmpC-producing isolates possessed virulence gene profiles which could allow them to cause infections in humans. The results of this study suggest that chickens in Vietnam could be a source of human contamination by C3G-resistant ExPEC and that this resistance could be disseminated by plasmids and/or clones.

## **Abbreviations**

OIE: World Animal Health Organisation

EcL: OIE reference laboratory for *E. coli*

3GC: third-generation cephalosporins

AMR: Antimicrobial resistance

MDR: Multidrug resistance

QRDR: Quinolone-resistance determining region

APEC: Avian pathogenic *E. coli*

ExPEC: Extraintestinal pathogenic *E. coli*

PFGE: Pulsed Field Gel Electrophoresis

UPGMA: Unweighted pair group method with arithmetic mean

ESBL: Extended-spectrum beta-lactamases

AmpC: Cephamycinase

XDR: Extensively drug resistance

CI: Confidence interval

WHO: World Health Organization.

## **Acknowledgments**

We thank Thu Minh Pham for providing the samples from chickens. We also thank Dr. Ghyslaine Vanier and Mr. Gabriel Desmarais (OIE reference laboratory for *E. coli*, Université de Montreal, Canada) for their excellent technical assistance.

## **Funding**

This work was supported in part by a grant from

- Fonds de Recherche du Quebec - Nature et Technologies [CRIP Regroupements stratégiques 111946], which financially supports the Centre de recherche en infectiologie porcine et aviaire (CRIPA) of the Université de Montréal,
- Groupe de Recherche en Zoonoses et Santé Publique (GREZOSP) of the Université de Montréal.

### **Availability of data and materials**

All relevant data supporting the conclusions of this study are presented within the article.

### **Authors' contributions**

All authors contributed to this work. PV carried out all laboratory analyses, JA and PV carried out statistical analyses, PV, JA, JMF and RBA prepared the manuscript. All authors have read and approved the final manuscript.

### **Ethics approval and consent to participate**

Not applicable

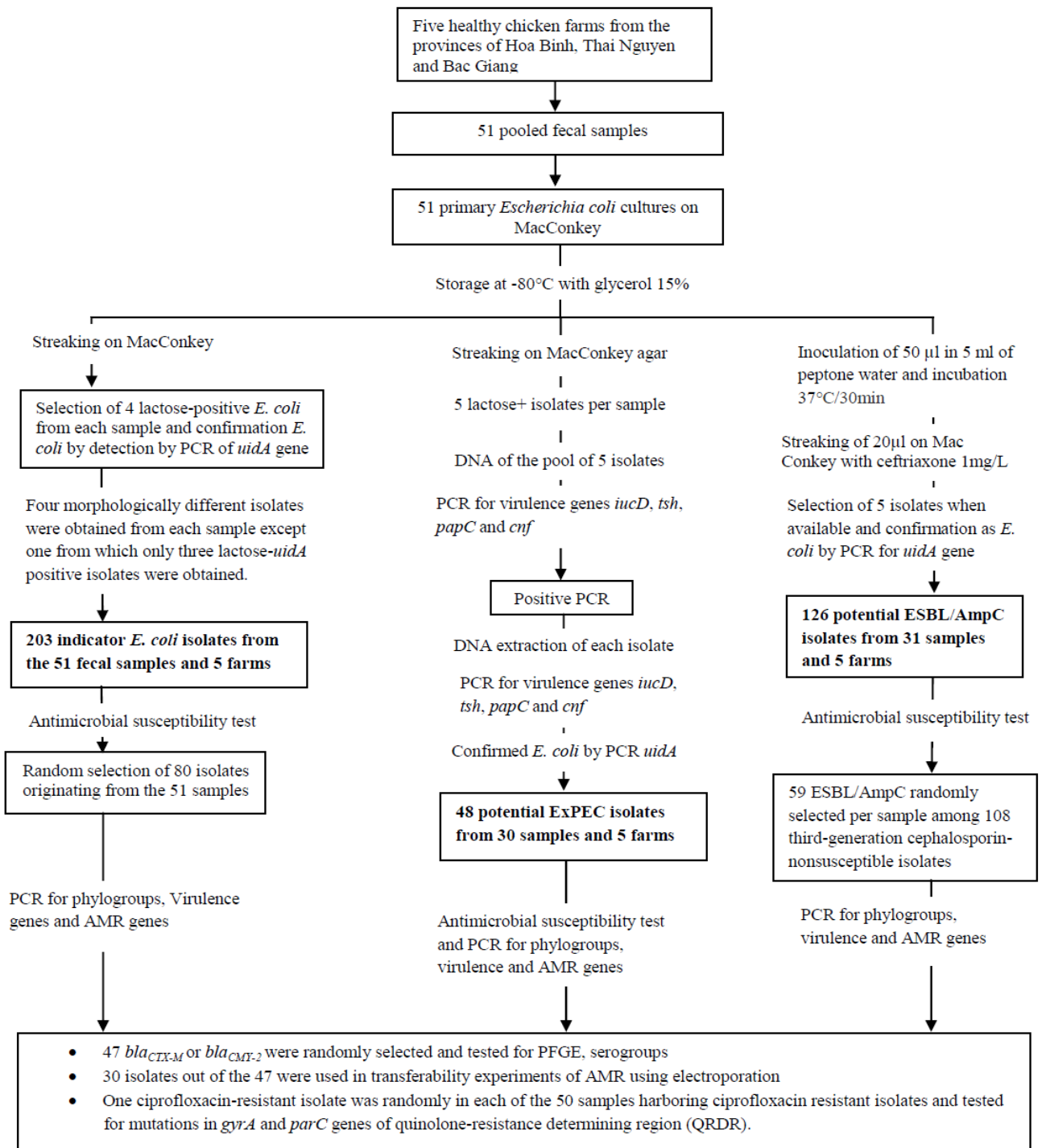
### **Consent for publication**

Not applicable.

### **Competing interests**

JMF is co-founder of Prevtect Microbia Inc. (Saint-Hyacinthe, QC, Canada).

All other authors: No competing financial interests exist.



Supplementary Figure 1. Methodological approach used in this study.



## References

1. Erb A, Stürmer T, Marre R, Brenner H. Prevalence of antibiotic resistance in *Escherichia coli*: overview of geographical, temporal, and methodological variations. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2007; 26: 83-90.
2. WHO, *Antimicrobial Resistance: Global report on Surveillance*. <http://www.who.int/drugresistance/documents/surveillancereport/en/>. Accessed 05 June 2018.
3. Geser N, Stephan R, Hächler H. Occurrence and characteristics of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL) producing *Enterobacteriaceae* in food producing animals, minced meat and raw milk. *BMC Vet Res*. 2012; 8: 21. doi: 10.1186/1746-6148-8-21.
4. Woodford N, Ward ME, Kaufmann ME, Turton J, Fagan EJ, James D, Johnson AP, Pike R, Warner M, Cheasty T, Pearson A, Harry S, Leach JB, Loughrey A, Lowes JA, Warren RE, Livermore DM. Community and hospital spread of *Escherichia coli* producing CTX-M extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in the UK. *J Antimicrob Chemother*. 2004; 54: p. 735-743.
5. Brinas L, Moreno MA, Zarazaga M, Porrero C, Sáenz Y, García M, Dominguez L, Torres C. Detection of CMY-2, CTX-M-14, and SHV-12  $\beta$ -lactamases in *Escherichia coli* fecal-sample isolates from healthy chickens. *Antimicrob Agents chemother*. 2003; 47: 2056-2058.
6. Randall L, Clouting C, Horton RA, Coldham NG, Wu G, Clifton-Hadley FA, Davies RH, Teale CJ. Prevalence of *Escherichia coli* carrying extended-spectrum  $\beta$ -lactamases (CTX-M and TEM-52) from broiler chickens and turkeys in Great Britain between 2006 and 2009. *J Antimicrob Chemother*. 2010; 66:86-95.
7. Kuo, H-C, Chou C-C, Tu C, Gong S-R, Han C-L, Liao J-W, Chang S-K. Characterization of plasmid-mediated quinolone resistance by the *qnrS* gene in *Escherichia coli* isolated from healthy chickens and pigs. *Vet Med*. 2009; 54: 473-482.

8. Laube H, Friese A, von Salviati C, Guerra B, Käsbohrer A, Kreienbrock L, Roesler U. Longitudinal monitoring of extended-spectrum-beta-lactamase/AmpC-producing *Escherichia coli* at German broiler chicken fattening farms. *Appl Environ Microbiol.* 2013; 79: 4815-4820.
9. Costa D, Vinue L, Poeta P, Coelho AC, Matos M, Saenz Y, Somalo S, Zarazaga M, Rodrigues J Torres C. Prevalence of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* isolates in faecal samples of broilers. *Vet Microbiol.* 2009; 138: 339-344.
10. Bevan ER, Jones AM, Hawkey PM. Global epidemiology of CTX-M  $\beta$ -lactamases: temporal and geographical shifts in genotype. *J Antimicrob Chemother.* 2017; 72: 2145-2155.
11. Bortolaia V, Larsen J, Damborg P, Guardabassi L. Potential pathogenicity and host range of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* isolates from healthy poultry. *Appl Environ Microbiol.* 2011; 77: 5830-5833.
12. Stacy AK, Mitchell NM, Maddux JT, De la Cruz MA, Duran L, Giron JA, Curtuss R 3rd, Mellata M. Evaluation of the prevalence and production of *Escherichia coli* common pilus among avian pathogenic *E. coli* and its role in virulence. *PLoS One.* 2014; 9: p. e86565. [10.1371/journal.pone.0086565](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0086565).
13. Stromberg ZR, Johnson JR, Fairbrother JM, Kilbourne J, Van Goor A, Curtiss 3rd R, Mellata M. Evaluation of *Escherichia coli* isolates from healthy chickens to determine their potential risk to poultry and human health. *PloS one.* 2017; 12: e0180599. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0180599>.
14. Bergeron CR, Prussing C, Boerlin P, Daignault D, 540 Dutil L, Reid-Smith J, Zhanel GG, Manges AR. Chicken as reservoir for extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* in humans, Canada. *Emerg Infect Dis.* 2012;. 18: 415. DOI: <http://dx.doi.org/10.3201/eid1803.111099>.

15. Carrique- Mas JJ, Trung NV, Hoa NT, Mai HH, Thanh TH, Campbell J, Wagenaar JA, Hardon A, Hieu TQ, Schultsz C. Antimicrobial usage in chicken production in the Mekong Delta of Vietnam. *Zoonoses Pub Health*. 2015; 62: 70-78.
16. Van Cuong N, Nhung NT, Nghia NH, Mai Hoa NT, Trung NV, Thwaites G, Carrique- Mas J. Antimicrobial consumption in medicated feeds in vietnamese pig and poultry production. *EcoHealth*. 2016; 13: 490-498.
17. Nhung NT, Cuong NV, Thwaites G, Carrique- Mas J. Antimicrobial Usage and Antimicrobial Resistance in Animal Production in Southeast Asia: A Review. *Antibiotics*. 2016; 5: 37.
18. Usui M, Ozawa S, Onozato H, Kuge R, Obata Y, Uemae T, Ngoc PT, Heriyanto A, Chalemchaikit T, Makita K, Muramatsu Y, Tamura Y. Antimicrobial susceptibility of indicator bacteria isolated from chickens in Southeast Asian countries (Vietnam, Indonesia and Thailand). *Vet Med Sci*. 2014; 76: 685-692.
19. Nhung N, Cuong NV, Campbell J, Hoa NT, Bryant JE, Truc VN, Kiet BT, Trung NV, Hien VB, Thwaites G, Baker S, Carrique-Mas J. High levels of antimicrobial resistance among *Escherichia coli* isolates from livestock farms and synanthropic rats and shrews in the Mekong Delta of Vietnam. *Appl Environ Microbiol*. 2015; 81: 812-820.
20. Agersø, Y, Aarestrup FM, Pedersen K, Seyfarth AM, Struve T, Hasman H. Prevalence of extended-spectrum cephalosporinase (ESC)-producing *Escherichia coli* in Danish slaughter pigs and retail meat identified by selective enrichment and association with cephalosporin usage. *J Antimicrob. Chemother*. 2012; 67: 582-588.
21. CLSI [Clinical and Laboratory Standards Institute]. Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals. 5th Ed. CLSI standard VET01. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute. 2018.

22. CLSI [Clinical and Laboratory Standards Institute]. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 26th Ed. CLSI supplement M100S. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute. 2016.
23. CLSI [Clinical and Laboratory Standards Institute]. Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals. 3rd Ed. CLSI supplement VET01S. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute. 2015.
24. Vounba P, Kane Y, Ndiaye C, Arsenault J, Fairbrother JM, Bada Alambédji R. Molecular Characterization of *Escherichia coli* Isolated from Chickens with Colibacillosis in Senegal. *Foodborne Pathog Dis.* 2018; 15: 517-525.
25. Borgogna TR, Borgogna JL, Mielke JA, Brown CJ, Top EM, Botts RT, Cummings DE. High diversity of CTX-M extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in municipal wastewater and urban wetlands. *Microb Drug Resist.* 2016; 22: 312-320.
26. Paauw A, Fluit AC, Verhoef J, Leverstein-van Hall MA. *Enterobacter cloacae* outbreak and emergence of quinolone resistance gene in Dutch hospital. *Emerg Infect Dis.* 2006; 12: 807-812.
27. Everett MJ, Jin YF, Ricci V, Piddock LJ. Contributions of individual mechanisms to fluoroquinolone resistance in 36 *Escherichia coli* strains isolated from humans and animals. *Antimicrob Agents Chemother.* 1996; 40: 2380-2386.
28. Johnson TJ, Wannemuehler Y, Doetkott C, Johnson SJ, Rosenberger SC, Nolan LK. Identification of minimal predictors of avian pathogenic *Escherichia coli* virulence for use as a rapid diagnostic tool. *J Clin Microbiol.* 2008; 46: 3987-3996.
29. Johnson JR, Kuskowski MA, Owens K, Gajewski A, Winokur PL. Phylogenetic origin and virulence genotype in relation to resistance to fluoroquinolones and/or extended-spectrum cephalosporins and cephamycins among *Escherichia coli* isolates from animals and humans. *J Infect Dis.*, 2003; 188: 759-768.

30. Clermont O, Bonacorsi S, Bingen E. Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. *Appl Environ Microbiol.* 2000; 66: 4555-4558.
31. Clermont O, Christensen JK, Denamur E, Gordon DM. The Clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: improvement of specificity and detection of new phylo-groups. *Environ Microbiol Rep.* 2013; 5: 58 -65.
32. Orskov I, Orskov F, Jann B, Jann K. Serology, chemistry, and genetics of O and K antigens of *Escherichia coli*. *Bacteriol Rev.* 1977; 41: 667-710.
33. *Escherichia coli* serotyping. <http://www.ecl-lab.com/en/products/serotyping.asp>. Accessed 05 June 2018.
34. Ribot EM, Fair MA, Gautom R, Cameron DN, Hunter SB, Swaminathan B, Barrett TJ. Standardization of pulsed-field gel electrophoresis protocols for the subtyping of *Escherichia coli* O157: H7, *Salmonella*, and *Shigella* for PulseNet. *Foodborne Pathog Dis.* 2006; 3: 59-67.
35. Barbieri, NL, de Oliveira AL, Tejkowski TM, Pavanelo DB, Matter LB, Pinheiro SR, Vaz TM, Nolan LK, Logue CM, de Brito BG, Horn F. Molecular characterization and clonal relationships among *Escherichia coli* strains isolated from broiler chickens with colisepticemia. *Foodborne Pathog Dis.* 2015; 12: 74-83.
36. McLellan SL, Daniels AD, Salmore AK. Genetic characterization of *Escherichia coli* populations from host sources of fecal pollution by using DNA fingerprinting. *Appl Environ Microbiol.* 2003; 69: 2587-2594.
37. Johnson TJ, Wannemuehler YM, Johnson SJ, Logue CM, White DG, Doetkott C, Nolan LK. Plasmid replicon typing of commensal and pathogenic *Escherichia coli* isolates. *Appl Environ Microbiol.* 2007; 73: 1976-1983.
38. Mnif B, Harhour H, Jdidi J, Mahjoubi F, Genel N, Arlet G, Hammami A. Molecular epidemiology of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in Tunisia and characterization of their virulence factors and plasmid addiction systems. *BMC Microbiol.* 2013; 13: 147. doi: [10.1186/1471-2180-13-147].

39. Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG, Harbarth S, Hindler JF, Kahlmeter G, Olsson-Liljequist B, Paterson DL, Rice LB, Stelling J, Struelens MJ, Vatopoulos A, Weber JT, Monnet DL. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect.* 2012; 18: 268-281.
40. Sweeney MT, Lubbers BV, Schwarz S, Watts JL. Applying definitions for multidrug resistance, extensive drug resistance and pandrug resistance to clinically significant livestock and companion animal bacterial pathogens. *J Antimicrob Chemother.* 2018; 73: 1460-1463.
41. EFSA [European Food Safety Authority] and ECDC [European Centre for Disease Prevention and Control]. The European Union summary report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2016. *EFSA Journal.* 2018; 16: 5182. doi:10.2903/j.efsa.2018.5182.
42. Johnson JR, Murray AC, Gajewski A, Sullivan M, Snippes P, Kuskowski MA, Smith KE. Isolation and molecular characterization of nalidixic acid-resistant extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* from retail chicken products. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003; 47: 2161-2168.
43. Nguyen DP, Nguyen TA, Le TH, Tran NM, Ngo TP, Dang VC, Kawai T, Kamki T, Kawahara R, Jinnai M, Yonogi S, Hirai Y, Yamamoto Y, Kumeda Y. Dissemination of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-and AmpC  $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* within the food distribution system of Ho Chi Minh City, Vietnam. *BioMed Res Int.* 2016; 2016:8182096. doi: 10.1155/2016/8182096.
44. Nguyen VT, Carrique-Mas JJ, Ngo TH, Ho HM, Ha TT, Campbell JI, Nguyen TN, Hoang NN, Pham VM, Wagenaar JA, Hardon A, Thai QH, Schultsz C. Prevalence and risk factors for carriage of antimicrobial-resistant *Escherichia coli* on household and small-scale chicken farms in the Mekong Delta of Vietnam. *J Antimicrob Chemother.* 2015. 70: 2144-2152.

45. Agersø Y, Jensen JD, Hasman H, Pedersen K. Spread of extended spectrum cephalosporinase-producing *Escherichia coli* clones and plasmids from parent animals to broilers and to broiler meat in a production without use of cephalosporins. *Foodborne Pathog Dis.* 2014; 11: 740-746.
46. Ferreira JC, Penha Filho RAC, Andrade LN, Berchieri Junior A, Darini ALC. Diversity of plasmids harboring bla<sub>CMY-2</sub> in multidrug-resistant *Escherichia coli* isolated from poultry in Brazil. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2017. 88: 361-364.
47. Bengtsson, B., Swedish veterinary antimicrobial resistance monitoring (SVARM) 2008. *Svensk Veterinärtidning.* 2009; 61: 17-19.
48. Baron S, Jouy E, Larvor E, Eono F, Bougeard S, Kempf I. Impact of third-generation cephalosporin administration in hatcheries on fecal *E. coli* antimicrobial resistance in broilers and layers. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014; 58:5428-5434.
49. Bui TKN, Bui TMH, Ueda S, Le DT, Yamamoto Y, Hirai I. Potential Transmission Opportunity of CTX-M-producing *Escherichia coli* in Large-scale Chicken Farm in Vietnam. *J Glob Antimicrob Resist.* 2017; 13:1-6.
50. Li Y, Chen L, Wu X, Huo S. Molecular characterization of multidrug-resistant avian pathogenic *Escherichia coli* isolated from septicemic broilers. *Poult Sci.* 2015; 94: 601-611.
51. Cortés P, Blanc V, Mora A, Dahbi 639 G, Blanco JE, Blanco M, Lopez C, Andreu A, Navarro F, Alonso MP, Bou G, Blanco J, Llagostera M. Isolation and characterization of potentially pathogenic antimicrobial-resistant *Escherichia coli* strains from chicken and pig farms in Spain. *Appl Environ Microbiol.* 2010; 76: 2799-2805.
52. Yin J, Cheng J, Sun Z, Ye Y, Gao YF, Li JB, Zhang XJ. Characterization of two plasmid-encoded cefotaximases found in clinical *Escherichia coli* isolates: CTX-M-65 and a novel enzyme, CTX-M-87. *J Med Microbiol.* 2009; 58: 811-815.
53. Biedenbach DJ, Bouchillon SK, Hoban DJ, Hackel M, Phuong DM, Nga TT, Phuong NT, Phuong TT, Badal RE. Antimicrobial susceptibility and extended-spectrum beta-

- lactamase rates in aerobic gram-negative bacteria causing intra-abdominal infections in Vietnam: report from the Study for Monitoring Antimicrobial Resistance Trends (SMART 2009–2011). *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2014; 79: 463-467.
54. Fu Y, Zhang W, Wang H, Zhao S, Chen Y, Meng F, Zhang Y, Xu H, Chen X, Zhang F. Specific patterns of *gyr A* mutations determine the resistance difference to ciprofloxacin and levofloxacin in *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*. *BMC Infect Dis.* 2013; 13: 8. doi: 10.1186/1471-2334-13-8.
55. McDonald LC, Chen FJ, Lo HJ, Yin HC, Lu PL, Huang CH, Chen P, Lauderdale TL, Ho M. Emergence of Reduced Susceptibility and Resistance to Fluoroquinolones in *Escherichia coli* in Taiwan and Contributions of Distinct Selective Pressures. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001; 45: 3084-3091.
56. Vanni M, Meucci V, Tognetti R, Cagnardi P, Montesissa C, Piccirillo A, Rossi AM, Di Bello D, Intorre L. Fluoroquinolone resistance and molecular characterization of *gyrA* and *parC* quinolone resistance-determining regions in *Escherichia coli* isolated from poultry. *Poult Sci.* 2014; 93: 856-863.
57. Fuzi M, Szabo D, Cserecsik R. Double-Serine Fluoroquinolone Resistance Mutations Advance Major International Clones and Lineages of Various Multi-Drug Resistant Bacteria. *Front Microbiol* 2017; 8: 2261. doi: [10.3389/fmicb.2017.02261].
58. Le QP, Ueda S, Nguyen TN, Dao TV, Van Hoang TA, Tran TT, Hirai I, Nakayama T, Kawahara R, Do TH, Vien QM, Yamamoto Y. Characteristics of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* in retail meats and shrimp at a local market in Vietnam. *Foodborne Pathog Dis.* 2015; 12: 719-725.
59. Vangchhia B, Abraham S, Bell JM, Collingnon P, Gison JS, Ingram PR, Johnson JR, Kennedy K, Trott DJ, Turnidge JD, Gordon DM. Phylogenetic diversity, antimicrobial susceptibility and virulence characteristics of phylogroup F *Escherichia coli* in Australia. *Microbiol.* 2016; 162: 1904-1912.



60. Randall LP, Clouting C, Horton RA, Coldham NG, Wu G, Clifton-Hadley FA, Davies RH, Teale CJ. Prevalence of *Escherichia coli* carrying extended-spectrum  $\beta$ -lactamases (CTX-M and TEM-52) from broiler chickens and turkeys in Great Britain between 2006 and 2009. *J Antimicrob Chemother.* 2010; 66: 86-95.
61. Girlich D, Poirel L, Carattoli A, Kempf I, Lartigue MF, Bertini A, Nordmann P. Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase CTX-M-1 in *Escherichia coli* isolates from healthy poultry in France. *Appl Environ Microbiol.* 2007; 73: 4681-4685.
62. Burgos S, Hong Hanh PT, Roland-Holst D, Burgos SA. Characterization of poultry production systems in Vietnam. *Int J Poult Sci.* 2007; 6: 709-712.
63. Carattoli A. Plasmids in Gram negatives: molecular typing of resistance plasmids. *Int J Med Microbiol* 2011; 301: 654-658.
64. Carattoli A. Resistance plasmid families in *Enterobacteriaceae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009; 53: 2227-2238.
65. WHO [World Health Organization]. Critically important antimicrobials for human medicine – 5th rev. Geneva: World Health Organization 2017(Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.).

## Article 5.

---

Révisé et resoumis le 5 avril 2019 à *Journal of Global Antimicrobial resistance*.

### **Prevalence of colistin resistance and *mcr-1/mcr-2* genes in ESBL/AmpC-producing *E. coli* isolated from chickens in Canada (Quebec), Senegal and Vietnam.**

Passoret Vounba<sup>a1</sup>, Mohamed Rhouma<sup>a1\*</sup>, Julie Arsenault<sup>a</sup>, Rianatou Bada Alambédji<sup>a,b</sup>,  
Philippe Fravallo<sup>a</sup>, John Morris Fairbrother<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Department of Pathology and Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, Université de Montréal, 3200 Sicotte St., Saint-Hyacinthe, QC J2S 2M2, Canada.

<sup>b</sup>Ecole Inter-Etats des Sciences et Médecine Vétérinaires de Dakar, Dakar, Sénégal

<sup>1</sup>; These authors contributed equally to this work.

**Running title:** Colistin resistance in chickens of different origin

**Keywords:** Chickens, Colistin, *E. coli*, ESBL, *mcr*, Prevalence

## Highlights

- No *E. coli* from Quebec poultry farms were colistin-resistant or possessed *mcr (1-2)*
- *E. coli* from Senegal poultry farms were colistin-resistant but *mcr (1-2)* negative
- New mutations in the PmrAB of colistin resistant *E. coli* were detected
- *E. coli* from Vietnam poultry farms were colistin-resistant and *mcr-1* positive
- Colistin resistant *E. coli* were highly multidrug resistant and possessed ESBL/AmpC genes

## Abstract

*Objectives:* This study investigated the prevalence of *E. coli* colistin resistance and *mcr-1* and *mcr-2* genes among ESBL/AmpC-producer *E. coli* isolates recovered from chicken feces in Canada (Quebec), Senegal and Vietnam, and evaluated the susceptibility pattern of the colistin-resistant *E. coli* isolates to other clinically relevant antimicrobials.

*Methods:* A total of 327 potential ESBL/AmpC-producing *E. coli* isolates from chicken farms in Canada (Quebec), Senegal and Vietnam, were analysed for colistin susceptibility and for the presence of the *mcr (1-2)* genes. The *pmrA* and *pmrB* genes of colistin resistant *E. coli* isolates, in absence of *mcr (1-2)* genes were sequenced. Antimicrobial resistance phenotypes of colistin-resistant *E. coli* isolates were determined by disk diffusion.

*Results:* None of the 108 potential ESBL/AmpC-producing *E. coli* isolates from 7 farms in Canada were colistin-resistant or possessed *mcr-1* or *mcr-2*. A low prevalence of 2.2 % of colistin resistance was observed in 93 Senegalese isolates from the 15 sampled farms although neither *mcr-1* nor *mcr-2* was found. A prevalence of 8.7% of colistin resistance was observed among 126 Vietnamese isolates from 2 of the 4 sampled farms. The *mcr-1* gene was detected in 85% of the 13 phenotypically colistin resistant isolates. Moreover, all colistin resistant isolates presented a multidrug resistant phenotype.

*Conclusions:* The co-existence of the *mcr-1* and ESBL/AmpC genes and the very high level of multiple drug resistance in all colistin resistant *E. coli* isolates obtained from sampled chicken farms in Vietnam is a major concern.

## 1. Introduction

The poultry industry is one of the most important animal food industries worldwide, with affordable selling prices, high quality protein and relatively low fat content in the meat [1]. Despite the progress that has been made in the control of bacterial diseases in poultry during the last decade, avian colibacillosis, caused by avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC), remains a major cause of economic losses in this sector worldwide [2]. Colistin, also known as polymyxin E, is a cationic polypeptide antibiotic widely used for the prevention and the treatment of avian colibacillosis [3, 4]. This antimicrobial is approved for use in poultry in most countries throughout the world, excluding North America (Canada and USA) [3, 5]. The association between colistin use in food animals and the risk of colistin resistance in commensal bacteria has been described in several countries in Europe as well as in Vietnam [6, 7]. Resistance to colistin in Gram-negative bacteria (GNB) can occur either through mutations in genes encoding for the two component systems; PhoP–PhoQ (PhoPQ) and PmrA–PmrB (PmrAB) or through plasmid-mediated horizontal gene transfer (*mcr* genes) [4]. Both mechanisms lead to a modification in lipopolysaccharide (LPS) molecules by decreasing the net negative charge of its phosphate residues, and consequently reducing the electrostatic interaction between LPS and colistin positive charges [8]. In *E. coli*, mutation in the PmrAB two-component system was identified as the main chromosomal target associated with resistance to colistin and polymyxin B [9].

Since the first identification in 2015 of a plasmid harboured *mcr-1* gene encoding for colistin resistance in *Enterobacteriaceae*, some authors have suggested that farm animals are mainly responsible for the global dissemination of plasmids carrying *mcr* genes [10, 11]. The *mcr-1* gene has been detected in both retail chicken meat and poultry feces on several continents (Africa, Asia, Europe and South America) [10, 12-14].

In Canada, although colistin is not approved in veterinary medicine, it is sometimes used in food animals, as a last resort antimicrobial, for the oral treatment of digestive infections caused by GNB [15]. Colistin use remains under veterinarian responsibility regarding justification, dose and setting of the withdrawal period [8]. On the other hand, in Senegal, colistin is approved for use in animal production and is widely used in chickens, for either

therapeutic, prophylactic or growth promotion purposes [16]. To the best of our knowledge, no study has been conducted in poultry to estimate the prevalence of *E. coli* colistin resistance or *mcr* genes in either Canada or Senegal. Interestingly, *mcr-1* gene has been identified in *E. coli* isolated from humans [17, 18], as well as from lean ground beef in Canada [17]. In Vietnam, colistin is approved in veterinary medicine and widely used in poultry farms, mostly for disease prevention and to improve growth performance [19, 20], and *mcr-1*-producing *E. coli* has been isolated with high prevalence in poultry [7, 21].

Several studies have reported a co-existence of *mcr* genes and extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL) genes in the same bacterial strains in poultry meat, clinical isolates from sick birds, and fecal samples from healthy birds in Denmark and China [22, 23]. A recent study has suggested an increasing trend of co-existence and transmission of ESBL and *mcr-1* genes in both human and veterinary medicine [23]. ESBL/AmpC-producing *E. coli* have been frequently reported in poultry, and therefore this animal production was suggested as a reservoir of these resistant bacteria, posing a potential threat to human health [24]. Similarly, we have demonstrated a high prevalence of farms carrying third-generation cephalosporin (3GC)-resistant fecal *E. coli* isolates in Senegal, Quebec and Vietnam (unpublished data).. 3GC-resistance is a major issue as these antimicrobials are critically important in animal and human health. This study aimed to 1) investigate prevalence of colistin resistance, and of *mcr-1* and *mcr-2* genes among fecal potential ESBL/AmpC-producer *E. coli* isolated in our previous studies in 2011-2012 from healthy chicken farms located in Canada (Quebec), Senegal and Vietnam, and 2) to evaluate the susceptibility patterns to 14 clinically relevant antimicrobials in the colistin-resistant isolates.

## **2. Material and methods**

### **2.1 Isolate collections**

This project was conducted using chicken *E. coli* isolates from Quebec (Canada), Senegal and Vietnam collected as part of the activities of the OIE Reference Laboratory for *Escherichia coli* (EcL Laboratory) at the Université de Montréal. In Canada, fecal samples (n=35) were originally collected, as part of a previous study [25], from 12 clinically healthy broiler farms practicing thinning (i.e. partial depopulation), from June 2011 to February 2012 in the region

of Saint-Hyacinthe, Quebec. Each farm housed 20,000 to 30,000 birds aged between 35 and 40 days. Each sample consisted of a pool of 5 fecal samples taken from different places in the broiler house. Samples were then sent to the EcL Laboratory for *E. coli* isolation and identification. Samples were stored in glycerol at -80°C, at the EcL laboratory, before processing. A quantity of 10 g of each thawed sample was incubated in a filter bag with 90 ml of buffered peptone water for 12h at 37°C, to allow bacterial growth. The filtrate was streaked on MacConkey agar, and incubated at 37°C overnight to obtain primary cultures (initial *E. coli* culture obtained from fecal samples). Each primary culture was suspended in 15% glycerol and stored at -80°C before further analyses. In Senegal, fecal samples (n=50) were collected from clinically healthy birds in 32 chicken farms randomly selected in the Dakar region, between May and July 2011, using the same sampling approach described above for Canadian farms. These samples were transported in a cooler at 4°C to the microbiology laboratory of the École Inter-États des Sciences et Médecine Vétérinaires (EISMV) of Dakar. At the EISMV, each pooled fecal sample was homogenised 1/10 (weight/volume) in buffered peptone water, using a sterile filter sample bag (Whirl-pak®). The filtrate was streaked on MacConkey plates and incubated overnight at 37°C, to obtain primary cultures. All primary cultures were kept at 4°C until their shipping to the EcL Laboratory and then handled as described above. In Vietnam, fecal samples (n=51) were taken from five healthy chicken farms, chosen by convenience, and located in the provinces of Hoa Binh, Thai Nguyen, and Bac Giang in the north east of Vietnam. The fecal sampling was conducted between July and September 2011. From each farm, fecal swabs were randomly collected from five points on each pen floor using sterile cotton swabs, and then pooled to constitute one sample per farm. All samples were transported to the National Veterinary Institute in Hanoi, Vietnam. After enriching in peptone water at 37°C, overnight, samples were cultured on MacConkey agar, and incubated at 37°C, overnight. All primary cultures were kept at 4°C until shipping to the EcL laboratory in Canada and then handled as described above.

## **2.2 Selection of potential ESBL/AmpC- producing isolates**

Potential ESBL/AmpC-producing *E. coli* isolates were obtained using the method developed by Agersø *et al.* [26] with some minor modifications. Briefly, 50 µL of the primary cultures, following storage at -80°C, was added to 5 mL of peptone water, and after 30 minutes of

incubation at 37 °C, 20 µL of this broth was streaked on MacConkey agar supplemented with 1 mg/L ceftriaxone, and incubated overnight aerobically at 37°C. Isolates demonstrating growth on this culture medium were considered as potential ESBL/AmpC- producers. The potential ESBL/AmpC isolates were obtained from 15, 4 and 7 farms in Senegal, Vietnam and Canada (Quebec), respectively. Five morphologically different isolates lactose-positive on MacConkey agar supplemented with ceftriaxone, when available, were confirmed as *E. coli* by colony morphology, biochemical analysis as well as by the presence of the β-glucuronidase (*uidA*) housekeeping gene, as previously described [27].

### **2.3 Colistin susceptibility testing**

All potential ESBL/AmpC-producing *E. coli* isolates were inoculated on Mueller Hinton agar supplemented with 2 mg/L colistin. Isolates recovered from this medium were considered as potential colistin-resistant bacteria, as previously described [27]. The Minimum inhibitory concentrations (MICs) of colistin were determined only for potential colistin-resistant isolates using the broth microdilution method in duplicate according to the guidelines of the Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) as previously described [15, 27]. Phenotypically, *E. coli* isolates with colistin MICs > 2 mg/L were defined as resistant (R), and those with colistin MICs ≤ 2 mg/L as susceptible (S) according to the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) guidelines ([http://www.eucast.org/clinical\\_breakpoints/](http://www.eucast.org/clinical_breakpoints/)).

### **2.4 DNA extraction and molecular detection of *mcr (1-2)* genes**

Bacterial DNA extraction was performed by heat lysis as previously described [28]. All potential ESBL/AmpC-producing *E. coli* isolates, resistant or not to colistin, were screened by PCR for the presence of the *mcr-1* and *mcr-2* genes, using primers and conditions previously described [29, 30]. DNA from *E. coli* strains harbouring either the *mcr-1* or *mcr-2* gene were used as positive control.

### **2.5 Sequencing of *pmrAB* genes**

The *pmrA* and *pmrB* genes of colistin resistant *E. coli* isolates, in absence of *mcr (1-2)* genes, were amplified by PCR, sequenced and polymorphisms were identified by comparison with



the reference sequences, AY725333.1 and KX652271.1 for PmrA and PmrB, respectively. These reference sequences are available in the National Center for Biotechnology Information (NCBI) database (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

The coding sequences of the *pmrA* and *pmrB* genes were amplified using primers designed in this study for *E. coli pmrA* [forward 5'-CAAACCTGCAGGAGAGTGAG-3' and reverse 5'-GCTGATCAGCTCAAACACCA-3'] and *E. coli pmrB* [forward 5'-GGCTTTGGCTATATGCTGGT-3' and reverse 5'-TTAACTACCGTGTTTCAGCGT-3']. PCR was performed using the following cycling conditions: 25 cycles of 94 °C × 30 s, 57.5 °C × 30 s, 72 °C × 60 s, and 25 cycles of 94 °C × 30 s, 57 °C × 30s, 72 °C × 75 s, for *pmrA* and *pmrB* genes, respectively. DNA fragments were excised then purified from gels using PureLink® PCR Purification Kit (Invitrogen, Canada). Sequencing of the PCR products, was conducted by an external service provider (McGill University and Génome Québec Innovation Centre, Canada), using the Sanger sequencing method. Sequence alignment was performed using Clustal Omega (European Molecular Biology Laboratory–European Bioinformatics Institute, Hinxton, United Kingdom).

## **2.6 Detection of ESBL/AmpC genes and antimicrobial susceptibility testing**

All colistin resistant *E. coli* isolates were tested for the presence of ESBL/AmpC genes as well as for their susceptibility to 14 clinically relevant antimicrobials belonging to 9 classes. These antimicrobials are included in the list of antimicrobials whose antimicrobial resistance is monitored by the Canadian Integrated Program for Antimicrobial Resistance Surveillance (CIPARS) [31]. The susceptibility of colistin-resistant *E. coli* isolates, to the selected antimicrobials, was examined using the disk diffusion (Kirby–Bauer) method, as previously described [32]. Isolates demonstrating intermediate susceptibility or resistance to three or more classes of antimicrobial agents, including colistin, were considered to be Multidrug resistant (MDR) and isolates demonstrating intermediate susceptibility or resistance to all but two classes of antimicrobial agents were considered to be extensively drug resistant (XDR) [33]. The colistin resistant isolates were screened by PCR for the presence of five beta-lactamase encoding genes (*bla<sub>CTX-M</sub>*, *bla<sub>TEM</sub>*, *bla<sub>OXA-1</sub>*, *bla<sub>SHV</sub>* and *bla<sub>CMY-2</sub>*) using previously described primers and conditions [34].

## **2.7 Statistical analysis**

Prevalence with 95% confidence intervals of colistin-resistant, *mcr-1* or *mcr-2* genes positive among potential ESBL/AmpC-producing isolates were estimated at the isolate and the farm level for each country. At the isolate level, estimates were adjusted for clustering of isolates within farms. For the estimation at the farm level, a farm was considered as positive when at least one positive isolate was detected in the pool sample, and exact confidence intervals were estimated. All analyses were conducted in SAS version 9.4, using the freq or surveyfreq procedures.

## **3. Results**

### **3.1 Prevalence of potential ESBL/AmpC-producing *E. coli* isolates**

A total of 327 potential ESBL/AmpC-producing *E. coli* isolates had been recovered from chicken fecal samples using MacConkey agar supplemented with 1 mg/L of ceftriaxone. These were considered as potential ESBL/AmpC producing *E. coli* isolates, until confirmation by subsequent molecular characterisation of the target ESBL/AmpC genes. The median number of potential ESBL/AmpC isolates per farm was 12 with a minimum of 3 and a maximum of 40 in Quebec; 5 with a minimum 1 and a maximum of 10 in Senegal, and 35 with a minimum of 2 and a maximum of 55 in Vietnam.

### **3.2 Prevalence of *E. coli* colistin resistance, and *mcr-1* and *mcr-2* genes among potential ESBL/AmpC-producer *E. coli* isolates**

From the 327 potential ESBL/AmpC producing *E. coli* isolates, 62 (19%) were identified as potential colistin resistant *E. coli*, using the Mueller Hinton agar supplemented with 2 mg/L of colistin (Table 1).

**Table 1.** Prevalence of colistin resistance and *mcr-1* gene among potential ESBL/AmpC-producing *Escherichia coli* isolates recovered from chicken feces in Canada (Quebec), Senegal and Vietnam.

Country	Number of isolates	Number of potential colistin resistant isolates	Resistance to colistin			Presence of <i>mcr-1</i> gene		
			Number of resistant isolates	Prevalence (%)		Number of <i>mcr-1</i> positive isolates	Prevalence (%)	
				Estimate	95% CI		Estimate	95% CI
Senegal	93	33	2	2.2	0.0 – 5.4	0	0.0	-
Canada (Quebec)	108	2	0	0.0	-	0	0.0	-
Vietnam	126	27	11	8.7	0.0 – 34.4	11	8.7	0.0 – 34.4

CI: Confidence interval.

Thirteen isolates (4%, 13/327) were confirmed resistant to colistin by determining the MIC (Table 1), comprising two (2.2%; 95% CI=0.0 – 5.4) of 93 Senegal-derived isolates, and 11 (8.7%; 95% CI=0.0 – 34.4) of 126 Vietnam-derived isolates. None of the 108 Canada-derived potential ESBL/AmpC-producing *E. coli* isolates from 7 sampled farms were found to be resistant to colistin (Table 1). At the farm level, colistin-resistant isolates were found in two of 2 of 15 sampled farms in Senegal and 2 of 4 sampled farms in Vietnam (Table 2).

The *mcr-1* gene was only detected in Vietnam, in 11 (85%) of the 13 colistin-resistance isolates found in this study, all derived from two farms (Table 1 and 2). The *mcr-2* gene was not detected.

**Table 2.** Prevalence of colistin resistance and *mcr-1* gene among potential ESBL/AmpC-producing *Escherichia coli* isolates in chicken farms in Canada (Quebec), Senegal and Vietnam.

Country	Number of farms	Number of farms with potential colistin resistant isolates	Resistance to colistin			Presence of <i>mcr-1</i> gene		
			Number of farms with resistant isolates	Prevalence (%)		Number of farms with <i>mcr-1</i> positive isolates	Prevalence (%)	
				Estimate	95% CI		Estimate	95% CI
Senegal	15	12	2	13.3	1.7 – 40.5	0	0.0	0.0 – 0.1
Canada (Quebec)	7	2	0	0.0	0.0 – 40.9	0	0.0	0.0 – 40.9
Vietnam	4	4	2	50.0	6.8 – 93.2	2	50.0	6.8 – 93.2

CI: Confidence interval

### **3.3 Molecular characterisation of colistin resistant *E. coli* isolates in absence of *mcr (1-2)* genes**

Sequencing of the *pmrA* and *pmrB* genes of the two colistin resistant isolates obtained from Senegalese farms demonstrated one polymorphism that produces a protein variant in PmrA (*S29G*), and two polymorphisms that produce protein variants in PmrB (*P94L* and *D283G*) (Table 4). In addition, these two isolates were *bla<sub>CTX-M</sub>* positive (Table 4).

### **3.4 Resistance phenotypes of colistin-resistance *E. coli* isolates**

Antimicrobial susceptibilities of the eleven (n=11) *mcr-1*-positive *E. coli* isolates derived from two chicken farms in Vietnam, and the two (n=2) colistin-resistant isolates derived from two chicken farms in Senegal, are shown in Tables 3 and 4. All these isolates were confirmed phenotypically colistin-resistant with an MIC  $\geq$  4 mg/L (Table 3 and 4). These isolates were confirmed also as ESBL/AmpC- producing *E. coli* by identifying the targeted genes using PCR (Tables 3 and 4). A co-existence of *mcr-1*, the targeted ESBL gene *bla<sub>CTX-M</sub>*, and *bla<sub>TEM</sub>* was identified in 10 isolates and of *mcr-1*, the targeted AmpC gene *bla<sub>CMY-2</sub>*, and *bla<sub>OXA-1</sub>* was identified in one isolate from sampled chicken farms in Vietnam (Table 3). Susceptibility testing to other antimicrobials in colistin-resistant ESBL-producing isolates in Vietnam revealed MDR against seven or eight classes of antimicrobial (MDR [7] or MDR [8]), whereas the AmpC-producing isolate was MDR [10] or possibly XDR, being non-susceptible to all tested classes of antimicrobials (Table 3). The two colistin resistant ESBL-producer isolates from Senegal were each positive to *bla<sub>CTX-M</sub>* gene and MDR [6] and MDR [7], respectively (Table 4).

**Table 3.** Antimicrobial susceptibility of *mcr-1*-positive *Escherichia coli* isolates from healthy chickens in Vietnam.

Sample-Isolate ID	Farm ID	ESBL genes*	AmpC genes	Antimicrobial resistance profile	Colistin MIC (mg/L)	Colistin-resistance gene	Multidrug resistance profile
ECL23357	01	<i>bla</i> <sub>TEM</sub> , <i>bla</i> <sub>CTX-M</sub>	-	KAN, STR, CRO, TIO, CIP, NAL, SSS, SXT, AMP, CHL, TET	4	<i>mcr-1</i>	MDR [8]
ECL23223	01	<i>bla</i> <sub>TEM</sub> , <i>bla</i> <sub>CTX-M</sub>	-	STR, CRO, TIO, NAL, SSS, SXT, AMP, CHL, TET	4	<i>mcr-1</i>	MDR [8]
ECL23358	01	<i>bla</i> <sub>TEM</sub> , <i>bla</i> <sub>CTX-M</sub>	-	STR, CRO, TIO, CIP, NAL, SSS, SXT, AMP, CHL, TET	4	<i>mcr-1</i>	MDR [8]
ECL23216	01	<i>bla</i> <sub>TEM</sub> , <i>bla</i> <sub>CTX-M</sub>	-	KAN, STR, CRO, TIO, CIP, NAL, SSS, SXT, AMP, TET	4	<i>mcr-1</i>	MDR [7]
ECL23359	01	<i>bla</i> <sub>TEM</sub> , <i>bla</i> <sub>CTX-M</sub>	-	CRO, TIO, CIP, NAL, SSS, SXT, AMP, CHL, TET	4	<i>mcr-1</i>	MDR [7]
ECL23360	01	<i>bla</i> <sub>TEM</sub> , <i>bla</i> <sub>CTX-M</sub>	-	CRO, TIO, CIP, NAL, SSS, SXT, AMP, CHL, TET	4	<i>mcr-1</i>	MDR [7]

ECL23361	01	<i>bla</i> <sub>TEM</sub> , <i>bla</i> <sub>CTX-M</sub>	-	KAN, <u>STR</u> , CRO, TIO, CIP, NAL, SSS, SXT, AMP, TET	4	<i>mcr-1</i>	MDR [7]
ECL23362	01	<i>bla</i> <sub>TEM</sub> , <i>bla</i> <sub>CTX-M</sub>	-	KAN, <u>STR</u> , CRO, TIO, CIP, NAL, SSS, SXT, AMP, TET	8	<i>mcr-1</i>	MDR [7]
ECL23363	01	<i>bla</i> <sub>TEM</sub> , <i>bla</i> <sub>CTX-M</sub>	-	KAN, CRO, TIO, CIP, NAL, SSS, SXT, AMP, TET	4	<i>mcr-1</i>	MDR [7]
ECL23364	05	<i>bla</i> <sub>TEM</sub> , <i>bla</i> <sub>CTX-M</sub>	-	GEN, KAN, <u>STR</u> , CRO, TIO, CIP, NAL, SSS, SXT, AMP, CHL, TET	4	<i>mcr-1</i>	MDR [8]
ECL23253	05	<i>bla</i> <sub>TEM</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA-1</sub>	<i>bla</i> <sub>CMY-2</sub>	GEN, KAN, STR, CRO, TIO, FOX, AMC, CIP, NAL, SSS, SXT, AMP, CHL, TET	4	<i>mcr-1</i>	MDR [10]  (Possible XDR)

\* : The *bla*<sub>TEM</sub> variants have not been determined and therefore we are not sure whether it is ESBL; Abbreviations of antimicrobials: ID, Identity ; GEN, Gentamicin; KAN, Kanamycin; STR, Streptomycin; CRO, Ceftriaxone; TIO, Ceftiofur; FOX, Cefoxitin; AMC, Amoxicillin-Clavulanic acid; CIP, Ciprofloxacin; NAL, Nalidixic acid; SSS, Sulfisoxazole; SXT, Trimethoprim-sulfamethoxazole; AMP, Ampicillin; CHL, Chloramphenicol; TET, Tetracycline. Antimicrobial with intermediate susceptibility is underlined. MDR [N],



Multidrug resistance expressed against N classes of antimicrobials; XDR, extensive drug resistance

**Table 4.** Antimicrobial phenotypes and molecular analysis of colistin resistant *Escherichia coli* isolates from healthy chickens in Senegal in absence of *mcr* (1-2) genes.

Isolates	Farm ID	Colistin MIC (mg/L)	ESBL gene	Antimicrobial resistance profile	PmrAB polymorphisms	Multidrug resistance profile
ECL23197	02	8	bla <sub>CTX-M</sub>	STR, CRO, TIO, NAL, SSS, SXT, AMP, TET	S29G (PmrA) P94L (PmrB)	MDR [7]
ECL23181	07	16	bla <sub>CTX-M</sub>	CRO, TIO, NAL, SSS, SXT, AMP, TET	S29G (PmrA) D283G (PmrB)	MDR [6]

Abbreviations of antimicrobials: AMP, Ampicillin; CRO, Ceftriaxone; TIO, Ceftiofur; NAL, Nalidixic acid; STR, Streptomycin; SSS, Sulfisoxazole; SXT, Trimethoprim-sulfamethoxazole; TET, Tetracycline.

Nomenclature of amino acids: D, Aspartic Acid; G, Glycine; L, Leucine; S, serine; P, Proline.

MDR [N]; Multidrug resistance expressed against N classes of antimicrobials.

#### 4. Discussion

Our study provides some insight into the co-existence of *mcr-1* gene and colistin resistance in ESBL/AmpC-producing *E. coli* isolates obtained from chicken farms in three different countries, Canada (Quebec), Senegal and Vietnam. The lack of colistin resistance and *mcr (1-2)* genes in ESBL/AmpC-producing *E. coli* in samples from Canadian farms is coherent with the limited use of colistin in food animals in Canada, considering that this antimicrobial is not approved for use in animals in this country [15]. A study in Ontario (Canada) on cecal samples in chickens also revealed that after selective enrichment and screening by qPCR, *E. coli* was negative for the *mcr-1* and *mcr-2* genes [35]. Nevertheless, it has been reported that two *mcr-1* positive *E. coli* isolates were recovered from lean ground beef in Ontario, although the origin of this meat (domestic or imported) was unknown [17].

In the current study, we reported 8.7% (95% CI = 0.0 – 34.4) of colistin resistance isolates, combined with the presence of *mcr-1*, among the ESBL/AmpC-producing *E. coli* in the north east of Vietnam. Our results corroborate those of Nguyen et al. [21], who estimated a prevalence of 22.2% (95% CI = 17 – 32) of colistin-resistant-*mcr-1* positive fecal *E. coli* isolated from chickens in Vietnam. In addition, a much higher prevalence of 59.4% (95% CI = 47.9 – 71.0) of colistin-resistant-*mcr-1* positive fecal *E. coli* [7], and of *mcr-1* gene (33.3%) in CTX-M-producing fecal *E. coli* isolates [36] was observed in chicken farms in the Red River Delta region of Vietnam. Yamaguchi et al. [37] also reported a high prevalence of *mcr-1* gene (39%) in ESBL or AmpC-producing *E. coli* isolates obtained from chicken meat in the Ho Chi Minh City in Vietnam. On the other hand, neither the *mcr-1* gene nor phenotypic colistin resistance were identified previously in a collection of *bla*<sub>CTX-M</sub>-producing *E. coli* strains (n=11), derived from chicken fecal samples in the Van Lam district of the Hung Yen province in Vietnam [38]. Thus, the Delta region of Vietnam where colistin is extensively used in chickens as a growth promoter as well as for prophylactic and therapeutic purposes has been associated with a higher prevalence of *E. coli* colistin resistance in this animal production [20, 36]. In our study, the *mcr-1* status of farms was not homogeneous; the gene was not detected in two farms, whereas 49.9% and 2.3% of isolates were *mcr-1* positive in the two other farms.

It is worth noting that no information was collected regarding the history of antimicrobial use, specifically, whether or not colistin has been used in these sampled chicken farms. We did not identify the *mcr-2* gene in any of the colistin-resistant *E. coli* isolates from Vietnamese farms, supporting results of previous studies conducted in chicken farms in this country [37]. In contrast, we observed the presence of resistance to colistin, but not of the *mcr-1* nor *mcr-2* genes, in ESBL-producing *E. coli* from Senegalese farms.

The amino acid substitutions in both PmrA and PmrB found in chicken isolates obtained from Senegalese farms have been previously described in colistin resistant *E. coli* isolates from other species, for example in humans in China and South Korea [39, 40]. However, it would be important in a future study to determine, if these isolates harbour any of the other six-*mcr* genes discovered to date. Nevertheless, to the best of our knowledge, this is the first report of these mutations in the PmrAB two-component system in colistin resistant *E. coli* strains of animal origin, that is, healthy chickens.

In our study, the MIC values of the colistin resistant *E. coli* derived from the Senegalese farms were 4 to 8 times higher than the EUCAST clinical breakpoint (2 mg/L). This finding is concordant with previous studies showing that chromosomally encoded mechanisms of colistin resistance, contrary to the *mcr* gene mechanisms, are generally associated with high levels of colistin resistance in *Enterobacteriaceae* strains [4]. Although we could not obtain information regarding colistin use in the sampled farms, a substantial use of this antimicrobial has been reported in chickens in Senegal [16], which could contribute to the colistin resistance observed in our study. We observed a relatively low prevalence of colistin-resistant *E. coli* isolates (2.2%); however, as our study was conducted in 2011, more recent study is needed to document the evolution of *E. coli* colistin resistance in chicken since this date.

It should be noted that a larger number of isolates was used to determine the status of farms in Vietnam (average of 31.5) and in Quebec (median of 34.5) as compared to Senegal (average of 5.0). Therefore, the ability to detect resistance on a farm in Vietnam was higher than in Senegal, which may partly explain the higher prevalence of farms with colistin resistance in Vietnam. Moreover, differences in the selective enrichment protocol between countries may contribute partly to the differences observed. Also, a convenience samples of farms was used

in Vietnam and thus results should be considered as preliminary, as the representativity of these farms could not be assessed. Likewise, in Canada, only farms practicing thinning from a small geographical area were selected, limiting our ability to infer the results.

Our finding of the co-existence of the *mcr-1* gene and ESBL/AmpC genes and the very high level of MDR and even possible XDR in all phenotypic colistin resistance *E. coli* strains (n=11) obtained from sampled chicken farms in Vietnam is a major concern. This may favour the selection of colistin-resistant strains under the selective pressure imposed by this antimicrobial or even by the use of a wide range of other antimicrobials of less critical importance for human health. Hence, it is important at the farm level to apply an overall strategy that includes a reduction, not only in colistin use but also in the use of all antimicrobials, including those of critical importance for human health [5]. It is worth noting that the transmission of *mcr-1* gene between chickens and humans has been confirmed in Vietnam [7], and this country is a potential source of worldwide dissemination of *mcr-1* gene among international travelers [41].

## **5. Conclusions**

Our study demonstrated the presence of colistin resistance in ESBL/AmpC-producing *E. coli* isolates in chicken farms located in Senegal and Vietnam, but not in Canada, which is coherent with reported portraits of colistin use in these countries. The co-existence of the *mcr-1* and ESBL/AmpC genes and the very high level of multiple drug resistance in all colistin resistant *E. coli* strains obtained from sampled chicken farms in Vietnam is a major concern for both human and veterinary medicine. This co-existence could contribute to selecting and enhancing the rapid worldwide dissemination of colistin resistance with pressure by antimicrobials other than colistin.

## **Funding**

This work was partially supported by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) (412247-10, 412247-15 and 520873-17).

## **Competing interests**

None declared.

**Ethical approval**

Not required.

## References

1. Magdelaine P, Spiess M, Valceschini E. Poultry meat consumption trends in Europe. *Worlds Poult Sci J* 2008;64:53-64.
2. Han Y, Liu Q, Willias S, Liang K, Li P, Cheng A et al. A bivalent vaccine derived from attenuated *Salmonella* expressing O-antigen polysaccharide provides protection against avian pathogenic *Escherichia coli* O1 and O2 infection. *Vaccine* 2018;36:1038-46.
3. Kempf I, Jouy E, Chauvin C. Colistin use and colistin resistance in bacteria from animals. *Int J Antimicrob Agents* 2016;48:598-606.
4. Rhouma M, Beaudry F, Theriault W, Letellier A. Colistin in pig production: chemistry, mechanism of antibacterial action, microbial resistance emergence, and One Health perspectives. *Front Microbiol* 2016;7:1-22.
5. Rhouma M, Letellier A. Extended-spectrum beta-lactamases, carbapenemases and the *mcr-1* gene: is there a historical link? *Int J Antimicrob Agents* 2017;49:269-71.
6. Catry B, Cavaleri M, Baptiste K, Grave K, Grein K, Holm A et al. Use of colistin-containing products within the European Union and European Economic Area (EU/EEA): development of resistance in animals and possible impact on human and animal health. *Int J Antimicrob Agents* 2015;46:297-306.
7. Trung NV, Matamoros S, Carrique-Mas JJ, Nghia NH, Nhung NT, Chieu TT et al. Zoonotic transmission of *mcr-1* colistin resistance gene from small-scale poultry farms, Vietnam. *Emerg Infect Dis* 2017;23:529-32.
8. Rhouma M, Beaudry F, Letellier A. Resistance to colistin: what is the fate for this antibiotic in pig production? *Int J Antimicrob Agents* 2016;48:119-26.
9. Phan MD, Nhu NTK, Achard MES, Forde BM, Hong KW, Chong TM et al. Modifications in the *pmrB* gene are the primary mechanism for the development of

- chromosomally encoded resistance to polymyxins in uropathogenic *Escherichia coli*. J Antimicrob Chemother 2017;72:2729-36.
10. Grami R, Mansour W, Mehri W, Bouallègue O, Boujaâfar N, Madec J et al. Impact of food animal trade on the spread of *mcr-1*-mediated colistin resistance, Tunisia, July 2015. Euro Surveill 2016;21:30144.
  11. Nordmann P, Poirel L. Plasmid-mediated colistin resistance: an additional antibiotic resistance menace. Clin Microbiol Infect 2016;22:398.
  12. Kluytmans-van den Bergh MF, Huizinga P, Bonten MJ, Bos M, De Bruyne K, Friedrich AW et al. Presence of *mcr-1*-positive Enterobacteriaceae in retail chicken meat but not in humans in the Netherlands since 2009. Euro Surveill 2016;21:30149.
  13. Nishino Y, Shimojima Y, Suzuki Y, Ida M, Fukui R, Kuroda S et al. Detection of the *mcr-1* gene in colistin resistant *Escherichia coli* from retail meat in Japan. Microbiol Immunol 2017;61:554-57.
  14. Fernandes M, Moura Q, Sartori L, Silva K, Cunha M, Esposito F et al. Silent dissemination of colistin-resistant *Escherichia coli* in South America could contribute to the global spread of the *mcr-1* gene. Euro Surveill 2016;21.
  15. Rhouma M, Beaudry F, Theriault W, Bergeron N, Beauchamp G, Laurent-Lewandowski S et al. *In vivo* therapeutic efficacy and pharmacokinetics of colistin sulfate in an experimental model of enterotoxigenic *Escherichia coli* infection in weaned pigs. Vet Res 2016;47:58.
  16. Traore E. Secteur Avicole Sénégal. Revues nationales de l'élevage de la division de la production et de la santé animales de la FAO 2014. No 7. Available at : <http://www.fao.org/docrep/019/i3659f/i3659f.pdf>. Accessed 14 November, 2018
  17. Mulvey MR, Mataseje LF, Robertson J, Nash JH, Boerlin P, Toye B et al. Dissemination of the *mcr-1* colistin resistance gene. Lancet Infect Dis 2016;16:289-90.

18. Payne M, Croxen MA, Lee TD, Mayson B, Champagne S, Leung V et al. Mcr-1-positive colistin-resistant *Escherichia coli* in traveler returning to Canada from China. *Emerg Infect Dis* 2016;22:1673-5.
19. Carrique-Mas JJ, Trung NV, Hoa NT, Mai HH, Thanh TH, Campbell JI et al. Antimicrobial usage in chicken production in the Mekong Delta of Vietnam. *Zoonoses Public Health* 2015;62 Suppl 1:70-8.
20. Kim DP, Saegerman C, Douny C, Dinh TV, Xuan BH, Vu BD et al. First survey on the use of antibiotics in pig and poultry production in the Red River Delta region of Vietnam. *Food and Public Health* 2013;3:247-56.
21. Nguyen NT, Nguyen HM, Nguyen CV, Nguyen TV, Nguyen MT, Thai HQ et al. Use of colistin and other critical antimicrobials on pig and chicken farms in southern Vietnam and its association with resistance in commensal *Escherichia coli* bacteria. *Appl Environ Microbiol* 2016;82:3727-35.
22. Hasman H, Hammerum A, Hansen F, Hendriksen RS, Olesen B, Agersø Y et al. Detection of mcr-1 encoding plasmid-mediated colistin-resistant *Escherichia coli* isolates from human bloodstream infection and imported chicken meat, Denmark 2015. *Euro Surveill* 2015;20:1-5.
23. Wu C, Wang Y, Shi X, Wang S, Ren H, Shen Z et al. Rapid rise of the ESBL and mcr-1 genes in *Escherichia coli* of chicken origin in China, 2008–2014. *Emerg Microbes Infect* 2018;7:30.
24. Castellanos LR, Donado-Godoy P, Leon M, Clavijo V, Arevalo A, Bernal JF et al. High heterogeneity of *Escherichia coli* sequence types harbouring ESBL/AmpC genes on IncII plasmids in the Colombian poultry chain. *PLoS One* 2017;12:e0170777.
25. Lanthier B. Variabilité des souches de *Escherichia coli* provenant de divers poulaillers au Québec. Montreal Université de Montréal.; 2016. M.Sc, Université de Montréal. Available at : <https://papyrus.bib.umontreal.ca/xmlui/handle/1866/13367>. Accessed: 14 November 2018.



26. Agersø Y, Aarestrup FM, Pedersen K, Seyfarth AM, Struve T, Hasman H. Prevalence of extended-spectrum cephalosporinase (ESC)-producing *Escherichia coli* in Danish slaughter pigs and retail meat identified by selective enrichment and association with cephalosporin usage. *J Antimicrob Chemother* 2011;67:582-88.
27. Rhouma M, Bessalah S, Salhi I, Theriault W, Fairbrother JM, Fravallo P. Screening for fecal presence of colistin-resistant *Escherichia coli* and *mcr-1* and *mcr-2* genes in camel-calves in southern Tunisia. *Acta Vet Scand* 2018;60:35.
28. Rhouma M, Fairbrother JM, Theriault W, Beaudry F, Bergeron N, Laurent-Lewandowski S et al. The fecal presence of enterotoxin and F4 genes as an indicator of efficacy of treatment with colistin sulfate in pigs. *BMC Microbiol* 2017;17:6.
29. Liu YY, Wang Y, Walsh TR, Yi LX, Zhang R, Spencer J et al. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. *Lancet Infect Dis* 2016;16:161-68.
30. Xavier BB, Lammens C, Ruhel R, Kumar-Singh S, Butaye P, Goossens H et al. Identification of a novel plasmid-mediated colistin-resistance gene, *mcr-2*, in *Escherichia coli*, Belgium, June 2016. *Euro Surveill* 2016;21.
31. The Canadian Integrated Program for Antimicrobial Resistance Surveillance (CIPARS). Resistance to antimicrobials in *Escherichia coli* isolates from chickens; abattoir surveillance. 2009. [<https://www.canada.ca/en/public-health/services/surveillance/canadian-integrated-program-antimicrobial-resistance-surveillance-cipars/2009-preliminary-results/antimicrobial-resistance-in-humans-and-the-agri-food-sector.html>]
32. Vounba P, Yaghouba K, Ndiaye C, Arsenault J, Fairbrother JM, Alameddji RB. Molecular characterization of *Escherichia coli* isolated from chickens with colibacillosis in Senegal. *Foodborne Pathog Dis* 2018;15:517-25.

33. Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey R, Carmeli Y, Falagas M, Giske C et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect* 2012;18:268-81.
34. Dierikx C, van Essen-Zandbergen A, Veldman K, Smith H, Mevius D. Increased detection of extended spectrum beta-lactamase producing *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* isolates from poultry. *Vet Microbiol* 2010;145:273-78.
35. Chalmers G, Davis KE, Poljak Z, Friendship R, Mulvey MR, Deckert AE, Reid-Smith RJ and Boerlin P. A method to detect *Escherichia coli* carrying the colistin-resistance genes *mcr-1* and *mcr-2* using a single real-time polymerase chain reaction and its application to chicken cecal and porcine fecal samples. *Can J Vet Res* 2018. **82**(4): p. 312-315.
36. Bui TKN, Bui TMH, Ueda S, Le DT, Yamamoto Y, Hirai I. Potential transmission opportunity of CTX-M-producing *Escherichia coli* on a large-scale chicken farm in Vietnam. *J Glob Antimicrob Resist* 2018;13:1-6.
37. Yamaguchi T, Kawahara R, Harada K, Teruya S, Nakayama T, Motooka D et al. The presence of colistin resistance gene *mcr-1* and -3 in ESBL producing *Escherichia coli* isolated from food in Ho Chi Minh City, Vietnam. *FEMS Microbiol Lett* 2018;365.
38. Malhotra-Kumar S, Xavier BB, Das AJ, Lammens C, Hoang HTT, Pham NT et al. Colistin-resistant *Escherichia coli* harbouring *mcr-1* isolated from food animals in Hanoi, Vietnam. *Lancet Infect Dis* 2016; 16:286-87.
39. Luo Q, Yu W, Zhou K, Guo L, Shen P, Lu H et al. Molecular epidemiology and colistin resistant mechanism of *mcr*-positive and *mcr*-negative clinical isolated *Escherichia coli*. *Front Microbiol* 2017; 8:2262.
40. Lee J-Y, Choi M-J, Choi HJ, Ko KS. Preservation of acquired colistin resistance in Gram-negative bacteria. *Antimicrob Agents Chemother* 2015; 60:609-12.

41. Nakayama T, Kumeda Y, Kawahara R, Yamaguchi T, Yamamoto Y. Carriage of colistin-resistant, extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* harboring the *mcr-1* resistance gene after short-term international travel to Vietnam. *Infect Drug Resist* 2018; 11:391.

## **CHAPITRE IV. DISCUSSION ET CONCLUSION**

La RAM est l'une des menaces les plus importantes qui planent sur la santé des humains et des animaux. En marge de la 71<sup>ème</sup> session de l'assemblée générale des Nations-Unies en 2016, pour la première fois, les chefs d'États se sont concertés afin d'adopter une approche commune de lutte contre les causes de la RAM en santé humaine et animale ainsi que dans l'agriculture. En aviculture, l'utilisation des antimicrobiens a largement contribué à l'accroissement des productions via le bien-être des animaux. Mais en même temps, cet usage des antimicrobiens, qu'il soit thérapeutique, prophylactique ou comme promoteur de croissance, peut favoriser la sélection des souches bactériennes résistantes aux antimicrobiens. Ces bactéries résistantes aux antimicrobiens peuvent par la suite être transmises directement ou indirectement aux humains à travers des produits animaux destinés à la consommation humaine ou via des contacts directs ou indirects (285). De plus, les gènes de résistance aux antimicrobiens peuvent être mobilisés des bactéries commensales ou pathogènes des animaux vers les bactéries pathogènes pour les humains. Ces résistances affectent de plus en plus les antimicrobiens tels que les fluoroquinolones, les céphalosporines de 3<sup>ème</sup> génération (C3G) ou encore la colistine, tous utilisés comme derniers remparts pour combattre des infections dues aux bactéries à Gram négatif multirésistantes. Au Sénégal, au Québec et au Vietnam, où l'aviculture est en plein essor avec son corollaire d'utilisation des antimicrobiens, le rôle des clones et des plasmides dans la résistance des *E. coli* isolés des poulets n'est pas encore bien élucidé.

Dans cette thèse, les objectifs globaux étaient de déterminer les caractéristiques de virulence et de RAM des *E. coli* isolés des poulets au Sénégal, au Québec et au Vietnam et de déterminer le rôle éventuel des plasmides et des clones dans cette RAM. Les méthodes d'échantillonnage utilisées dans les différents pays ne permettent pas, du point de vue épidémiologique, de faire des comparaisons. Toutefois, nous allons quand-même souligner les particularités dans les profils de virulence, de RAM et des plasmides porteurs de la RAM dans chaque pays afin d'avoir une vue partielle des spécificités qui caractérisent chaque pays.

## **1. Profils de résistance antimicrobienne**

---

Dans un premier temps, nous voulions savoir d'une part les profils de RAM pour 58 isolats de *E. coli* issus des poulets ayant une colibacillose clinique dans 58 fermes des régions de Thiès

et de Dakar au Sénégal (Article 1) et des *E. coli* isolés des poulets de chair cliniquement sains dans 32 fermes de la région de Dakar (Article 2). Il est à noter que les régions de Thiès et de Dakar concentrent à elles seules plus de 80% des exploitations avicoles commerciales du Sénégal (19). Le choix de ces deux types d'isolats avait pour but d'avoir une vue d'ensemble des caractéristiques des *E. coli* isolés des poulets au Sénégal et de voir si les profils de virulence et de RAM de ces deux types d'isolats différaient. Car, il faut le mentionner, les *E. coli* aviaires n'avaient, au meilleur de notre connaissance, pas encore fait l'objet d'une telle caractérisation alors que la colibacillose est l'une des principales pathologies bactériennes dans les élevages avicoles au Sénégal (286). D'autre part, il s'agissait d'étudier le profil de RAM des *E. coli* fécaux isolés des poulets au Québec et au Vietnam afin de déterminer si les isolats fécaux du Sénégal, du Québec et du Vietnam partageaient certaines caractéristiques telle que la présence du clone pandémique humain ST131 dont la présence a été rapporté chez les APEC que chez les AFEC (16, 287). A cet effet, trois collections d'isolats ont été constituées à partir d'échantillons collectés dans les fermes de poulets sains de chacun des pays : une collection d'isolats indicateurs pour déterminer la prévalence des caractéristiques de virulence et de RAM, une collection d'isolats potentiels ESBL/AmpC pour augmenter les chances de détection des *E. coli* producteurs d'ESBL/AmpC et enfin, une collection d'isolats potentiels ExPEC pour accroître les chances de détection des *E. coli* pathogènes.

Au Sénégal, aussi bien dans les isolats cliniques (Figure 2, Article 1) que dans les isolats indicateurs provenant des poulets cliniquement sains (Tableau 1, Article 2), nous avons observé que la RAM phénotypique et génétique était élevée vis-à-vis des antimicrobiens de haute et moyenne importances en santé humaine, mais très faible pour ceux de très haute importance (ciprofloxacine, ceftriaxone (et son équivalent vétérinaire le ceftiofur) et gentamicine) (Figure 1, Article 1 et Tableau 3, Article 2). Ces profils comparables de RAM entre les deux types d'isolats reflètent probablement l'utilisation des antimicrobiens, car les antimicrobiens de haute et moyenne importances en santé humaine (tétracycline, ampicilline, sulfamides, etc.) sont les plus employés en aviculture au Sénégal, en plus d'être couramment utilisés en santé humaine (200, 286). De même, aussi bien au Québec (Tableau 1, Article 3) qu'au Vietnam (Tableau 1, Article 4), une prévalence élevée de la non-susceptibilité aux antimicrobiens de moyenne et haute importances a été observée. Ces résultats ont également

été confirmés par une prévalence élevée des gènes codant la résistance à ces antimicrobiens (Tableau 2, Article 3 et Tableau 3, Article 4), confirmant ainsi les observations selon lesquelles les gènes de résistance aux antimicrobiens les plus anciens et les plus longtemps utilisés en médecine humaine et animale (qui correspondent à ceux de moyenne et haute importances) sont largement distribués chez les entérobactéries des animaux à travers le monde (288-290).

Quant aux C3G (ceftriaxone et ceftiofur), il convient de noter qu'aucune étude n'a, au meilleur de notre connaissance, rapporté leur utilisation chez les poulets au Sénégal ou au Vietnam, ce qui pourrait expliquer la prévalence très faible de non-susceptibilité à ces antimicrobiens dans les isolats indicateurs. Les isolats indicateurs du Québec se démarquaient, pour leur part, par une prévalence de 31.3% de non-susceptibilité aux C3G avec 26,7% testés positifs pour *bla<sub>CMY-2</sub>*. La prévalence élevée de résistance aux C3G au Québec résulte probablement de l'utilisation systématique *in ovo* du ceftiofur qui était en cours au Québec à la période de collecte d'échantillons.

Au Sénégal, jusqu'à 86.2% des isolats cliniques (Figure 3, Article 1) et 68.4% d'isolats indicateurs provenant des poulets sains (Figure 2, Article 2) étaient non-susceptibles à au moins trois classes d'antimicrobiens et donc définis comme des MDR. Au Québec, 62.6% des isolats indicateurs étaient MDR (Figure 1, Article 3) tandis qu'au Vietnam, cette prévalence atteignait les 99% (Figure 1, Article 4). La prévalence élevée d'isolats MDR au Sénégal et au Vietnam est peut-être le reflet des pratiques d'utilisation des antimicrobiens. En effet, au Sénégal (19) tout comme au Vietnam (291), les antimicrobiens, y compris ceux d'importance critique en médecine humaine, peuvent être acquis sans ordonnance sur les marchés puis utilisés chez les animaux en thérapeutique ou en prophylaxie. Cette prévalence élevée d'isolats indicateurs multirésistants pourrait aussi être due à une co-sélection de la résistance du fait de la co-localisation plasmidique des déterminants génétiques de RAM, surtout en ce qui concerne les isolats du Québec où une prévalence élevée d'isolats indicateurs positifs à *bla<sub>CMY-2</sub>* (26,7%) a été observée. D'ailleurs, une étude effectuée au Québec avait rapporté une possible co-sélection de *E. coli* résistants au ceftiofur et à la gentamicine suite à l'utilisation de la spectinomycine-lincomycine chez les poulets (292). En outre, lorsque les isolats provenant des poulets sains ont été sélectionnés sur milieu supplémenté de ceftriaxone (isolats

potentiels ESBL/AmpC) ou sur la base de la présence des gènes de virulence (isolats potentiels ExPEC), une présence marquée d'isolats possibles XDR (Extensively drug resistance, c'est-à-dire, des isolats qui ne demeurent susceptibles qu'à un maximum de deux des classes d'antimicrobiens testés) a été notée (Figures 1 des Articles 2, 3 et 4). La prévalence très élevée des MDR dans la collection d'isolats potentiels ESBL/AmpC illustre, à suffisance, l'ampleur de la pression de sélection des souches multirésistantes que l'utilisation des C3G chez les poulets pourrait potentiellement induire. Ces résultats sont aussi la preuve supplémentaire que le statut de producteur de bêta-lactamase chez les *E. coli* est associé à la multirésistance (293) et que la RAM peut être associée à la virulence (294).

Au Sénégal, à l'image de la faible prévalence de résistance aux C3G, seulement 5 isolats cliniques positifs au gène *bla<sub>CTX-M</sub>* (Figure 1, Article 1) et respectivement 1 et 2 isolats indicateurs positifs à *bla<sub>CMY-2</sub>* et *bla<sub>CTX-M</sub>* ont été détectés (Tableau 3, Article 2). Considérant l'ensemble d'isolats issus des poulets sains au Sénégal et provenant des trois collections qui ont été testés pour les gènes d'ESBL/AmpC (n=251), les gènes *bla<sub>CTX-M</sub>* et *bla<sub>CMY-2</sub>* étaient détectés dans respectivement 5,6% et 11,2%. Ainsi, la non-susceptibilité aux C3G était due aux gènes *bla<sub>CTX-M</sub>* pour les isolats cliniques alors qu'elle est l'œuvre à la fois des gènes *bla<sub>CTX-M</sub>* et *bla<sub>CMY-2</sub>* pour ce qui concerne les *E. coli* issus des poulets sains. Toutefois, seulement un isolat avait été retenu par ferme de poulets malades et il est fort probable que le gène *bla<sub>CMY-2</sub>* ait été détecté si plusieurs échantillons et isolats avaient également été sélectionnés dans chaque ferme. En d'autres mots, les profils de résistance aux C3G auraient pu être les mêmes si la même méthode d'échantillonnage avait été appliquée dans les deux types de fermes.

Au Sénégal, les gènes *bla<sub>CTX-M</sub>* ont été détectés dans des isolats fécaux et d'eau de rinçage des carcasses tandis que le gène *bla<sub>CMY-2</sub>* était observé dans les isolats provenant des échantillons d'eau d'abreuvement et de fèces; aucun isolat positif à *bla<sub>CTX-M</sub>* ou *bla<sub>CMY-2</sub>* n'était observé dans les carcasses. L'absence d'isolats positifs à *bla<sub>CTX-M</sub>* ou *bla<sub>CMY-2</sub>* dans les carcasses pourrait suggérer que les opérations de traitement des carcasses n'ont pas contribué à la contamination fécale de celles-ci. Cependant, cette absence de contamination pourrait plutôt s'expliquer par le faible nombre d'échantillons de carcasses (n = 6), car les opérations de traitement des carcasses sont généralement une source importante contamination des



carcasses par des *E. coli* producteurs d'ESBL/AmpC (295). De plus, contrairement à la collection d'indicateurs où les isolats résistants aux C3G n'ont été observés que dans les échantillons de fèces, d'eau d'abreuvement et d'eau de rinçage des carcasses, ce type d'isolats a également été observé dans les carcasses après sélection au ceftiofur. La présence dans les carcasses de *E. coli* producteurs d'ESBL/AmpC pourrait constituer un danger pour les consommateurs et/ou manipulateurs des viandes de poulets. Au Québec, sur 175 isolats testés provenant des trois collections, le gène *bla<sub>CMY-2</sub>* (50,3%) prédominait largement sur les gènes *bla<sub>CTX-M</sub>* (1,7%), tandis qu'au Vietnam, sur 187 isolats testés, *bla<sub>CTX-M</sub>* était plus fréquemment détecté (19,8%) que *bla<sub>CMY-2</sub>* (14,4%). La prédominance du gène *bla<sub>CMY-2</sub>* parmi les *E. coli* résistants aux C3G au Québec pourrait être attribuée au fait que le ceftiofur y soit utilisée *in ovo*, car au Québec, le principal déterminant génétique de la résistance des *E. coli* aviaires au ceftiofur est le gène *bla<sub>CMY-2</sub>* (292). Toutefois, une étude effectuée en France (296) avait démontré que l'administration *in ovo* du ceftiofur entraîne aussi la sélection d'isolats producteurs d'ESBL CTX-M. Cependant, il est possible qu'une utilisation *in ovo* à long terme du ceftiofur, comme ce fut le cas au Québec, ait pu favoriser la prédominance de *bla<sub>CMY-2</sub>*. Par comparaison aux proportions obtenues ci-dessus pour les gènes d'ESBL/AmpC parmi les *E. coli* isolés des poulets sains au Sénégal (5,6% d'isolats positifs à *bla<sub>CTX-M</sub>* et 11,2% positifs à *bla<sub>CMY-2</sub>*), l'on peut également présumer que ces différences dans les types d'ESBL/AmpC dans l'un ou l'autre des pays pourraient également résulter des différences dans la répartition géographique de ces gènes (296).

Les gènes *bla<sub>CTX-M</sub>* détectés parmi les isolats indicateurs au Sénégal appartenaient aux génotypes *bla<sub>CTX-M-1</sub>*, *8* et *-15* (Article 2, section Prévalence des gènes de RAM). Les variants *bla<sub>CTX-M-1</sub>* et *bla<sub>CTX-M-8</sub>* avaient déjà été observés parmi les cinq isolats cliniques résistants aux C3G (Article 1), mais cette étude (Article 2) est la première à rapporter la présence du gène *bla<sub>CTX-M-15</sub>* parmi les *E. coli* isolés des poulets cliniquement sains au Sénégal, bien que la présence de ce variant ait déjà été rapportée au Sénégal chez des enfants en santé d'un village reculé (244). Le variant *bla<sub>CTX-M-15</sub>* étant le plus répandu mondialement parmi les entérobactéries (297), la présence, à la fois, chez des humains en santé et des poulets sains de *E. coli* producteurs de cet ESBL suggère que ce variant est bien établi au Sénégal. Au Québec, les *bla<sub>CTX-M</sub>* étaient tous de génotype *bla<sub>CTX-M-1</sub>* tandis que ce gène était plus diversifié dans les

isolats vietnamiens, les génotypes *bla<sub>CTX-M-1</sub>*, -14, -15, -17, -57 et -85 ayant été identifiés au Vietnam. La présence des *E. coli* positifs au gène *bla<sub>CTX-M-1</sub>* a déjà été rapporté chez le poulet au Québec (292). Au Vietnam, les *E. coli* producteurs de *bla<sub>CTX-M-1</sub>*, -14, -15, -17, -57 ont également été isolés dans les fermes de poulets (216, 298). Le variant *bla<sub>CTX-M-85</sub>* a été rapporté pour la première fois chez des *E. coli* isolés en 2009 chez des personnes souffrant d'infections urinaires en Chine (299), mais notre étude est la première à rapporter la présence de ce variant chez des *E. coli* isolés des poulets. Par ailleurs, le variant *bla<sub>CTX-M-1</sub>*, identifié à la fois dans les isolats cliniques et dans les isolats issus des poulets sains de toute origine géographique, et *bla<sub>CMY-2</sub>* qui constitue la bêta-lactamase à large spectre la plus prépondérante au Québec avec une forte représentativité au Sénégal et au Vietnam chez les *E. coli* isolés des poulets sains, renforcent les conclusions des études antérieures selon lesquelles ces variants sont très répandus parmi les *E. coli* aviaires (300, 301).

En ce qui concerne les fluoroquinolones, la norfloxacine, une fluoroquinolone de la même génération que la ciprofloxacine est utilisée chez les poulets au Sénégal (286). De plus, nous avons observé, lors de notre enquête de terrain que la norfloxacine était utilisée chez les poulets, tout comme Niyibizi (286) l'avait rapporté dans son étude sur les résidus d'antimicrobiens dans les œufs de poules au Sénégal. Cette utilisation pourrait expliquer la prévalence sensiblement élevée de non-susceptibilité que nous avons observée pour la ciprofloxacine (26,9%) et l'acide nalidixique (44,0%) parmi les isolats issus des poulets sains au Sénégal. La non-susceptibilité aux quinolones était aussi très élevée dans les isolats du Vietnam (83,7% pour l'acide nalidixique et 59,6% pour la ciprofloxacine), une particularité qui pourrait être liée par l'utilisation très répandue des quinolones et fluoroquinolones dans ce pays, y compris chez les animaux de productions (22). Quant au Québec, la très faible prévalence de non-susceptibilité aux quinolones (4,0% pour l'acide nalidixique et 1,0% pour la ciprofloxacine) pourrait être due au fait que ces antimicrobiens ne sont pas utilisés en aviculture. Il faut reconnaître, toutefois, que nous n'avons pas de données relatives à l'utilisation des antimicrobiens dans les fermes faisant l'objet de la présente étude, ni au Québec, ni au Vietnam, et qu'une étude intégrant la consommation antimicrobienne est à envisager pour établir ou pas une corrélation.

L'utilisation des quinolones est citée comme la principale cause des mutations dans les gènes *gyrA* et *parC* conduisant à la résistance aux quinolones (302). Dans notre étude au Sénégal, effectivement, nous avons observé que les isolats cliniques non-susceptibles aux quinolones et les isolats provenant des poulets sains résistants à la ciprofloxacine n'étaient pas porteurs du gène plasmidique *qnrB*, mais la presque totalité étaient porteurs d'au moins une mutation dans *gyrA* ou *parC*, rapportée dans la littérature scientifique pour leur implication dans la résistance aux quinolones. Au Vietnam aussi, le séquençage des gènes *gyrA* et *parC* chez 50 isolats résistants à la ciprofloxacine a démontré la présence des mêmes mutations que nous avons observées dans les souches provenant des poulets sains et malades au Sénégal. Les mutations que nous avons observées dans *gyrA* et *parC* ont été décrites comme un indice d'un niveau élevé de résistance aux fluoroquinolones (303). Par ailleurs, au Sénégal, 23,1% d'isolats cliniques provenant chacun d'une ferme distincte (Tableau 1, Article 1) et 88,2% d'isolats issus de poulets sains (Tableau 4, Article 2), originaires de 19 fermes sur un total de 20, étaient porteurs de la double mutation sérine (Ser83Leu dans *gyrA* et Ser80Ile dans *parC*) tandis qu'au Vietnam, 82.0% d'isolats issus des 5 fermes en étaient porteurs. Fuzi et al. (304) rapportent que cette double mutation sérine, en conférant un avantage compétitif au clone pandémique humain ST131, a contribué à ce que ce dernier conquière de nouvelles niches écologiques. Cette double mutation pourrait donc avoir joué un tel rôle compte-tenu du fait que les isolats porteurs sont présents dans presque toutes les fermes. Les mutations dans *gyrA* et *parC* citées comme causes de résistance aux quinolones ont également été observées, par d'autres auteurs, dans les isolats de *E. coli* environnementaux qui ont peu de chance d'avoir été exposés à ces molécules synthétiques (305). Il est donc possible que ces résistances puissent découler de l'expression d'autres gènes plasmidiques de résistance aux quinolones que nous n'avons pas examinés. Autrement dit, il serait intéressant de séquencer l'ensemble du génome de nos isolats non-susceptibles ou résistants aux quinolones et porteurs desdites mutations afin d'écarter tout autre mécanisme qui aurait pu contribuer à cette résistance. Mieux encore, on pourrait envisager de sélectionner des isolats sensibles aux quinolones et dépourvus de plasmides de résistance puis les soumettre à des doses sous-thérapeutiques de quinolone afin de déterminer si à terme, de telles mutations peuvent apparaître, les rendant résistants. Quoiqu'il en soit, il convient ici de recommander l'arrêt de l'utilisation des fluoroquinolones en aviculture au Sénégal et au Vietnam, car il a été reconnu aux États-Unis

que l'utilisation de l'enrofloxacin en aviculture est le principal contributeur au développement de la résistance croisée des *Campylobacter* à la ciprofloxacine chez les humains (306). Ce constat avait alors conduit, en Septembre 2005, à l'arrêt effectif de l'utilisation de l'enrofloxacin en production avicole aux États-Unis.

L'examen par PCR des *E. coli* producteurs d'ESBL/AmpC issus des poulets sains a permis de constater qu'un même isolat pouvait posséder, peu importe qu'il provienne du Sénégal, du Québec ou du Vietnam, de multiples plasmides. Cette diversité plasmidique pourrait expliquer la prévalence élevée des multirésistances mentionnées plus haut pour chacun des pays. En outre, les expériences de transférabilité de la résistance aux C3G ont démontrés que les gènes *bla<sub>CTX-M</sub>/bla<sub>CMY-2</sub>* étaient, quel que soit le pays, portés majoritairement par les plasmides du groupe II et accessoirement par d'autres groupes tels que K/B, FIB, et B/O. Ces plasmides porteurs des gènes *bla<sub>CTX-M</sub>/bla<sub>CMY-2</sub>* ont déjà été rapportés par d'autres auteurs au Québec (292) et dans d'autres pays (216, 300). En plus de ces plasmides, d'autres, non identifiés au Québec, ni au Sénégal, tels que A/C, R et HII étaient aussi porteurs des gènes d'ESBL/AmpC au Vietnam. Des plasmides du groupe A/C porteurs du gène *bla<sub>CMY-2</sub>* ont été identifiés chez des APEC isolés des poulets au Québec (292). De même, des plasmides du groupe HII porteurs de gènes d'ESBL ont été rapportés chez des chevaux aux Pays-Bas (307). Par ailleurs, les gènes *bla<sub>CTX-M-1</sub>* étaient, presque tous, portés par les plasmides du groupe d'incompatibilité II et que ceux-ci co-transféraient aussi la résistance à la tétracycline et au sulfisoxazole. Börjesson et ses collègues (300) ont également rapporté le portage par des plasmides II de tous les gènes *bla<sub>CTX-M-1</sub>* identifiés chez des isolats de *E. coli* aviaires. Le fait que les plasmides II porteurs de *bla<sub>CTX-M-1</sub>* co-transfèrent la résistance au sulfisoxazole et à la tétracycline suggère qu'une éventuelle utilisation de ces antimicrobiens pourrait contribuer à la sélection d'isolats producteurs d'ESBL/AmpC. Les plasmides de groupe II étaient également porteurs d'autres variants de *bla<sub>CTX-M</sub>* et de *bla<sub>CMY-2</sub>*; ils étaient présents dans des isolats non-apparentés provenant de différentes fermes investiguées dans les trois pays. Les plasmides des groupes II et FII qui ont été identifiés chez les deux isolats cliniques sont décrits comme ayant une allure épidémique (308). De ce point de vue, le suivi de leur diffusion entre les fermes devrait être régulièrement effectué par leur typage au moyen de la méthode pMLST (plasmid MLST).

L'évaluation de la présence d'isolats non-susceptibles aux C3G dans les fermes de poulets sains au Sénégal n'a pas formellement permis d'identifier de facteurs de risque, bien que cinq facteurs potentiels aient eu une nette tendance à la significativité. Cette incapacité à identifier des facteurs de risque pourrait être due à la petite taille de notre échantillon de fermes (n=32). Elle pourrait aussi s'expliquer par un potentiel biais d'information lors de notre enquête de terrain. En effet, seulement 8 fermiers sur 32 avaient déclaré avoir fait recours aux antimicrobiens sur les lots étudiés. Étant donné que la plupart des éleveurs au Sénégal ont reçu une formation d'auxiliaire d'élevage et que ceux-ci dépassent parfois leur prérogatives en administrant des antimicrobiens souvent sous-dosés au animaux (309), l'on peut valablement soupçonner que certains de ces actes délictuels n'aient pas été déclarés. Aussi, il n'est pas exclu que les antimicrobiens aient été utilisés au couvoir ou sur les lots antérieurs à ceux que nous avons échantillonnés. Cette étude pourrait donc constituer une base à des études de plus grande envergure sur des échantillons d'élevage plus grands et en prenant en compte l'utilisation des antimicrobiens dans les lots antérieurs et les couvoirs d'où proviennent les poussins.

Les gènes d'ESBL/AmpC peuvent parfois coexister au sein d'un même isolat avec ceux codant la résistance à la colistine, un autre antimicrobien utilisé en dernier recours en santé humaine pour combattre les infections dues aux bactéries multirésistantes. Il a même été rapporté dans une récente étude en Chine (310) que les *E. coli* producteurs d'ESBL isolés des poulets sont plus enclins à être positifs au gène *mcr-1* de résistance à la colistine que les isolats non producteurs d'ESBL. De même, une hausse importante de la résistance à la colistine a été constatée en France parmi les *E. coli* producteurs d'ESBL/AmpC isolés des veaux non exposés à la colistine (311). Ainsi, dans l'article 5, nous avons examiné les isolats fécaux potentiels producteurs d'ESBL/AmpC des trois pays afin d'évaluer leur sensibilité à la colistine et de déterminer le mécanisme qui sous-tend la résistance à cet antimicrobien. Les résultats ont montré qu'au Québec, aucun des 108 isolats testés n'était résistant à la colistine (Tableaux 1 et 2, Article 5). On pouvait, logiquement, s'attendre à un tel résultat puisque cet antimicrobien n'est pas homologué en aviculture au Canada. Ces résultats concordent avec ceux de Chalmers et al. (312) qui n'ont pas non plus identifiés d'isolats résistants à la colistine après avoir examiné des échantillons fécaux et caeaux aviaires. En revanche, au Vietnam, 11

isolats issus de deux fermes, tous porteurs du gène *mcr-1*, étaient résistants à la colistine (Tableaux 1 et 2, Article 5). La présence, au Vietnam, d'isolats résistants à la colistine n'est pas une surprise puisqu'en plus de l'utilisation du ceftiofur et de la colistine en aviculture dans ce pays (23), des prévalences plus élevées que la nôtre avaient déjà été rapportées chez des *E. coli* producteurs d'ESBL/AmpC isolés des poulets au Vietnam (313, 314). Au Sénégal, deux isolats provenant de deux fermes, non porteurs de gènes *mcr*, étaient résistants à la colistine (Tableaux 1 et 2, Article 5). Au Sénégal, aucune étude n'a, à ce jour rapporté l'utilisation des C3G en aviculture, bien qu'en revanche, la colistine y soit utilisée comme promoteur de croissance (286). Contrairement aux observations d'études effectuées au Vietnam qui rapportaient des prévalences élevées de résistance et du gène *mcr-1* dans les *E. coli* producteurs d'ESBL/AmpC isolés des poulets, la prévalence que nous observons ici pour ce type d'isolats est plutôt faible. Cette faible prévalence relève peut-être de la non-utilisation de la colistine dans les fermes investiguées. En effet, dans les fermes de poulets sains enquêtées au Sénégal, aucune utilisation de cet antimicrobien n'avait été mentionnée par les fermiers. Aussi, faut-il noter dans cette étude, la faible occurrence du *mcr-1* parmi les isolats producteurs d'ESBL/AmpC au Sénégal, au Québec et au Vietnam, contrairement à l'étude chinoise (310) qui indiquait une probabilité de détection du gène *mcr-1* plus élevée dans les *E. coli* aviaires producteurs d'ESBL/AmpC en comparaison à ceux qui n'en produisent pas.

Cette étude est la première du genre à rapporter la présence de *E. coli* isolés de poulets sains qui soient résistants à la colistine au Sénégal. Cette résistance à la colistine ne relevait ni de la présence du gène *mcr-1*, ni de celle de *mcr-2* et probablement pas d'autres variants du gène *mcr*. Le séquençage de ces isolats a, en effet, démontré la présence des mutations dans le système à deux composantes *pmrA/pmrB* (Tableau 4, Article 5) rapportées par d'autres études (315, 316) comme étant une cause chromosomique de résistance des entérobactéries à la colistine. En outre, dans cette étude, tous les isolats résistants à colistine étaient positifs soit à *bla<sub>CTX-M</sub>*, soit à *bla<sub>CMY-2</sub>* (Tableau 4, Article 5) et tous étaient MDR avec un profil de multirésistance incluant de 6 à 10 classes différentes d'antimicrobiens. Cette combinaison des gènes d'ESBL/AmpC et *mcr-1* dans un même isolat témoigne du danger potentiel que représentent ces bactéries. Il y a aussi lieu de craindre que certains de ces gènes *mcr* et ESBL/AmpC, voire des gènes de résistance à d'autres antibiotiques soient portés par un

même plasmide. En d'autres termes, une co-localisation de tels gènes sur un même plasmide accroît la dangerosité de ces isolats en raison non seulement du potentiel pathogène de ces isolats tel que mentionné ci-dessus, mais aussi du fait que ces plasmides peuvent être transférés à d'autres pathogènes pour les humains. L'identification des plasmides porteurs des gènes *mcr-1* et d'ESBL/AmpC chez les isolats du Vietnam et la détermination de la virulence et d'un pouvoir pathogène des isolats résistants à la colistine en utilisant un modèle animal d'infection humaine pourrait constituer une piste intéressante de recherches.

## **2. Pathogénicité potentielle des *E. coli* isolés des poulets**

Dans cette étude, sur la base des critères génétiques établis pour définir les ExPEC humains (317) ou aviaires (318), des isolats potentiellement capables d'infecter les poulets et/ou les humains ont été identifiés aussi bien dans la collection clinique au Sénégal (Article 1) que dans les isolats provenant des poulets cliniquement sains dans les trois pays (Figure 2, Article 2; Figure2, Article 3 et Figure 2, Article 4). La capacité des ExPEC isolés des échantillons au Québec que nous avons examinés dans l'article 3 à causer des infections chez l'humain a déjà été démontrée dans un modèle murin (93). De plus, l'hypothèse que les poulets puissent constituer un réservoir des *E. coli* pathogènes pour les humains a déjà été évoquée au Canada (319). La présence dans les poulets, particulièrement ceux destinés à la consommation humaine, des *E. coli* potentiellement capables d'infecter les humains peut représenter un danger pour les consommateurs ou les travailleurs de fermes. Le risque de contamination humaine est d'autant plus élevé dans des pays où les volailles peuvent être vendues vivantes sur les marchés et les fermes installées en zones densément peuplées, voire à l'intérieur des habitations comme au Sénégal (19) ou au Vietnam (21). D'après l'enquête de terrain effectuée initialement (320), certaines des fermes échantillonnées au Québec avaient en leur sein des animaux autres que des poulets et au Sénégal également, nous avons remarqué que d'autres espèces animales pouvaient partager le même abri avec les poulets. Ces isolats potentiels ExPEC pourraient provenir d'autres espèces, y compris des humains, d'où l'importance de sensibiliser les éleveurs au respect des mesures de biosécurité dans les élevages.

Les isolats potentiels ExPEC humains des trois provenances étaient fréquemment porteurs des gènes prédictors des APEC (*iroN*, *iss*, *hlyF*, *ompT* et *iucD*). Quant aux gènes définissant les

ExPEC humains, les isolats du Québec, dans leur grande majorité, combinaient les gènes *iucD* et *kpsMII* (virotype ExPEC *iucD-kpsMII*), tandis que ceux du Sénégal et du Vietnam avaient autant un virotype *iucD-kpsMII* que *iucD-papC*. S'agissant des profils de RAM, les isolats potentiels ExPEC du Québec étaient très peu résistants aux antimicrobiens (Figure 2, Article 3), ceux du Sénégal (Figure 2, Article 2) et du Vietnam (Figure 2, Article 4) avaient une prévalence élevée de non susceptibilité aux antimicrobiens tels que la tétracycline, la streptomycine, l'acide nalidixique, la ciprofloxacine et/ou les sulfamides, avec une détection fréquente des gènes de résistance à ces antimicrobiens. Les profils variés de virulence et de RAM des isolats potentiels ExPEC humains corroborent les résultats des profils plasmidiques qui avaient démontré une grande diversité de ceux-ci. Pour ce qui concerne le Sénégal et le Vietnam où le potentiel pathogène des isolats semble associé à la RAM, cela pourrait s'expliquer par la localisation des gènes de virulence et de RAM sur les mêmes plasmides. Une telle co-localisation des gènes de virulence et de RAM pourrait entraîner la sélection des souches à la fois virulentes et résistants en cas d'utilisation des antimicrobiens.

### **3. Clonalité des isolats potentiellement pathogènes et/ou producteurs d'ESBL/AmpC**

Il n'y avait d'emblée, pas d'évidence de la présence du clone pandémique humain, ni parmi les *E. coli* isolés des poulets malades au Sénégal, ni parmi les *E. coli* isolés des poulets sains dans les trois pays, puisqu'aucun isolat positif à CTX-M n'était du phylo-sérogroupe B2-O25. Néanmoins, afin de déterminer les relations clonales qui pourraient exister entre les isolats de *E. coli* potentiellement pathogènes et/ou producteurs de bêta-lactamases à spectre étendu, ceux-ci ont été examinés pour leurs groupes phylogénétiques, leurs sérogroupe O et leur profil génétique de migration par électrophorèse en champ pulsé (PFGE).

Les *E. coli* producteurs de *bla<sub>CTX-M</sub>/bla<sub>CMY-2</sub>* isolés des poulets sains au Sénégal, au Québec et au Vietnam étaient en général génétiquement très hétérogènes. Cette diversité génétique des *E. coli* producteurs d'ESBL/AmpC a été rapportée ailleurs par d'autres études (321). Les exceptions consistaient en deux à trois ou quatre isolats partageant une similarité d'au moins 80%, provenant de différentes fermes au Sénégal (Figure 3, Article 2) ou au Vietnam (Figure 3, Article 4), qui se retrouvent dans un même groupe PFGE lorsque la similarité entre les isolats était fixée à 80%. Des isolats issus de fermes différentes qui soient si apparentés,



surtout 2 isolats du groupe PFGE 15 au Sénégal (Figure 2, Article 2) qui partageaient plus de 95% de similarité, suggère que ceux-ci proviennent d'une même source de contamination. Le couvoir, les denrées alimentaires ou encore les mouvements du personnel pourraient être les sources les plus probables de contamination. Pour le cas du Sénégal, la pratique dans ce pays d'intermédiaires qui collectent les poulets dans les fermes afin de les vendre sur les marchés (19) pourrait également y avoir joué un rôle. Au Québec en revanche, des isolats provenant d'échantillons collectés à différents étages du bâtiment d'élevage étaient regroupés dans un même groupe PFGE comme ce fut le cas pour le groupe PFGE 7 (Figure 3, Article 3). La dissémination à différents étages d'isolats apparentés pourrait aussi avoir été facilitée par une même source de propagation telle qu'évoquée ci-haut.

Les cinq isolats cliniques positifs à CTX-M appartenaient à différents sérogroupes et phylogroupes et la PFGE a démontré leur grande diversité génétique (Figure 1, Article 1). Néanmoins des isolats du groupe PFGE 13, appartenant au séro groupe O25 et au phylogroupe F, fortement producteurs de biofilms, multirésistants aux antimicrobiens et dont certains partageaient 100% de similarité (Figure 1, Article 1), étaient classés comme potentiellement capables d'infecter les humains. En effet, les *E. coli* du séro groupe O25 sont des agents de méningites néonatales et le phylogroupe F est un groupe étroitement apparenté aux groupes phylogénétiques D et B2 qui rassemblent la majorité des *E. coli* pathogènes chez les humains (71, 322). Par ailleurs le séquençage du génome complet de deux de ces isolats a révélé qu'ils appartenaient au séro groupe O25 :H1 et à la séquence type ST624, renforçant la possibilité qu'en plus d'être impliqués dans la colibacillose aviaire, ces isolats soient capables d'infecter les humains. Car, des *E. coli* ST624 ont déjà été identifiés chez des patients humains (91, 323) et dans des cas de colibacillose chez les poulets (92).

Cette étude, bien qu'ayant examiné un grand nombre d'isolats dans chaque pays, possède quelques limites qui entravent l'extrapolation des résultats. D'abord, les méthodes d'échantillonnage différentes entre les pays qui ne permettent pas de comparaison épidémiologique et la multiplicité d'isolats par échantillons qui pourrait avoir induit un biais dans l'estimation des prévalences. En effet, les isolats d'un même échantillon n'avaient nécessairement pas le même profil de non susceptibilité et il aurait fallu pondérer les prévalences pour la sélection d'isolats selon leurs morphologies. Ensuite, le séquençage du

génomique (WGS) complet aurait été la méthode idéale pour conduire cette étude, mais du fait des coûts hors de portée et de son non-opérationnalité au laboratoire au moment où on menait cette étude, elle n'a pu être utilisée. Ainsi, la parenté entre les isolats, les mutations codant les résistances aux quinolones ou à la colistine doivent être effectivement confirmées par le séquençage du génome entier. Une telle approche pourrait en effet permettre de confirmer ou non la présence de gènes de résistance qui n'ont pas été examinés par PCR et qui auraient pu jouer un rôle dans la résistance. De même, il aurait été intéressant d'effectuer des tests *in vivo* en utilisant un modèle murin pour confirmer le potentiel des isolats classés ExPEC humains à causer des infections chez les humains. En outre, une étude intégrant l'approche « une seule santé » portant sur les isolats issus de poulets et des humains et utilisant des méthodes de pointe comme la WGS aiderait à établir un lien épidémiologique, surtout dans les pays comme le Sénégal et le Vietnam où il y a une certaine proximité entre les volailles et les humains. Enfin, les isolats cliniques n'ont été examinés qu'au Sénégal et une étude sur un plus grand nombre de fermes et incluant des *E. coli* isolés des poulets malades est à envisager au Québec et au Vietnam.

Cette étude a, toutefois, le mérite non seulement d'avoir produit des données qui pourraient contribuer à élucider le rôle des clones et de plasmides dans la résistance des *E. coli* isolés des poulets au Québec, au Sénégal et au Vietnam, mais aussi d'avoir contribué à la standardisation des termes utilisés pour décrire la RAM. En effet, très peu d'études sont publiées en utilisant des terminologies normalisées telles que MDR, XDR, présumés producteurs d'ESBL/AmpC, etc. pour décrire les multirésistances en médecine vétérinaire (324) et cette étude est une contribution à l'harmonisation et la vulgarisation de ces termes auprès de la communauté scientifique. Notre étude est la première du genre à utiliser des *E. coli* isolés des poulets provenant de trois continents différents et à les répartir de façon méthodique en trois collections différentes afin de décrire le maximum des profils qui pourraient exister dans chaque pays. En outre, notre étude permet d'avoir une vue d'ensemble de la prévalence de RAM, aussi bien à l'échelle des fermes que des isolats.

#### **4. Conclusions**

---

Cette étude contribue à cerner à la fois l'ampleur de la résistance antimicrobienne et l'étendu du défi à relever pour juguler le phénomène dans la filière avicole au Sénégal, au Canada (Québec) et au Vietnam. En effet, des isolats d'*Escherichia coli* potentiellement pathogènes pour les humains et présentant une résistance aux antimicrobiens d'importance critique pour la santé humaine ont été détectés chez des poulets en bonne santé au Sénégal, au Québec et au Vietnam. La résistance aux C3G était due aux gènes CTX-M/CMY-2, tandis que la résistance à la ciprofloxacine, très importante au Sénégal et au Vietnam, était due des mutations dans les gènes *gyrA* et *parC*. Certains isolats producteurs d'ESBL/AmpC étaient apparentés, suggérant leur circulation dans les exploitations. De plus, l'implication de plasmides dans la dissémination de ces gènes d'ESBL/AmpC peut être possible puisque des plasmides hébergeant ces gènes ont été observés dans des isolats de différents groupes clonaux provenant de différentes fermes. Enfin la présence d'isolats MDR résistants à la fois aux C3G et à la colistine au Sénégal et au Vietnam constitue un potentiel danger de santé publique et souligne la nécessité d'un contrôle rigoureux de l'utilisation des antimicrobiens en élevage dans ces pays.

## Références bibliographiques

1. Berg RD. The indigenous gastrointestinal microflora. Trends in microbiology. 1996;4(11):430-5.
2. Dho-Moulin M, Fairbrother JM. Avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC). Vet Res. 1999;30(2-3):299-316.
3. Nakazato G, De Campos TA, Stehling EG, Brocchi M, Da Silveira WD. Virulence factors of avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC). Pesq Vet Bras 2009;29:479-86.
4. Stacy AK, Mitchell NM, Maddux JT, Miguel A, Durán L, Girón JA, et al. Evaluation of the prevalence and production of *Escherichia coli* common pilus among avian pathogenic *E. coli* and its role in virulence. PLoS One. 2014;9(1):e86565.
5. Mellata M. Human and avian extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: infections, zoonotic risks, and antibiotic resistance trends. Foodborne Pathog Dis. 2013;10(11):916-32.
6. Barnes JH, Nolan LK, Vaillancourt JP. Colibacillosis. In: Diseases of Poultry, Saif, Y M, H J Barnes, J R Glisson, A M Fadly, L R McDougald and Swayne (Eds). 2008;Blackwell Publishing Professional(212 State Avenue, Ames, Iowa 50014, USA:):p. 691-732.
7. Lister SA, Barrow P. *Enterobacteriaceae*. In: Poultry Diseases Pattison, M McMullin, P F Bradbury, J M Alexander, D J (Eds), 2008, Elsevier. 2008:110-45.
8. Wang XM, Liao XP, Zhang WJ, Jiang HX, Sun J, Zhang MJ, et al. Prevalence of serogroups, virulence genotypes, antimicrobial resistance, and phylogenetic background of avian pathogenic *Escherichia coli* in south of China. Foodborne Pathog Dis. 2010;7(9):1099-106.
9. Hammerum AM, Heuer OE. Human health hazards from antimicrobial-resistant *Escherichia coli* of animal origin. Clin Infect Dis. 2009;48(7):916-21.
10. Miles TD, McLaughlin W, Brown PD. Antimicrobial resistance of *Escherichia coli* isolates from broiler chickens and humans. BMC Vet Res. 2006;2:7.
11. Lima-Filho JV, Martins LV, de Oliveira Nascimento DC, Ventura RF, Batista JEC, Silva AFB, et al. Zoonotic potential of multidrug-resistant extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* obtained from healthy poultry carcasses in Salvador, Brazil. Braz J Inf Dis. 2013;1:54-61.

12. Guillot JF. Bases moléculaires et épidémiologiques de l'antibiorésistance bactérienne. *Ann Rech Vét.* 1990;21:1-11.
13. Yue L, Jiang HX, Liao XP, Liu JH, Li SJ, Chen XY, et al. Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance qnr genes in poultry and swine clinical isolates of *Escherichia coli*. *Vet Microbiol.* 2008;132(3-4):414-20.
14. Coque T, Baquero F, Canton R. Increasing prevalence of ESBL-producing *Enterobacteriaceae* in Europe. *Euro surveillance: bulletin europeen sur les maladies transmissibles/ European communicable disease bulletin.* 2008;13(47):5437-53.
15. Rogers BA, Sidjabat HE, Paterson DL. *Escherichia coli* O25b-ST131: a pandemic, multiresistant, community-associated strain. *J Antimicrob Chemother.* 2010; 66:1-14.
16. Braga JFV, Chanteloup NK, Trotureau A, Baucheron S, Guabiraba R, Ecco R, et al. Diversity of *Escherichia coli* strains involved in vertebral osteomyelitis and arthritis in broilers in Brazil. *BMC Vet Res.* 2016;12(1):140. doi: 10.1186/s12917-016-0762-0.
17. Mora A, Herrera A, Mamani R, López C, Alonso MP, Blanco JE, et al. Recent emergence of clonal group O25b: K1: H4-B2-ST131 *ibeA* strains among *Escherichia coli* poultry isolates, including CTX-M-9-producing strains, and comparison with clinical human isolates. *Appl Environ Microbiol.* 2010;76(21):6991-7.
18. Ewers C, Bethe A, Semmler T, Guenther S, Wieler L. Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing and AmpC-producing *Escherichia coli* from livestock and companion animals, and their putative impact on public health: a global perspective. *Clin Microbiol Infect.* 2012;18(7):646-55.
19. FAO. Secteur Avicole Senegal. *Revue nationale de l'élevage de la division de la production et de la santé animales de la FAO.* Rome. 2014;7.
20. Cardinale E, Perrier JD, Aidara A, Tall F, Coudert C, Gueye IL, et al. Identification d'une nouvelle salmonelle multirésistante dans une viande de poulet de chair au Sénégal. *Rev Elev Méd vét Pays Trop.* 2000;53:5-8.
21. Burgos S, Hanh PH, Roland-Holst D, Burgos S. Characterization of poultry production systems in Vietnam. *International J Poultry Sci.* 2007;6(10):709-12.
22. Nguyen VT, Carrique-Mas JJ, Ngo TH, Ho HM, Ha TT, Campbell JI, et al. Prevalence and risk factors for carriage of antimicrobial-resistant *Escherichia coli* on household and

small-scale chicken farms in the Mekong Delta of Vietnam. *J Antimicrob Chemother.* 2015;70(7):2144-52.

23. Carrique-Mas JJ, Trung NV, Hoa NT, Mai HH, Thanh TH, Campbell J, et al. Antimicrobial usage in chicken production in the Mekong Delta of Vietnam. *Zoon Pub Health.* 2015;62(s1):70-8.

24. Nguyen NT, Nguyen HM, Nguyen CV, Nguyen TV, Nguyen MT, Thai HQ, et al. Use of colistin and other critical antimicrobials on pig and chicken farms in southern Vietnam and its association with resistance in commensal *Escherichia coli* bacteria. *Appl Environ Microbiol.* 2016;82(13):3727-35.

25. Avery B, Parmley E, Reid-Smith R, Daignault D, Finley R, Irwin R. Canadian integrated program for antimicrobial resistance surveillance: Retail food highlights, 2003–2012. *Canada communicable disease report/ Releve des maladies transmissibles au Canada.* 2014;40(Suppl 2):29-35.

26. Canada. Gd. Rapport annuel 2016 du Programme intégré canadien de surveillance de la résistance aux antimicrobiens (PICRA). Agence de la santé publique du Canada, Guelph (Ontario). 2018.

27. Arp LH, Jensen AE. Piliation, Hemagglutination, Motility, and Generation Time of *Escherichia coli* that are virulent or avirulent for turkeys. *Avian Dis.* 1980;24:153-61.

28. Orskov F. Genus I. *Escherichia*. In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol 1* Krieg, N R, Holt, J G (Eds) Williams & Wilkins, Baltimore/London. 1984:420-3.

29. Mainil J. Facteurs de virulence et propriétés spécifiques des souches invasives d'*E. coli*: I) les adhésines et facteurs de colonisation. *Ann Méd Vét.* 2003;147:105-26.

30. Orskov I, Orskov F, Jann B, Jann K. Serology, chemistry, and genetics of O and K antigens of *Escherichia coli*. *Bacteriolog Rev.* 1977;41(3):667.

31. Barnes HJ, Vaillancourt JP, Gross WB. Colibacillosis. In: *Diseases of Poultry*, Saif, Y M, H J Barnes, J R Glisson, A M Fadly, L R McDougald and Swayne (Eds) Blackwell Publishing Professional Iowa State University Press, 2121 State Avenue, Ames, Iowa 50014, USA, 11th Éd pp: 631-652. 2003.

32. Wilson GS, Miles A. *Escherichia*. In: *Principles of bacteriology, virology and immunity, Vol 1, 6th Ed*, Butler & Tanner, London 859-865; 1975:859-65.

33. Stordeur P, Mainil J. La colibacillose aviaire. *Ann Méd Vét.* 2002;1:11-8.
34. Lior H. Classification of *Escherichia coli*. In: CAB International 1994 *Escherichia coli* in domestic animals and humans (Eds Gyles, C L). 1994:31-72.
35. Riley LW, Remis RS, Helgerson SD, McGee HB, Wells JG, Davis BR, et al. Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. *New England Journal of Medicine.* 1983;308(12):681-5.
36. Tau NP, Meidany P, Smith AM, Sooka A, Keddy KH. *Escherichia coli* O104 associated with human diarrhea, South Africa, 2004–2011. *Emerg Infect Dis.* 2012;18(8):1314.
37. Ratchtrachenchai OA, Subpasu S Fau - Hayashi H, Hayashi H Fau - Ba-Thein W, Ba-Thein W. Prevalence of childhood diarrhoea-associated *Escherichia coli* in Thailand. *J Med Microbiol.* 2004;53(0022-2615 (Print)):237-43.
38. Sekse C, Sunde M, Hopp P, Bruheim T, Cudjoe KS, Kvitle B, et al. Occurrence of potentially human-pathogenic *Escherichia coli* O103 in Norwegian sheep. *Appl Environ Microbiol.* 2013;79(23):7502-9.
39. Cho S-H, Oh K-H, Kim S-H, Oh H-B, Park M-S. Distribution of virulence genes and their Association of Serotypes in pathogenic *Escherichia coli* isolates from diarrheal patients in Korea. *Osong public health and research perspectives.* 2010;1(1):29-35.
40. Huppertz H-I, Rutkowski S, Aleksic S, Karch H. Acute and chronic diarrhoea and abdominal colic associated with enteroaggregative *Escherichia coli* in young children living in western Europe. *The Lancet.* 1997;349(0140-6736 (Print)):1660-2.
41. Bidet P, Mahjoub-Messai F, Blanco J, Blanco J, Dehem M, Aujard Y, et al. Combined multilocus sequence typing and O serogrouping distinguishes *Escherichia coli* subtypes associated with infant urosepsis and/or meningitis. *J inf Dis.* 2007;196(0022-1899 (Print)):297-303.
42. Wiles TJ, Kulesus RR, Mulvey MA. Origins and virulence mechanisms of uropathogenic *Escherichia coli*. *Exp Mol Pathol.* 2008;85(1096-0945 (Electronic)):11-9.
43. Devine DA, Robinson L, Roberts AP. Occurrence of K1, K5 and O antigens in *Escherichia coli* isolates from patients with urinary tract infections or bacteriemia. *J Med Microbiol.* 1989;30:295-9.

44. Smith HW, Huggins MB. Further Observations on the Association of the Colicine V Plasmid of *Escherichia coli* with Pathogenicity and with Survival in the Alimentary Tract. *J Gen Microbiol.* 1976;92:335-50.
45. Orskov F, Orskov I. Special *Escherichia coli* serotypes from enteropathies in domestic animals and man. In: *Escherichia coli* infections in domestic animals Proceedings of the symposium during the 12th international congress of microbiology in Munich on September 3-8, 1978 1978:7-14.
46. Kaper JB, Nataro JP, Mobley HLT. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol.* 2004;2:123-40.
47. Manning SD. Deadly diseases and epidemics: *Escherichia coli* infections. 2005;Philadelphia: Chelsea House Publishers:137p.
48. Pruiboom-Brees IM, Morgan TW, Ackermann MR, Nystrom ED, Samuel JE, Cornick NA, et al. Cattle lack vascular receptors for *Escherichia coli* O157:H7 shiga toxins. *Proceed Nat Acad Sci USA* 2000;97:10325-9.
49. Dean-Nystrom EA, Bosworth BT, O'Brien AD, Moon HW. Bovine infection with *Escherichia coli* O157:H7. In: CAB International 1999 *Escherichia coli* O157:H7 in farm animals (Eds Stewart, C S and Flint, H J). 1999:51-8.
50. Naylor SW, Low C, Besser TE, Mahajan A, Gunn JG, Pearce MC, et al. Lymphoid Follicle-Dense Mucosa at the Terminal Rectum Is the Principal Site of Colonization of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in the Bovine Host. *Infect Immun.* 2003;71:1505-12.
51. Beutin L, Geier D, Steinruck H, Zimmermann S, Scheutz F. Prevalence and some properties of verotoxin (Shiga-like toxin)-producing *Escherichia coli* in seven different species of healthy domestic animals. *J Clin Microbiol.* 1993;31(0095-1137 (Print)):2483-8.
52. Wieler LH, Bauerfeind R, Baljer G. Characterization of Shiga-like toxin producing *Escherichia coli* (SLTEC) isolated from calves with and without diarrhoea. *Zentralbl Bakteriol.* 1992;276(0934-8840 (Print)):243-53.
53. Dean-Nystrom EA, Bosworth BT, Cray JR WC, Moon HW. Pathogenicity of *Escherichia coli* O157:H7 in the Intestines of Neonatal Calves. *Infect Immun.* 1997;65:1842-8.



54. Wray C, Morris JA. Aspects of colibacillosis in farm animals. *J Hyg, Camb.* 1985;95:577-93.
55. Duhamel GE, Moxley RA, Maddox CW, Erickson ED. Enteric infection of a goat with enterohemorrhagic *Escherichia coli* (0103:H2). *J Vet Diagn Invest.* 1992;4:197-200.
56. J.H. Barnes, L.K. Nolan, Vaillancourt JP. Colibacillosis. In: *Diseases of Poultry*, Saif, Y. M., H. J. Barnes, J. R. Glisson, A. M. Fadly, L. R. McDougald and Swayne (Eds). Blackwell Publishing Professional 2008;212 State Avenue, Ames, Iowa 50014, USA:691-732.
57. La Ragione R, Woodward MJ. Virulence factors of *Escherichia coli* serotypes associated with avian colisepticaemia. *Res Vet Sci.* 2002;73(1):27-35.
58. Foxman B. Epidemiology of urinary tract infections: Incidence, morbidity, and economic costs. *AM J Med.* 2003;49(2):53-70.
59. Chen SL, Hung CS, Hung CS, Xu J, Reigstad CS, Magrini V, et al. Identification of genes subject to positive selection in uropathogenic strains of *Escherichia coli*: a comparative genomics approach. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2006;103(0027-8424 (Print)):5977-82.
60. Mariana-Kurkdjian P. Physiologie des infections urinaires. *Méd Thérap/Pédiatr.* 2004;7:167-72.
61. Gaschignard J, Levy C, Romain O, Cohen R, Bingen E, Aujard Y, et al. Neonatal Bacterial Meningitis: 444 Cases in 7 Years. *Pediatr Infect Dis.* 2011;30(1532-0987 (Electronic)):212-7.
62. Amstey MS, Lewin E, Colaice J. Vaginal colonization with invasive *Escherichia coli* during pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 1980;137(0002-9378 (Print)):534-5.
63. Bonacorsi S, Houdoin V, Bingen E. Facteurs de virulence associés à *E. coli* responsable de méningite néonatale. *Archives de Pédiatrie.* 2001;8, Supplement 4(0):726-31.
64. Collyn F, Simonet M. *Escherichia coli*, une bactérie modèle pour appréhender l'émergence des agents infectieux. MAPAR, Article de communications scientifiques 2006:573-6.
65. Escobar-Paramo P, Clermont O, Blanc-Potard A-B, Bui H, Le Bouguenec C, Denamur E. A Specific Genetic Background Is Required for Acquisition and Expression of virulence Factors in *Escherichia coli*. *Mol Biol Evol.* 2004;21:1085-94.

66. Touchon M, Hoede C, Tenaillon O, Barbe V, Baeriswyl S, Bidet P, et al. Organised Genome Dynamics in the *Escherichia coli* Species Results in Highly Diverse Adaptive Paths. *Plos Genet.* 2009;5(1):e1000344.
67. Salipante SJ, Roach DJ, Kitzman JO, Snyder MW, Stackhouse B, Butler-Wu SM, et al. Large-scale genomic sequencing of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strains. *Genome Res.* 2015;25(1):119-28.
68. Anjum MF, Tucker JD, Sprigings KA, Woodward MJ, Ehricht R. Use of miniaturized protein arrays for *Escherichia coli* O serotyping. *Clin Vacc Immun : CVI.* 2006;13(5):561-7.
69. Clermont O, Bonacorsi S, Bingen E. Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. *Appl Environ Microbiol.* 2000;66(10):4555-8.
70. Gordon DM. The ecology of *Escherichia coli*. In: *Escherichia coli: Pathotypes and principles of pathogenesis* Donnenberg, M S (Ed), 2nd Ed Elsevier, Academic Press. 2013:3-20.
71. Clermont O, Christenson JK, Denamur E, Gordon DM. The Clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: improvement of specificity and detection of new phylo-groups. *Environ Microbiol Rep.* 2013;5(1):58 -65.
72. Escobar-Paramo P, Giudicelli C, Parsot C, Denamur E. The evolutionary history of Shigella and enteroinvasive *Escherichia coli* revised. *J Mol Evol.* 2003;57(0022-2844 (Print)):140-8.
73. Vangchhia B, Abraham S, Bell JM, Collignon P, Gibson JS, Ingram PR, et al. Phylogenetic diversity, antimicrobial susceptibility and virulence characteristics of phylogroup F *Escherichia coli* in Australia. *Microbiol.* 2016;162(11):1904-12.
74. Logue CM, Wannemuehler Y, Nicholson BA, Doetkott C, Barbieri NL, Nolan LK. Comparative Analysis of Phylogenetic Assignment of Human and Avian ExPEC and Fecal Commensal *Escherichia coli* Using the (Previous and Revised) Clermont Phylogenetic Typing Methods and its Impact on Avian Pathogenic *Escherichia coli* (APEC) Classification. *Front Microbiol.* 2017; 8:283. doi: 10.3389/fmicb.
75. Adzitey F, Huda N, Ali GRR. Molecular techniques for detecting and typing of bacteria, advantages and application to foodborne pathogens isolated from ducks. *3 Biotech.* 2013;3(2):97-107.

76. Foley SL, Lynne AM, Nayak R. Molecular typing methodologies for microbial source tracking and epidemiological investigations of Gram-negative bacterial foodborne pathogens. *Infect Genet Evol.* 2009;9(4):430-40.
77. Schwartz DC, Cantor CR. Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. *Cell.* 1984;37(1):67-75.
78. Foxman B, Zhang L, Koopman JS, Manning SD, Marrs C. Choosing an appropriate bacterial typing technique for epidemiologic studies. *Epidemiol Perspect Innov.* 2005;2:10.
79. Johnson JR, Russo TA. Molecular epidemiology of extraintestinal pathogenic (uropathogenic) *Escherichia coli*. *Int J Med Microbiol.* 2005;295(6):383-404.
80. Maiden MC, Bygraves JA, Feil E, Morelli G, Russell JE, Urwin R, et al. Multilocus sequence typing: A portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1998;95:3140-5.
81. Enright MC, Spratt BG. Multilocus sequence typing. *Trends in microbiology.* 1999;7(12):482-7.
82. Audebert C, Hot D, Lemoine Y, Caboche S. Le séquençage haut-débit-Vers un diagnostic basé sur la séquence complète du génome de l'agent infectieux. *Méd/Sci.* 2014;30(12):1144-51.
83. Sabat A, Budimir A, Nashev D, Sá-Leão R, Van Dijl J, Laurent F, et al. Overview of molecular typing methods for outbreak detection and epidemiological surveillance. *Euro surveill.* 2013;18(4):20380.
84. Shokoohzadeh L. Molecular methods for bacterial strain typing. *Med Lab J.* 2016;10(2):1-7.
85. Gordon DM, Cowling A. The distribution and genetic structure of *Escherichia coli* in Australian vertebrates: host and geographic effects. *Microbiol.* 2003;149(1350-0872 (Print)):3575-35-86.
86. Quin PJ, Carter ME, Markey B, Carter GR. *Clinical Veterinary Microbiology.* Dublin: Wolfe Publishing. 1994:648p.
87. Duriez P, Clermont O, Bonacorsi S, Bingen E, Chaventré A, Elion J, et al. Commensal *Escherichia coli* isolates are phylogenetically distributed among geographically distinct human populations. *Microbiol.* 2001;147(1350-0872 (Print)):1671-6.

88. Mankin KR, Wang L, Hutchinson L, Marchin. *Escherichia coli* Sorption to Sand and Silt Loam Soil. Transactions of the ASABE. 2007;50:1159-65.
89. Barbieri NL, Oliveira ALd, Tejkowski TM, Pavanelo DB, Matter LB, Pinheiro SRS, et al. Molecular characterization and clonal relationships among *Escherichia coli* strains isolated from broiler chickens with colisepticemia. Foodborne Pathog Dis. 2015;12(1):74-83.
90. Cunha MPV, Saidenberg AB, Moreno AM, Ferreira AJP, Vieira MAM, Gomes TAT, et al. Pandemic extra-intestinal pathogenic *Escherichia coli* (ExPEC) clonal group O6-B2-ST73 as a cause of avian colibacillosis in Brazil. PLoS one. 2017;12(6):e0178970.
91. Djamdjian L, Naas T, Tandé D, Cuzon G, Hanrotel-Saliou C, Nordmann P. CTX-M-93, a CTX-M-variant lacking penicillin hydrolytic activity. Antimicrob Agents Chemother. 2011; 55(5):1861-6.
92. Solà-Ginés M, Cameron-Veas K, Badiola I, Dolz R, Majó N, Dahbi G, et al. Diversity of multi-drug resistant Avian Pathogenic *Escherichia coli* (APEC) causing outbreaks of colibacillosis in broilers during 2012 in Spain. PLoS One. 2015;10(11):e0143191.
93. Stromberg ZR, Johnson JR, Fairbrother JM, Kilbourne J, Van Goor A, Curtiss 3rd R, et al. Evaluation of *Escherichia coli* isolates from healthy chickens to determine their potential risk to poultry and human health. PLoS one. 2017;12(7):e0180599.
94. Mellata M, Johnson J, Curtiss III R. *Escherichia coli* isolates from commercial chicken meat and eggs cause sepsis, meningitis and urinary tract infection in rodent models of human infections. Zoon Pub Health. 2018;65(1):103-13.
95. Caya F, Fairbrother JM, Lessard L, Quessy S. Characterization of the risk to human health of pathogenic *Escherichia coli* isolates from chicken carcasses. J Food Protect. 1999;62(7):741-6.
96. Morabito S, Dell'Omo G, Agrimi U, Schmidt H, Karch H, Cheasty T, et al. Detection and characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in feral pigeons. Vet Microbiol. 2001;82(0378-1135 (Print)):275-83.
97. Asakura H, Makino S, Shirahata T, Tsukamoto T, Kurazono H, Ikeda T, et al. Detection and genetical characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from wild deer. Microbiol Immunol 1998;42(0385-5600 (Print)):815-22.

98. van Elsas JD, Semenov AV, Costa R, Trevors JT. Survival of *Escherichia coli* in the environment: fundamental and public health aspects. *ISME J.* 2011;5(1751-7370 (Electronic)):173–83.
99. Winfield MD, Groisman EA. Role of nonhost environments in the lifestyles of *Salmonella* and *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol.* 2003;69:3687. DOI: 10.1128/AEM.69.7.3687-94.2003.
100. Génereux M, Côté C. Détection et persistance d'*Escherichia coli* dans le sol. Access online: [http://www.wirdaqcca/assets/documents/Publications/documents/genereux-cote-2010\\_fiche\\_persistence\\_ecoli\\_solpdf](http://www.wirdaqcca/assets/documents/Publications/documents/genereux-cote-2010_fiche_persistence_ecoli_solpdf). 2010.
101. Sjogren RE. Prolonged survival of an environmental *Escherichia coli* in laboratory soil microcosms. *Water Air Soil pollut.* 1994;75:389-403.
102. Zhang T, Wang H, Wu L, Lou J, Wu J, Brookes PC, et al. Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in Soils from Jiangsu Province, China. *PLoS ONE* 8(12): e81178 doi:10.1371/journal.pone0081178. 2013.
103. Ishii S, Ksoll WB, Hicks RE, Sadowsky MJ. Presence and Growth of Naturalized *Escherichia coli* in Temperate Soils from Lake Superior Watersheds. *Environ Microbiol.* 2006;72:612-21.
104. Fukushima H, Hoshina K, Gomyoda M. Long-Term Survival of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* O26, O111, and O157 in Bovine Feces. *Appl Environ Microbiol.* 1999;65:5177–81.
105. Mitscherlich E, Marth EH. Microbial survival in the environment: Bacteria and rickettsiae important in human and animal health. Springer-Verlag Berlin Heidelberg New-York Tokyo 802 p. 1984.
106. Nwachuku N, Gerba CP. Occurrence and persistence of *Escherichia coli* O157: H7 in water. *Rev Environ Scie Bio/Technol.* 2008;7(3):267.
107. Gerba CP, McLeod JS. Effect of sediments on the survival of *Escherichia coli* in marine waters. *Appl Environ Microbiol.* 1976;32:114-20.
108. Miyagi K, Omura K, Ogawa A, Hanafusa M, Nakano Y, Morimatsu S, et al. Survival of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157 in marine water and frequent detection of the Shiga toxin gene in marine water samples from an estuary port. *Epidemiol Infect.* 2001;126(0950-2688 (Print)):129-33.

109. Anderson KL, Whitlock JE, Harwood VJ. Persistence and Differential Survival of Fecal Indicator Bacteria in Subtropical Waters and Sediments. *Appl Environ Microbiol.* 2005;71:3041–8.
110. Korajkic A, Wanjugi P, Harwood VJ. Indigenous microbiota and habitat influence *Escherichia coli* survival more than sunlight in simulated aquatic environments. *Appl Environ Microbiol.* 2013;79(1098-5336 (Electronic)):5329-37.
111. Wanjugi P, Harwood VJ. The influence of predation and competition on the survival of commensal and pathogenic fecal bacteria in aquatic habitats. *Environ Microbiol* 2013;15(1462-2920 (Electronic)):517-26.
112. Kerr M, Fitzgerald M, Sheridan JJ, McDowell DA, Blair IS. Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in bottled natural mineral water. *J Appl Microbiol.* 1999;87(1364-5072 (Print)):833-41.
113. Warburton DW, Austin JW, Harrison BH, Sanders G. Survival and recovery of *Escherichia coli* O157:H7 in inoculated bottled water. *J Food Prot.* 1998;61(0362-028X (Print)):948-52.
114. Kaneko M. Chlorination of pathogenic *E. coli* O157. *Water Sci Technol.* 1998;38(12):141-4.
115. Vernozy-Rozand C, Montet MP, Ray-Gueniot S. Présence d'*E. coli* O157:H7 dans l'eau : un problème en santé publique. *Rev Méd Vét.* 2002;153:235-42.
116. Bidet P, Bonarcorsi S, Bingen E. Facteurs de pathogénicité et physiopathologie des *Escherichia coli* extra- intestinaux. *Archives de Pédiatrie.* 2012;19:S80-S92.
117. Ewers C, Janssen T, Wieler LH. [Avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC)]. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* 2003;116(0005-9366 (Print)):381-95.
118. Moon HW. Colonization factor antigens of Enterotoxigenic *Escherichia coli* in animals. *Curr Top Microbiol Immunol.* 1990;151:148-65.
119. Stones D, Krachler A-M. Fatal attraction: how bacterial adhesins affect host signaling and what we can learn from them. *Int J Mol Sci.* 2015;16(2):2626-40.
120. Babai R, Stern BE, Hacker J, Ron EZ. New Fimbrial Gene Cluster of S-Fimbrial Adhesin Family. *Infect Immun.* 2000;68:5901–7.

121. Amabile de Campos T, Stehling EG, Ferreira A, Pestana de Castro AF, Brocchi M, Dias da Silveira W. Adhesion properties, fimbrial expression and PCR detection of adhesin-related genes of avian *Escherichia coli* strains. *Vet Microbiol.* 2005;106(3–4):275-85.
122. Knöbl T, Moreno AM, Paixao R, Gorr TAT, Vieira MAM, da Silva Leite D, et al. Prevalence of Avian Pathogenic *Escherichia coli* (APEC) clone harboring *sfa* gene in Brazil. *Scientific World J.* 2012;doi:10.1100/2012/437342.
123. Klemm P, Christiansen G. Three fim genes required for the regulation of length and mediation of adhesion of *Escherichia coli* type 1 fimbriae. *Mol Gen Genet.* 1987;208(0026-8925 (Print)):439-45.
124. Hahn E, Wild P, Hermanns U, Sebbel P, Glockshuber R, Häner M, et al. Exploring the 3D Molecular Architecture of *Escherichia coli* Type 1 Pili. *J Mol Biol.* 2002;323(5):845-57.
125. Orndorff PE. Chapter 7. *Escherichia coli* type 1 pili. In: *Molecular Genetics Bacterial Pathogenesis* Miller, V L, Kaper, J B, Isberg, R R (Ed), American Society for Microbiology, 1325 Massachusetts Avenue, N W Washington, DC 20005 1994:91-109.
126. Dozois CM, Chanteloup N, Dho-Moulin M, Brée A, Desautels C, Fairbrother JM. Bacterial colonization and in vivo expression of F1 (Type 1) fimbrial antigens in chickens experimentally infected with pathogenic *Escherichia coli*. *Avian Dis.* 1994;38:231-9.
127. Pourbakhsh SA, Boulianne M, Martineau-Doizé B, Fairbrother JM. Virulence mechanisms of avian fimbriated *Escherichia coli* in experimentally inoculated chickens. *Vet Microbiol.* 1997;58(2–4):195-213.
128. Marc D, Arne P, Bree A, Dho-Moulin M. Colonization ability and pathogenic properties of a fim- mutant of an avian strain of *Escherichia coli*. *Res Microbiol.* 1998;149(0923-2508 (Print)):473-85.
129. La Ragione RM, Cooley WA, Woodward MJ. The role of fimbriae and flagella in the adherence of avian strains of *Escherichia coli* O78:K80 to tissue culture cells and tracheal and gut explants. *J Med Microbiol.* 2000;49:327-38.
130. Mellata M, Dho-Moulin M, Dozois CM, Curtiss III R, Lehoux B, Fairbrother JM. Role of avian pathogenic *Escherichia coli* virulence factors in bacterial interaction with chicken heterophils and macrophages. *Infect Immun.* 2003;71(1):494-503.

131. Wooley RE, Gibbs PS, Brown TP, Glisson JR, L. SW, Maurer JJ. Colonization of the chicken trachea by an avirulent avian *Escherichia coli* transformed with plasmid pHK11. *Avian Dis.* 1998;42(0005-2086 (Print)):194-8.
132. Arné P, Marc D, Brée A, Schouler C, Dho-Moulin M. Increased tracheal colonization in chickens without impairing pathogenic properties of avian pathogenic *Escherichia coli* MT78 with a fimH deletion. *Avian Dis.* 2000;44:343-55.
133. Dozois CM, Pourbakhsh SA, Fairbrother JM. Expression of P and type 1 (F1 ) fimbriae in pathogenic *Escherichia coli* from poultry. *Vet Microbiol.* 1995;45:297-309.
134. Edelman S, Leskelä S, Ron E, Apajalahti J, Korhonen TK. In vitro adhesion of an avian pathogenic *Escherichia coli* O78 strain to surfaces of the chicken intestinal tract and to ileal mucus. *Vet Microbiol.* 2003;91(1):41-56.
135. Zhao L, Gao S, Huan H, Xu X, Zhu X, Yang W, et al. Comparison of virulence factors and expression of specific genes between uropathogenic *Escherichia coli* and avian pathogenic *E. coli* in a murine urinary tract infection model and a chicken challenge model. *Microbiol.* 2009;155:1634–44.
136. Knöbl T, Gomes TAT, Vieira MAM, Ferreira F, Bottino JA, Ferreira AJP. Some adhesins of avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) isolated from septicemic poultry in Brazil. *Braz J Microbiol.* 2006;37:379-84.
137. Janßen T, Schwarz C, Preikschat P, Voss M, Philipp H-C, Wieler LH. Virulence-associated genes in avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) isolated from internal organs of poultry having died from colibacillosis. *Int J Med Microbiol.* 2001;291(5):371-8.
138. Moulin-Schouleur M, Reperant M, Laurent S, Bree A, Mignon-Grasteau S, Germon P, et al. Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strains of avian and human origin: link between phylogenetic relationships and common virulence patterns. *J Clin Microbiol.* 2007;45(10):3366-76.
139. Naveh MW, Zusman T, Skutelsky E, Ron EZ. Adherence pili in avian strains of *Escherichia coli*: effect on pathogenicity. *Avian Dis.* 1984;28(0005-2086 (Print)):651-61.
140. Mellata M, Dho-Moulin M, Dozois CM, Curtiss Rr, B. L, Fairbrother JM. Role of avian pathogenic *Escherichia coli* virulence factors in bacterial interaction with chicken heterophils and macrophages. *Infect Immun.* 2003;71(0019-9567 (Print)):494-503.



141. Blum G, Ott M, Lischewski A, Ritter A, Imrich H, Tschape H, et al. Excision of large DNA regions termed pathogenicity islands from tRNA-specific loci in the chromosome of an *Escherichia coli* wild-type pathogen. *Infect Immun.* 1994;62(0019-9567 (Print)):606-14.
142. Strömberg N, Marklund BI, Lund B, Ilver D, Hamers A, Gaastra W, et al. Host-specificity of uropathogenic *Escherichia coli* depends on differences in binding specificity to Gal alpha 1-4Gal-containing isoreceptors. *Embo J.* 1990;9(0261-4189 (Print)):2001-10.
143. Johnson JR, Brown JJ. A Novel Multiply Primed Polymerase Chain Reaction Assay for Identification of Variant papG Genes Encoding the Gal(alpha-4)Gal-Binding PapG Adhesins of *Escherichia coli*. *J Infect Dis.* 1996;173:920-6.
144. Dozois CM, Fairbrother JM, Harel J, Bosse M. pap- and pil-related DNA sequences and other virulence determinants associated with *Escherichia coli* isolated from septicemic chickens and turkeys. *Infect Immun.* 1992;60(7):2648-56.
145. Ewers C, Janssen T, Kiessling S, Philipp HC, Wieler LH. Molecular epidemiology of avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) isolated from colisepticemia in poultry. *Vet Microbiol.* 2004;104(1-2):91-101.
146. Yerushalmi Z, Smorodinsky NI, Naveh MW, Ron EZ. Adherence pili of avian strains of *Escherichia coli* O78. *Infect Immun.* 1990;58:1129-31.
147. Maurer JJ, Brown TP, Steffens WL, Thayer SG. The occurrence of ambient temperature-regulated adhesins, curli, and temperature-sensitive haemagglutinin Tsh among avian *Escherichia coli*. *Avian Dis.* 1998;42:106-18.
148. Kostakioti M, Stathopoulos C. Functional Analysis of the Tsh Autotransporter from an Avian Pathogenic *Escherichia coli* Strain. *Infect Immun.* 2004;72:5548-54.
149. Olsén A, Jonsson A, Normark S. Fibronectin binding mediated by a novel class of surface organelles on *Escherichia coli*. *Nature.* 1989;338: 652 - 5.
150. Chapman MR, Robinson LS, Pinkner JS, Roth R, Heuser J, Hammar M, et al. Role of *Escherichia coli* curli operons in directing amyloid fiber formation. *Science.* 2002;295(1095-9203 (Electronic)):851-5.
151. Hammer ND, McGuffie BA, Zhou Y, Badtke MP, Reinke AA, Brännström K, et al. The C-terminal repeating units of CsgB direct bacterial functional amyloid nucleation. *J Mol Biol.* 2012;422(1089-8638 (Electronic)):376-89.

152. Olsén A, Arnqvist A, Hammar M, Normark S, Normark S. Environmental regulation of curli production in *Escherichia coli*. *Infect Agents Dis.* 1993;2(1056-2044 (Print)):272-4.
153. Hammar M, A. A, Bian Z, Olsen A, Normark S. Expression of two *csg* operons is required for production of fibronectin- and congo red-binding curli polymers in *Escherichia coli* K-12. *Mol Microbiol.* 1995;18(0950-382X (Print)):661-70.
154. Olsén A, Jo Wick M, Mörgelin M, Björck L. Curli, fibrous surface proteins of *Escherichia coli*, interact with Major Histocompatibility Complex Class I molecules. *Infect Immun.* 1998;66:944–9.
155. La Ragione RM, Collighan RJ, Woodward MJ. Non-curliation of *Escherichia coli* O78:K80 isolates associated with IS1 insertion in *csgB* and reduced persistence in poultry infection. *FEMS Microbiol Lett.* 1999;175:247^53.
156. Collison SK, Doig PC, Doran JL, Clouthier S, Trust TJ, Kay WW. Thin, aggregative fimbriae mediate binding of *Salmonella enteritidis* to fibronectin. *J Bacteriol.* 1993;175:12-8.
157. Olsén A, Jonsson A, Normark S. Fibronectin binding mediated by a novel class of surface organelles on *Escherichia coli*. *Nature.* 1989;338(0028-0836 (Print)):652-5.
158. Gao Q, Wang X, Xu H, Xu Y, Ling J, Zhang D, et al. Roles of iron acquisition systems in virulence of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: salmochelin and aerobactin contribute more to virulence than heme in a chicken infection model. *BMC Microbiol.* 2012;12:doi:10.1186/471-2180-12-143.
159. Lafont J-P, Dho M, D'Hauteville HM, Brée A, Sansonetti PJ. Presence and Expression of Aerobactin Genes in Virulent Avian Strains of *Escherichia coli*. *Infect Immun.* 1987;55:193-7.
160. Johnson JR. Virulence factors in *Escherichia coli* urinary tract infection. *Clin Microbiol Rev* 1991;4(0893-8512 (Print)):80-128.
161. Emery DA, Nagaraja KV, Shaw DP, Newman JA, White DG. Virulence factors of *Escherichia coli* associated with colisepticemia in chickens and turkeys. *Avian Dis.* 1992;36:504-11.
162. Kanamaru S, Kurazono H, Ishitoya S, Terai A, Habuchi T, Nakano M, et al. Distribution and genetic association of putative uropathogenic virulence factors *iroN*, *iha*, *kpsMT*, *ompT* and *usp* in *Escherichia coli* isolated from urinary tract infections in Japan. *J Urol.* 2003;170:2490–3.

163. Mora A, Lopez C, Dabhi G, Blanco M, Blanco JE, Alonso MP, et al. Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* O1:K1:H7/NM from human and avian origin: detection of clonal groups B2 ST95 and D ST59 with different host distribution. BMC Microbiol. 2009;9:132.
164. Russo TA. Chapter 14 - Capsule and Lipopolysaccharide. In: Donnenberg MS, editor. *Escherichia Coli*, virulence mechanisms and a versatile pathogen. San Diego: Academic Press; 2002. p. 379-403.
165. Orskov F, Orskov I. *Escherichia coli* serotyping and disease in man and animals. Can J Microbiol. 1992;38(0008-4166 (Print)):699-704.
166. Whitfield C, Roberts IS. Structure, assembly and regulation of expression of capsules in *Escherichia coli*. Mol Microbiol. 1999;31(0950-382X (Print)):1307-19.
167. Johnson JR, O'Bryan TT. Detection of the *Escherichia coli* group 2 polysaccharide capsule synthesis gene kpsM by a rapid and specific PCR-based assay. J. Clin Microbiol. 2004;42(4):1773-6.
168. Ngeleka M, Kwaga JKP, White DG, Whittam TS, Riddell C, Goodhope R, et al. *Escherichia coli* Cellulitis in Broiler Chickens: Clonal Relationships among Strains and Analysis of Virulence-Associated Factors of Isolates from Diseased Birds. Infect Immun. 1996;64:3118-26.
169. Gomis SM, Riddell C, Potter AA, Allan BJ. Phenotypic and genotypic characterization of virulence factors of *Escherichia coli* isolated from broiler chickens with simultaneous occurrence of cellulitis and other colibacillosis lesions. Can J Vet Res. 2000;65:1-6.
170. De Brito BG, Gaziri CLJ, Vidotto MC. Virulence Factors and Clonal Relationships among *Escherichia coli* Strains Isolated from Broiler Chickens with Cellulitis. Infect Immun. 2003;71:4175-7.
171. Rietschel ET, Kirikae T, Schade FU, Mamat U, Schmidt G, Loppnow H, et al. Bacterial endotoxin: molecular relationships of structure to activity and function. The FASEB J. 1994;8:217-25.
172. Szalo IM, Taminiau B, Mainil J. Le lipopolysaccharide d'*Escherichia coli* : structure, biosynthèse et rôles. Ann Méd Vét. 2006;150:108-24.

173. Raetz CR. Bacterial endotoxins: extraordinary lipids that activate eucaryotic signal transduction. *J Bacteriol.* 1993;175(0021-9193 (Print)):5745-53.
174. Parreira VR, Arns CW, Yano T. Virulence factors of avian *Escherichia coli* associated with swollen head syndrome. *Avian Pathol.* 1998;27:148-54.
175. Quel NG, Aragão AZB, Salvadori MR, Farias AS, Joazeiro PP, Santos LMB, et al. Cellulitis lesions in broiler chickens are induced by *Escherichia coli* Vacuolating Factor (ECVF). *Vet Microbiol.* 2013;162(2-4):866-72.
176. Blanco JE, Blanco M, Mora A, Blanco J. Production of Toxins (Enterotoxins, Verotoxins, and Necrotoxins) and Colicins by *Escherichia coli* Strains Isolated from Septicemic and Healthy Chickens: Relationship with *In Vivo* Pathogenicity. *J Clin Microbiol.* 1997;35:2953-7.
177. Maluta RP, Gatti MSV, Joazeiro PP, De Paiva JB, Rojas TCG, Silveira F, et al. Avian extraintestinal *Escherichia coli* exhibits enterotoxigenic-like activity in the *in vivo* rabbit ligated ileal loop assay. *Foodborne Pathog Dis.* 2014;11(6):484-9.
178. Binns MM, Davies DL, Hardy KG. Cloned fragments of the plasmid ColV,I-K94 specifying virulence and serum resistance. *Nature.* 1979;279(0028-0836 (Print)):778-81.
179. Johnson TJ, Wannemuehler YM, Nolan LK. Evolution of the iss Gene in *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol.* 2008;74:2360-9.
180. McPeake SJ, Smyth Ja Fau - Ball HJ, Ball HJ. Characterisation of avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) associated with colisepticaemia compared to faecal isolates from healthy birds. *Vet Microbiol.* 2005;110(0378-1135 (Print)):245-53.
181. Ellis MG, Arp LH, Lamont SJ. Serum resistance and virulence of *Escherichia coli* isolated from turkeys. *Am J Vet Res.* 1988;49(0002-9645 (Print)):2034-7.
182. Allan BJ, van den Hurk JV, Potter AA. Characterization of *Escherichia coli* isolated from cases of avian colibacillosis. *Can J Vet Res.* 1993;57(3):146-51.
183. Mellata M, Dho-Moulin M, Dozois CM, Curtiss III R, Brown PK, Arné P, et al. Role of Virulence Factors in Resistance of Avian Pathogenic *Escherichia coli* to Serum and in Pathogenicity. *Infect Immun.* 2003;71:536-40.
184. Moll A, Manning PA, Timmis KN. Plasmid-Determined Resistance to Serum Bactericidal Activity: a Major Outer Membrane Protein, the traT Gene Product, Is

- Responsible for Plasmid-Specified Serum Resistance in *Escherichia coli*. *Infect Immun.* 1980;28:359-67.
185. Agüero ME, Aron L, DeLuca AG, Timmis KN, Cabello FC. A plasmid-encoded outer membrane protein, TraT, enhances resistance of *Escherichia coli* to phagocytosis. *Infect Immun.* 1984;46(0019-9567 (Print)):740-6.
186. Pramoonjago P, Kaneko M, Kinoshita T, Ohtsubo E, Takeda J, Hong KS, et al. Role of TraT protein, an anticomplementary protein produced in *Escherichia coli* by R100 factor, in serum resistance. *J Immunol.* 1992;148(0022-1767 (Print)):827-36.
187. Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev.* 2002;15(2):167-93.
188. Watnick P, Kolter R. Biofilm, city of microbes. *J Bacteriol.* 2000;182(10):2675-9.
189. Jefferson KK. What drives bacteria to produce a biofilm? *FEMS Microbiol Lett.* 2004;236(2):163-73.
190. Vogeleeer P, Tremblay YD, Mafu AA, Jacques M, Harel J. Life on the outside: role of biofilms in environmental persistence of Shiga-toxin producing *Escherichia coli*. *Front Microbiol.* 2015; 5:317. doi: 10.3389/fmicb.2014.00317.
191. Gyles CL, Fairbrother JM. *Escherichia coli*. In: Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals, 4th Ed Gyles, C L, Prescott, J F, Songer, J G, Thoen, C O (Eds) 2010 Blackwell Publishing, 2121 State Avenue, Ames, Iowa 50014-8300, USA. 2010;267-298.
192. Kabir S. Avian colibacillosis and salmonellosis: a closer look at epidemiology, pathogenesis, diagnosis, control and public health concerns. *Intl J Environ Res Pub Health.* 2010;7(1):89-114.
193. Norton RA. Avian cellulitis. *World's poultry Sci J.* 1997;53:337-49.
194. Elfadil AA, Vaillancourt J-P, Meek AH. Farm management risk factors associated with cellulitis in broiler chickens in southern Ontario. *Avian Dis.* 1996;40:699-706.
195. Hafez HM, Löhren U. Swollen head syndrome: clinical observations and serological examinations in West Germany. *Dtsch Tierärztl Wochenschr* 1990;97(0341-6593 (Print)):322-4.
196. Nakamura K, Mase M, Tanimura N, Yamaguchi S, Nakazawa M, Yuasa N. Swollen head syndrome in broiler chickens in Japan: Its pathology, microbiology and biochemistry. *Avian Pathol.* 1997;26(0307-9457 (Print)):139-54.

197. McEwen SA, Fedorka-Cray PJ. Antimicrobial use and resistance in animals. *Clin Infect Dis*. 2002;34(Supplement\_3):S93-S106.
198. Jones F, Ricke S. Observations on the history of the development of antimicrobials and their use in poultry feeds. *Poultry Sci*. 2003;82(4):613-7.
199. Rosengren LB, Gow SP, Weese JS. Antimicrobial use and resistance in pigs and chickens: A review of the science, policy and control practices from farm to slaughter—executive summary. *Can J Infect Dis Med Microbiol*. 2010;21(3):123-4.
200. Bada-Alambedji R, Fofana A, Seydi M, Akakpo AJ. Antimicrobial resistance of *Salmonella* isolated from poultry carcasses in Dakar (Senegal). *Braz J Microbiol*. 2006;37(4):510-5.
201. Van Cuong N, Nhung NT, Nghia NH, Hoa NTM, Trung NV, Thwaites G, et al. Antimicrobial consumption in medicated feeds in vietnamese pig and poultry production. *EcoHealth*. 2016;13(3):490-8.
202. Chevalier P, Dutil L. L'usage des substances antimicrobiennes en production animale: position des experts et des gouvernements. Quebec: Institut National de Santé Publique du Québec. 2012.
203. Fluit AC, Visser MR, Schmitz FJ. Molecular detection of antimicrobial resistance. *Clin Microbiol Rev*. 2001;14(0893-8512 (Print)):836-71.
204. Bridges BA. Hypermutation in bacteria and other cellular systems. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B: Biological Sciences*. 2001;356(1405):29-39.
205. Partridge SR, Kwong SM, Firth N, Jensen SO. Mobile genetic elements associated with antimicrobial resistance. *Clin Microbiol Rev*. 2018;31(4):e00088-17.
206. Magalhães ML, Blanchard JS. Aminoglycosides: Mechanisms of Action and Resistance. In: *Antimicrobial drug resistance Volume 1: Mechanisms of drug resistance* Mayers, D L, Lerner, S A, Ouellette, M, Sobel, J D (Éds). 2009:171-81.
207. Llano-Sotelo B, Azucena Jr EF, Kotra LP, Mobashery S, Chow CS. Aminoglycosides Modified by Resistance Enzymes Display Diminished Binding to the Bacterial Ribosomal Aminoacyl-tRNA Site. *Chemistry & Biology*. 2002;9(4):455-63.
208. Fofana A, Bada Alambedji R, Seydi M, Akakpo AJ. [Antibioresistance of *Escherichia coli* strains isolated from raw chicken meat in Senegal]. *Dakar Med*. 2006;51(1):57-62.

209. Yang H, Chen S, White DG, Zhao S, McDermott P, Walker R, et al. Characterization of multiple-antimicrobial-resistant *Escherichia coli* isolates from diseased chickens and swine in China. *J Clin Microbiol.* 2004;42(8):3483-9.
210. Varga C, Brash ML, Slavic D, Boerlin P, Ouckama R, Weis A, et al. Evaluating Virulence-Associated Genes and Antimicrobial Resistance of Avian Pathogenic *Escherichia coli* Isolates from Broiler and Broiler Breeder Chickens in Ontario, Canada. *Avian Dis.* 2018;62(3):291-9.
211. Johnson TJ, Logue CM, Johnson JR, Kuskowski MA, Sherwood JS, Barnes HJ, et al. Associations between multidrug resistance, plasmid content, and virulence potential among extraintestinal pathogenic and commensal *Escherichia coli* from humans and poultry. *Foodborne Pathog Dis.* 2012;9(1):37-46.
212. Usui M, Ozawa S, Onozato H, Kuge R, Obata Y, Uemae T, et al. Antimicrobial Susceptibility of Indicator Bacteria Isolated from Chickens in Southeast Asian Countries (Vietnam, Indonesia and Thailand). *J Vet Med Sci.* 2014;76:685–92.
213. Agunos A, Arsenault RK, Avery BP, Deckert AE, Gow SP, Janecko N, et al. Changes in antimicrobial resistance levels among *Escherichia coli*, *Salmonella*, and *Campylobacter* in Ontario broiler chickens between 2003 and 2015. *Can J Vet Res.* 2018;82(3):163-77.
214. Boulianne M, Arsenault J, Daignault D, Archambault M, Letellier A, Dutil L. Drug use and antimicrobial resistance among *Escherichia coli* and *Enterococcus* spp. isolates from chicken and turkey flocks slaughtered in Quebec, Canada. *Can J Veterinary Res.* 2016;80(1):49-59.
215. Yassin AK, Gong J, Kelly P, Lu G, Guardabassi L, Wei L, et al. Antimicrobial resistance in clinical *Escherichia coli* isolates from poultry and livestock, China. *PloS one.* 2017;12(9):e0185326.
216. Li Y, Chen L, Wu X, Huo S. Molecular characterization of multidrug-resistant avian pathogenic *Escherichia coli* isolated from septicemic broilers. *Poultry Sci.* 2015;94(4):601-11.
217. Sköld O. Sulfonamides and Trimethoprim. In: Antimicrobial drug resistance Volume 1: Mechanisms of drug resistance Mayers, D L, Lerner, S A, Ouellette, M, Sobel, J D (Éds). 2009:259-69.
218. Goldstein FW. Sulfamides et triméthoprime. In: Antibiogramme 2è édition Courvalin, P, Leclercq, R, Bingen, E Éditions ESKA 2006. 2006:341-8.

219. Tadesse DA, Zhao S, Tong E, Ayers S, Singh A, Bartholomew MJ, et al. Antimicrobial Drug Resistance in *Escherichia coli* from Humans and Food Animals, United States, 1950–2002. *Emerg Infect Dis.* 2012;18:741-9.
220. Enne VI, Livermore DM, Stephens P, Hall LMC. Persistence of sulphonamide resistance in *Escherichia coli* in the UK despite national prescribing restriction. *The Lancet.* 2001;357(9265):1325-8.
221. Huovinen P. Trimethoprim resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* 1987;31(10):1451.
222. Taur Y, Smith MA. Adherence to the Infectious Diseases Society of America guidelines in the treatment of uncomplicated urinary tract infection. *Clin Infect Dis.* 2007;44(1537-6591 (Electronic)):769-74.
223. Kozak GK, Pearl DL, Parkman J, Reid-Smith RJ, Deckert A, Boerlin P. Distribution of Sulfonamide Resistance Genes in *Escherichia coli* and *Salmonella* Isolates from Swine and Chickens at Abattoirs in Ontario and Québec, Canada. *Appl Environ Microbiol.* 2009;75:5999. DOI: 10.1128/AEM.02844-08. .
224. Blaettler L, Mertz D, Frei R, Elzi L, Widmer AF, Battegay M, et al. Secular Trend and Risk Factors for Antimicrobial Resistance in *Escherichia coli* Isolates in Switzerland 1997–2007. *Infection.* 2009;37:534-9.
225. Schwarz S, Kehrenberg C, Doublet B, Cloeckaert A. Molecular basis of bacterial resistance to chloramphenicol and florfenicol. *FEMS Microbiol Rev.* 2004;28(5):519-42.
226. Gouvêa R, dos Santos F, de Aquino M. Fluoroquinolones in industrial poultry production, bacterial resistance and food residues: a review. *Revista Brasileira de Ciência Avícola.* 2015;17(1):1-10.
227. Blanco JE, Blanco M, Mora A, Blanco J. Prevalence of Bacterial Resistance to Quinolones and Other Antimicrobials among Avian *Escherichia coli* Strains Isolated from Septicemic and Healthy Chickens in Spain. *J Clin Microbiol.* 1997;35:2184–5.
228. Soussy C-J. Quinolones et bactéries à Gram négatif. In: *Antibiogramme 2è édition Courvalin, P, Leclercq, R, Bingen, E Éditions ESKA* 2006. 2006:263-77.
229. Strahilevitz J, Jacoby GA, Hooper DC, Robicsek A. Plasmid-mediated quinolone resistance: a multifaceted threat. *Clin Microbiol Rev.* 2009;22(4):664-89.



230. Huong CTT, Duong NTH, Hien NTT. Contamination of some bacteria isolated from chicken meat in retail markets in Hanoi and examination of the antibiotic resistance ability of *Salmonella* and *E. coli* strains isolated J Sci Dev. 2009;7:181 - 6.
231. CIPARS. Figure 15. Resistance to antimicrobials in *Escherichia coli* isolates from chickens; Abattoir Surveillance, 2009. <http://www.phac-aspc.gc.ca/cipars-picra/2009/1-eng.php>. 2009;Access online: .
232. Poyart C. Tétracyclines. In: Antibiogramme 2<sup>e</sup> édition Courvalin, P, Leclercq, R, Bingen, E Éditions ESKA 2006. 2006:325-33.
233. Chopra I, Roberts M. Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. Microbiol Mol Biol Rev. 2001;65(2):232-60.
234. Falagas ME, Kasiakou SK, Saravolatz LD. Colistin: the revival of polymyxins for the management of multidrug-resistant gram-negative bacterial infections. Clin Infect Dis. 2005;40(9):1333-41.
235. Rhouma M, Beaudry F, Thériault W, Letellier A. Colistin in pig production: chemistry, mechanism of antibacterial action, microbial resistance emergence, and one health perspectives. Front Microbiol. 2016;7.
236. Kempf I, Jouy E, Chauvin C. Colistin use and colistin resistance in bacteria from animals. Int J Antimicrob Agents. 2016;48(6):598-606.
237. Liu Y-Y, Wang Y, Walsh TR, Yi L-X, Zhang R, Spencer J, et al. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. Lancet Infect Dis. 2016;16(2):161-8.
238. Wang X, Wang Y, Zhou Y, Li J, Yin W, Wang S, et al. Emergence of a novel mobile colistin resistance gene, *mcr-8*, in NDM-producing *Klebsiella pneumoniae*. Emerg Microbes Infect. 2018;7(1):122.
239. Bialvaei AZ, Samadi Kafil H. Colistin, mechanisms and prevalence of resistance. Current Med Res Opinion. 2015;31(4):707-21.
240. Poirel L, Jayol A, Nordmann P. Polymyxins: antibacterial activity, susceptibility testing, and resistance mechanisms encoded by plasmids or chromosomes. Clin Microbiol Rev. 2017;30(2):557-96.

241. Bonnet C.  $\beta$ -lactamines et Entérobactéries. In: AntibioGramme 2<sup>e</sup> édition Courvalin, P, Leclercq, R, Bingen, E Éditions ESKA 2006. 2006:141-62.
242. Petty NK, Zakour NLB, Stanton-Cook M, Skippington E, Totsika M, Forde BM, et al. Global dissemination of a multidrug resistant *Escherichia coli* clone. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2014;111(15):5694-9.
243. Woodford N, Ward ME, Kaufmann ME, Turton J, Fagan EJ, James D, et al. Community and hospital spread of *Escherichia coli* producing CTX-M extended-spectrum beta-lactamases in the UK. J Antimicrob Chemother. 2004;54(0305-7453 (Print)):735-43.
244. Ruppé E, Woerther P-L, Diop A, Sene A-M, Da Costa A, Arlet G, et al. Carriage of CTX-M-15-Producing *Escherichia coli* Isolates among Children Living in a Remote Village in Senegal. Antimicrob Agents Chemother. 2009;3135-3137.
245. Li L, Jiang Z-G, Xia L-N, Shen J-Z, Dai L, Wang Y, et al. Characterization of antimicrobial resistance and molecular determinants of beta-lactamase in *Escherichia coli* isolated from chickens in China during 1970–2007. Vet Microbiol. 2010;144(3–4):505-10.
246. Briñas L, Moreno MA, Zarazaga M, Porrero C, Sáenz Y, Garcia M, et al. Detection of CMY-2, CTX-M-14, and SHV-12 beta-lactamases in *Escherichia coli* fecal-sample isolates from healthy chickens. Antimicrob Agents Chemother. 2003;47(0066-4804 (Print)):2056-8.
247. Randall LP, Clouting C, Horton RA, Coldham NG, Wu G, Clifton-Hadley FA, et al. Prevalence of *Escherichia coli* carrying extended-spectrum beta-lactamases (CTX-M and TEM-52) from broiler chickens and turkeys in Great Britain between 2006 and 2009. J Antimicrob Chemother. 2011;66(1460-2091 (Electronic)):86-95.
248. Cortes P, Blanc V, Mora A, Dahbi G, Blanco JE, Blanco M, et al. Isolation and characterization of potentially pathogenic antimicrobial-resistant *Escherichia coli* strains from chicken and pig farms in Spain. Appl Environ Microbiol. 2010;76(1098-5336 (Electronic)):2799–805.
249. Jacoby GA. AmpC  $\beta$ -Lactamases. Clin Microbiol Rev. 2009;22:161–82.
250. Carattoli A. Plasmids in Gram negatives: molecular typing of resistance plasmids. Int J Med Microbiol. 2011;301(1618-0607 (Electronic)):654-8.
251. Mataseje LF, Baudry PJ, Zhanel GG, Morck DW, Read RR, Louie M, et al. Comparison of CMY-2 plasmids isolated from human, animal, and environmental

*Escherichia coli* and *Salmonella* spp. from Canada. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2010;67(4):387-91.

252. Baudry PJ, Mataseje L, Zhanel GG, Hoban DJ, Mulvey MR. Characterization of plasmids encoding CMY-2 AmpC beta-lactamases from *Escherichia coli* in Canadian intensive care units. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2009;65(1879-0070 (Electronic)):379–83.

253. Marsik FJ, Nambiar S. Review of carbapenemases and AmpC-beta lactamases. *Pediatr Infect Dis*. 2011;30(1532-0987 (Electronic)):1094-5.

254. Carattoli A. Resistance plasmid families in *Enterobacteriaceae*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009;53:2227–38.

255. Poirel L, Bonnin RA, Nordmann P. Genetic features of the widespread plasmid coding for the carbapenemase OXA-48. *Antimicrobial Agents Chemother*. 2012;56(1):559-62.

256. Fischer J, Rodriguez I, Schmoger S, Friese A, Roesler U, Helmuth R, et al. *Escherichia coli* producing VIM-1 carbapenemase isolated on a pig farm. *J Antimicrob Chemother*. 2012;67:1793-5.

257. Ahmad K, Khattak F, Ali A, Rahat S, Noor S, Mahsood N, et al. Carbapenemases and Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase-Producing Multidrug-Resistant *Escherichia coli* Isolated from Retail Chicken in Peshawar: First Report from Pakistan. *J Food Protect*. 2018;81(8):1339-45.

258. Roschanski N, Fischer J, Falgenhauer L, Pietsch M, Guenther S, Kreienbrock L, et al. Retrospective Analysis of Bacterial Cultures Sampled in German Chicken-Fattening Farms During the Years 2011–2012 Revealed Additional VIM-1 Carbapenemase-Producing *Escherichia coli* and a Serologically Rough *Salmonella enterica* Serovar Infantis. *Frontiers in microbiology*. 2018;9:538.

259. Datta N, Hedges RW. Compatibility Groups among  $\phi$ - R Factors. *Nature*. 1971;234(5326):222-3.

260. Holmes AH, Moore LS, Sundsfjord A, Steinbakk M, Regmi S, Karkey A, et al. Understanding the mechanisms and drivers of antimicrobial resistance. *Lancet*. 2016;387(10014):176-87.

261. Johnson TJ, Giddings CW, Horne SM, Gibbs PS, Wooley RE, Skyberg J, et al. Location of Increased Serum Survival Gene and Selected Virulence Traits on a Conjugative R Plasmid in an avian *Escherichia coli* Isolate. *Avian Dis*. 2002;46:342-52.

262. Fricke WF, F. MP, Mammel MK, Zhao S, Johnson TJ, Rasko DA, et al. Antimicrobial resistance-conferring plasmids with similarity to virulence plasmids from avian pathogenic *Escherichia coli* strains in *Salmonella enterica* serovar Kentucky isolates from poultry. *Appl Environ Microbiol.* 2009;75(1098-5336 (Electronic)):5963-71.
263. Johnson TJ, Nolan LK. Pathogenomics of the Virulence Plasmids of *Escherichia coli*. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2009;73:750–74.
264. Johnson TJ. Multiple Antimicrobial Resistance Region of a Putative Virulence Plasmid from an *Escherichia coli* Isolate Incriminated in Avian Colibacillosis. *Avian Dis.* 2004;48:351-60.
265. Sun H, Li S, Xie Z, Yang F, Sun Y, Zhu Y, et al. A novel multidrug resistance plasmid isolated from an *Escherichia coli* strain resistant to aminoglycosides. *J Antimicrob Chemother.* 2012;doi:10.1093/jac/dks107(1460-2091 (Electronic)).
266. Pan Y-S, Yuan L, Zong Z-Y, Liu J-H, Wang L-F, Hu G-Z. A multidrug-resistance region containing *bla<sub>CTX-M-65</sub>*, *fosA3* and *rmtB* on conjugative IncFII plasmids in *Escherichia coli* ST117 isolates from chicken. *J Med Microbiol.* 2014;63:485-8.
267. Bortolaia V, Larsen J, Damborg P, Guardabassi L. Potential pathogenicity and host range of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* isolates from healthy poultry. *Appl Environ Microbiol.* 2011;77(16):5830-3.
268. Chabbert Y, Scavizzi M, Witchitz J, Gerbaud G, Bouanchaud D. Incompatibility groups and the classification of *fi*- resistance factors. *J Bacteriol.* 1972;112(2):666-75.
269. Wooley RE, Gibbs PS, Dickerson HW, Brown J, Nolan LK. Analysis of plasmids cloned from a virulent avian *Escherichia coli* and transformed into *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ . *Avian Dis.* 1996;40:533-9.
270. Mellata M, Ameiss K, Mo H, Curtiss III R. Characterization of the Contribution to Virulence of Three Large Plasmids of Avian Pathogenic *Escherichia coli*  $\chi$ 7122 (O78:K80:H9). *Infect Immun.* 2010;78:1528–41.
271. Johnson TJ, Wannemuehler YM, Johnson SJ, Logue CM, White DG, Doetkott C, et al. Plasmid replicon typing of commensal and pathogenic *Escherichia coli* isolates. *Appl Environ Microbiol.* 2007;73(0099-2240 (Print)):1976-83.

272. Bonnet C, Diarrassouba F, Brousseau R, Masson L, Topp E, Diarra MS. Pathotype and antibiotic resistance gene distributions of *Escherichia coli* isolates from broiler chickens raised on antimicrobial-supplemented diets. *Appl Environ Microbiol.* 2009;75(22):6955-62.
273. Waters VL, Crosa JH. Colicin V virulence plasmids. *Microbiol Rev.* 1991;55:437-50.
274. Johnson TJ, Siek KE, Johnson SJ, Nolan LK. DNA Sequence of a ColV Plasmid and Prevalence of Selected Plasmid-Encoded Virulence Genes among Avian *Escherichia coli* Strains. *J Bacteriol.* 2006;188:745–58.
275. Ojeniyi A. Direct transmission of *Escherichia coli* from poultry to humans. *Epidemiology & Infection.* 1989;103(3):513-22.
276. Linton AH, HOWE K, Bennett P, Richmond M, Whiteside E. The colonization of the human gut by antibiotic resistant *Escherichia coli* from chickens. *J Appl Bacteriol.* 1977;43(3):465-9.
277. Van den Bogaard A, London N, Driessen C, Stobberingh E. Antibiotic resistance of faecal *Escherichia coli* in poultry, poultry farmers and poultry slaughterers. *J Antimicrob Chemother.* 2001;47(6):763-71.
278. Szmolka A, Nagy B. Multidrug resistant commensal *Escherichia coli* in animals and its impact for public health. *Front Microbiol.* 2013;4:258.
279. Zhang L, Huang Y, Zhou Y, Buckley T, Wang HH. Antibiotic administration routes significantly influence the levels of antibiotic resistance in gut microbiota. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013:AAC. 00670-13.
280. Mo SS, Kristoffersen AB, Sunde M, Nødtvedt A, Norström M. Risk factors for occurrence of cephalosporin-resistant *Escherichia coli* in Norwegian broiler flocks. *Prev Vet Med.* 2016;130:112-8.
281. Vanderkerchove D, de Herdt P, Laevens H, Pasmans F. Risk factors associated with colibacillosis outbreaks in caged layer flock. *Avian Pathol.* 2004;33:337-42.
282. dos Santos Alves T, Lara GHB, Maluta RP, Ribeiro MG, da Silva Leite D. Carrier flies of multidrug-resistant *Escherichia coli* as potential dissemination agent in dairy farm environment. *Sci Total Environ.* 2018;633:1345-51.
283. Beytur A, Yakupogullari Y, Oguz F, Otlu B, Kaysadu H. Oral Amoxicillin-Clavulanic Acid Treatment in Urinary Tract Infections Caused by Extended-Spectrum Beta-Lactamase-Producing Organisms. *Jundishapur J Microbiol.* 2015;8(1).

284. Paauw A, Verhoef J, Fluit AC, Blok HE, Hopmans TE, Troelstra A, et al. Failure to control an outbreak of *qnrAI*-positive multidrug-resistant *Enterobacter cloacae* infection despite adequate implementation of recommended infection control measures. *J Clin Microbiol.* 2007;45(5):1420-5.
285. Economou V, Gousia P. Agriculture and food animals as a source of antimicrobial-resistant bacteria. *Infect Drug Resist.* 2015;8:49.
286. Niyibizi B. Etude préliminaire sur l'utilisation des antibiotiques dans les élevages de poules pondeuses de la région de Dakar et la présence de résidus d'antibiotiques dans les œufs. Master EISMV, Université Cheick Anta Diop de Dakar, Sénégal. 2012.
287. Liu CM, Stegger M, Aziz M, Johnson TJ, Waits K, Nordstrom L, et al. *Escherichia coli* ST131-H22 as a Foodborne Uropathogen. *MBio.* 2018;9(4):e00470-18.
288. Shin SW, Shin MK, Jung M, Belaynehe KM, Yoo HS. Prevalence of antimicrobial resistance and transfer of tetracycline resistance genes in *Escherichia coli* isolated from beef cattle. *Applied and environmental microbiology.* 2015: *Appl Environ Microbiol.* 81:5560 – 5566.
289. Seifi S, Khoshbakht R. Prevalence of tetracycline resistance determinants in broiler isolated *Escherichia coli* in Iran. *British Poultry Sci.* 2016;57(6):729-33.
290. Younis G, Awad A, Mohamed N. Phenotypic and genotypic characterization of antimicrobial susceptibility of avian pathogenic *Escherichia coli* isolated from broiler chickens. *Vet World.* 2017;10(10):1167.
291. Zellweger RM, Carrique-Mas J, Limmathurotsakul D, Day NPJ, Thwaites GE, Baker S, et al. A current perspective on antimicrobial resistance in Southeast Asia. *J Antimicrob Chemother.* 2017;72(11):2963-72.
292. Chalmers G, Cormier AC, Nadeau M, Côté G, Reid-Smith RJ, Boerlin P. Determinants of virulence and of resistance to ceftiofur, gentamicin, and spectinomycin in clinical *Escherichia coli* from broiler chickens in Québec, Canada. *Vet Microbiol.* 2017;203:149-57.
293. Mathers AJ, Peirano G, Pitout JD. The role of epidemic resistance plasmids and international high-risk clones in the spread of multidrug-resistant *Enterobacteriaceae*. *Clin Microbiol Rev.* 2015;28(3):565-91.

294. da Silva GJ, Mendonça N. Association between antimicrobial resistance and virulence in *Escherichia coli*. *Virulence*. 2012;3(1):18-28.
295. Nguyen DP, Nguyen TAD, Le TH, Tran NMD, Ngo TP, Dang VC, et al. Dissemination of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-and AmpC  $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* within the food distribution system of Ho Chi Minh City, Vietnam. *BioMed Res Int*. 2016;2016.
296. Baron S, Jouy E, Larvor E, Eono F, Bougeard S, Kempf I. Impact of third-generation cephalosporin administration in hatcheries on fecal *E. coli* antimicrobial resistance in broilers and layers. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014; 58(9):5428-34.
297. Bevan ER, Jones AM, Hawkey PM. Global epidemiology of CTX-M  $\beta$ -lactamases: temporal and geographical shifts in genotype. *J Antimicrob Chemother*. 2017;72(8):2145-55.
298. Kim NBT, Mai HBT, Ueda S, Le Danh T, Yamamoto Y, Hirai I. Potential Transmission Opportunity of CTX-M-producing *Escherichia coli* in Large-scale Chicken Farm in Vietnam. *J Global Antimicrob Resist*. 2017.
299. Yin J, Cheng J, Sun Z, Ye Y, Gao Y-F, Li J-B, et al. Characterization of two plasmid-encoded cefotaximases found in clinical *Escherichia coli* isolates: CTX-M-65 and a novel enzyme, CTX-M-87. *J Med Microbiol*. 2009;58(6):811-5.
300. Börjesson S, Bengtsson B, Jernberg C, Englund S. Spread of extended-spectrum beta-lactamase producing *Escherichia coli* isolates in Swedish broilers mediated by an *incI* plasmid carrying bla CTX-M-1. *Acta Vet Scandinavica*. 2013;55(1):3.
301. Maamar E, Hammami S, Alonso CA, Dakhli N, Abbassi MS, Ferjani S, et al. High prevalence of extended-spectrum and plasmidic AmpC beta-lactamase-producing *Escherichia coli* from poultry in Tunisia. *Int J Food Microbiol*. 2016;231:69-75.
302. Minarini LA, Darini ALC. Mutations in the quinolone resistance-determining regions of *gyrA* and *parC* in Enterobacteriaceae isolates from Brazil. *Braz J Microbiol*. 2012;43(4):1309-14.
303. Vanni M, Meucci V, Tognetti R, Cagnardi P, Montesissa C, Piccirillo A, et al. Fluoroquinolone resistance and molecular characterization of *gyrA* and *parC* quinolone resistance-determining regions in *Escherichia coli* isolated from poultry. *Poultry Sci*. 2014;93(4):856-63.

304. Fuzi M, Szabo D, Csercsik R. Double-serine fluoroquinolone resistance mutations advance major international clones and lineages of various multi-drug resistant bacteria. *Front Microbiol.* 2017;8:2261.
305. Johnning A, Kristiansson E, Fick J, Weijdegård B, Larsson D. Resistance mutations in *gyrA* and *parC* are common in *Escherichia* communities of both fluoroquinolone-polluted and uncontaminated aquatic environments. *Fronts Microbiol.* 2015;6:1355.
306. Nelson JM, Chiller TM, Powers JH, Angulo FJ. Fluoroquinolone-resistant *Campylobacter* species and the withdrawal of fluoroquinolones from use in poultry: a public health success story. *Clin Infect Dis.* 2007;44(7):977-80.
307. Apostolakos I, Franz E, van Hoek AH, Florijn A, Veenman C, Sloet-van Oldruitenborgh-Oosterbaan MM, et al. Occurrence and molecular characteristics of ESBL/AmpC-producing *Escherichia coli* in faecal samples from horses in an equine clinic. *J Antimicrob Chemother.* 2017;72(7):1915-21.
308. Carattoli A, Bertini A, Villa L, Falbo V, Hopkins KL, Threlfall EJ. Identification of plasmids by PCR-based replicon typing. *J Microbiol Meth.* 2005;63(3):219-28.
309. Paul MCB. Sénégal, un système de santé animale en voie de privatisation [Thesis, École vétérinaire d'Alfort] 2005.
310. Wu C, Wang Y, Shi X, Wang S, Ren H, Shen Z, et al. Rapid rise of the ESBL and *mcr-1* genes in *Escherichia coli* of chicken origin in China, 2008–2014. *Emerg Microbes Infect.* 2018;7(1):30.
311. Haenni M, Métayer V, Gay E, Madec J-Y. Increasing trends in *mcr-1* prevalence among extended-spectrum- $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* isolates from French calves despite decreasing exposure to colistin. *Antimicrob Agents Chemother.* 2016;60(10):6433-4.
312. Chalmers G, Davis KE, Poljak Z, Friendship R, Mulvey MR, Deckert AE, et al. A method to detect *Escherichia coli* carrying the colistin-resistance genes *mcr-1* and *mcr-2* using a single real-time polymerase chain reaction and its application to chicken cecal and porcine fecal samples. *Can J Vet Res.* 2018;82(4):312-5.
313. Yamaguchi T, Kawahara R, Harada K, Teruya S, Nakayama T, Motooka D, et al. The presence of colistin resistance gene *mcr-1* and -3 in ESBL producing *Escherichia coli* isolated from food in Ho Chi Minh City, Vietnam. *FEMS Microbiol Lett.* 2018;365(11).



314. Bui TKN, Bui TMH, Ueda S, Le DT, Yamamoto Y, Hirai I. Potential transmission opportunity of CTX-M-producing *Escherichia coli* on a large-scale chicken farm in Vietnam. *J Global Antimicrob Resist*. 2018;13:1-6.
315. Luo Q, Yu W, Zhou K, Guo L, Shen P, Lu H, et al. Molecular Epidemiology and Colistin Resistant Mechanism of mcr-Positive and mcr-Negative Clinical Isolated *Escherichia coli*. *Front Microbiol*. 2017;8:2262.
316. Lee J-Y, Choi M-J, Choi HJ, Ko KS. Preservation of acquired colistin resistance in Gram-negative bacteria. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015:AAC. 01574-15.
317. Johnson JR, Kuskowski MA, Owens K, Gajewski A, Winokur PL. Phylogenetic origin and virulence genotype in relation to resistance to fluoroquinolones and/or extended-spectrum cephalosporins and cephamycins among *Escherichia coli* isolates from animals and humans. *J Infect Dis*. 2003;188(5):759-68.
318. Johnson TJ, Wannemuehler Y, Doetkott C, Johnson SJ, Rosenberger SC, Nolan LK. Identification of minimal predictors of avian pathogenic *Escherichia coli* virulence for use as a rapid diagnostic tool. *J Clin Microbiol*. 2008;46(12):3987-96.
319. Bergeron CR, Prussing C, Boerlin P, Daignault D, Dutil L, Reid-Smith RJ, et al. Chicken as reservoir for extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* in humans, Canada. *Emerg Infect Dis*. 2012;18(3):415.
320. Lanthier B. Variabilité des souches de *Escherichia coli* provenant de divers poulaillers au Québec. Mémoire de Maîtrise, Université de Montréal. 2016.
321. Girlich D, Poirel L, Carattoli A, Kempf I, Lartigue M-F, Bertini A, et al. Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase CTX-M-1 in *Escherichia coli* isolates from healthy poultry in France. *Appl Environ Microbiol*. 2007;73(14):4681-5.
322. Bingen E, Picard B, Brahim N, Mathy S, Desjardins P, Elion J, et al. Phylogenetic analysis of *Escherichia coli* strains causing neonatal meningitis suggests horizontal gene transfer from a predominant pool of highly virulent B2 group strains. *J Infect Dis*. 1998;177(3):642-50.
323. Poirel L, Kieffer N, Brink A, Coetze J, Jayol A, Nordmann P. Genetic features of MCR-1-producing colistin-resistant *Escherichia coli* isolates, South Africa. *Antimicrob Agents Chemother*. 2016; 60(7):4394-7.

324. Sweeney MT, Lubbers BV, Schwarz S, Watts JL. Applying definitions for multidrug resistance, extensive drug resistance and pandrug resistance to clinically significant livestock and companion animal bacterial pathogens. *J Antimicrob Chemother.* 2018;73(6):1460-3.