

Université de Montréal

Effet de l'arrêt du ceftiofur et son remplacement par la lincomycine-spectinomycine sur les gènes de bêta-lactamase à spectre étendu ESBL/AmpC et sur la multirésistance chez les *Escherichia coli* provenant d'une chaîne de production aviaire pyramidale au Canada

Par Luc Verrette

Département de sciences cliniques
Faculté de médecine vétérinaire

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

Décembre 2018

© Luc Verrette, 2018

Université de Montréal
Faculté de médecine vétérinaire

Ce mémoire intitulé

Effet de l'arrêt du ceftiofur et son remplacement par la lincomycine-spectinomycine sur les gènes de bêta-lactamase à spectre étendu ESBL/AmpC et sur la multirésistance chez les *Escherichia coli* provenant d'une chaîne de production aviaire pyramidale au Canada

Présenté par

Luc Verrette

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes

Alexandre Thibodeau, président-rapporteur

Martine Boulianne, directrice de recherche

John M. Fairbrother, codirecteur

Olivia Labrecque, membre du jury

Résumé

Le ceftiofur, un antimicrobien de la classe des céphalosporines, a été utilisé systématiquement dans les couvoirs canadiens pour prévenir les mortalités en début d'élevage, causant une prévalence élevée d'*Escherichia coli* résistants aux céphalosporines chez les poulets de chair. L'utilisation préventive du ceftiofur a cessé en 2014. Nous avons examiné l'effet de son administration, de l'arrêt de tout antimicrobien au couvoir et du remplacement par la lincomycine-spectinomycine sur la proportion d'échantillon d'*E. coli* positifs à des gènes de β -lactamases à spectre étendu (ESBL) et de β -lactamases AmpC, ainsi que sur les profils de multirésistance des *E. coli* ESBL/AmpC chez des poulets de chair et leurs reproducteurs, un an après l'arrêt. Pour les *E. coli* indicateurs provenant de milieux non-enrichis avec du ceftriaxone, une diminution significative de la proportion d'échantillons possédant les gènes *bla*_{CMY-2} et/ou *bla*_{CTX-M} a été observée suivant l'arrêt. En revanche, suite à l'enrichissement au ceftriaxone, facilitant la détection d'*E. coli* producteurs d'ESBL/AmpC, 99% des échantillons avant et après l'arrêt de ceftiofur possédaient des *E. coli* positifs pour *bla*_{CMY-2} ou *bla*_{CTX-M}. Les troupeaux recevant la lincomycine-spectinomycine après l'arrêt du ceftiofur ont démontré une non-susceptibilité significativement accrue pour les classes des aminoglycosides, inhibiteurs de folate, phénicol, tétracyclines et pour les isolats d'*E. coli* possiblement extensivement résistants comparativement aux troupeaux recevant le ceftiofur ou aucun antimicrobien au couvoir. Cette étude démontre clairement une diminution initiale des *E. coli* positifs pour des ESBL/AmpC suite à l'arrêt du ceftiofur mais également une augmentation de la multirésistance aux différentes classes d'antimicrobien testées chez les *E. coli* suivant le remplacement avec la lincomycine-spectinomycine.

Mots-clés: arrêt, ceftiofur, poulet, lincomycine-spectinomycine, multirésistance, *bla*_{CMY-2}, *bla*_{CTX-M}

Abstract

Ceftiofur, a cephalosporin antimicrobial, has been used systematically in Canadian hatcheries for many years to prevent early mortality in chicks leading to a high prevalence of cephalosporin resistance in *Escherichia coli* in chickens. Preventive use of ceftiofur in hatcheries stopped in 2014. We examined the effect of ceftiofur, complete antimicrobial cessation in hatchery and replacement with lincomycin-spectinomycin on the proportion of *E. coli* positive sample for extended-spectrum β -lactamase (ESBL) and AmpC β -lactamase related genes, and on the multidrug resistance profiles of ESBL/AmpC positive *E. coli* in broilers and their associated breeders, at one year post-cessation. For indicator *E. coli* from non-enriched ceftriaxone media, a significant decrease post-cessation in the proportion of samples harboring *E. coli* isolates positive for *bla*_{CMY-2} and/or *bla*_{CTX-M} was observed. In contrast, following enrichment in medium containing ceftriaxone (1mg/L) to facilitate recovery of ESBL/AmpC β -lactamase producing *E. coli* colonies, both pre- and post-cessation, 99% of the samples harbored *E. coli* positive for *bla*_{CMY-2} or *bla*_{CTX-M}. Flocks receiving lincomycin-spectinomycin after cessation of ceftiofur showed a significantly greater non-susceptibility to aminoglycoside, folate inhibitor, phenicol, tetracycline and possible extensively drug resistant *E. coli* isolates compared to those that received ceftiofur or no antimicrobial at hatchery. This study clearly demonstrates an initial decrease in ESBL/AmpC positive *E. coli* following the cessation of ceftiofur in hatchery but an increase in multidrug resistant to different antimicrobial class tested in *E. coli* following replacement with lincomycin-spectinomycin.

Keywords: ceftiofur cessation, chicken, lincomycin-spectinomycin, antimicrobial resistance, *bla*_{CMY-2}, *bla*_{CTX-M}

Table des matières

Résumé.....	iii
Abstract.....	iv
Table des matières.....	v
Liste des tableaux.....	viii
Liste des sigles	x
Liste des abréviations.....	xii
Remerciements.....	xiv
Introduction.....	1
Revue de Littérature.....	5
Industrie de la volaille.....	6
La génétique : une structure pyramidale.....	6
Gestion des troupeaux.....	8
Production des œufs d’incubation commerciaux.....	9
Couvaison et éclosion	11
<i>Escherichia coli</i>	12
Rôles des bactéries commensales dans le tractus digestif	14
Classifications.....	16
ExPEC.....	23
APEC	26
Plasmides bactériens	30
Traitements lors de la vaccination des poussins au couvoir	30
Céphalosporines (β -lactamines).....	31
Gentamicine	33
Lincomycine-Spectinomycine	33
Pourquoi l’industrie avicole canadienne a cessé l’utilisation du ceftiofur en 2014?	34

a) Classification du ceftiofur par rapport à son importance chez l'humain	34
b) Réglementations et initiatives.....	34
Résistances antimicrobiennes	35
β-lactamases et leurs gènes associés	38
Transmission des gènes de résistance chez l'humain	42
Sélection et propagation de bactéries avec ESBL/AmpC.....	44
Impact de l'arrêt du ceftiofur dans les couvoirs.....	48
Multirésistance.....	51
Multirésistance due à des co-sélections	53
Zoonoses causées par des souches d'ExPEC multirésistants	56
Résumé de la problématique.....	61
Rappel des objectifs	61
Article	62
Détails sur le rôle du candidat dans la conception de l'article:.....	64
Abstract.....	65
Importance	65
Introduction.....	66
Material and Methods	67
1. Sampling	67
2. Colony isolation of <i>Escherichia coli</i>	69
3. DNA extraction and <i>uidA</i> PCR.....	70
4. Detection of antimicrobial resistance genes	70
5. Phenotypic antimicrobial susceptibility testing in the potential ESBL/AmpC- producing isolate collection	70
6. Statistical Analysis.....	71
Results.....	71
1. Decreased proportion in indicator <i>E. coli</i> collection positive for <i>bla</i> _{CMY-2} or <i>bla</i> _{CTX-M} following cessation of <i>in ovo</i> administration of ceftiofur in hatchery	71
2. High proportion of ceftriaxone-enriched samples from all sources before and after cessation of <i>in ovo</i> administration of ceftiofur harboring <i>E. coli</i> positive for <i>bla</i> _{CMY-2}	72

3. Antimicrobial non-susceptibility in ESBL/AmpC resistance gene positive <i>E. coli</i> isolates from ceftriaxone-enriched samples from newly hatched, broiler and breeder birds following the cessation of <i>in ovo</i> administration of ceftiofur and substitution with lincomycin-spectinomycin.....	73
4. Increased proportion of ceftriaxone-enriched samples with <i>E. coli</i> non-susceptible to antimicrobials of different classes following the cessation of <i>in ovo</i> administration of ceftiofur and substitution with lincomycin-spectinomycin.....	74
5. Greater level of MDR in ESBL/AmpC resistance gene positive <i>E. coli</i> isolates in ceftriaxone-enriched samples from newly hatched, broiler and breeder birds following the cessation of <i>in ovo</i> administration of ceftiofur and substitution with lincomycin-spectinomycin	75
Discussion.....	76
Acknowledgments.....	81
References.....	82
Tables and Figures	86
Supplemental material	91
Supplemental material references	94
Discussion.....	95
Conclusion	110
Références bibliographiques.....	i

Liste des tableaux

Dans la revue de littérature

Table 1. Résultats possibles lors de la nouvelle PCR établie par Clermont et al. en 2013 et tests supplémentaires requis selon les phylogroupes obtenus.....	20
--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

Dans l'article

Table 1. Effect of cessation of <i>in ovo</i> administration of ceftiofur and replacement with lincomycin-spectinomycin on the proportion of non-enriched ceftriaxone samples from newly hatched, broiler and breeder birds with <i>E. coli</i> isolates positive for ESBL/AmpC resistance genes	86
Table 2. Effect of cessation of <i>in ovo</i> administration of ceftiofur and the substitution with lincomycin-spectinomycin on the proportion of ceftriaxone-enriched samples from newly hatched, broiler and breeder birds with <i>E. coli</i> isolates positive for ESBL/AmpC resistance genes	87
Table 3. Effect of cessation of <i>in ovo</i> administration of ceftiofur and substitution with lincomycin-spectinomycin on the proportion of ceftriaxone-enriched samples from newly hatched, broiler and breeder birds harboring antimicrobial non-susceptible in ESBL/AmpC resistance gene positive <i>E. coli</i> samples ^a	88
Table 4. Effect of ceftiofur cessation and the substitution with lincomycin-spectinomycin on the proportion of antimicrobial phenotypic cross-resistance profiles in samples from newly hatched, broiler and breeder birds with <i>E. coli</i> of the ceftriaxone enriched collection	89

Dans le matériel supplémentaire de l'article

Table 1S: Supplemental data: list of primers and control strains used in the PCR	91
Table 2S: Supplemental data: list of antimicrobial disks used for Kirby Bauer assays	92
Table S3. Proportion of <i>E. coli</i> isolates positives to <i>Bla_{SHV}</i> before and after cessation of <i>in ovo</i> administration of ceftiofur and with the substitution with lincomycin-spectinomycin in indicator and ceftriaxone-enriched collection from newly hatched, broiler and breeder birds with	93

Liste des figures

Dans la revue de littérature

Figure 1. Organisation structurelle pyramidale des entreprises d'élevage de volaille d'aujourd'hui.....	7
Figure 2. Résistance observée aux antimicrobiens parmi les isolats d' <i>E. coli</i> provenant de poulets; Surveillance en abattoir par le PICRA en 2008	37
Figure 3. Prévalence de viande de poulet contaminée avec <i>Escherichia coli</i> et <i>Salmonella enterica</i> sérovar Heidelberg résistants au ceftiofur et incidence des infections humaines dues à la présence de <i>Salmonella</i> Heidelberg résistantes au ceftiofur au Canada	49
Figure 4. Variation temporelle de la résistance aux antimicrobiens de la classe des céphalosporines de troisième génération parmi les isolats d' <i>E. coli</i> provenant de poulets du Québec du bulletin du PICRA de 2016.....	50
Figure 5. Résistance au ceftiofur et à la gentamicine parmi les isolats collectés d' <i>E. coli</i> associés à la colibacillose entre 1994 et 2014 au Québec.....	56

Dans l'article

Figure 1 : Effect of cessation of <i>in ovo</i> administration of ceftiofur and replacement with lincomycin-spectinomycin on the proportion of multidrug resistance in ESBL/AmpC resistance gene positive <i>E. coli</i> isolates in ceftriaxone-enriched samples from newly hatched, broiler and breeder birds	90
-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

Liste des sigles

ACIA : Agence Canadienne d'Inspection des Aliments

ACMV : Association Canadienne des Médecins Vétérinaires

ADN: acide désoxyribonucléique

AmpC: plasmid-mediated among class C cephalosporinase (Céphalosporinase de classe C médiée par des plasmides ou AmpC β -lactamase)

APEC: avian pathogenic *Escherichia coli* (*Escherichia coli* pathogène aviaire)

ARN: acide ribonucléique

CLSI : Clinical Laboratory Standards Institute (Institution de standards de laboratoire clinique)

DNA : deoxyribonucleic acid (Acide désoxyribonucléique)

EAEC : enteroaggregative *Escherichia coli* (*Escherichia coli* entéro-agrégatifs)

ECOR : *Escherichia coli* Reference Collection (Collection de référence des *Escherichia coli*)

EHEC : enterohemorrhagic *Escherichia coli* (*Escherichia coli* entéro-hémorragiques)

EIEC : enteroinvasive *Escherichia coli* (*Escherichia coli* entéro-invasifs)

EPEC : enteropathogenic *Escherichia coli* (*Escherichia coli* entéro-pathogènes)

EUCAST: European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (Comité européen sur les tests de susceptibilité aux antimicrobiens)

ESBL: extended-spectrum β -lactamase (β -lactamase à spectre étendu)

ETEC : enterotoxigenic *Escherichia coli* (*Escherichia coli* entérotoxino-gène)

ExPEC: extra-intestinal pathogenic *Escherichia coli* (*Escherichia coli* pathogène extra-intestinal)

FDA: United States Food and Drug Administration (administration américaine des denrées alimentaires et des médicaments)

Galerie API : «analytical profile index»

HACCP: hazard analysis critical control point (analyse des risques et maîtrise des points critiques)

IPEC: intra-intestinal pathogenic *Escherichia coli* (*Escherichia coli* pathogène intra-intestinal)

MDR : multidrug resistant (multirésistant)

MLEE : multilocus enzyme electrophoresis (électrophorèse enzymatique multilocus)

MLST : multilocus sequence typing (typage de séquences multilocus)

NDLR : note de la rédaction

NMEC : neonatal meningitis-causing *Escherichia coli* (*Escherichia coli* causant des méningites néonatales)

OMS : Organisation Mondiale de la Santé animale

PCR : polymerase chain reaction (réaction de polymérase en chaîne)

PDR : pan-drug resistant (pan-résistant)

PICRA : Programme Intégré Canadien de surveillance de la Résistance aux Antimicrobiens

SEPEC : human sepsis-associated *Escherichia coli* (*Escherichia coli* pathogènes septicémiques)

STEC: shiga toxin-producing *Escherichia coli* (*Escherichia coli* producteurs de shiga toxines)

ST: séquence type

tsh: temperature-sensitive haemagglutinin (hémagglutinine sensible à la température)

TTSS : type three secretion system (système de sécrétion type trois)

UPEC : uropathogenic *Escherichia coli* (*Escherichia coli* pathogènes urinaires)

XDR : extensively drug-resistant (extensivement résistant)

Liste des abréviations

Art. : article

colV: colicin V (plasmide)

E.: *Escherichia*

et al. : et autres

Etc. : Et cætera

Ex : par exemple

F : fimbriae

H : flagelle

Inc : groupe d'incompatibilité

K : capsule bactérienne

kg : kilogramme

mg : milligramme

O : lipopolysaccharides

spp. : sous-espèce

*À ma très chère fiancée, Laurie-Anne Beausoleil,
qui m'a épaulée chaque jour dans ce projet.*

*Puisse ce travail témoigner de
ma profonde et sincère affection pour toi.*

Remerciements

Ce mémoire n'aurait pas été possible sans l'intervention d'un grand nombre de personnes que je souhaite remercier ici.

Je tiens tout d'abord à souligner ma directrice de recherche Martine Boulianne et mon co-directeur John M. Fairbrother, pour leurs conseils, leur patience et leur aide durant toute ma maîtrise qui ont été déterminants dans la réalisation de ce travail de recherche. Ce fut un privilège pour moi de vous côtoyer durant toute la réalisation de mon DMV-maîtrise.

Aussi, je tiens à remercier toutes les personnes qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce projet, tant pour la partie d'échantillonnages du projet, dont le personnel du couvoir, les producteurs participants et Benoît Lanthier, que pour la partie réalisée au laboratoire EcL avec Ghyslaine Vanier, Brigitte Lehoux, Gabriel Desmarais, Kathleen Sary et Jocelyn Dubuc.

Je veux également remercier les membres du jury pour l'intérêt qu'ils ont porté à notre recherche en acceptant d'examiner ce mémoire.

Enfin, j'adresse mes plus sincères remerciements à tous mes proches et amis, qui m'ont toujours encouragé au cours de la réalisation de ce mémoire.

Merci à tous et à toutes.

Introduction

Une des plus importantes causes de mortalité en début d'élevage chez les poulets de chair est l'omphalite, une infection bactérienne causée majoritairement par *Escherichia coli* (1, 2). Les pathotypes impliqués d'*E. coli* sont ceux causant des infections à l'extérieur du système digestif (« extra-intestinal pathogenic *E. coli* » pour *E. coli* pathogène extra-intestinal ou ExPEC). Seulement un sous-groupe de souches parmi les ExPEC, possédant des facteurs de virulence spécifiques pour la volaille, et nommé «avian pathogenic *E. coli* » (*E. coli* pathogènes aviaires ou APEC), peuvent causer l'omphalite. L'omphalite est l'une des nombreuses lésions observables lors de la colibacillose aviaire (1, 3). L'utilisation d'antimicrobiens en prévention avant le début de l'élevage dans les couvoirs auprès de troupeaux reproducteurs et de poulets de chair a été une pratique courante de l'industrie avicole pendant plus de 15 ans dans plusieurs pays pour diminuer le taux de mortalité dû à la colibacillose. Ainsi, l'industrie de la volaille canadienne a utilisé le ceftiofur, une céphalosporine de troisième génération, pendant de nombreuses années au sein des couvoirs, administrée soit en injection sous-cutanée à un jour d'âge ou en injection *in ovo* à 18 jours d'incubation (4). Cette utilisation hors-homologation de ceftiofur dans les couvoirs avicoles s'est produite dans différents pays au courant des dernières décennies et une augmentation marquée de la prévalence de résistance associée à des «extended-spectrum β -lactamases» (β -lactamases à spectre étendu ou ESBL) et des AmpC β -lactamases produites par des *E. coli* a été rapportée mondialement dans la pyramide avicole (5-7). Cette augmentation de résistance est une source de grande inquiétude au niveau de la santé publique puisque la résistance au ceftiofur est souvent accompagnée de résistances à d'autres antimicrobiens, un phénomène nommé co-résistance. La co-résistance à d'autres β -lactamines à spectre étendu tels que le ceftriaxone et la céphamycine, deux antimicrobiens largement utilisés en médecine humaine, est fréquente lors de résistance au ceftiofur (8, 9). Les gènes ESBL/AmpC qui ont été associés à ces résistances chez la volaille sont *bla*_{CMY-2}, *bla*_{OXA}, *bla*_{SHV}, *bla*_{TEM} et *bla*_{CTX-M} (8, 10). Le ceftiofur a été utilisé hors-homologation chez les animaux de production en Amérique du Nord depuis 1989 et le gène *bla*_{CMY-2} a été rapporté pour la première fois chez ceux-ci en 1998(11). Il a été démontré que le gène *bla*_{CMY-2} est généralement présent sur un des plasmides de type IncII ou IncA/C dans les isolats d'*E. coli* provenant du poulet et de la viande de poulet au Canada. Les plasmides de type IncII codent généralement que pour la résistance aux céphalosporines tandis que les plasmides de type IncA/C peuvent coder non seulement pour la

résistance aux céphalosporines mais aussi pour d'autres classes d'antimicrobiens, tels que la gentamicine, le chloramphénicol, la tétracycline et les sulfamides, rendant ainsi les souches contenant ces plasmides plus difficiles à traiter (12).

Les Producteurs de poulets du Canada ont recommandé à l'industrie de cesser l'utilisation de ceftiofur à des fins préventives. En effet, cet antimicrobien est classé par la Direction des médicaments vétérinaires de Santé Canada et par des organismes internationaux tels que l'Organisation Mondiale de la Santé animale (OMS) comme un antimicrobien de très haute importance en santé humaine (catégorie 1). Étant donné la grande importance des céphalosporines de 3^e génération pour les traitements réalisés en médecine humaine, le 15 mai 2014, l'industrie avicole canadienne a instauré une politique éliminant l'utilisation préventive de ceftiofur dans les couvoirs à l'échelle nationale (4). Cette mesure n'a touché que les poulets de chair, qui ne reçoivent ainsi plus de traitement antimicrobien préventif pour certains troupeaux à présent. Les troupeaux parents (reproducteurs) au Canada proviennent tous de troupeaux grands-parents américains et leurs progénitures, les parents, sont tous nées dans des couvoirs américains qui ont continués l'administration de ceftiofur jusqu'en 2015 (Boulianne M., Université de Montréal, communication personnelle). Au Canada, c'est le second arrêt réalisé pour l'utilisation de cet antimicrobien dans les couvoirs canadiens. En mars 2005, l'association des couvoiriers du Québec avait volontairement cessé l'utilisation de ceftiofur et plusieurs couvoirs en Ontario avaient également suivi cette mesure. Ceci s'est traduit par une diminution de la prévalence de résistance au ceftiofur chez les souches de *Salmonella* Heidelberg provenant de la viande de volaille au Québec et en Ontario, mais les résultats furent différents pour les souches d'*E. coli*, une baisse temporaire de la prévalence de résistance au ceftiofur n'ayant été observée qu'au Québec et non en Ontario. De plus, malgré l'arrêt de l'utilisation de ceftiofur au Québec entre 2005 et la reprise de cette pratique à la fin de 2007, un certain nombre de souches d'*E. coli* ont toujours démontré de la résistance au ceftiofur (9). Les études plus récentes réalisées en 2014 au Canada depuis le deuxième arrêt de ceftiofur ont démontré une diminution de la prévalence des gènes associés aux ESBL/AmpC (7, 13, 14). Au Japon, la prévalence des *E. coli* résistants provenant de poulets de chair en santé avait aussi diminué significativement un an après un arrêt semblable dans leur industrie avicole (5). Une diminution de la prévalence des *Salmonella* possédant *bla*_{CMY-2} sur la viande

de poulets a aussi été observée dans les mêmes années (15), tout comme dans l'étude de Dutil et al. (9). Au Canada, alors que certains couvoirs ont complètement arrêté l'utilisation d'antimicrobiens préventifs suite à l'arrêt du ceftiofur, comme discuté avec les Producteurs d'œufs d'incubation du Canada et les Producteurs de poulet du Canada (16), plusieurs troupeaux reçoivent en remplacement une combinaison de lincomycine et de spectinomycine (4, 7). L'utilisation de la lincomycine-spectinomycine dans les couvoirs canadiens a commencé en 2005, lorsque le ceftiofur n'était plus utilisé, et ensuite en alternance avec le ceftiofur depuis 2007. L'utilisation de ces antimicrobiens a déjà été associé à de la co-sélection avec la gentamicine, les gènes de résistance à la spectinomycine et à la gentamicine ayant été identifiés sur le même plasmide (7).

À notre connaissance, il n'y a eu aucune étude verticale réalisée sur des troupeaux de poulets de chair en santé au Canada qui compare l'impact du ceftiofur, de la lincomycine-spectinomycine et de l'utilisation d'aucun antimicrobien au couvoir sur la proportion de gènes de résistance antimicrobienne. De plus, la pratique consistante à injecter par voie sous-cutanée du ceftiofur ou d'autres antimicrobiens à des poussins d'un jour d'âge destinés à la reproduction pourrait favoriser la sélection de souches d'*E. coli* résistants à ces antimicrobiens ou même multirésistants, ainsi que la transmission de ces résistances à leur progéniture.

Nos objectifs étaient donc d'examiner l'effet du ceftiofur, du retrait des antimicrobiens au couvoir et du remplacement du ceftiofur par la lincomycine-spectinomycine au couvoir sur la proportion d'échantillon d'*E. coli* positifs pour les gènes de résistance ESBL/AmpC tels que *bla*_{CMY-2}, *bla*_{SHV}, *bla*_{CTX-M}, *bla*_{OXA} et *bla*_{TEM}, et sur les profils de multirésistance antimicrobienne de souches d'*E. coli* producteur d'ESBL/AmpC chez les jeunes poussins, les poulets de chair en élevage et sur leurs parents dans une chaîne d'approvisionnement d'élevages québécois au niveau de leur microbiote intestinal.

Revue de Littérature

Industrie de la volaille

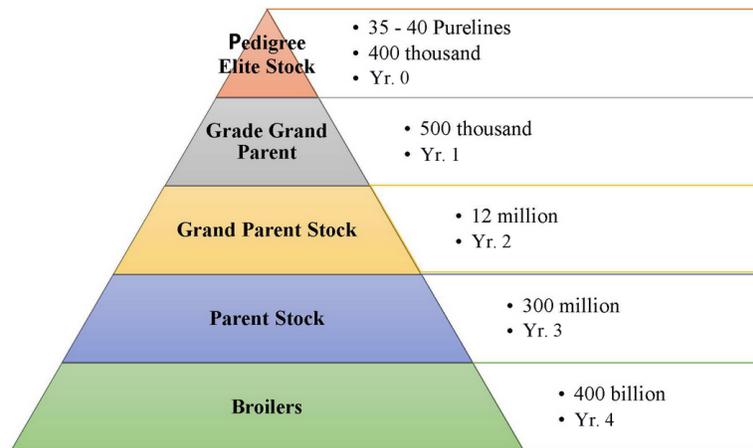
L'industrie avicole joue un rôle clé dans le monde comme source de protéines animales de haute qualité à faible coût. Ainsi, la consommation de viande de volaille a augmenté grandement dans les pays industrialisés et en voie de développement à travers le monde entre 1995 et 2005, notamment parce que cette viande blanche est moins dispendieuse au gramme que le porc ou le bœuf (17). Dans certains pays en voie de développement, jusqu'à 89% de la population rurale élève des poulets à cause du faible coût de production associé à cet élevage (18). La raison pour laquelle cette viande est moins coûteuse à produire est grâce à la grande efficacité et au rendement important de cette industrie pour produire des poulets de chair. Plusieurs facteurs technologiques peuvent expliquer cette importante productivité, comme la génétique, la reproduction, la nutrition, l'automatisation de la régie et la gestion de l'environnement. De ces différents facteurs, il est estimé que la génétique et la reproduction sont responsables de 80 à 90% de ce rendement amélioré depuis les années 1940 (19-21). Les principaux traits sélectionnés ayant une importance économique sont le poids corporel, la vitesse de croissance, l'efficacité alimentaire et le poids de la poitrine (17, 20, 21). Puisque les consommateurs nord-américains démontrent un intérêt marqué pour la viande blanche de la poitrine, beaucoup de recherches ont eu lieu afin d'augmenter l'efficacité de production et la grosseur de la poitrine produite par poulet et en diminuer le coût de production (19).

La génétique : une structure pyramidale

Cette avancée technologique est très semblable partout dans le monde et est due à la création d'une structure pyramidale. Au sommet de la pyramide, quelques troupeaux de lignées pures élites (il existe moins de 50 lignées dans le monde, composées chacune de quelques dizaines de milliers d'individus) possèdent une haute valeur génétique, nommé «pedigree». Ces troupeaux sont nommés grands-parents et même arrière-grands-parents selon les cas. Ceux-ci produisent la prochaine génération de la pyramide aviaire, les parents. Avec les générations, le nombre de volailles à la génération suivante augmente de façon exponentielle. Il y a donc beaucoup plus de troupeaux parents que de troupeaux grands-parents (ces deux générations sont souvent nommées les reproducteurs), et encore plus de troupeaux de poulets de chair, ceux-ci étant la progéniture des troupeaux parents. Il y a donc des milliards d'oiseaux

considérés comme étant des poulets de chair à travers le monde. Ce sont les poulets de chair qui sont élevés pour être vendus aux consommateurs de viande de volaille. L'impact au niveau des poulets de chair au bas de la pyramide d'un changement au sommet (à l'apex) de la pyramide peut prendre jusqu'à 4 ans avant de se manifester (10, 17).

Figure 1. Organisation structurelle pyramidale des entreprises d'élevage de volaille d'aujourd'hui



Adapté et reproduit avec la permission d'Oxford University Press (Elsevier) and Copyright Clearance Center (17)

Au début des années 2000, les 35 à 40 lignées pures d'élite contenaient environ 400 000 individus, qui produisaient ensemble plus de 400 milliards de poulets de chair. Deux types de lignées distinctes sont présentes, les lignées mâles et les lignées femelles. Chaque lignée subit une pression de sélection génétique pour des traits bien précis, nommés traits génétiques majeurs. Les lignées mâles ont eu une sélection principalement pour le taux de croissance, le rendement de viande comestible (surtout la viande blanche) et le taux de conversion alimentaire. Pour les lignées femelles, les principaux traits sélectionnés étaient le taux de croissance, le rendement de viande comestible et la production d'œufs. Le taux de conversion alimentaire des lignées femelles était aussi parfois sélectionné selon les lignées. Deux techniques de sélection sont utilisées principalement, soit une sélection positive ou négative. La sélection positive consiste à ne garder que les familles qui ont le meilleur rendement pour un trait donné, comme les traits majeurs mentionnés plus haut. Pour les traits génétiques mineurs (de moindre importance), une sélection négative était réalisée, soit en éliminant les

familles avec les moins bons rendements pour ces traits. Ceux-ci incluent la fertilité, l'éclosabilité et la viabilité des poussins. Cette approche vise donc à maintenir un taux acceptable pour les traits mineurs tout en augmentant le rendement des traits majeurs. Les traits mineurs sont considérés comme ayant une faible héritabilité (0 à 15 % liés à la génétique) alors que les traits majeurs ont une héritabilité beaucoup plus élevée (20 à 40%). Une augmentation de 1% pour un trait majeur est donc beaucoup plus facile à obtenir, et donc plus rentable (19). Si on considère que des poulets sont sexuellement matures à 20 semaines d'âge, on peut comprendre la rapidité avec laquelle les progrès génétiques et les améliorations de performances conséquentes se font. Ainsi, les poulets de chair atteignent le poids cible de leur production en consommant 50% moins de nourriture qu'en 1953. Entre 1957 et 2005, leur taux de croissance a augmenté de 400%. Ils atteignent le poids cible 10 semaines plus rapidement qu'en 1923 avec un taux accru de viandes blanches (19-21).

Avec le temps, certaines conditions ont été associées à des désordres métaboliques et physiologiques, tels que l'ascite («water belly»), des problèmes de croissance squelettique (par exemple la dyschondroplasie tibiale et des problèmes de varus-valgus ou «twisted leg»), des désordres métaboliques, une altération de la fonction immunitaire et une baisse des performances de fertilité. Ces conditions ont été associées à une augmentation du taux de mortalité, ce qui n'était plus arrivé depuis plusieurs décennies, le taux de mortalité étant passé de 18% en 1923 à moins de 3% dans les années 1970 et finalement remonter autour de 9% au cours des années 1990. Plus récemment, des stratégies génétiques ont été mises de l'avant pour identifier et limiter des gènes responsables de ces conditions. Les poulets sont d'ailleurs les premiers animaux de production que le génome a été séquencé complètement. L'étude du génome prend ainsi une place de plus en plus importante dans l'industrie. Grâce à ces technologies, l'industrie a changé ou ajouté certains critères de sélection. D'autres traits que les majeurs doivent à présent être sélectionnés pour limiter les mortalités (20, 21).

Gestion des troupeaux

Dans les troupeaux commerciaux, tous les paramètres de l'élevage sont surveillés et mesurés puisque ceux-ci peuvent avoir un impact important sur la santé et la rentabilité du troupeau. Ainsi, des fiches d'élevage pour chaque troupeau parent sont remplies pour détailler les

différents vaccins et traitements antimicrobiens que ces troupeaux ont reçu. Des systèmes de ventilation performants sont présents pour assurer un air sain avec un minimum de gaz carbonique et d'ammoniac. La nourriture offerte est calculée pour optimiser la croissance avec des céréales, des sources de protéines, des suppléments de vitamines et de minéraux, comme du calcium pour les poules pondeuses (important dans la formation de la coquille de l'œuf.) La luminosité est cruciale et c'est la raison pour laquelle les bâtiments sur les fermes n'ont pas de fenêtres. On peut ainsi créer une photostimulation à n'importe quel moment de l'année pour stimuler la ponte chez les poules, ou contrôler la prise alimentaire chez les poulets de chair. Des mesures de biosécurité obligatoires sont aussi présentes pour chaque troupeau canadien. Il faut ainsi changer de vêtements et de bottes lorsque l'on entre en ferme, désinfecter les bottes à l'entrée et à la sortie, se laver les mains et pour certains troupeaux reproducteurs avec des standards plus élevés, prendre une douche. Les troupeaux sont élevés en tout plein tout vide, ce qui signifie que tous les poulets dans un même poulailler ont le même âge et sont élevés en même temps. Cette technique facilite le lavage et la désinfection du bâtiment et des équipements entre les troupeaux. Une aire contrôlée autour des poulaillers est aussi présente pour limiter la contamination des troupeaux par des pathogènes de l'extérieur (22, 23).

En général, plus on est haut dans la pyramide avicole, plus les standards de biosécurité seront élevés. Les traitements de désinfection entre les troupeaux reproducteurs seront beaucoup plus rigoureux et les protocoles de vaccination et de traitements aux antimicrobiens sont différents de ceux utilisés chez les poulets de chair. Par exemple, les troupeaux de poulets de chair peuvent recevoir dans leur nourriture des anticoccidiens (nicarbazine, narasine, salinomycine, monensin, etc.) alors que les troupeaux reproducteurs, où le coût associé à la longévité de l'individu est plus élevé, recevront plutôt des vaccins contre la coccidiose et, en général, moins de traitements oraux antimicrobiens (10).

Production des œufs d'incubation commerciaux

Dans les troupeaux commerciaux, les poules pondeuses, que ce soient les grands-parents ou les parents, ne couvent pas leurs œufs. Ceux-ci sont livrés dans des couvoirs où ils sont installés dans des incubateurs jusqu'à leur éclosion, d'où le terme d'œufs d'incubation. Il y a

très peu de troupeaux de grands-parents au Québec, et même au Canada. Ainsi, la majorité des troupeaux commerciaux de parents au Québec sont des poussins nés dans des couvoirs aux États-Unis, provenant de troupeaux grands-parents. Les poussins possèdent un sac vitellin qui leur permet de survivre les premiers jours de vie sans manger. Néanmoins, une gelée contenant des nutriments est souvent offerte au poussin durant les longs transports. Au Canada, les troupeaux parents ont en moyenne entre 10 000 et 15 000 individus. Suite à leur éclosion aux États-Unis, les poussins parents sont livrés à un jour d'âge au Canada dans des poulaillers d'élevage où ils atteindront leur maturité sexuelle afin d'être envoyés dans des pondoirs. Les troupeaux parents sont séparés au sein du poulailler pour les premières 22-26 semaines de l'élevage entre mâles et femelles, étant donné que ceux-ci n'ont pas les mêmes besoins nutritionnels. Ils sont ensuite mis en contact dans le poulailler pour commencer la production d'œufs. Ce sont ces troupeaux qui produiront les poulets de chair canadiens. Pour satisfaire les besoins nutritionnels propres aux mâles et aux femelles, les mangeoires des mâles sont surélevées, hors de portée des femelles, et celles des femelles sont plus étroites, les têtes plus grosses des mâles les empêchant de s'y nourrir. La période de production des troupeaux parents s'étendra pendant 34 à 36 semaines. Durant cette période, chaque poule pondeuse pondra en moyenne entre 150 et 160 œufs fertiles. Les poules pondeuses possèdent des nids (compartiments isolés) où elles peuvent aller pondre. Les œufs pondus tombent alors automatiquement sur une courroie et seront récoltés automatiquement chaque jour. Les œufs qui sont pondus sur le sol ont plus de risques d'être contaminés par des fientes. Ceux-ci ne seront pas ramassés puisqu'un œuf contaminé risquerait de contaminer les autres œufs au couvoir. Les producteurs marchent régulièrement dans les poulaillers pour limiter la ponte d'œuf sur le sol du poulailler. Les œufs récoltés seront minutieusement inspectés pour toute anomalie, fissure ou saleté avant d'être refroidis et livrés par camion aux couvoirs. Les camions ont une température contrôlée (environ 18°C) afin de conserver les embryons vivants et d'arrêter leur développement pendant le transport, permettant ainsi de synchroniser leur éclosion en futur poulet de chair (23).

En 2015, il y avait 244 producteurs d'œufs d'incubation dans huit provinces à travers le Canada qui produisaient ensemble plus de 700 millions d'œufs de poulets de chair. De plus,

selon les accords commerciaux, près de 150 million de poulet de chair d'un jour étaient importés annuellement au Canada des États-Unis (22, 23).

Couvaison et éclosion

Tout comme les fermes, les couvoirs sont des bâtiments où la biosécurité est très importante. Les installations sont désinfectées et nettoyées chaque jour. Les travailleurs doivent prendre des mesures de biosécurité rigoureuses, comme changer de vêtements, se laver les mains, etc. Le programme canadien de qualité des œufs d'incubation repose sur les principes du «hazard analysis critical control point» (analyse des risques et maîtrise des points critiques ou HACCP) et est conforme à l'approche de salubrité des aliments élaborée par l'Agence Canadienne d'Inspection des Aliments (ACIA). Arrivés aux couvoirs, les œufs sont encore gardés à température et humidité contrôlées. Ils sont inspectés une deuxième fois. Seuls les œufs avec un jaune (*vitellus*) intact, propres, sans tache et sans déformation de la coquille sont conservés. Les œufs d'au moins 52 grammes ont un poids considéré idéal et les œufs de moins de 52 grammes sont rejetés. Les œufs de plus de 75 grammes sont aussi rejetés, ceux-ci possédant souvent deux vitellus. Les œufs avec deux vitellus sont trop gros pour les incubateurs et aucun poussin ne peut en éclore. Après ce deuxième triage, les œufs sont installés dans des incubateurs entre 37 et 38 °C. L'apex le plus gros de l'œuf est généralement celui qui contient la chambre d'air et c'est ce côté qui est placé vers le haut dans l'incubateur. Ils restent dans l'incubateur 18 jours, où ils sont tournés régulièrement (chaque heure) pour empêcher l'embryon de coller à la coquille. Au 18^e jour d'incubation, les œufs sont sortis de l'incubateur. Les œufs infertiles sont identifiés à l'aide d'un faisceau lumineux puis éliminés. Ensuite, un vaccin contre la maladie de Marek peut être administré directement dans l'œuf (vaccination *in ovo*). Les œufs sont ensuite installés dans les incubateurs pour l'éclosion (écloqueur) pour environ 3 jours. Il faut donc 21 jours au total pour produire un poussin. Les poussins éclosent dans l'écloqueur. C'est dans l'écloqueur qu'ils produisent leur première fiente, nommée méconium. Les poussins sont ensuite sortis de l'écloqueur et séparés de leur coquille. Ils sont ensuite vérifiés manuellement à la naissance pour toute anomalie ou maladie. Les poussins non viables sont euthanasiés. Certaines lignées de poulets peuvent être sexées à l'aile, les plumes des femelles étant plus longues que celles des mâles. Les autres poussins

peuvent avoir, selon les protocoles des couvoirs, des injections sous-cutanées ou des vaporisateurs afin de les vacciner contre la coccidiose par exemple. Ils sont ensuite livrés par camion à leur ferme. Le cycle total pour produire un poulet de chair à partir d'un œuf prend approximativement 9 semaines. Les poulets de chair produits au couvoir seront livrés chez l'un des 2800 producteurs de poulets de chair au Canada (22-25).

Escherichia coli

Comme tous les vertébrés, les poulets possèdent une grande quantité de la bactérie *Escherichia coli* (*E. coli*) dans leur tractus digestif, l'un des micro-organismes les plus étudiés dans le monde. Cette bactérie a été découverte en 1885 par Theodor Escherich et nommée à l'époque *bacterium coli*. Cette bactérie de la famille des *Enterobacteriaceae*, un colibacille Gram négatif anaérobie facultatif flagellé non sporulant, est majoritairement commensal (vit en symbiose avec l'organisme hôte) (26, 27). Vivant souvent sur les muqueuses du tractus digestif, son taux de réplication est très rapide, pouvant atteindre 30 minutes pour un cycle complet chez certaines souches dans des conditions favorables. Plusieurs facteurs peuvent influencer la prévalence et la diversité de cette bactérie au sein d'un organisme, comme l'alimentation, des facteurs environnementaux, la prédation par des protozoaires, l'utilisation d'antimicrobiens, etc. La proportion d'*E. coli* varie ainsi d'une espèce à l'autre, étant plus élevée chez l'humain que la faune sauvage et avec des proportions plus basses encore chez les reptiles. L'environnement et l'alimentation sont des facteurs clés pour la sélection et la variabilité des *E. coli* au sein d'un organisme. Ainsi, des études chez l'humain ont démontré que les habitants des pays tropicaux ont une population d'*E. coli* commensal beaucoup plus diversifiée que ceux des pays nordiques. Des études ont aussi démontré qu'en France, en 20 ans, les changements socioéconomiques apportés dans le pays avec l'incorporation de la chaîne du froid (réfrigération des aliments), l'augmentation de l'hygiène et les changements au niveau de l'alimentation ont aussi fortement contribué à modifier la population d'*E. coli* chez les humains. De plus, la diversité génétique de la population d'*E. coli* et ces phylogroupes (la notion des phylogroupes des *E. coli* sera expliquée plus bas) ont grandement changé dans ce pays et ainsi que dans d'autres pays développés comparativement à des pays tropicaux en voie de développement (27). Il y a aussi une forte diversité des *E. coli* chez un même individu. Certaines souches sont prédominantes, constituant plus de la moitié des souches d'un individu,

alors que les autres souches peuvent être présentes à des niveaux très variés. De plus, certaines de ces souches peuvent être résidentes (présentes des années dans le tractus gastro-intestinal) alors que d'autres sont transitoires et ne seront observées que quelques semaines voire quelques jours au sein d'un même individu (28).

Les *E. coli* possèdent plusieurs particularités comme celles de fermenter le lactose en galactose, en glucose et en acides, ce qui change le pH de son milieu et donne une coloration rouge ou rose lorsqu'ils poussent sur un milieu différentiel tel que le MacConkey. Ils possèdent aussi la particularité de pouvoir métaboliser l'indole, mais pas le citrate. Des techniques d'identifications chromogènes et fluorogéniques ont donc été élaborées, notamment en prenant en compte qu'ils possèdent la β -glucuronidase, mais aussi la β -galactosidase comme la plupart des coliformes. La détection visuelle des *E. coli* directement sur des milieux de cultures primaires, comme avec l'ajout d'indicateur de pH dans le milieu de culture, rend leur identification rapide (29, 30). Au sein du laboratoire de référence pour le *E. coli* de la faculté de médecine vétérinaire de l'Université de Montréal, la méthode de détection consiste ainsi à mettre en solution l'échantillon à analyser dans de l'eau peptonée dans un whirl-pack avec filtre, puis d'utiliser le filtrat pour inoculer sur une gélose MacConkey. Après incubation d'une nuit à 37° C, les souches lactoses positives sont sélectionnées et repiqués une deuxième nuit sur un second MacConkey. Le milieu MacConkey est un milieu de culture sélectif qui inhibe la croissance de plusieurs bactéries dont des Gram positifs grâce au crystal violet et aux sels biliaries. Une colonie lactose positive est une colonie qui prend une coloration rose sur la gélose au lieu de rester blanche. Cette coloration est due au métabolisme du lactose dans le milieu, produisant ainsi des acides et le changement de couleur. La confirmation finale de la colonie comme un *E. coli* se fait ensuite par PCR (31).

Les techniques d'identifications chromogènes et fluorogéniques comportent quelques lacunes puisqu'elles ne sont pas toujours spécifiques aux *E. coli*. C'est pourquoi des méthodes d'identifications moléculaires par PCR ont été élaborées à l'aide d'un des gènes codant pour ses deux dernières enzymes, soit le gène *uidA* (codant β -glucuronidase, un «house keeping gene» ou gène domestique des *E. coli*) et *gadA/B* (codant pour la β -galactosidase, exprimée par plusieurs coliformes dont les *E. coli*, celui-ci ayant été mis de côté n'étant pas assez

spécifique). À l'aide des techniques moléculaires ciblant le gène *uidA* seulement, le taux de détection est spécifique à 97% et très rapide à réaliser. Cette méthode par PCR est donc plus rapide pour réaliser la confirmation des souches d'*E. coli* que les galeries API (batterie de tests enzymatiques), ou encore les tests phénotypiques classiques plus laborieux et moins sensibles exigeant la culture des bactéries dans des milieux contenant du 4-méthylumbellifère (30, 32).

Rôles des bactéries commensales dans le tractus digestif

Un hôte sain a plusieurs mécanismes de défenses intrinsèques contre les bactéries pathogènes à même le tractus digestif, que ce soit des défenses mécaniques (péristaltisme, barrière muqueuse) ou immunitaires (cellules phagocytaires, compléments et anticorps entre autres). Un troisième mécanisme de protection est aussi présent à ce niveau, provenant de l'interaction mutuellement bénéfique entre l'hôte et sa flore commensale. Celle-ci est très diversifiée, possédant plus de 7000 espèces différentes et dont la composition exacte et la diversité varie selon les sections intestinales. L'environnement qu'est l'hôte procure une stabilité nutritionnelle pour la flore commensale. En échange, la flore commensale, dont les *E. coli*, offre différents avantages à l'hôte, comme une contribution à la nutrition par le métabolisme de certains nutriments non digestibles, une stimulation du système immunitaire, l'angiogenèse et le stockage de certains lipides. Finalement, le microbiote intestinal protège l'hôte contre les différentes bactéries pathogènes en empêchant celles-ci de coloniser le tractus gastro-intestinal. Les bactéries du microbiote utilisent pour ce faire plusieurs mécanismes différents conférant une résistance à la colonisation par les pathogènes. Par exemple, elles empêchent les autres bactéries pathogènes d'adhérer à la surface puisqu'elles l'occupent déjà. Aussi, elles produisent des molécules inhibitrices comme des antimicrobiens qui sont des substances toxiques pour les autres bactéries (exemple : bactériocines composées de courtes chaînes d'acides lipidiques). C'est notamment le principe à l'origine des probiotiques. Elles stabilisent aussi la protection mécanique des muqueuses, limitent les nutriments pour les pathogènes en les consommant elles-mêmes et promeuvent la motilité intestinale (28, 33). Plus récemment, le microbiote commensal a été associé à l'hypothèse de l'hygiène, une théorie selon laquelle les maladies auto-immunes ou allergiques sont en augmentation dans les pays industrialisés dû à une hygiène trop importante qui ne favorise pas la maturation du système immunitaire. Celui-

ci aurait en effet besoin de stimulation antigénique. Chez plusieurs des patients atteints, une dysbiose du microbiote intestinale est observée. Le microbiote servirait de stimulant pour l'immunorégulation en agissant au niveau de récepteurs «toll-like» et prévenant ainsi des processus auto-immuns(34). Le rôle du microbiote dans différentes maladies, tumeurs, désordres intestinaux et troubles du comportement est à l'étude, son implication semblant être importante.

Il a déjà été prouvé que de débalancer la flore intestinale normale avec des traitements antimicrobiens augmente grandement les risques d'infections par des pathogènes entériques puisque les antimicrobiens ne sont pas spécifiques pour les pathogènes, mais affectent aussi grandement les commensaux. Certaines études ont aussi démontré que l'inflammation cause un changement dans la flore commensale, favorisant la croissance des bactéries pathogènes. En effet, la muqueuse inflammée relâche des molécules qui inhibent la flore commensale mais auxquelles certains pathogènes sont plus résistants (ex : complément, anticorps IgA, interleukine, défensine, mucine, phospholipase A2, lysozyme, lactoferrine, etc.). L'inhibition par ces différentes molécules de certaines souches commensales favorise ensuite la prolifération des micro-organismes pathogènes. De plus, les changements inflammatoires causés par l'hôte changent la biodisponibilité des nutriments et les sites d'adhésion sur la paroi intestinale, puisqu'ils sont moins utilisés par la flore commensale qui est inhibée. Ainsi, les bactéries pathogènes peuvent profiter de cet apport nutritionnel supplémentaire pour proliférer, ce que l'on nomme l'hypothèse alimentaire. De plus, la paroi inflammée est plus perméable, provoquant une augmentation de fluides dans la lumière intestinale, fournissant ainsi des nutriments supplémentaires pour plusieurs bactéries pathogènes et provoque la diarrhée chez l'hôte. Plusieurs types d'entéro-pathogènes comme les EPEC, mais aussi d'autres espèces telles que *Yersina* spp. et *Shigella* spp. sont bien adaptés aux systèmes de l'hôte et sont opportunistes, c'est-à-dire qu'ils attendent le moment propice pour se multiplier et causer une infection, comme lors de dysbiose intestinale, alors qu'ils ne causent aucun signe clinique chez un animal en santé. Ces études démontrent l'importance de la flore commensale dont fait partie les *E. coli* pour la santé entérique des animaux et des humains (26, 33).

Vers les années 1940, des associations ont commencé à être faites entre les bactéries du genre *E. coli* et certaines infections, notamment la dysenterie chez les jeunes enfants (généralement âgés de moins de 1 an). Il était donc important de mieux caractériser ces bactéries pour mieux comprendre leur virulence, comment les traiter et les prévenir (35).

Classifications

La classification selon la capacité des bactéries à fermenter différents sucres s'étant avérée limitée, d'autres classifications ont été utilisées selon les différentes propriétés physiologiques, morphologiques, antigéniques et génétiques des bactéries (28).

Classification selon le sérotype

Lorsqu'on classe les *E. coli* selon leurs formules antigéniques, 4 différents constituants de la bactérie sont utilisés, soit la capsule (K), les lipopolysaccharides (O; ce sont des constituants de la membrane cellulaire), les flagelles (H) et les fimbriae (F). Lorsque l'on identifie les *E. coli* à l'aide de plusieurs antigènes, on nomme cette classification leur sérotype. La disponibilité des antigènes O et H étant les plus répandus dans les différents laboratoires, la classification des *E. coli* a été réalisée principalement grâce à ceux-ci et ce système est devenu un «gold standard» à travers le monde à partir des années 1940. Ces antigènes ont une importance particulière, notamment dans la pathogénie de la bactérie, mais aussi comme cible pour l'immunité acquise et innée. En effet, ils confèrent la spécificité antigénique à la souche. On testait tout d'abord ces différents antigènes par agglutination avec des antisérums spécifiques pour chacun des différents sérogroupes. Bien que les antigènes K et F sont aussi étudiés (par exemple il existe plus de 80 antigènes K), ceux-ci sont moins fréquemment utilisés pour la classification. Aujourd'hui, il existe plus de 170 différents types de O et 50 types de H répertoriés. Par contre, puisqu'il pouvait y avoir plusieurs souches différentes au sein d'un même sérotype O:H et que certaines souches étaient classées comme étant non typables (non classables), d'autres techniques pour raffiner cette classification ont ensuite été développées comme les biotypes, les phylogroupes et les caractérisations génétiques. Classifier ces différentes bactéries était très important car certaines des souches non typables peuvent être pathogènes (28, 36, 37).

Classifications selon des phylogroupes

Les années 1980 ont vu le développement de «multilocus enzyme electrophoresis» (électrophorèse enzymatique multilocus ou MLEE). Les isolats sont caractérisés par la migration sur un gel d'électrophorèse de plusieurs enzymes «housekeeping» solubles dans un milieu aqueux. La mobilité de ces enzymes était alors directement reliée à un allèle de celles-ci, correspondant à un locus, et l'addition de tous ces locus dans un dendrogramme permettait de classifier la bactérie dans différentes lignées. Cette analyse a permis de démontrer la très grande diversité génétique des *E. coli*, où différents génotypes peuvent être associés à un même sérogroupes. Une dizaine d'années plus tard, une analyse plus performante utilisant des chaînes de nucléotides, le «multilocus sequence typing (typage de séquences multilocus ou MLST), a permis d'approfondir les connaissances sur la génétique des *E. coli*. Avec cette méthode, les souches sont identifiées avec le numéro de leur séquence type (ST) (28).

Ensuite, une classification plus simple et rapide a été développée au début des années 2000 et s'est rapidement répandue partout dans le monde. La classification phylogénétique, établit selon Clermont et al. (38), sépare les différentes souches en 4 groupes phylogénétiques (A, B1, B2 et D) avec une précision de 80-85% par rapport à leur type MLST associé. La méthode de base repose sur l'utilisation d'une PCR triplex pour détecter 2 gènes (gène *chuA*, codant pour la protéine «outer membrane hemin receptor *chuA*» et le gène *yjaA*, qui code pour une protéine non caractérisée d'*E. coli* K-12) et pour un fragment d'ADN (nommé TspE4.C2 qui a été identifié comme une partie d'un gène pour une lipase estérase). Elle repose sur un principe datant des années 1980 stipulant que certains fragments d'ADN pourraient être des marqueurs spécifiques, nommés substructures génétiques, pour certains phylogroupes. Ainsi, le gène *chuA* n'est présent que pour les phylogroupes B2 et D, que l'on différencie par la suite avec le gène *yjaA* présent seulement chez B2. Finalement, on différencie B1 de A par la présence du fragment TspE4.C2 chez les membres du phylogroupe B1. Cette méthode réalisée à l'aide d'une seule PCR triplex était donc beaucoup plus rapide et est moins coûteuse que les MLST ou encore le ribotyping (migration d'ADN bactérien sur gel d'électrophorèse suivie d'une hybridation avec des fragments d'ARN ribosomal pour faire des analyses phylogénétiques en les comparant avec des organismes de référence). L'étude de ces substructures génétiques a permis de révéler que les souches appartenant à différents phylogroupes ne sont pas

distribuées aléatoirement, mais diffèrent sur plusieurs points phénotypiques et génétiques, selon leur niche écologique, les traits historiques de la souche et leur pathogénicité. Chez l'humain, les phylogroupes A et B2 seraient prédominants alors que chez les animaux, B1 serait le groupe prédominant, selon des études faites sur plus de 1000 animaux, dont plusieurs vertébrés en Australie (mammifère, oiseau, poisson, grenouille, reptile), des mammifères dans des zoos (carnivores, omnivores et herbivores), des animaux de production, des animaux sauvages et des animaux de compagnie. Il a aussi été démontré que les phylogroupes B2 et, à un moindre degré, D sont les principaux phylogroupes associés à des infections extra-intestinales par des *E. coli* chez l'humain (28, 38). Chez la volaille, des études ont démontré que les phylogroupes associés à ces mêmes infections étaient plutôt associés au phylogroupe A (39).

Avec la première classification par Clermont et al. en 2000, une quantité importante de données accumulées avec les séquences de multilocus et le séquençage bactérien (abordé dans le prochain paragraphe) ont ajouté à la compréhension du génome bactérien des *E. coli* et un raffinement a été nécessaire (40). En 2009, 5 groupes d'*Escherichia* ont été nommés *cryptic clade* I à V, ceux-ci étant phénotypiquement indifférenciables des *E. coli* avec les méthodes biochimiques usuelles, mais génétiquement différentes lors d'analyse par MLST (41, 42).

Une nouvelle classification s'est alors imposée pour inclure 8 phylogroupes, dont 7 groupes pour les *E. coli* (A, B1, B2, C, D, E, F) et le huitième pour les *Escherichia cryptic clade* I. Cette nouvelle méthode par PCR permet aussi de les différencier des autres types d'*Escherichia cryptic clade* (II à IV). Comparativement à la méthode avec une PCR triplex par Clermont et al. en 2000 qui associait phylogroupes et MLST à environ 80-85%, la nouvelle méthode au PCR quadruplex permettant la classification en 8 phylogroupes effectue l'association d'un phylogroupe avec le bon type MLST dans 95% des cas. Ceci est logique, puisque 13% des souches testées avec PCR triplex seraient en fait dans les nouveaux phylogroupes (C, E, F, clade I) et qu'une portion significative des souches testées avec le triplex (A₀, D₁, D₂) était incorrectement assignée. Ainsi, le phylogroupe E contient quelques sérotypes dont O157 : H7 est le plus connu. Le phylogroupe F serait très près du B2 et C serait relié, mais distinct du phylogroupe B1. Finalement, les *E. clade* I sont indifférenciables des *E.*

coli au niveau phénotypique, mais en sont distincts génétiquement. Par contre, le grand degré de recombinaison entre ces différentes souches nécessite aussi leur différenciation dans de nouveaux phylogroupes. En bref, les trois mêmes gènes ont été conservés, mais les amorces ont été modifiées pour être plus spécifiques aux *E. coli* et non aux *E. clade I*. Ensuite, une quatrième substructure génétique, le gène *arpA*, a été ajoutée. Celui-ci permet d'avoir un contrôle de qualité étant donné que tous les phylogroupes doivent avoir au moins ce gène présent. De plus, ce gène est présent pour tous les phylogroupes (sauf B2 et F) mais est absent chez les *E. clade II* à *IV* et chez *E. albertii* et *E. fergusonii* (un test subséquent est nécessaire pour différencier les différents *E. clade II* à *V*). Finalement, pour différencier les souches des phylogroupes C et E, une PCR additionnelle doit être réalisée (voir le tableau 1). Cette approche à 4 gènes minimum est un peu plus complexe que la première décrite, puisqu'un isolat peut être soit immédiatement identifié à un phylogroupe ou nécessiter une deuxième PCR. Elle a cependant l'avantage de classer correctement 80% des souches précédemment mal classées avec l'ancienne PCR triplex. Avec cette nouvelle nomenclature, moins de 1% des souches ne peuvent être assignées à un phylogroupe (40, 41).

Table 1. Résultats possibles lors de la nouvelle PCR établie par Clermont et al. en 2013 et tests supplémentaires requis selon les phylogroupes obtenus

<i>arpA</i>	<i>chuA</i>	<i>yjaA</i>	TspE4.C2	Phylogroupe	Prochaines étapes
+	-	-	-	A	
+	-	-	+	B1	
-	+	+	-	B2	
-	+	+	+		
-	+	-	+		Confirmer en testant <i>ibeA</i>
+	-	+	-	A ou C	Confirmer avec une amorce C
+	+	-	-	D ou E	Confirmer avec une amorce E
+	+	-	+		
-	+	-	-	F	
+	+	+	-	E ou Clade I	Confirmer avec une amorce E
-	-	+	-	Clade I ou II	Confirmer avec des amorces Clade
-	476 pb au lieu de 288	-	-	Clade III à ou V	Confirmer avec des amorces Clade La migration de <i>chuA</i> est plus basse
Autres combinaisons				Inconnu	MLST

Classification à l'aide du séquençage

Enfin, la lecture même du génome bactérien, le séquençage, permet d'avoir le plus de données précises sur les populations et les différents recombinaisons bactériens. Le premier *E. coli* commensal a été séquencé complètement en 2008, ce qui a permis de commencer l'élaboration d'une banque de données pour réaliser des études plus poussées sur le génome bactérien d'*E. coli*. Depuis l'établissement de «*Escherichia coli* Reference Collection» (Collection de référence des *Escherichia coli* ou ECOR), plusieurs études ont démontré que les arbres phylogénétiques construits à l'aide d'analyses de quelques gènes seulement présentaient des incongruences entre eux. Ainsi, les regroupements des souches n'étaient pas les mêmes selon les différents gènes et méthodes utilisées. Avec l'arrivée du séquençage de génome entier, il est maintenant possible d'étudier des centaines de souches pour mieux comprendre l'évolution au niveau génomique des populations bactériennes d'*E. coli* (28, 43). Cette tâche n'est pas simple, leur génome étant très complexe, contenant plus de 17000 gènes. Par exemple, une étude ayant fait le séquençage de 20 différentes souches a démontré que le

nombre moyen de gènes par bactérie est de 4721, mais seulement 1976 de ces gènes en moyenne possédaient une forte homogénéité entre les souches, 98,3% identique au niveau des séquences de 4,1 méga-base. Ces 2000 gènes forment le génome de base des *E. coli*. Ce génome de base est surtout le génome primordial pour le métabolisme bactérien principalement (44). La tâche dans la compréhension du génome se complexifie encore plus lorsque l'on ajoute les gènes accessoires. Le génome est en fait estimé à près de 13 000 différents gènes, ce qui donne une idée à quel point le génome des *E. coli* peut être diversifié. Donc, les mécanismes d'infections que ces bactéries peuvent utiliser le sont eux aussi (28, 43).

Classification selon la virulence

Lorsque l'on connaît le mécanisme d'infection de la bactérie, on peut la classer selon un pathotype. Ces mécanismes sont acquis par les bactéries pathogènes grâce à des gènes qui leurs confèrent des traits de virulence. On peut classer les souches pathogènes d'*E. coli* en deux grandes catégories selon la localisation dans le système de l'hôte où celles-ci causent des signes cliniques, soit en «extra-intestinal pathogenic *Escherichia coli*» (*Escherichia coli* pathogène extra-intestinal ou ExPEC) ou en «intra-intestinal pathogenic *Escherichia coli*» (*Escherichia coli* pathogène intra-intestinal ou IPEC). Ces dernières sont responsables d'infections dans le tractus digestif seulement, comme leur nom l'indique. Il existe 5 principales sous-catégories d'IPEC. Elles sont classifiées selon les différents gènes de virulence qu'elles possèdent, donc selon leur pathogénie : les «enteropathogenic *Escherichia coli*» (*Escherichia coli* entéro-pathogènes ou EPEC), les «enterotoxigenic *Escherichia coli*» (*Escherichia coli* entérotoxigène ou ETEC), les «enteroinvasive *Escherichia coli*» (*Escherichia coli* entéro-invasifs ou EIEC), les «enteroaggregative *Escherichia coli*» (*E. coli* entéro-agrégatifs ou EAEC) et les «enterohemorrhagic *Escherichia coli*» (*Escherichia coli* entéro-hémorragiques ou EHEC). Bien que ces 5 pathotypes soient les plus souvent décrits, d'autres pathotypes moins fréquents d'IPEC existent aussi (26, 29, 45, 46).

Les EPEC contiennent un «type three secretion system» (système de sécrétion type trois ou TTSS), qui cause des lésions typiques que l'on qualifie de lésions d'attachement et d'effacement. Les ETEC utilisent également deux sortes de toxines, des toxines labiles et des toxines stables qui vont altérer la balance osmotique du petit intestin. Alors que la plupart des

IPEC restent dans la lumière intestinale, les EIEC envahissent la paroi intestinale et pénètrent les entérocytes, évitant ainsi plusieurs des mécanismes de défenses immunitaires de l'hôte. Les EAEC sont caractérisés par la formation d'un biofilm dans le colon puis par la sécrétion de toxines et de facteurs cytolytiques. Finalement, les EHEC utilisent la vérocytotoxine ou toxine shiga, responsable de signes systémiques comme des syndromes urémiques et hémorragiques, qui peuvent causer secondairement des dommages neurologiques et rénaux permanents. C'est la raison pour laquelle certains auteurs vont plutôt les nommer «shiga toxin-producing *Escherichia coli*» (*Escherichia coli* producteurs de shiga toxines ou STEC). Ils sont notamment impliqués dans l'éruption de maladie du hamburger (colite hémorragique), causée par le sérotype O157:H7 (43, 45-47).

De plus en plus de nouvelles évidences démontrent que les gènes de virulence qui confèrent la pathogénicité à des certaines souches d'*E.coli* sont en fait maintenus dans le microbiote commensal par d'autres *E. coli*. Ces différents gènes peuvent en effet conférer un avantage en exprimant des adhésines, des capteurs de fer, certaines toxines et protectines qui leur donnent plus de faciliter à coloniser le tractus intestinal. D'autres gènes codant pour les LPS, les toxines shiga et les gènes de virulence extra-intestinaux confèrent un avantage contre la prédation par des protozoaires ou des nématodes (28). Par exemple, la variabilité antigénique des antigènes O permet d'avoir une résistance contre certains bactériophages qui ont une sélectivité accrue pour certains sérogroupes O (48). Ces évidences suggèrent donc que les bactéries *E. coli* commensales ont un certain potentiel pathogène et peuvent aussi servir de réservoir à certains facteurs de virulence chez un individu sain. La présence de ces facteurs est explicable chez un animal sain puisque leur utilité n'est pas strictement pathologique. En effet, ils sont utilisés par des *E. coli* commensaux pour faciliter leur colonisation ou ils peuvent potentiellement être en transit entre des souches commensales jusqu'à être acquis par des souches pathogènes. De ces éléments en transit, plusieurs d'entre eux peuvent être associés à des séquences transmises avec des phages et des prophages, confirmant leur importance dans l'évolution des différents pathotypes (28).

ExPEC

Les ExPEC sont une classe d'*E. coli* qui ne cause pas d'infections lorsque présente dans le tractus digestif contrairement aux IPEC. Le tractus gastro-intestinal est souvent un réservoir pour ces bactéries, où elles ont un cycle de vie semblable aux *E. coli* non pathogènes. Elles ont cependant une forte prédisposition à infecter d'autres tissus à l'extérieur du système digestif. Cette susceptibilité est dictée par différents facteurs, comme le bagage génétique de la souche, l'hôte infecté (le système immunitaire est différent d'un individu à l'autre), la voie d'infection et les facteurs environnementaux prédisposants. Tel que déjà mentionné, leur bagage génétique est différent des IPEC. Les ExPEC appartiennent en général au phylogroupe B2 et, à un moindre degré, D. Les ExPEC, tout comme les IPEC, sont divisés en plusieurs pathotypes. Chez l'humain, on en retrouve principalement trois : les «uropathogenic *Escherichia coli*» (*Escherichia coli* pathogènes urinaires ou UPEC), les «neonatal meningitis-causing *Escherichia coli*» (*Escherichia coli* causant des méningites néonatales ou NMEC) et les «human sepsis-associated *Escherichia coli*» (*Escherichia coli* pathogènes septicémiques ou SEPEC). D'autres pathotypes moins fréquents peuvent aussi être responsables d'infections respiratoires, d'infections de plaies chirurgicales et de péritonites (45, 46, 49).

Pour réaliser ces infections, les souches ExPEC ont fait l'acquisition de gènes de virulence qui leur confèrent l'habilité de survivre à l'extérieur du système digestif de leur hôte spécifique. Une grande variété de gènes de virulence existe, certains dans le génome et d'autres sur des plasmides, ce qui donne une grande plasticité au génome des ExPEC. Ainsi, certaines souches auront des gènes codant pour des adhésines (fimbriae de type I et P), des facteurs pour éviter le système immunitaire de l'hôte (la capsule bactérienne, les lipopolysaccharides), des mécanismes pour acquérir des nutriments (sidérophores pour l'acquisition de fer) et la production de toxines (des hémolysines, le facteur cytotoxique nécrosant). La combinaison de ces gènes n'est pas nécessairement la même d'un pathotype à l'autre. Certains gènes de virulence peuvent être plus spécifiques pour un pathotype en particulier, comme le plasmide Colicin V (ou colV, contenant les gènes de virulence *iss*, *tsh*, *iucC*, *cvi*, *hyla*, *iroN* et *ompT*) pour les APEC, la capsule K1 lors de méningite (chez les NMEC) et les gènes *sat* et *Usp* lors d'infection urinaire (UPEC), suggérant qu'un certain bagage génétique est nécessaire pour l'acquisition et l'expression de certains facteurs de virulence (47, 49, 50). Une étude ayant

testée 33 différents gènes de virulence chez plus de 500 ExPEC provenant d'ECOR a déterminé que chacune de ces souches contenait 5 à 26 différents gènes de virulence démontrant leur grande diversité génétique (51).

Ces souches bactériennes sont une grande préoccupation en santé humaine, particulièrement chez les nouveau-nés, les personnes âgées, les immuno-supprimés et chez les femmes (problèmes urinaires). Durant les dernières années, l'incidence d'infections dues à des ExPEC a augmenté et est devenue l'une des causes principales d'infections nosocomiales. Les infections avec fatalité causées par ces bactéries sont dramatiquement en augmentation partout dans le monde, ce qui est une grande préoccupation pour la santé publique. Selon des études d'Australie et d'Europe, les ExPEC sont à présent considérés comme les agents infectieux extra-intestinaux les plus prévalents et dont la prévalence augmente depuis les dernières années. Par exemple, les bactériémies par des ExPEC ont augmenté de 33% entre 2004 et 2008 au Royaume-Uni. Cette augmentation pourrait être due à l'augmentation de la résistance antimicrobienne, qui sera abordée dans une prochaine section (46, 52).

UPEC

Étant la cause d'infections urinaires la plus fréquente chez l'humain, les UPEC peuvent aussi avoir des complications plus sévères comme des pyélonéphrites et même parfois des septicémies pouvant causer la mort. Près de 70% des infections urinaires sont dues à ces bactéries et 50% sont des infections urinaires nosocomiales. Ces infections, souvent récurrentes, ont quatre fois plus d'incidence chez la femme, étant dans 30% des flores vaginales normales (53). Les personnes les plus à risque de développer les signes de cette maladie sont les femmes enceintes, les femmes post-ménopauses, les patients ayant des cathéters urinaires et les individus atteints de diabète (54). Chez les femmes enceintes, ce pathotype peut provoquer plusieurs problèmes comme des complications néonatales et obstétricales, des enfants nés avec un faible poids, des septicémies et des méningites néonatales (53). En médecine vétérinaire, les UPEC sont aussi l'agent bactérien responsable de la majorité des infections urinaires chez le chien et certains sérotypes (comme O6 :H31) ont été associés à un risque potentiel de zoonose (55). Dans une autre étude, 15,6% des ST identifiés auprès d'UPEC canin ont été associées à des souches de cas d'infection par UPEC

chez les humains (56). Le principaux phylogroupes associés à ces souches chez le chien et le chat serait B2 (57). Tout comme chez l'humain, le traitement contre ces souches nécessite un antibiogramme, plusieurs de ces souches étant multirésistantes (55, 56, 58).

NMEC

Les nouveaux nés sont plus susceptibles à ces infections étant donné l'immaturation de leur système immunitaire. Ils acquièrent la majorité de ces infections lors du passage dans le tractus génital maternel à la naissance ou directement *in utero*. La bactérie provoque ensuite une bactériémie, adhère et envahit le système endothélial cérébral, traverse la barrière hémato-encéphalique et cause une inflammation locale du système nerveux central (méningite). La grande majorité de ces souches (80%) possèdent la capsule K1 (49). Ce pathotype affecte surtout les nourrissons prématurés, causant plusieurs signes sévères. Le taux de mortalité (10 à 25%) et de morbidité (20 à 56%) est important avec des séquelles neurologiques possibles chez les survivants (59, 60). L'incidence de ces souches est en augmentation, ce qui pourrait être due à l'utilisation d'antibioprophylaxie *intra-partum*. Des transmissions verticales de souches résistantes avec le phylogroupe B2 avaient été détectées dans un premier temps par un frottis vaginal chez la mère enceinte en santé puis chez le bébé infecté (61). En médecine vétérinaire, des cas de méningites à *E. coli* chez le chien sont connus depuis 1949 (62). Ils sont de plus en plus documentés chez les animaux de compagnie, mais les études et rapport de cas sont moins bien documentés que chez l'humain ou la volaille (63). Chez les bovins, *gimB*, un gène associé à des NMEC chez l'humain, a été isolé chez 2,1% des isolats cliniques d'*E. coli*. Il n'a pas été isolé chez des isolats cliniques de chiens et de chats en revanche alors qu'il est bien documenté chez la volaille (64). L'inoculation de NMEC chez des rats peut causer des signes cliniques allant jusqu'à la mort chez les rats (65). Cependant, les recherches chez ces espèces (chien, chat, bovin et rat) ne permettent pas de conclure un risque réel de zoonose (63-65).

SEPEC

Les SEPEC causent des infections systémiques directement dans le sang de l'hôte infecté. Ce pathotype est surtout présent chez les individus dont l'efficacité du système immunitaire est compromise. Les septicémies qu'il provoque sont une importante cause de mortalité et de

morbidity pour le système de santé, sans compter les coûts que de tels traitements requièrent (49). Ce pathotype est responsable de 30% des cas de septicémies aux États-Unis. (47). Une augmentation de 54% a été observée en Europe entre 2001 et 2009, avec une augmentation de résistance croissante aux céphalosporines de 3^e génération chez ces souches (49, 66). L'augmentation du nombre de cas de souches résistantes a aussi été observée en Australie (67). Il est certain que cette augmentation est source d'une grande inquiétude, notamment parce que ces souches sont souvent multirésistantes (49). En recherche, l'inoculation de SEPEC chez des porcs et des chiens peut causer des septicémies, mais les recherches chez ces espèces ne permettent pas non plus de conclure un risque réel de zoonose ou d'espèces agissant en tant que réservoir (68, 69).

APEC

Bien que les ExPEC chez la volaille puissent causer une variété de pathologies, ils ne sont généralement pas classifiés selon des pathotypes différents, mais sont tous regroupés comme étant des «avian pathogenic *E. coli*» (*E. coli* pathogènes aviaires ou APEC). Selon les souches, les infections causées pourront être localisées (la cellulite), localisées puis devenir systémiques (aérosacculite), systémiques (septicémie) ou systémiques puis devenir localisées (méningite) (49, 51).

Les souches IPEC ont peu d'importance clinique chez la volaille. Les souches cliniques d'*E. coli* causant la majorité des problèmes au niveau de la santé des troupeaux sont plutôt dues au ExPEC, nommées APEC chez la volaille. Contrairement aux IPEC, les APEC chez la volaille sont une cause de pertes économiques importantes. Ils sont ainsi considérés comme l'une des infections causant les pertes économiques les plus significatives dans l'industrie avicole internationalement (3, 49, 50, 70, 71). Ces pertes financières sont dues aux coûts des traitements, aux retards de croissance, à la condamnation des carcasses en abattoir et à la mortalité en élevage. Dans les troupeaux atteints, les infections par APEC peuvent causer un taux de mortalité variant de 1 à 10% (72, 73), pouvant parfois être encore plus élevé chez les poulets de chair ou chez les poulets issus d'élevage biologique, chez qui les APEC sont la cause la plus importante de mortalité, allant même de 16 à 61% selon les troupeaux (74). On estime que 36 à 43% des condamnations à l'abattoir sont des lésions dues à ces infections (49,

75). Contrairement aux ExPEC chez l'humain, les APEC ne sont pas divisés en plusieurs sous-pathotypes selon leurs différentes habilités à causer des syndromes caractéristiques ou leurs gènes de virulence, comprenant plutôt un groupe très hétérogène de souches pathogènes. Ainsi, ils peuvent affecter une grande variété d'organes, les lésions (souvent fibrineuses) variant selon le mode d'entrée de la bactérie et la présence de bactériémie. Les lésions associées à ce pathotype comprennent, par exemple, des aérosacculites, des péricardites, des hépatites, des polysérosites, des cellulites, des salpingites, des omphalites, des synovites, des infections de sac vitellin, des coligranulomes, des panophtalmies, des septicémies et des lésions de tête enflée. On regroupe tous ces différents symptômes pouvant être causées par les APEC comme étant la colibacillose aviaire (3, 49, 71, 73).

Les premières études sur ce pathotype considéraient les APEC comme des bactéries opportunistes, qui causeraient des infections seulement lorsque le système immunitaire de leur hôte était affaibli, comme lors de stress biologique ou environnemental, ou en tant qu'infections secondaires. Des études plus récentes démontrent en fait que les gènes de virulence qui sont exprimés par les APEC chez des animaux atteints de colibacillose sont significativement différents des gènes retrouvés chez les *E. coli* dans les fientes d'animaux sains (71, 76). Des caractères spécifiques, tant phénotypiques et génotypiques, ont été identifiés comme des marqueurs de virulence reliés au sous-groupe des APEC et non associés à des *E. coli* obtenus de fientes de poulets en santé ou même à certaines souches ExPEC chez l'humain. Ces données révèlent l'importance des APEC dans les processus d'infections, ce qui a notamment aussi été démontrée à l'aide d'expérience *in vivo*. Elle n'exclut cependant pas un risque zoonotique potentiel des APEC (49). Cependant, comme il a été démontré lors des infections des sacs vitellins et d'omphalites, il est tout de même possible que des *E. coli* ne possédant pas de facteurs de virulence et donc considérés comme des commensaux, puissent causer ces infections (3).

Plusieurs gènes de virulence différents peuvent être impliqués dans les infections par des APEC, ce qui explique pourquoi il n'existe pas de consensus pour déterminer si une souche est un APEC. Bien que des souches possédant l'antigène O78, O1 et O2 soient souvent responsables, les 3 ensemble ne sont présents que de 15 à 61% des cas de colibacilloses. De

plus, les ST 10, 48, 95 et 117 ont été fréquemment observées chez ce pathotype, mais plusieurs autres ST ont aussi été identifiées. Le fimbriae F1 (type 1) permet aux APEC d'adhérer aux cellules respiratoires épithéliales du pharynx et de la trachée. Le «temperature-sensitive haemagglutinin» (hémagglutinine sensible à la température ou *tsh*) joue un rôle dans la colonisation des sacs aériens. Les systèmes aérobactines de séquestration de fer permettent aux bactéries de croître dans des milieux pauvres en fer comme dans le sang. Le fimbriae P est important pour les stades plus avancés d'infections où les bactéries infectent des organes et résistent à la phagocytose. Par contre, d'une souche APEC à une autre, tous ces différents gènes de virulence ne sont pas présents de façon constante (3, 77). De plus, les traits génétiques pour définir précisément les APEC ne sont pas encore tous élucidés. Tout comme les ExPEC chez l'humain, ces souches sont très variées et il est difficile de trouver une méthode simple et rapide pour les identifier comme APEC. Les sérogroupes O1, O2 et O78, bien que prédominants, varient beaucoup entre les études (15 à 61%). Plusieurs gènes de virulence ont été démontrés comme étant impliqués dans les infections par APEC, incluant des adhésines (les fimbriaes F1, P et Stg, *curlI*, et *EA/I*), des facteurs protégeant contre le système de défense de l'hôte (*OmpA*, *Iss*, lipopolysaccharide, et capsule bactérienne comme K1), des systèmes d'acquisition de fer (aérobactine, Iro protéine, yersiniabactine et le locus *Sit* d'acquisition de fer), des autotransporteurs (*tsh*, *Vat* et *AatA*), des systèmes de transport des phosphates, des gènes impliqués dans le métabolisme de différents sucres et la protéine IbeA. Beaucoup d'autres gènes ont aussi été associés à la virulence des APEC et de nouveaux gènes continuent encore d'être découverts (49, 78).

Ces gènes, rarement tous présents sur une même bactérie, rendent la détection et la classification d'APEC difficile, étant un groupe très hétérogène. Ainsi, plusieurs protocoles de PCR multiplex ont été décrits pour détecter des combinaisons de gènes de virulence permettant d'identifier des APEC, par exemple ceux contenus sur le plasmide colicin V (ColV) ou les 4 gènes de virulence *iss*, *tsh*, *iucC* et *cvi* (71). D'autres protocoles plus élaborés consistent à identifier un nombre minimum de gènes parmi cinq gènes de virulence qui sont les plus significativement associés aux APEC (*iutA*, *hlyF*, *iss*, *iroN* et *ompT*) à l'aide d'une PCR pentaplex (79) ou des PCR multiplex comprenant plus de gènes, comme par exemple ces 8 gènes de virulence : les toxines *astA* et *vat*, la protéine *iss* qui augmente la survie dans le

sérum, les systèmes d'acquisition de fer *irp2* et *iucD*, l'adhésine *papC*, *tsh*, et le gène opéron *cva-cvi* dans le plasmide ColV (80). Une étude en 2012 a déterminé que la détection d'au moins quatre gènes de virulence parmi deux systèmes d'acquisitions de fer (*iutA*, *sitA*), le fimbriae P (F11), un métabolisme du sucre relié au gène *frzorf4*, le sérotype O78 et les gènes associés à la protéine T6SS (*aec26*, *aec4*), identifierait 70,2% des souches d'APEC et devrait être utilisée pour le diagnostic. Dans la même étude, les sérogroupes O1, O2, O5, O8, O18 et O78 étaient présents chez plus de la moitié des APEC alors que très peu étaient présents dans la flore intestinale commensale (71). Aucun test génétique ne permet d'affirmer hors de tout doute qu'une souche est véritablement un APEC. Un modèle infectieux *in vivo* aviaire doit être utilisé actuellement pour confirmer hors de tout doute une souche comme étant un APEC (49, 78).

Le tractus digestif de l'hôte, mais aussi l'environnement des poulets (contaminé par leurs fientes) sont considérés comme les principaux réservoirs des souches APEC (78). Aussi, la transmission verticale des souches APEC des troupeaux reproducteurs à leur progéniture a été démontrée (3). Les signes cliniques qui sont présents chez le poulet dépendent de plusieurs facteurs, comme la souche elle-même, la résistance de l'hôte, la voie d'infection et des facteurs environnementaux prédisposants. Ainsi, chez les jeunes poussins, les infections du sac vitellin et les omphalites sont les premières causes de mortalité dans la première semaine d'âge (53% des cas) (81). Les aérosacculites sont particulièrement prévalentes dans les poulaillers très poussiéreux. En effet, les bactéries sont inhalées via la poussière contaminée par des fientes et celles-ci colonisent les sacs aériens, dépourvus de macrophages, puis pénètrent les capillaires sanguins des poumons. Une infection systémique peut suivre (péricardite, périhépatite, septicémie) et causer d'importantes condamnations à l'abattoir (82). Chez les poules pondeuses, une infection ascendante du tractus génital ou une infection systémique affectant ensuite l'oviducte peut causer des salpingites. De telles infections peuvent augmenter le taux de mortalité embryonnaire des poussins et diminuer la production d'œufs (83). Le cannibalisme cloacal peut prédisposer à ces infections, étant la cause de blessure traumatique la plus fréquente chez les pondeuses (jusqu'à 20 % des cas rapportés de mortalités présenteraient des lésions) (84). Finalement, des égratignures (pouvant être causées lors de combat ou de picage par exemple) suivies d'un contact avec des souches présentes

dans la litière entraîneraient une infection sous-cutanée nommée cellulite (85). La cellulite représente jusqu'à 6% des condamnations en abattoir et est la première cause de condamnation chez certains troupeaux.(86).

Plasmides bactériens

Plusieurs éléments génétiques mobiles existent chez les cellules procaryotes comme des plasmides, des transposons, des intégrons et des bactériophages. Ces éléments sont des fragments d'ADN qui peuvent être intégrés ou non au chromosome bactérien. Dans certains cas, ceux-ci peuvent contenir des gènes donnant un avantage à leur hôte. Il existe 3 modes de transmissions de ces éléments : la transformation, qui est le transfert de fragment d'ADN libre, la conjugaison, qui est le transfert de plasmides à l'aide de pili, et la transduction, principalement associée aux bactériophages (87). Les plasmides sont des éléments circulaires doubles brins d'ADN bactérien qui ne sont pas des éléments génétiques du chromosome bactérien. À l'intérieur de leur hôte, ils ont la capacité de réguler leur réplication de façon autonome ainsi que leur transmission via conjugaison. Beaucoup de plasmides procurent des gènes à leurs hôtes qui peuvent s'avérer avantageux pour ceux-ci, comme des gènes de résistance ou de virulence. Leur identification et leur classification se font grâce à des traits présents de façon constante au sein des plasmides. L'un de ces principaux traits est le système de réplication, nommé réplicon. Un deuxième de ces traits est basé sur la stabilité du plasmide durant la conjugaison, nommé groupe d'incompatibilité. L'incompatibilité a été définie comme l'incapacité de deux plasmides apparentés à se propager de manière stable dans la même cellule. Par exemple, l'un des premiers groupes découvert a donc été nommé IncI, pour groupe d'incompatibilité un (88).

Traitements lors de la vaccination des poussins au couvoir

La principale cause de mortalité en début d'élevage est la colibacillose, sous forme d'omphalites ou d'infections du sac vitellin(3, 25). Pour diminuer l'incidence de cette maladie, les couvoirs administrent des antimicrobiens en prévention aux poussins. Cette administration se fait soit à un jour d'âge sous forme d'une injection sous-cutanée, ou le plus souvent, à 18 jours d'incubation simultanément à l'administration *in ovo* du vaccin contre la maladie de Marek (25, 70, 89). Au Québec, 6 couvoirs produisent des poulets de chair et un seul d'entre

eux fait des injections sous-cutané à un jour d'âge (Boulianne M., Université de Montréal, communication personnelle). Plusieurs antimicrobiens ont été utilisés dans les couvoirs au courant des dernières années (9), les principaux utilisés durant les dernières décennies pour prévenir la colibacillose dus aux ExPEC étant le ceftiofur (une céphalosporines de 3^e génération de la classe des β -lactamines) , la gentamicine (classe des aminoglycosides) et un mélange de lincomycine (classe des lincosamides) et de spectinomycine (classe des aminosides) (7). Par contre, une nouvelle politique de l'industrie avicole canadienne a limité l'utilisation des antimicrobiens dans les couvoirs, soit l'arrêt volontaire de l'utilisation du ceftiofur depuis 2014 (16). Ainsi, la majorité des troupeaux ne reçoivent plus aucun antimicrobien au couvoir. Aux États-Unis, des protocoles semblables ont été instaurés chez les poulets de chair (89, 90). Les reproducteurs provenant des États-Unis ont reçu du ceftiofur par voie sous-cutanée à un jour d'âge avant livraison jusqu'en 2015 (Boulianne M., Université de Montréal, communication personnelle).

Céphalosporines (β -lactamines)

Les β -lactamines sont l'une des classes d'antimicrobiens les plus diversifiées. Ces antimicrobiens fonctionnent en prenant pour cible la synthèse de la paroi cellulaire bactérienne, plus précisément en inhibant l'activité de transpeptidases responsables de la formation de lien entre les peptidoglycanes, ce qui résulte en une augmentation de la perméabilité cellulaire et éventuellement une hydrolyse (45, 90). Plusieurs sous-catégories de β -lactamines existent, dont les céphalosporines, qui ont tout d'abord été isolées de fungus nommés *Cephalosporium* (91). Les noyaux des céphalosporines peuvent être modifiés, ce qui change leur spectre d'action. On regroupe ces différents spectres d'action en génération. Les premières générations de céphalosporines, soit les premières qui ont été obtenues, ont des propriétés antimicrobiennes surtout contre les bactéries à Gram positifs. Chaque nouvelle génération a des propriétés antimicrobiennes supérieures contre les bactéries à Gram négatifs comparativement à celles des générations précédentes et, dans la majorité des cas, une activité réduite contre les bactéries à Gram positifs. Les céphalosporines de la troisième génération sont identifiées à spectre étendu, comme le ceftiofur utilisé en médecine vétérinaire ou le ceftriaxone utilisé en médecine humaine (92).

Aux États-Unis, ces antimicrobiens, sont utilisés pour traiter un vaste éventail d'infections, soit des infections respiratoires chez les bovins, porcs, moutons, équins et chèvres, des nécrobacillooses interdigitées aiguës, des métrites aiguës et des mammites chez les bovins. Ces antimicrobiens sont homologués chez les animaux de compagnie pour des infections de tissus mous, de peau et urinaires. Chez la volaille, le ceftiofur était homologué pour administration à un jour d'âge pour le contrôle des mortalités en début d'élevage. Les céphalosporines de 3^e génération sont utilisées en médecine humaine pour plusieurs infections (infections de peau, tissus mous, respiratoires, abdominales, urinaires, septicémies, etc.) (90). Au Canada, cette classe d'antimicrobiens a aussi été particulièrement utilisée dans les dernières décennies en médecine vétérinaire. Plus précisément, le ceftiofur, a été utilisé pour différentes indications chez les bovins, moutons, porcs, chevaux, dindes, chiens et chats (9). Pour ce qui est de son utilisation chez les poulets de chair, le ceftiofur a été utilisé hors homologation de façon sous-cutanée et *in ovo* en prévention pour contrôler les *E. coli* responsables d'omphalites en début d'élevage. Une utilisation hors homologation est une utilisation qui n'est pas conseillé par le fabricant (directive de l'étiquette ou de la notice d'accompagnement) d'un médicament homologué par Santé Canada ou la FDA aux États-Unis. Une telle utilisation est légale si elle n'enfreint pas des normes éthiques ou des règles de sécurité comme le temps de retrait pour les animaux destinés à la consommation humaine (93). Les doses injectées *in ovo* de ceftiofur au Canada étaient de 0,17 mg par poussins et ce bien que l'homologation aux États-Unis varie de 0,08 à 0,2 mg pour l'injection sous-cutanée seulement (70). En 2003-2004, son utilisation hors homologation *in ovo* dans les couvoirs canadiens (au Québec précisément) était évaluée entre 76 à 78% des lots en abattoir (7, 9). Une inspection sur 8 différents couvoirs aux États-Unis a démontré que 6 d'entre eux administraient le ceftiofur aussi hors-homologation (injection *in ovo*) (90). Le début de l'utilisation du ceftiofur à cette dose date de 1992, celle-ci diminuant la mortalité en début d'élevage ainsi que les lésions d'infections bactériennes chez les poussins en bas âge (70). La licence pour l'utilisation du ceftiofur chez les animaux de production date de 1988 et le premier cas de détection de bactéries résistantes à cet antimicrobien a été fait la même année chez un chien au Japon (94).

Gentamicine

Approuvé contre les infections à *E. coli*, aux salmonelles et à *Pseudomonas aeruginosa*, cet antimicrobien est couramment utilisé hors homologation en une injection unique de 0,2 mg par poussin pour prévenir l'omphalite. Ce traitement était recommandé chez les poulets de chair dans les lignes directrices de l'Association Canadienne des Médecins Vétérinaires (ACMV). Son administration *in ovo* n'était pas recommandée ni par le manufacturier, ni par l'ACMV. Cependant, étant donné son temps de retrait au Canada de 35 jours, une utilisation tôt en élevage a été préconisée (70). Cette utilisation date de 1976, celle-ci diminuant la mortalité en début d'élevage et augmentant ainsi l'efficacité des poussins (meilleure croissance et efficacité alimentaire et moins de condamnations à l'abattoir) (95). Son utilisation au Québec au niveau des couvoirs de poulets de chair a eu lieu avant 2003, avant que cet antimicrobien ne soit plus disponible suite à une commande en souffrance du manufacturier, les couvoirs ayant alors optés pour le ceftiofur en remplacement (Normand Lamothe, Merck, communication personnelle).

Lincomycine-Spectinomycine

Un des noms commerciaux du produit utilisé au Canada est Linco-spectin, une combinaison des antimicrobiens de lincomycine et de spectinomycine. Cet antimicrobien est homologué au Canada pour utilisation de 20 à 22 mg/kg chez les animaux de compagnie. Son utilisation par voie sous-cutanée à un jour d'âge ou *in ovo* chez la volaille est hors homologation, mais recommandée par l'ACMV (70). Son utilisation au niveau des couvoirs a débuté en 2005, puisque le ceftiofur et la gentamicine n'étaient plus utilisés à ce moment, puis l'a été en alternance avec le ceftiofur depuis 2007 (7). L'utilisation de cette combinaison d'antimicrobiens date d'une étude réalisée en 1978, où les troupeaux ayant reçus seulement la lincomycine ont présentés moins de mortalité due à *Staphylococcus aureus* (NDLR : ce qui est normal puisque cette classe d'antimicrobiens a moins d'effet contre les bactéries à Gram négatif telles que les *E. coli*). Les troupeaux ayant reçus seulement la spectinomycine avaient moins de mortalité causée par *E. coli* (NDLR : la spectinomycine est la composante du Linco-Spectin qui a un effet contre les Gram négatifs). Les troupeaux ayant reçus la combinaison des deux antimicrobiens ont démontré une plus faible mortalité lorsque seulement un des deux

antimicrobiens étaient utilisés seuls. L'effet de l'utilisation combinée de ces deux antimicrobiens est donc additif (2).

Pourquoi l'industrie avicole canadienne a cessé l'utilisation du ceftiofur en 2014?

a) Classification du ceftiofur par rapport à son importance chez l'humain

Depuis plusieurs années, l'utilisation de l'Excenel (nom commercial du ceftiofur utilisé chez la volaille) n'est pas recommandée pour utilisation hors homologation. Le ceftiofur, une céphalosporine de 3^e génération, a été défini comme un antimicrobien d'importance critique pour la médecine humaine par l'OMS et comme un antimicrobien de classe 1, soit de très haute importance en médecine humaine, par la Division de la direction des médicaments vétérinaires du gouvernement fédéral du Canada. L'OMS a même classé les céphalosporines de 3^e et 4^e générations comme l'une des 3 classes d'antimicrobiens les plus importantes en médecine humaine. L'OMS a déclaré que l'utilisation d'antimicrobiens de classe 1 doit être minimale en médecine vétérinaire (9, 70, 96). Chez les animaux de production, l'emploi d'autres classes d'antimicrobiens devrait être priorisé avant l'utilisation d'antimicrobiens de classe 1, afin de limiter le développement de résistances à ces antimicrobiens, lesquelles pourraient éventuellement être problématiques en médecine humaine (9, 70, 90).

b) Réglementations et initiatives

L'OMS a récemment émis un avertissement suite à l'observation que des résistances à des antimicrobiens d'importance critique en médecine humaine sont en augmentation partout dans le monde, notamment pour les céphalosporines à spectre étendu (comme le ceftiofur), les fluoroquinolones, les carbapénèmes et la colistine, entraînant de sérieuses infections chez l'humain (97). Le 1^{er} mai 2014, l'industrie avicole canadienne, après consultation auprès de nombreux experts, a pris l'initiative d'arrêter l'utilisation de ceftiofur en prévention au couvoir. Cette décision a été prise plus précisément par les Producteurs de Poulets du Canada (7, 16, 98). Par la suite, le Ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation du

Québec a proposé un projet de règlement sur la protection sanitaire des animaux, le chapitre p-42, qui entrera en vigueur le 25 février 2019:

« L'administration, à des fins curatives, d'un médicament appartenant à l'une des classes d'antimicrobiens de « Catégorie I: Très haute importance » à un animal destiné ou dont les produits sont destinés à la consommation humaine, est réservée aux seuls cas où il appert, notamment à la suite de la réalisation d'un antibiogramme, que l'administration d'un médicament d'une classe autre que celles de cette catégorie ne permettra pas de traiter la maladie» (99).

Ce chapitre mentionne aussi :

« Est interdite l'administration à des fins préventives d'un médicament appartenant à l'une des classes d'antimicrobiens de «Catégorie I: Très haute importance» à un animal destiné ou dont les produits sont destinés à la consommation humaine» (99).

Finalement, ce même chapitre mentionne également :

« Est interdite l'administration d'un médicament appartenant à l'une des classes d'antimicrobiens de «Catégorie I: Très haute importance» à des œufs embryonnés de volaille» (99).

Résistances antimicrobiennes

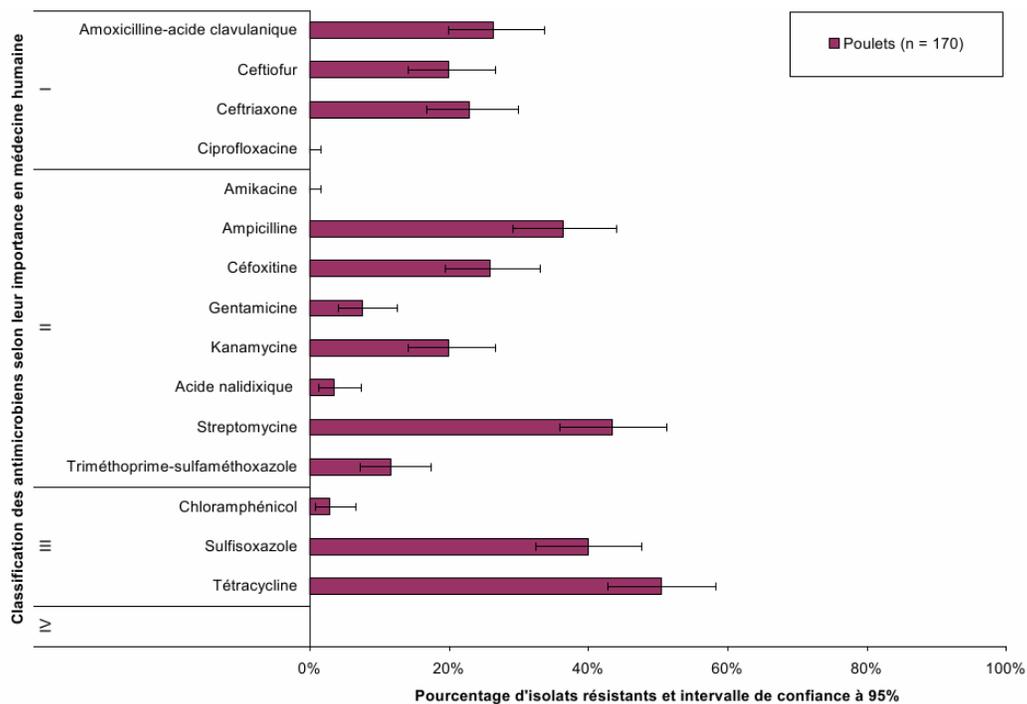
La présence de résistance antimicrobienne est un ancien phénomène qui résulte, dans la majorité des cas, à des bactéries possédant déjà de telles résistances intrinsèques comme *Streptomyces*. L'utilité pour ces micro-organismes est que la résistance vis-à-vis les antibiotiques produits par d'autres bactéries partageant la même niche écologique les favorisent dans leur environnement (100). Les antimicrobiens ont été utilisés dans plusieurs productions animales dont la volaille à des niveaux sous-thérapeutiques en tant que facteurs de croissance (pour prévenir et contrôler les infections, pour améliorer la conversion alimentaire et le gain de poids). Cette pratique peut modifier la flore intestinale en créant une pression sélective favorisant le développement de souches bactériennes résistantes aux antimicrobiens (101). L'augmentation de résistances non intrinsèques chez des bactéries a commencé après l'introduction d'antimicrobiens en médecine moderne, il y a environ 70 ans, ce qui

suggère une corrélation entre la pression de sélection antimicrobienne et l'émergence de ces résistances (100).

La flore commensale intestinale semble jouer un rôle important dans l'émergence de résistances antimicrobiennes. Une densité élevée de bactéries avec une grande diversité, tel que mentionné plus haut, combiné à une exposition à des antimicrobiens de façon parfois intensive dans les dernières décennies, que ce soit en médecine humaine ou vétérinaire, a contribué fortement à la sélection de résistance aux antimicrobiens dans le microbiote commensal. Des études chez l'humain ont confirmé une plus haute proportion de résistances bactériennes chez les groupes exposés à des antimicrobiens dans leur flore commensale. De plus, les phylogroupes A et D chez *E. coli* démontrent plus de facilité à acquérir la résistance antimicrobienne alors que les souches du phylogroupe B2 en acquièrent moins, ce qui peut expliquer la diminution de ce phylogroupe chez les animaux de compagnie chez qui des antimicrobiens sont fréquemment utilisés (28). Une étude au Japon sur les phylogroupes associés à des résistances aux β -lactamines a démontré aussi que les groupes A, B1 et D sont impliqués pour ces résistances alors que B2 ne l'est pas (39).

Une augmentation des résistances aux β -lactamines a été constatée dans les dernières décennies et ce, à l'échelle mondiale. Dans la revue actuelle, l'emphase sera mise aux résistances rapportées pour les céphalosporines de 3^e génération puisque les objectifs sont, entre autres, de déterminer l'effet de l'arrêt de l'utilisation de la céphalosporine de 3^e génération, le ceftiofur, dans les couvoirs aviaires chez les *E. coli*. Au Japon, les premiers cas d'*E. coli* résistants aux céphalosporines chez la volaille ont été détectés en 1999 et leur prévalence a augmenté depuis, étant autour de 4% en 2003 et au-dessus de 10% depuis 2004 (39). Ceci est une source de grande inquiétude pour la santé publique puisque l'utilisation d'antimicrobiens tels que le ceftiofur chez les animaux de production, peut causer de la résistance croisée à d'autres β -lactamines tels que d'autres céphalosporines de 3^e génération ou la céphamycine, qui sont largement utilisées en médecine humaine (9). Au Canada, ces résistances chez les *E. coli* ont été détectées par le Programme Intégré Canadien de surveillance de la Résistance aux Antimicrobiens (PICRA) depuis plusieurs années en abattoir (9, 102) et même chez les bactéries commensales et l'environnement de poulets de chair (101).

Figure 2. Résistance observée aux antimicrobiens parmi les isolats d'*E. coli* provenant de poulets; Surveillance en abattoir par le PICRA en 2008



Reproduit avec la permission du Ministre de la Santé du Canada (102, 103)

Une étude allemande a démontré que la proportion de résistance aux céphalosporines chez des troupeaux de chair était d'environ 100%, 6 mois après l'arrêt de l'utilisation de ceftiofur au couvoir dans ce pays. Dans cette même étude, les troupeaux reproducteurs importés correspondant présentaient beaucoup moins de résistances, sauf lorsque ces troupeaux étaient traités avec des β -lactamines, leurs résistances avoisinant alors celle de leur progéniture. L'étude ne mentionnait pas si les parents avaient reçu du ceftiofur (10). Au Canada, l'utilisation de ceftiofur chez les poulets de chair a volontairement été arrêtée entre 2005 et 2006. Non seulement une diminution des *E. coli* et des *Salmonella* Heidelberg résistants au ceftiofur sur la viande de volaille s'est produite, mais une augmentation de la résistance suite à la réintroduction du ceftiofur a aussi été observée en 2007 chez ces bactéries (Figure 3) (9). Au Japon, une augmentation marquée de la résistance a été notée, ayant atteint presque 17% en 2010 (5). En Belgique, malgré l'arrêt de l'utilisation de ceftiofur, une augmentation de prévalence de 6% en 2001-2003 à 37% en 2007-2008 a été notée (96). Même la Suède, où

l'utilisation d'antimicrobiens comme le ceftiofur a toujours été limitée, avait mesuré en 2010 34% de proportion de résistance chez les poulets de chair, et près de 50% en 2014 (104, 105). D'autres pays, comme la Suisse, ont aussi vu une augmentation marquée de ces résistances chez la volaille et ce, malgré le fait que ces antimicrobiens ne soient pas utilisés dans leur industrie avicole locale (106). Cette augmentation a aussi été notée chez l'humain, par exemple la population générale porteuse de telle résistance est passée de 3,3% à 6,6 % entre 2001 et 2003 en Espagne (107).

Une des raisons pour lesquelles la prévalence ou les proportions des résistances varient autant entre les études est aussi due à la méthode pour sélectionner des isolats. En effet, certaines études ont de très faibles proportions car elles n'utilisent pas de milieu sélectif, recherchant des résistances dans la population bactérienne en générale. Utiliser un milieu sélectif est une méthode très sensible. Pour ce faire, des β -lactamines sont ajoutées au milieu de culture. Ainsi, seulement les bactéries qui ont des résistances à cette famille d'antimicrobiens pourront croître sur de tels milieux. Auparavant, certains organismes comme le «Clinical Laboratory Standards Institute» (Institution de standards de laboratoire clinique ou CLSI) recommandaient de tester plusieurs fois avec plusieurs antimicrobiens différents (cefopodoxime, ceftazidime, aztreoname, cefotaxime et ceftriaxone) pour détecter les souches résistantes. Chez les *E. coli* et les salmonelles, il a été démontré que certaines céphalosporines étaient plus efficaces que d'autres pour détecter des isolats résistants tels que le cefotaxime, le cefopodoxime et le ceftriaxone. Ainsi, une seule culture avec un seul de ces 3 antimicrobiens est actuellement considérée efficace pour la détection de bactéries résistantes. D'autres molécules, comme le ceftiofur et le ceftazidime, ont été démontrées moins efficaces pour cette détection (25, 108, 109).

β -lactamases et leurs gènes associés

Avec l'utilisation des céphalosporines dans les dernières décennies, une augmentation de la présence de β -lactamases chez les bactéries à Gram négatif a été constatée dans plusieurs pays (5, 8, 10, 25, 108, 110). Ces enzymes sont divisées en quatre classes, selon la base de leur structure (A, B, C, D) (111). Ces enzymes agissent principalement en hydrolysant l'anneau des β -lactamines. Elles ont été identifiées dans les bactéries de plusieurs espèces animales (porc, bœuf, dinde, chien, chat, volaille, cheval, humain et faune sauvage), le système gastro-

intestinal semblant être un important réservoir (6, 90). Deux principaux groupes de β -lactamases sont la cause de ces émergences, soit les «extended-spectrum β -lactamases» (β -lactamases à spectre étendu ou ESBL) de la classe A et les AmpC β -lactamases (AmpC) de la classe C. En Europe, la prévalence des souches produisant ces β -lactamases semble être faible, ayant été testée de façon non sélective sur différentes espèces animales et sur différents types de viande. En 2009, une prévalence d'isolats résistants de 0,4 à 5% chez les salmonelles et de 2 à 9% chez les *E. coli* a été observée. Cependant, dans la même étude, une prévalence allant jusqu'à 40% sur la viande d'animaux de production (volaille, bœuf) a été détectée (112).

«Extended-spectrum β -lactamases» (β -lactamases à spectre étendu ou ESBL)

Les ESBL peuvent conférer de la résistance à une grande variété de β -lactamines, incluant selon les β -lactamases, les pénicillines, les 4^e générations de céphalosporines et les monobactames. Cependant, elles ne confèrent en général pas la résistance aux carbapénèmes, à la céphamycine et aux inhibiteurs de β -lactamases qui réussissent en général à neutraliser les ESBL. Chez les *Enterobacteriaceae*, les groupes de gènes les plus fréquents codant pour des ESBL sont *bla*_{TEM}, la variable sulfhydryl (*bla*_{SHV}) et *bla*_{CTX-M} (8, 10, 113). Le groupe des ESBL contient d'autres gènes moins fréquents comme les types oxacilline (*bla*_{OXA}). Une étude récente a démontré que la proportion de *bla*_{TEM} est la même dans la population bactérienne en générale que dans la population bactérienne résistante aux céphalosporines, ce qui vient supporter que *bla*_{TEM} n'encode pas pour la résistance à des β -lactamines à spectre étendu (7). Avant les années 2000, les infections nosocomiales humaines étaient surtout dues aux bactéries possédant les gènes de *bla*_{TEM} et *bla*_{SHV}. Ceux-ci sont transmis par des plasmides, facilitant leur transmission au sein des hôpitaux. Au cours des dernières décennies, le gène *bla*_{CTX-M} est devenu le plus prévalent dans les infections nosocomiales, se répandant partout dans le monde. Parmi les onze types de *bla*_{CTX-M} rapportés, le gène *bla*_{CTX-M-15} s'est propagé chez l'humain et il est à présent considéré comme le plus répandu et problématique en médecine humaine (8, 46, 49, 100, 114, 115). D'un autre côté, le gène *bla*_{CTX-M-1} est le type de *bla*_{CTX-M} le plus commun, mais il a surtout été détecté chez les animaux en Europe (8, 106, 114, 116, 117). Le groupe des gènes *bla*_{CTX-M} est cependant plus complexe encore, étant divisé en plus de 150 séquences types (106).

Tout comme chez l'humain, peu d'ESBL étaient détectés chez les isolats issus de la volaille avant les années 2000. Par exemple, chez les poulets de chair au Pays-Bas, les gènes *bla*_{ACC-1} and *bla*_{TEM-52} étaient prédominants avant les années 2000. La première augmentation significative a été notée en 2003 et a continué de croître par la suite, démontrant une transition vers des bactéries possédant majoritairement le gène *bla*_{CTX-M} (6). Au Japon entre 2000 et 2003, environ 4 % des souches testées étaient résistantes aux céphalosporines de 3^e génération alors que ce pourcentage a augmenté à plus de 10% à partir des années 2004 (5).

AmpC β-lactamases (AmpC)

À l'origine, les β-lactamases de la classe AmpC, nommés aussi «plasmid-mediated among class C cephalosporinase», étaient des gènes de céphalosporinases chromosomiques de plusieurs bactéries à Gram négatif. Durant les dernières décennies, plusieurs AmpC se sont «échappées» sur des plasmides, facilitant leur propagation et leur donnant parfois le nom de nouvelles β-lactamases dans la littérature. Plusieurs différents groupes phylogénétiques d'enzymes ont été identifiés (principalement CMY, FOX, ACC, DHA, MOX, CIT, DHA, EBC), le *bla*_{CMY-2} étant le plus prévalent d'entre eux (5, 10, 111). Le gène *bla*_{CMY-2} origine du chromosome bactérien de *Citrobacter freundii* et est à présent répandu mondialement sur un plasmide (CMY signifierait céphamynase). Ces enzymes confèrent un spectre d'action semblable aux ESBL, quoiqu'un peu plus élargi puisqu'elles couvrent les pénicillines, les 3 premières générations de céphalosporines, les monobactames, les céphamycines et les inhibiteurs de β-lactamases. Cependant, elles ne couvrent pas en général les céphalosporines de quatrième génération et, tout comme les ESBL, les carbapénèmes (8, 10, 88).

Distribution des plasmides ESBL/AmpC

En Europe, les gènes de résistance associés aux ESBL, principalement le *bla*_{CTX-M}, mais aussi le *bla*_{SHV}, sont les gènes de résistance les plus communs contre les céphalosporines alors qu'en Amérique du Nord, ces résistances sont principalement dues aux AmpC (6-8, 88, 112-114, 117). Tel que précédemment mentionné, dans les deux cas, ces gènes de résistance sont situés sur différents plasmides, présents tant chez l'humain que chez les animaux (10).

Plusieurs types de plasmide ont été identifiés par le passé pour contenir ces gènes de résistance, tels que IncF, IncI1, IncN, IncA/C, IncL/M, IncK, etc. Plus précisément, le

plasmide de type IncA/C a été associé à la propagation du gène *bla*_{CMY-2} aux États-Unis et aux Royaume-Uni et pourrait être responsable de la propagation de ce gène sur plusieurs continents alors que d'autres plasmides ont été associés à la propagation des gènes associés aux ESBL en Europe comme le type IncII pour *bla*_{TEM} (118, 119). Au Japon, les plasmides de type IncI γ , IncK, IncA/C, IncB/O et IncII ont démontré qu'ils possédaient le gène *bla*_{CMY-2} (5, 39). Au Danemark, les plasmides de type IncK, IncII, IncI2 et IncA/C ont aussi démontré pouvoir contenir *bla*_{CMY-2} (120). En Suède, c'est encore le plasmide de type IncK qui a été identifié pour *bla*_{CMY-2} alors que le plasmide de type IncI a été plutôt associé au *bla*_{CTX-M-1} dans le même pays, ainsi que dans plusieurs autres pays européens comme en France et en Suisse (104, 106, 114, 121). En Australie, c'est encore le plasmide de type IncII qui a été associé avec le *bla*_{CTX-M} (110). Une autre étude européenne rapporte aussi la détection de *bla*_{CMY-2} sur le plasmide de type IncK. Dans la même étude, les plasmides de type IncI et IncHI2/P ont été associés à la propagation de *bla*_{CTX-M}, non seulement chez le *E. coli*, mais aussi chez les salmonelles. La transmission de ces plasmides entre les espèces bactériennes pourrait expliquer en partie pourquoi ces résistances se sont répandues aussi rapidement partout dans le monde (6). Les plasmides de type IncB/O, IncII et IncA/C ont aussi démontré pouvoir contenir *bla*_{CMY-2} au Canada, alors que dans la même étude, seulement le type IncII contenait le *bla*_{CTX-M} (7).

Les plasmides contenant des gènes ESBL semblent plus diversifiés, une étude au Royaume-Uni ayant identifiée 5 plasmides différents contre seulement 2 différents pour les AmpC. Parmi les plasmides avec des gènes ESBL, aucun identifié dans l'étude britannique n'était épidémiologiquement relié, le gène *bla*_{CTX-M-15} étant le plus fréquent et pouvant varier de 50 à 200 paires de bases. Pour les plasmides contenant des AmpC, les plasmides de type IncA/C et IncII étaient présents majoritairement. Les réplicons A/C étaient très similaires, soit à plus de 90% alors que les réplicons II présentaient plus de variabilité (88, 119). La propagation de clones possédant le gène *bla*_{CMY-2} qui se transmettent entre les troupeaux explique pourquoi ce gène est aussi répandu dans le monde, notamment via le plasmide de type IncA/C en Amérique du Nord (88, 120). La dissémination dans plusieurs pays ou continents de clones bactériens et/ou de leurs plasmides a déjà été rapportée dans la littérature. Par exemple, *E. coli* O15:K2:H1, un ExPEC retrouvé dans plusieurs pays d'Europe, a aussi été retrouvé en

Amérique du Nord (107). Une telle diversité parmi les plasmides possédant des ESBL/AmpC rend leur étude complexe, mais certains plasmides semblant avoir des distributions géographiques et des prévalences plus importantes permettent de mieux comprendre l'augmentation de la prévalence des ESBL/AmpC selon les régions.

Plusieurs de ces plasmides ont une affinité pour très peu d'hôtes différents (moins de chance de transmission), mais certains, comme le plasmide de type IncA/C, peuvent se répliquer chez plusieurs espèces bactériennes différentes, classifiant ce type de plasmide comme un «broad-host-range plasmid» (plasmide avec une large gamme d'hôtes) (88). D'autres études rapportent aussi la possibilité de transmission de plasmides entre les espèces (9, 39, 101, 119).

Transmission des gènes de résistance chez l'humain

L'émergence de bactéries possédant des gènes associés aux ESBL/AmpC chez l'humain a été rapportée internationalement depuis le début des années 1990 (10, 108). La prévalence de ces souches varie selon les études, par exemple étant à 10,1% chez des isolats cliniques d'hôpitaux humains canadiens chez des *E. coli* en 2006 (122) ou encore à 6.5% chez des isolats obtenus de cas pédiatriques au Texas chez des *Enterobacteriaceae* entre 2010 et 2011 alors que les premiers cas humains détectés de ces souches remontent à 1983 (123). L'acquisition de ces résistances, lesquelles souvent sont présentes conjointement avec d'autres résistance, provoque une grande inquiétude dans les milieux hospitaliers, les céphalosporines étant un des traitements de choix contre les infections systémiques alors que d'autres classes comme les fluoroquinolones peuvent être toxiques en pédiatrie ou pour les femmes enceintes (9, 108). La transmission de bactéries contenant des gènes ESBL/AmpC entre humains a déjà été rapportée, ce qui est un facteur à considérer lors d'infection nosocomiale. La dissémination d'ESBL/AmpC au sein de la population générale s'est faite rapidement, les bactéries commensales du système digestif agissant comme réservoir (107). Par exemple, 12 % des patients hospitalisés seraient porteurs de souches positives à des gènes ESBL/AmpC (124). Les traitements à l'aide de β -lactamines sont généralement utilisés en première ligne et l'émergence de plus en plus importante de résistances à ces antimicrobiens limite les options de traitements pour les patients infectés. De plus, ces résistances retardent l'initiation d'un traitement antimicrobien efficace (suite à l'attente des résultats de cultures bactériennes). Elles

augmentent la morbidité et la mortalité des patients touchés, sans compter qu'elles augmentent le temps d'hospitalisation et donc le coût des traitements associés. Parmi les facteurs de risque des patients atteints d'infections avec des bactéries positives aux gènes d'ESBL/AmpC, les traitements d'antimicrobiens par le passé, en particulier avec les β -lactamines (céfuroxime, céfotaxime, ceftriaxone, ceftazidime, aztréonam et les associations des inhibiteurs de β -lactamase) ainsi qu'avec les fluoroquinolones, ont été rapportés (8, 125, 126).

Beaucoup d'études suggèrent que la colonisation du tractus digestif des humains par des bactéries avec des gènes ESBL/AmpC constitue un réservoir, mais que le réservoir primaire pourrait provenir de l'alimentation (10, 94, 107, 112, 115, 116, 127, 128). Bien que certaines études rapportent des contaminations de bactéries ESBL/AmpC provenant de plantes (par exemple des cas de chou contaminé par des *E. coli* O104:H4 possédant *bla*_{CTX-M-15} (129)), les animaux de production tels que la volaille, le porc et le bœuf sont largement incriminés due à la présence de gènes de résistance chez des animaux sains (10, 94, 116). De plus en plus de rapports et d'études rapportent la détection de bactéries contenant des ESBL/AmpC sur la viande et des associations sont faites entre des bactéries résistantes chez les animaux de production et des bactéries retrouvées chez l'humain (10, 94, 130). De plus, plusieurs études ont démontré que des clones d'*E. coli* produisant des ESBL/AmpC étaient présents tant sur la viande provenant d'animaux de production que chez des cas cliniques d'humains (10, 107, 112, 115, 127, 128). Les travailleurs de l'industrie agro-alimentaire de la volaille seraient plus à risque d'être porteurs d'*E. coli* producteur d'ESBL/AmpC (6). En effet, les travailleurs manipulant de la viande crue ont un risque plus élevé d'être porteurs de telles bactéries (27,5 % pour ces travailleurs contre 6,6% dans la population générale) (107).

Donc, la présence de bactéries résistantes aux antimicrobiens chez la volaille peut entraîner la contamination des produits à base de volaille, pouvant ainsi augmenter le risque de transfert de ces bactéries ou de leurs gènes de résistance à l'humain. En fait, une étude aux États-Unis a révélé que les femmes infectées par des *E. coli* multirésistants ont signalé une consommation plus fréquente de poulets (126). Au Canada, lors de l'arrêt de ceftiofur chez les poulets de chair en 2005-2006 (précédemment discuté), une diminution de la résistance suite à cet arrêt puis une augmentation lors de la réintroduction de ceftiofur a été observée chez des souches de

Salmonella Heidelberg isolées de poulets échantillonnés en abattoir. Ces observations ont aussi été faites parallèlement chez les souches de *Salmonella* Heidelberg provenant de cas cliniques humains. Ces résultats mettent en évidence que la nourriture contaminée par des bactéries résistantes peut influencer les prévalences de résistance chez l'humain (Figure 3) (9). Comme mentionné plus haut, des évidences démontrent aussi que les plasmides résistants des *Salmonella* peuvent être transmis aux *E. coli* (9, 39, 88, 101, 119).

L'évaluation de la cause de la contamination des troupeaux d'animaux de production par des *E. coli* produisant des ESBL/AmpC n'est pas facile puisque plusieurs facteurs de risque sont possibles et peu d'études avec des données fiables permettent d'évaluer en détail tous ces risques (8). La co-sélection bactérienne et la résistance suite à l'utilisation d'antimicrobiens sont des points majeurs comme facteurs de risque qui seront abordés plus en détail.

Sélection et propagation de bactéries avec ESBL/AmpC

Un des principaux facteurs de risque associé à l'émergence de bactéries avec des ESBL/AmpC chez les animaux de production est leur exposition à des β -lactamines, notamment le ceftiofur (8-10, 104, 110, 113, 116, 121). L'industrie de la volaille a déjà été incriminée comme une des industries ayant joué un des plus grands rôles dans cette dissémination, comparativement à d'autres industries alimentaires (113, 116). Étant donné que la structure avicole est pyramidale et que la propagation de ces résistances s'est produite très rapidement, plusieurs recherches ont étudié la possibilité d'une contamination en haut de la pyramide par ces souches qui seraient ensuite propagées de façon verticale (10, 105, 106, 120, 131). Le système pyramidal avicole est un système simple et efficace pour la production industrielle, mais il est aussi un système vulnérable puisqu'une contamination au sommet de la pyramide peut affecter rapidement un grand nombre de troupeaux. Si des maladies ou des bactéries résistantes aux antimicrobiens contaminent les troupeaux grands-parents, celles-ci peuvent être transmises globalement, ce qui pourrait s'être déroulé avec la propagation des ESBL/AmpC (10).

La transmission de certaines souches pathogènes est déjà bien connue comme les APEC O78 et O139 de troupeaux reproducteurs à leur progéniture dans le début des années 2000 en Italie (3). La transmission de souches avec des gènes de résistance ESBL/AmpC a aussi été démontrée plus récemment dans quelques études.

Par exemple, une étude suisse a démontré que la transmission ESBL/AmpC de troupeaux reproducteurs à leurs progénitures, en couvoir et en fin d'élevage, se produisait probablement grâce au transfert de plasmides contenant ces résistances et non dû à la transmission d'un clone bactérien en particulier (106). L'étude des gènes de résistance et de leurs plasmides est donc essentielle pour mieux comprendre la dynamique de la propagation mondiale de ces résistances (114). Ces résistances ont été démontrées dans plusieurs pays au bas de la pyramide où le ceftiofur n'est pas utilisé, alors qu'il est utilisé en haut de la pyramide pour les grands-parents. Au Danemark, certains troupeaux de grands-parents recevaient le ceftiofur alors que leur progéniture, les troupeaux parents et même les poulets de chair, n'en recevaient pas. Chez les troupeaux parents, 93% des troupeaux possédaient des *E. coli* avec ces résistances et même 27% chez les poulets de chair malgré l'absence d'utilisation de ceftiofur chez ces générations. Chez ces troupeaux de poulets de chair, les résistances étaient même présentes lorsque testées sur la viande de volaille en abattoir. La transmission peut donc possiblement se produire sur plusieurs générations et une contamination au sommet de la pyramide peut causer une transmission à beaucoup de troupeaux et même directement aux consommateurs (120). En Suède, une proportion de 34% des poulets de chair positifs pour des ESBL/AmpC a été mesurée, et ce, malgré le fait que ce pays utilise très peu d'antimicrobiens chez les animaux de production et n'a jamais utilisé de ceftiofur chez la volaille. Ceci suggère la possibilité d'une transmission verticale (104, 121). Une autre étude plus récente dans ce pays a démontré la présence de clones de *bla*_{CMY-2} des grands-parents importés et qui se transmettaient aux troupeaux de parents et aux poulets de chair alors que ceux-ci n'avaient tous jamais reçu de ceftiofur en Suède (105).

Une étude allemande a évalué la possibilité de transmission via les couvoirs et a conclu que la transmission à ce niveau était faible, mais possible (131). Dans une autre étude en Allemagne, 51% des poussins avaient des isolats positifs pour des *E. coli* avec des gènes de résistance ESBL/AmpC dès l'entrée en ferme. Bien que la transmission verticale soit un facteur possible, d'autres causes peuvent aussi expliquer cette forte prévalence. La transmission de souches de façon horizontale et la contamination de l'environnement ont aussi été décrites (9, 113). Le tractus digestif d'un poulet de chair en santé peut être un réservoir de ces gènes qui favorisent par la suite la dissémination dans l'environnement (88). En effet, de plus en plus d'études

démontrent que les *E. coli* digestifs commensaux et les pathogènes opportunistes sont responsables de la dissémination qui s'est produite dans la population bactérienne générale (107). Notamment, le gène *bla*_{CMY-2} a été détecté sur des plasmides connus pour être horizontalement transférables entre les souches (testé par conjugaison comme les réplicons de type Inc11 et IncK au Danemark et en Suède) (104, 120). À l'aide d'analyses du génome entier, une transmission horizontale d'entérobactéries productrices d'ESBL/AmpC a d'ailleurs été démontrée par la détection d'isolats producteurs d'ESBL étroitement apparentés chez deux troupeaux de poulets de chair consécutifs sur une même ferme et dans le même environnement. Cela démontre l'influence d'un troupeau en fin d'élevage sur le statut ESBL/AmpC du prochain troupeau de poulets à griller et, par conséquent souligne l'importance des mesures d'hygiène et de biosécurité à la ferme (132).

Plusieurs facteurs peuvent aussi avoir un rôle à jouer dans la propagation des bactéries résistantes dans l'environnement comme un mauvais nettoyage entre les troupeaux, la présence de vecteurs humains (producteurs, vétérinaires, techniciens, transporteurs, camionneurs, etc.), d'animaux (vermines, faunes sauvages, importation d'animaux) et d'insectes (11, 120). De plus, la forte concentration d'animaux dans les élevages industriels pourrait faciliter cette transmission. Non seulement les fientes, mais aussi la poussière et la litière peuvent être des vecteurs d'*E. coli* porteurs d'ESBL/AmpC. Les employés se déplaçant entre différentes fermes avec les mêmes bottes et les mêmes vêtements ne sont pas des facteurs négligeables, 90% des échantillons de bottes étant positifs pour ces bactéries. Ainsi, un nettoyage et une désinfection insuffisants entre les troupeaux pourraient fortement contribuer à l'augmentation de la proportion des isolats ESBL/AmpC positifs, allant jusqu'à 100% pour certains troupeaux (113).

Étant donné que ces bactéries sont présentes dans les fientes, leur utilisation comme fertilisant pour les champs peut aussi contaminer les terres agricoles. Les cours d'eau qui drainent ces champs peuvent donc être aussi un réservoir de ces bactéries dans l'environnement. Éventuellement, l'environnement pourrait contaminer la faune sauvage. Plusieurs animaux ont d'ailleurs été décrits comme vecteurs potentiels de ces bactéries, les rongeurs et les oiseaux sauvages principalement. La propagation par des oiseaux migrateurs est notamment une source d'inquiétude pour la communauté scientifique. Même si beaucoup d'humains, qui

peuvent eux aussi être porteurs sains de telles bactéries, voyagent entre différents pays ou continents, les oiseaux n'utilisent pas de systèmes d'égouts comme les humains. La dissémination de leurs fientes est donc beaucoup plus aléatoire et pourrait contaminer des troupeaux de production industrielle. Cela démontre la capacité des *E. coli* résistants de passer aisément d'un écosystème à un autre et souligne l'importance des vecteurs dans la dissémination de ces gènes (100). Au niveau des fermes de poulets de chair, plusieurs facteurs de gestion ont été associés à l'apparition d'une résistance au ceftiofur chez le *E. coli*: mauvaises conditions d'hygiène du réservoir d'eau servant à l'administration de médicaments, absence d'acidification de l'eau de boisson, plus de trois changements d'aliments pendant le cycle de production, couvoir d'origine, race, litière utilisée et traitements à l'aide d'antimicrobiens tels que l'amoxicilline. Ces facteurs confirment que non seulement le traitement antimicrobien à la ferme, mais également des facteurs liés à la gestion, la biosécurité et au couvoir influent sur l'apparition de la résistance aux antimicrobiens (96).

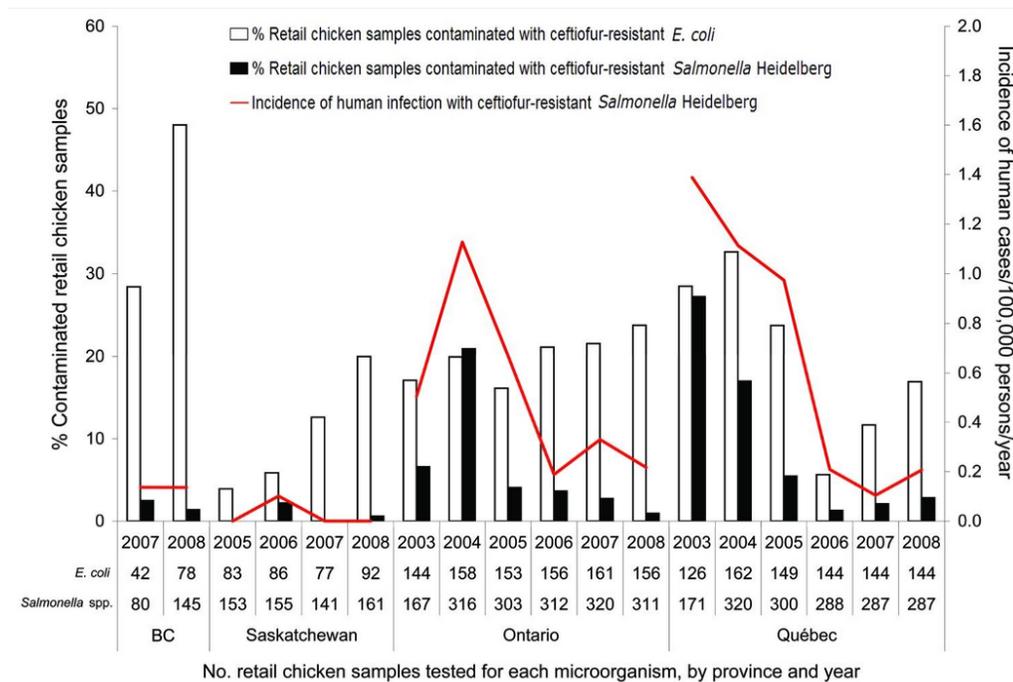
Finalement, le dernier point qui favorise la propagation de ces souches est que certains animaux peuvent être des porteurs sains à long terme. Ces animaux peuvent avoir de telles bactéries et ce, même lorsque l'administration de l'antimicrobien est arrêtée. En fait, des études récentes ont démontré qu'une fois que ces résistances sont présentes chez la flore bactérienne des *Enterobacteriaceae*, cela peut prendre un temps considérable afin que ces résistances soient perdues, même si aucune pression de sélection n'est réalisée directement avec un antimicrobien (110). Une étude australienne rapporte qu'une fois les résistances aux céphalosporines à spectre étendu présentes chez les troupeaux de porc, leur persistance suite à l'arrêt de ces antimicrobiens prend un minimum de 4 ans avant de s'estomper. Chez ces troupeaux fermés à l'importation depuis 30 ans, les plasmides contenant le gène de résistance *bla*_{CTX-M} étaient 99% semblables à certains plasmides présents chez les animaux de production en Europe, ce qui renforce l'idée que ces résistances persistent longtemps dans l'environnement ou même, ne disparaissent jamais totalement puisque le ceftiofur n'était pas utilisé il y a 30 ans en Europe ou en Australie (administration débutée autour de 1990). Cependant, on ne peut pas exclure la possibilité que les porcs en Australie ont été contaminés par des humains ayant été en contact avec des porcs hors de l'Australie ou avec l'aide des

oiseaux migrateurs. Les transmissions de l'humain à l'animal et en provenance de la faune sauvage sont moins documentées (110).

Impact de l'arrêt du ceftiofur dans les couvoirs

Le ceftiofur a été utilisé à plusieurs endroits dans le monde en prévention et son utilisation hors homologation a été arrêtée déjà à plusieurs reprises dans certains pays. Les principaux pays qui en ont fait usage aux couvoirs sont le Canada, les États-Unis, le Royaume-Unis, les Pays-Bas et le Japon (5, 9, 90, 117, 120). Bien qu'il a été arrêté au Canada en 2014, il s'agit en fait du deuxième arrêt de cet antimicrobien au couvoir chez les poulets de chair au Canada. En effet, le premier arrêt de cette utilisation remonte en 2005, suite à une augmentation de la résistance aux céphalosporines rapportée par le PICRA en 2003 chez les *Salmonella* Heidelberg et les *E. coli* (7). Lors du premier arrêt (Figure 3), la proportion de retailles de viande de poulet positive à des résistances aux céphalosporines de 3^e génération sur la viande de volaille est passée de 34% à 6% en 2 ans sans utilisation de milieux sélectifs contenant des céphalosporines pour détecter des bactéries résistantes chez les isolats d'*E. coli*. Suivant la réintroduction du ceftiofur aux couvoirs, la proportion de retailles de viande de poulet positive à des résistances a remonté de 6% à 18% sur la viande de volaille, toujours sans milieux sélectifs. Une diminution encore plus importante de proportion (82%) avait aussi été notée pour les *Salmonella* Heidelberg. Ces résultats ont clairement démontré une corrélation positive entre l'utilisation de ceftiofur au couvoir et la prévalence de résistance à cet antimicrobien chez les *E. coli* isolés sur la viande de volaille. Une corrélation très forte ($r=0,9$; $p<0,0001$) entre les bactéries résistantes chez la volaille et les *Salmonella* Heidelberg humaines a été démontrée dans la province de Québec lors de cet arrêt, démontrant que cet arrêt est positif aussi pour la médecine humaine (9).

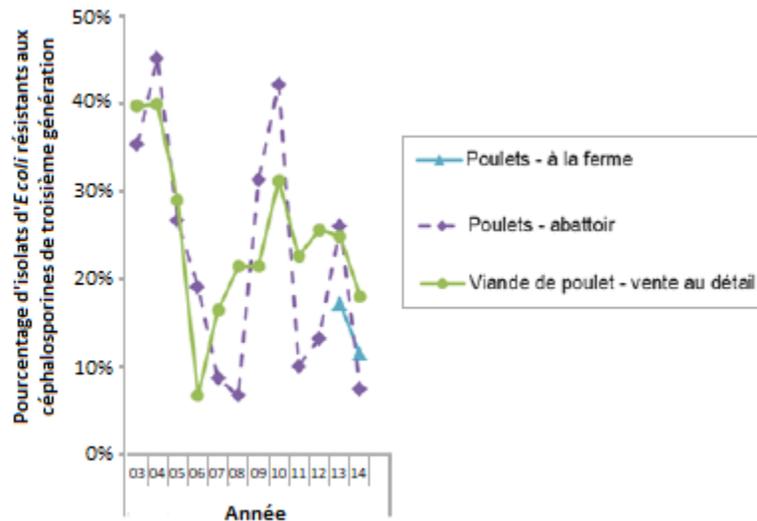
Figure 3. Prévalence de viande de poulet contaminée avec *Escherichia coli* et *Salmonella enterica* sérovar Heidelberg résistants au ceftiofur et incidence des infections humaines dues à la présence de *Salmonella* Heidelberg résistantes au ceftiofur au Canada



Cette figure provient du journal «Emerging Infectious Diseases», qui, étant un journal du domaine du publique des États-Unis, ne nécessite pas de permissions autres que cette citation (9)

Des données récentes du PICRA ont démontré une diminution de la résistance aux céphalosporines de troisième génération suite au deuxième arrêt au Québec parmi les *Salmonella* et les *E. coli* provenant de poulets à la ferme, à l'abattoir et de viande au détail. La Figure 4 ici-bas démontre sur le même graphique la diminution suivant le 1^{er} arrêt au Québec, puis une augmentation suite à la réintroduction du ceftiofur et finalement une 2^e diminution suite au 2^e arrêt réalisé au Québec (14).

Figure 4. Variation temporelle de la résistance aux antimicrobiens de la classe des céphalosporines de troisième génération parmi les isolats d'*E. coli* provenant de poulets du Québec du bulletin du PICRA de 2016



Adapté et reproduit avec la permission du Ministre de la Santé du Canada (14, 133)

Au Pays-Bas, chez la volaille, la prévalence des troupeaux positifs pour de telles souches a aussi diminué depuis l'arrêt de l'utilisation de ceftiofur, allant de 66% de prévalence avant l'arrêt en 2009 à 38% quelques années après l'arrêt, soit en 2016. Les antimicrobiens de très haute importance en médecine humaine ne sont plus autorisés et utilisés au Pays-Bas à présent chez la volaille. Ainsi, en 2016, parmi différentes souches d'*E. coli* testés aléatoirement originaires de différentes espèces animales de production échantillonnées dans le cadre du programme «Monitoring of Antimicrobial Resistance and Antibiotic Usage in Animals in the Netherlands», seulement 0,3% d'entre eux possédaient des ESBL/AmpC, le pourcentage le plus bas mesuré dans ce pays depuis 2007. La proportion d'*E. coli* résistants à des céphalosporines de 3^e génération a aussi substantiellement diminué sur la viande de volaille, passant de 10,7% en 2010 à 1,9% en 2013, montrant que la gestion de l'utilisation des antimicrobiens au couvoir peut aider à réduire la contamination par ces bactéries de la viande destinée à la consommation humaine (117, 134). Le ceftiofur a aussi été utilisé hors homologation au Japon pendant plus d'une décennie dans les couvoirs. Suite à son arrêt en 2012, une diminution significative des *E. coli* résistants aux céphalosporines de 3^e génération de 16,8% à 4,6% a été démontrée chez les poulets de chair sans culture des *E. coli* sur des

milieux sélectifs. Les ventes de streptomycine et de kanamycine ont augmenté suite à l'arrêt de ceftiofur au Japon, et une augmentation des résistances pour la streptomycine, la kanamycine et le chloramphénicol s'est produite (5). Étant donné ces effets carcinogènes possibles et d'aplasie de moelle osseuse chez l'humain, le chloramphénicol est pourtant interdit dans ce pays chez les animaux de consommation. Des phénomènes de co-sélections bactériennes peuvent expliquer et seront discutés dans la prochaine section. Un phénomène semblable de co-sélection s'est aussi produit au Canada avec l'utilisation de gentamicine suite à l'arrêt de ceftiofur (7).

Ces réductions suggèrent que la résistance aux céphalosporines de 3^e génération pourrait être contrôlée grâce à un arrêt au couvoir. Une réduction de la résistance aux céphalosporines à spectre étendu a aussi été constatée suite à l'arrêt de l'administration de ceftiofur chez d'autres espèces. En Australie, une réduction de cette résistance chez le porc a été démontrée, étant de 87% et 83% en 2013 et 2014 avant l'arrêt du ceftiofur chez cette espèce à 22% et 8,5% en 2015 et 2016. Le gène *bla*_{CTX-M} était le gène responsable de la majorité des résistances au niveau de ces fermes (110).

Multirésistance

Plusieurs nomenclatures ont été utilisées pour décrire les souches ayant des résistances à différents antimicrobiens ou classes antimicrobiennes par le passé. Deux organisations, «European Centre for Disease Prevention» (en Europe) et le «Center for Disease Control and Prevention» (aux USA), ont créé une nomenclature standardisée internationale. Cette terminologie permet de mieux catégoriser la multirésistance de plusieurs souches comme les *Staphylococcus aureus*, les *Enterococcus* spp., *Enterobacteriaceae* (sauf les *Salmonella* et les *Shigella*), les *Pseudomonas aeruginosa* et les *Acinetobacter* spp., ces souches pouvant toutes causer des problèmes de santé et posséder plusieurs résistances à différentes classes d'antimicrobiens. Pour chaque espèce bactérienne, une liste d'antimicrobiens à tester a été sélectionnée selon les particularités intrinsèques de l'espèce. Pour ce faire, plusieurs organismes ont été consultés, dont le CLSI, le «European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing» (Comité européen sur les tests de sensibilité aux antimicrobiens ou EUCAST) et le «United States Food and Drug Administration» (administration américaine des

denrées alimentaires et des médicaments ou FDA). Un isolat est classifié non sensible à un antimicrobien lorsque les limites de résistance à cet antimicrobien le classe comme étant intermédiaire, résistant ou non sensible selon la méthode de laboratoire utilisée et que ces limites proviennent d'un des 3 organismes mentionnés ci-haut. Pour s'assurer que les isolats testés entrent correctement dans la terminologie décidée, toutes les classes d'antimicrobiens sélectionnées par espèce doivent être testées pour les isolats à catégoriser (ou du moins la majorité d'entre elles). Selon certaines espèces, des classes d'antimicrobiens ne seront pas à tester puisqu'elles possèdent une résistance intrinsèque à certains antimicrobiens et non une résistance acquise (135).

Les définitions suivantes ont été proposées :

a) «Multidrug resistant bacteria » (bactérie multirésistante ou bactérie MDR) : non-sensibilité à au moins un des agents testés d'au moins 3 des classes d'antimicrobiens testées. Il ne faut donc pas prendre cette définition au sens littéral du terme, soit résistant à plus d'un agent antimicrobien. Des résistances à trois agents de trois classes différentes pour lesquelles aucune résistance intrinsèque n'est présente doivent être démontrées pour classer un isolat comme MDR.

b) «Extensively drug-resistant bacteria» (bactérie extensivement résistante ou bactérie XDR) : non-sensibilité à au moins un des agents testés de chaque classe d'antimicrobiens à l'exception d'un maximum de 2 classes d'antimicrobiens (donc susceptibilité à seulement deux classes d'antimicrobiens maximum). D'autres termes ont déjà été utilisés pour décrire ces bactéries, comme extensives, extrêmes ou extrêmement résistantes.

c) «Pan-drug resistant bacteria» (bactérie pan-résistante ou bactérie PDR) : non-sensibilité à tous les agents de toutes les classes d'antimicrobiens testées. Certaines anciennes terminologies mentionnaient les PDR comme étant résistants à presque tous les agents, résistants à tous les agents utilisés empiriquement ou de façon routinière, ce qui rendait la définition inconsistante et sujette à des erreurs d'interprétation.

Pour les *Enterobacteriaceae* comme *E. coli*, 17 classes d'antimicrobiens ont été déterminées selon le reflet de leurs utilisations contre le *E. coli* à travers le monde: aminoglycosides,

céphalosporines efficaces contre les *Staphylococcus aureus* résistants à la méthicilline, pénicillines antipseudomonales avec inhibiteurs de β -lactamase, carbapénèmes, céphalosporines de 1^e et 2^e génération, céphalosporines de 3^e et 4^e génération, céphamycines, fluoroquinolones, inhibiteurs de synthèse des folates, glycylicyclines, monobactames, pénicillines (seules), pénicillines avec inhibiteurs de β -lactamases, phénicol, acides phosphoniques, polymyxines et tétracyclines. Si au moins un agent de chaque classe n'ont pas été testés, les isolats testés ne pourront pas être classés comme XDR ou PDR, mais seront caractérisés plutôt comme de possibles XDR ou PDR. De possibles XDR dans une étude ne peuvent pas être comparés à des XDR d'une autre étude. De possibles XDR entre deux études ne peuvent non plus être comparés entre eux puisque ce ne sont pas nécessairement les mêmes antimicrobiens qui ont été testés selon les études. Cependant, de possibles XDR/PDR peuvent être utilisés comme des marqueurs de résistance extensive malgré les limitations de leur interprétation (135-137).

Multirésistance due à des co-sélections

Les gènes de résistance aux antimicrobiens sont souvent regroupés sur des éléments génétiques mobiles tels que des plasmides, des intégrons et des transposons. En conséquence, plusieurs résistances antimicrobiennes différentes peuvent être sélectionnées par l'utilisation d'un antimicrobien qui favoriserait la propagation d'un de ces éléments génétiques mobiles multirésistants (7, 87).

Plusieurs *E. coli* produisant des ESBL/AmpC peuvent présenter des résistances à d'autres classes d'antimicrobiens utilisées fréquemment en médecine vétérinaire. Notamment, les classes des sulfamides, des fluoroquinolones, des triméthoprimes et des aminoglycosides ont été rapportées pour sélectionner des *E. coli* produisant des ESBL/AmpC (8, 111). Selon les études, plusieurs co-sélections ont été rapportées sur des bactéries productrices d'ESBL/AmpC. La co-sélection chez des isolats *E. coli* avec *bla*_{CMY-2} et la résistance au florfenicol (gène *floR*) a aussi été rapportée depuis près d'une décennie (116). Une détection de 100% d'*E. coli* positifs pour des gènes ESBL/AmpC chez chaque individu testé dans certains troupeaux allemands a été démontrée alors que ceux-ci n'avaient reçus que des traitements antimicrobiens qui n'étaient pas des β -lactamines (colistine et enrofloxacin).

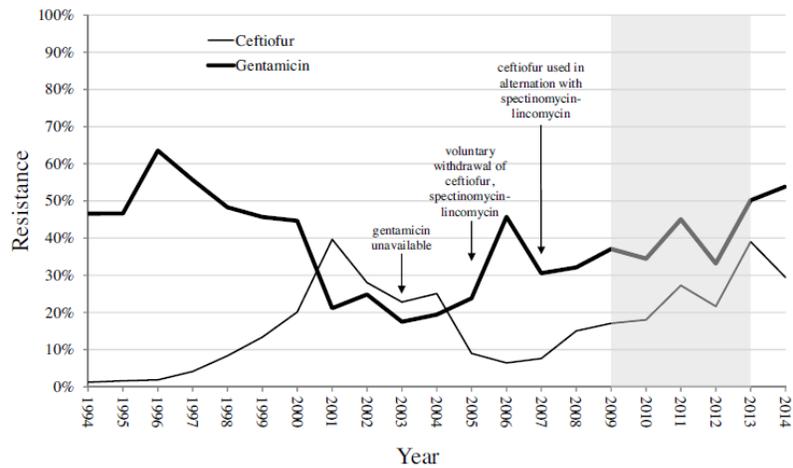
D'autres facteurs pourraient expliquer cette forte prévalence chez ces troupeaux, mais la co-sélection dans ces cas n'est pas un facteur à négliger (113). En Allemagne chez des troupeaux avec des *E. coli* possédant des gènes AmpC, Dierikx et al. ont rapporté la non-sensibilité concomitante à la tétracycline, à la gentamicine, au chloramphénicol, à la streptomycine, à la kanamycine, au sulphaméthoxazole et à l'acide nalidixique (10) et, aux Pays-Bas, au sulphaméthoxazole, triméthoprime et à la tétracycline (6). Toujours en Allemagne, 43,9% de la viande de volaille étaient considérées contaminées par des bactéries avec ESBL, présentant aussi des co-résistances pour la tétracycline, le co-trimoxazole et la ciprofloxacine. Ceci démontre que l'acquisition de ces gènes de résistance chez la volaille reflète leur utilisation d'antimicrobiens, ces 4 derniers antimicrobiens ayant tous été utilisés dans l'industrie avicole. Un pourcentage aussi élevé de souches multirésistantes sur la viande est une voie possible de transmission de telles souches chez l'humain (138). Une autre étude en Belgique a démontré que des *E. coli* résistants avec *bla*_{CTX-M} ou *bla*_{CMY-2} possédaient aussi d'autres gènes de résistance comme pour la tétracycline, l'acide nalidixique, les sulfamides et le triméthoprime (111). En France récemment, toutes les souches testées positives pour *bla*_{CTX-M-1} dans une étude possédaient aussi d'autres gènes de résistance sur le même plasmide de type IncII, comme pour la tétracycline, le sulphaméthoxazole, la ciprofloxacine, le triméthoprime et la streptomycine (114). Au Québec il y a près de 10 ans, 70% des troupeaux de poulets de chair possédaient des *E. coli* multirésistants (résistants à au moins 9 différents antimicrobiens dans l'étude, et tous possédaient les résistances à la pénicilline, l'érythromycine, la tylosine, la clindamycine et la novobiocine) et 61% des isolats possédaient le gène *bla*_{CMY-2} (101). Chez d'autres espèces comme le porc en Australie, des *E. coli* contenaient *bla*_{CTX-M} et démontraient des résistances à la tétracycline (47% des isolats), à la gentamicine (16,4%) et au florfénicol (11%) (110).

La possibilité que cette co-sélection se produise grâce à la transmission de plasmides multirésistants contenant non seulement des ESBL/AmpC, mais aussi d'autres gènes de résistance a déjà été étudiée. Au Japon, le plasmide de type IncA/C a été associé non seulement au gène *bla*_{CMY-2}, mais aussi à d'autres classes d'antimicrobiens telles que la tétracycline, le chloramphénicol et le triméthoprime-sulfamide (39). En Suède, tous les plasmides de type IncI identifiés porteurs du gène *bla*_{CTX-M-1} ont aussi démontré sur le même

plasmide les gènes de résistance au sulphaméthoxazole, à la tétracycline et certains aussi à la streptomycine (121). Le même gène en Suisse a aussi été associé sur des plasmides avec les résistances au sulphaméthoxazole, au triméthoprime, à la tétracycline et à l'acide nalidixique (106). La présence concomitante du gène *bla*_{CMY-2} et de résistances à d'autres classes d'antimicrobiens est de plus en plus rapportée et limite les options de traitement en médecine humaine et vétérinaire (88). Jahanbakhsh et al. ont aussi démontré de la co-résistance chez des *E. coli* multirésistants porcins canadiens possédant *bla*_{CMY-2} (96,5%) ou *bla*_{CTX-M} (3,5%). La présence d'intégrons de classe 1 significativement associée à la résistance à la gentamicine, la kanamycine, la streptomycine, le triméthoprime-sulphaméthoxazole, le sulfisoxazole, le chloramphénicol et la tétracycline en était responsable. Cette étude a également démontré chez les *E. coli* multirésistants la présence d'un plasmide appartenant au groupe d'incompatibilité majeure IncA/C, associé positivement à la résistance à la gentamicine, à la kanamycine, à la streptomycine, au triméthoprime-sulphaméthoxazole, au sulfisoxazole, au chloramphénicol, à la tétracycline, à la résistance à au moins huit différentes classes d'antimicrobiens, à la présence de *bla*_{TEM} et de l'intégron de classe 1 (11).

Le phénomène de co-sélection se produit aussi avec d'autres types d'antimicrobiens. Au Québec, alors que l'utilisation de gentamicine au couvoir a cessé en 2003, la résistance des bactéries contre cet antimicrobien n'a pas cessé d'augmenter jusqu'en 2014 pour atteindre 54% des isolats (Figure 5). Le mélange de lincomycine/spectinomycine avait remplacé la gentamicine depuis, en alternance avec le ceftiofur. Une étude récente a démontré que la résistance à la spectinomycine (le gène *aadA*) était fortement positivement corrélée ($p < 0,0001$) avec le gène de résistance à la gentamicine (le gène *aac(3)-VI*), confirmant un phénomène de co-sélection. Ces résistances étaient présentes sur des plasmides principalement de type IncII, IncA/C, InCB/O et FIB. Pour les isolats qui avaient le plasmide IncA/C, le gène *bla*_{CMY-2} était aussi présent de façon concomitante pour 100% de ces isolats (7).

Figure 5. Résistance au ceftiofur et à la gentamicine parmi les isolats collectés d'*E. coli* associés à la colibacillose entre 1994 et 2014 au Québec



Adapté et reproduit avec la permission d'Oxford University Press (Elsevier) and Copyright Clearance Center (7)

Zoonoses causées par des souches d'ExPEC multirésistants

a) Aspect zoonotique des ExPEC

La viande de volaille et les œufs sont reconnus mondialement comme étant une source potentielle de plusieurs zoonoses comme la listériose, la salmonellose et la campylobactériose. Plusieurs rappels alimentaires ont été réalisés à la suite d'une contamination de ces produits par ces bactéries. Par exemple, l'ACIA tient un registre public de plusieurs rappels alimentaires dont des produits de poulet crus panés et congelés en raison de présence de *Salmonella* (139). De plus, les informations basées sur la possibilité de transmission de zoonoses causées par des ExPEC provenant de viande de volaille provoquent aussi des inquiétudes (70, 140).

Tant chez l'humain que chez la volaille, il a été démontré que les ExPEC sont souvent des bactéries qui agissent en tant que commensaux dans le tractus digestif d'un hôte sain, mais qu'ils ont la particularité de pouvoir causer des infections à l'extérieur du système digestif (46, 50, 78). Des études démontrent que les ExPEC humains possèdent relativement peu de gènes différents entre les pathotypes, ce qui suggèrent qu'ils utilisent des mécanismes moléculaires

semblables, peu importe les types d'infections. Par contre, en comparant des souches humaines ExPEC avec des APEC, il a été remarqué que cette homogénéité est moins importante, suggérant que les infections entre espèces animales utilisent des mécanismes moléculaires d'infections différents et spécifiques. Il a ainsi été suggéré que les ExPEC humains contenus chez la volaille pourraient être en fait des commensaux chez la volaille, cette dernière agissant alors en tant que réservoir (43). Certaines études épidémiologiques ont déjà révélé que des souches génétiquement similaires aux ExPEC humains étaient présentes dans le contenu intestinal de poulets en santé et sur la viande au détail, ces souches ayant un chevauchement en terme de sérogroupes, phylogroupes et gènes de virulence (37, 76, 141, 142). De plus, Johnson et al. ont démontré que 92% d'échantillons provenant de la viande de volaille seraient contaminés par des *E. coli*, et que 46% de ces *E. coli* contiendraient des gènes de virulence (141). En effet, la viande de volaille présente les niveaux de contamination les plus élevés par *E. coli*, et ces *E. coli* peuvent démontrer plus de résistances aux antimicrobiens que ceux isolés à partir des autres viandes, démontrant l'importance de cette contamination si les *E. coli* aviaires peuvent être des réservoirs d'ExPEC (37).

Cependant, plusieurs études ont démontré une similarité entre les gènes de virulence et les phylogroupes présents dans les infections humaines par des ExPEC et par des APEC, suggérant un potentiel zoonotique. Les ExPEC sont en fait un groupe très complexe et important, au sein duquel les ExPEC humains (NMEC et UPEC) sont significativement différents ($p < 0,01$) des APEC dans une étude où plus de 1000 ExPEC ont été comparés au niveau de leur phylogroupe et de 67 autres caractères dont des gènes de virulence et les réplicons plasmidiques. Par contre, un petit nombre de lignées (dont certaines très répandues) possèdent beaucoup de similarité (dans la même étude, un sous-groupe de APEC et de NMEC ne différait pas significativement ($p > 0,05$)) au niveau de leur phylogroupe, leur séquence type, leurs plasmides et leurs gènes de virulence et peuvent causer des infections extra-intestinales à *E. coli* chez l'humain (NMEC et UPEC) et chez la volaille (APEC) (143). En effet, la volaille est la source animale alimentaire qui contient des souches les plus étroitement liées aux ExPEC humains, les APEC ayant été associés beaucoup plus fréquemment que les ExPEC des autres espèces aux ExPEC humains. Par exemple, manger du poulet sur base régulière est un facteur de risque pour des infections à UPEC (37, 50, 126, 143). Les *E. coli* du groupe clonal

A avec le phylogroupe D le complexe clonale 69 MLST responsable d'infections par UPEC sont aussi détectés chez la volaille alors qu'ils ne le sont pas chez le porc (144). Le séquençage de la bactérie APEC O1:K1:H7 a aussi démontré beaucoup de similarité avec certaines souches NMEC ou UPEC. Plus précisément, le génome de seulement 4,5% de l'APEC O1:K1:H7 n'a pas été trouvé dans les séquences du génome des ExPEC humains. De plus, certaines analyses par MLST de souches ExPEC humaines démontraient plus de similarités avec la souche APEC O1:K1:H7 qu'avec d'autres ExPEC humains (145). Une étude sur l'augmentation d'infection à APEC en Suède a démontré la présence d'un groupe de 47 souches O78:H4 ST117 apparenté à un groupe de ST117 humain et qui contenaient tous des gènes de virulence associés à des UPEC. La même étude a aussi démontré la transmission verticale de ces souches des reproducteurs à leur progéniture (77). Des études expérimentales renforcent l'hypothèse de zoonose potentielle puisque certaines souches d'ExPEC humains (surtout des UPEC et des NMEC) pourraient causer la colibacillose chez la volaille, alors que des souches APEC pourraient causer des signes cliniques chez des modèles animaux d'infections humaines (ex: comme des rats ou des modèles murins d'infections du tractus urinaire). Ce ne serait cependant pas toutes les souches ExPEC qui possèderaient cette capacité (37, 126, 143, 146-148). Ce risque zoonotique semble fortement relié à la présence de larges plasmides qui contiendraient des gènes de virulence retrouvés chez les APEC, mais aussi d'UPEC (142, 148) ou de NMEC tel le plasmide de type IncFIB (143). Le plasmide colV est aussi présent chez plusieurs APEC, UPEC et NMEC (51, 143). De plus, plusieurs gènes de virulence seraient présents chez les APEC et aussi parfois chez les UPEC ou les NMEC (gènes de captation du fer comme *aérobactine* et *salmochelone*, capsule K1, gène marqueur *iss* du plasmide colV, gènes d'invasion comme *ibeA* et *gimB*) (51, 142, 143, 148). Chez la souche APEC O78:K80:H9, souche qui aurait un potentiel zoonotique, le plasmide colV peut être transmis horizontalement par transposition expérimentalement (149).

b) ExPEC et APEC multirésistants

L'augmentation importante de la consommation de poulets durant les 30 dernières années a causée plusieurs changements dans l'industrie avicole dont une hausse de l'administration d'antimicrobiens (37). Plusieurs classes d'antimicrobiens ont été utilisées chez la volaille pour prévenir ou traiter les infections par des APEC ou encore ont été utilisées comme promoteurs

de croissance pour maximiser les performances. Cette utilisation a créé une pression de sélection sur la flore bactérienne commensale et pathogène et des études démontrent que les ExPEC présentent plus de résistances aux antimicrobiens (46, 49).

Les premiers cas rapportés d'infections nosocomiales par des souches résistantes d'ExPEC chez l'humain ont eu lieu en France en 1988 (100). Au début des années 1990, plusieurs traitements antimicrobiens tels que l'ampicilline et le triméthoprime-sulphaméthoxazole étaient utilisés avec succès pour les traitements d'infections causées par des ExPEC. Par contre, des souches ExPEC humaines et animales ont démontré dans les dernières décennies être des réservoirs importants de résistances à divers antimicrobiens de très haute importance comme les fluoroquinolones et les céphalosporines (46). Une étude au Bangladesh a démontré une forte proportion des APEC contenant divers gènes de résistance à des antimicrobiens fréquemment utilisés en médecine vétérinaire, comme la tétracycline, l'ampicilline, le triméthoprime-sulphaméthoxazole et l'acide nalidixique (18). Un plasmide contenant le gène *bla_{CMY-2}* et des gènes de virulence associés aux APEC a été identifié sur des cas cliniques de colibacillose en France (114). Plusieurs liens ont été faits entre des bactéries multirésistantes virulentes et leur transmission chez l'humain par de la viande contaminée. Ces bactéries seraient aussi présentes dans les intestins d'animaux sains (50, 78). Une étude danoise a démontré que des *E. coli* isolés de viande de volaille ou provenant de poulets de chair sains possédaient des gènes de virulence d'ExPEC humain et le gène *bla_{CMY-2}* (120). L'étude de Johnson et al. mentionnée dans la section précédente a démontré non seulement que la viande de volaille est la viande la plus contaminée par des *E. coli* (dont la moitié d'entre eux possèdent des gènes de virulence), mais aussi que 94% de ces *E. coli* possédaient des gènes de résistance aux antimicrobiens (141). En Espagne, des associations entre des *E. coli* possédant le gène *bla_{CTX-M-15}* retrouvés chez des humains et sur de la viande de volaille ont aussi démontré avoir une virulence faible, pouvant donc être des agents pathogènes opportunistes (115). Une étude sur le groupe clonal O25:K1:H4-B2-ST131, un agent pathogène ExPEC humain, a démontré 85% de similarité avec des souches d'APEC provenant de cas cliniques et de viande de volaille. Toutes ces souches possédaient la capsule K1 et le gène de virulence *ibeA*. De plus, plusieurs de ces souches étaient multirésistantes et possédaient entre autres, le gène *bla_{CTX-M}* (127). Les 4 groupes clonaux d'*E. coli* O11/O17/O77:K52:H18-D-ST69,

(sérotypes variables)-A-ST10, (sérotypes variables)-D-ST117 et O1/O2/O18:K1:H7-B2-ST95 ont aussi tous été reliés à des infections par ExPEC multirésistants chez l'humain et, chez les poulets, soit en tant que contaminant de la viande, en tant que APEC ou retrouvés chez un poulet sain (réservoir possible). Cependant, la possibilité d'une transmission directe animale à l'humain n'a toujours pas été démontrée pour ces 4 groupes clonaux. Un lien possible entre les ExPEC humains et les APEC est également corroboré par la similitude des profils de résistances aux antimicrobiens et des gènes de virulence chez les *E. coli* provenant de ces sources et par une association épidémiologique faites chez les femmes atteintes d'une infection par UPEC et leur consommation plus élevée de poulets (37, 126, 145). Une étude québécoise a démontré que plusieurs bactéries commensales chez les troupeaux de poulets de chair et les bactéries retrouvées sur la litière peuvent contenir un pourcentage élevé de d'isolats multirésistants et que plusieurs de ces souches contenaient aussi des gènes de virulence tels que *iucC*, *iss*, *tsh*, *traT* et des facteurs entérohémorragiques (*eaeA*, *hlyA*, *stx₁* et *stx₂*) (101).

Ces études suggèrent la volaille comme étant un réservoir possible pour les ExPEC humains. Étant donné que la viande de poulet est fortement contaminée par des *E. coli*, que les *E. coli* isolés chez la volaille sont souvent multirésistants et que la consommation de viande de poulet a augmenté significativement, plusieurs auteurs suggèrent que l'augmentation d'infections par des ExPEC chez l'humain et l'augmentation de multirésistance (notamment chez les ExPEC) seraient principalement due au développement des dernières décennies de la production avicole à l'échelle mondiale. Bien sûr, d'autres causes ne sont pas à délaissier dans l'augmentation de la prévalence de ces souches résistantes chez l'humain, comme les voyages et les échanges internationaux (49, 50). D'autres espèces animales pourraient aussi contribuer à ce phénomène, tels les animaux de compagnie et d'autres animaux de production (37, 50). Par exemple chez le porc en Australie, des *E. coli* multirésistants ont démontré posséder non seulement le gène *bla_{CTX-M}* et d'autres résistances antimicrobiennes sur un même plasmide, mais aussi des gènes de virulence entérotoxigènes impliqués dans les diarrhées pédiatriques chez l'humain (110). Jahanbakhsh et al. ont observé des porcs porteurs d'*E. coli* multirésistants avec des ESBL/AmpC et des gènes de virulences ETEC au Canada (11).

Résumé de la problématique

Le ceftiofur, une céphalosporine de catégorie I selon Santé Canada, a été administré aux poulets de chair au couvoir afin de prévenir la colibacillose en bas âge. L'augmentation mondiale de résistance à cet antimicrobien chez les *E. coli* a mené à l'arrêt de son utilisation dans les couvoirs canadien, puis éventuellement à son remplacement par de la lincomycine-spectinomycine, une combinaison d'antimicrobiens de catégorie II. L'effet de l'utilisation de ces différents antimicrobiens sur la résistance antimicrobiennes des *E. coli* du microbiote intestinal de poulets en santé n'a jamais été étudié au Canada dans une étude verticale comparant des troupeaux de reproducteurs et leur progéniture ayant reçu le ceftiofur, aucun antimicrobien ou la lincomycine-spectinomycine au couvoir.

Rappel des objectifs

1. Vérifier l'effet du retrait du ceftiofur au couvoir et son remplacement par la lincomycine-spectinomycine sur la proportion d'échantillons avec des *E. coli* positifs pour *bla*_{CTX-M}, *bla*_{CMY-2}, *bla*_{SHV}, *bla*_{TEM} et *bla*_{OXA} chez les jeunes poussins, les poulets de chair en élevage et leurs reproducteurs au niveau de leur microbiote intestinal.
2. Vérifier l'effet du retrait du ceftiofur au couvoir et son remplacement par la lincomycine-spectinomycine sur la proportion d'échantillons avec des *E. coli* multirésistants producteurs d'ESBL/AmpC chez les jeunes poussins, les poulets de chair en élevage et leurs reproducteurs au niveau de leur microbiote intestinal.

Article

Article accepté pour publication dans Applied Environmental Microbiology

Effect of ceftiofur cessation and substitution with lincomycin-spectinomycin on extended-spectrum-beta-lactamase/AmpC genes and multidrug resistance in *Escherichia coli* from a canadian broiler production pyramid

Verrette L.^a, Fairbrother J. M.^{b,c,#}, Boulianne M.^{a,c,#}

^a Department of Clinical Sciences, FMV, Université de Montréal

^b Department of Pathology and Microbiology, FMV, Université de Montréal

^c Swine and Poultry Infectious Diseases Research Center, Université de Montréal

Running Head: Ceftiofur and ESBL/AmpC genes in broiler production

[#] Corresponding author:

John M. Fairbrother : john.morris.fairbrother@umontreal.ca

Martine Boulianne : martine.boulianne@umontreal.ca

Keywords: ceftiofur cessation, chicken, lincomycin-spectinomycin, antimicrobial resistance, *bla*_{CMY-2}, *bla*_{CTX-M}

Détails sur le rôle du candidat dans la conception de l'article:

Je suis le premier auteur de cet article. J'ai participé à l'échantillonnage en 2014 et j'ai réalisé tout l'échantillonnage en 2015, de même que toutes les analyses de laboratoire. J'ai aussi activement participé à la conception de l'article par la rédaction initiale du manuscrit, ces corrections ainsi qu'aux analyses statistiques des données.

Abstract

Ceftiofur, a third generation cephalosporin antimicrobial, was used systematically in Canadian hatcheries for many years to prevent early mortality in chicks leading to a high prevalence of cephalosporin resistance in *Escherichia coli* in chickens. Preventive use of ceftiofur in hatcheries ceased in 2014. We examined the effect of ceftiofur, antimicrobial cessation in hatchery and replacement with lincomycin-spectinomycin on the proportion of *E. coli* positive sample for extended-spectrum β -lactamase (ESBL) and AmpC β -lactamase related genes, and on the multidrug resistance profiles of ESBL/AmpC positive *E. coli* in broilers and their associated breeders, at one year post-cessation. For indicator *E. coli* from non-enriched ceftriaxone media, a significant decrease post-cessation in the proportion of samples harboring *E. coli* isolates positive for *bla*_{CMY-2} and/or *bla*_{CTX-M} was observed. In contrast, following enrichment in medium containing ceftriaxone (1mg/L) to facilitate recovery of ESBL/AmpC β -lactamase producing *E. coli* colonies, both pre- and post-cessation, 99% of the samples harbored *E. coli* positive for *bla*_{CMY-2} or *bla*_{CTX-M}. Flocks receiving lincomycin-spectinomycin after cessation of ceftiofur showed a significantly greater non-susceptibility to aminoglycosides, folate inhibitor, phenicol, tetracycline and possible extensively drug resistant *E. coli* isolates compared to those that received ceftiofur or no antimicrobial at hatchery. This study clearly demonstrates an initial decrease in ESBL/AmpC positive *E. coli* following the cessation of ceftiofur in hatchery but an increase in multidrug resistant *E. coli* following replacement with lincomycin-spectinomycin.

Importance

Antimicrobial resistance is a global problem. The antimicrobial ceftiofur has been used worldwide for disease prevention in poultry production resulting in a greatly increased proportion of bacterial isolates resistant to this important antimicrobial for poultry and with a possible risk of transmission to human through retail meat consumption. Our study examines the impact of ceftiofur cessation and its replacement with the antimicrobial combination lincomycin-spectinomycin, a common practice in the Canadian industry. Our study demonstrated a decrease in ceftiofur resistance phenotype after the cessation of its use,

although the resistance genes remain ubiquitous in all phases of poultry production, highlighting that poultry remains a reservoir for ceftiofur resistance genes and requiring continued monitoring. We also observed a decrease in multidrug resistance after cessation of ceftiofur although the contrary findings following the use of lincomycin-spectinomycin. This indicates that the use of lincomycin-spectinomycin should be questioned. Reduced resistance to ceftiofur in poultry may translate to better treatment efficacy, decreased morbidity, mortality, duration and cost of hospitalization in humans (9).

Introduction

One of the most important causes of early mortality in broiler chick is omphalitis, mostly caused by avian pathogenic *E. coli* (APEC), a subgroup of extra-intestinal pathogenic *E. coli* (ExPEC) (1, 3). In many countries, ceftiofur, a third generation cephalosporin antimicrobial, has been administered for over 15 years either *in ovo* or by subcutaneous injection at the hatchery, in order to reduce early chick mortality (4) Consequently, an increased prevalence of extended-spectrum β -lactamase (ESBL) and AmpC β -lactamase producing *Escherichia coli* has been reported worldwide (5-7, 25), resulting in an increased extended spectrum cephalosporin resistance in the broiler poultry chain production. This is a public health concern since ceftiofur co-resistance with other extended spectrum cephalosporins occurs, such as ceftriaxone and cephamycin, antimicrobials which are used widely in human medicine (8, 9). ESBL/AmpC-associated resistance genes detected in chickens are *bla*_{CMY-2}, *bla*_{SHV}, *bla*_{CTX-M}, *bla*_{OXA} and *bla*_{TEM} (8, 10). Ceftiofur has been used in food-producing animals in North America since 1989, and *bla*_{CMY-2} gene was first reported in 1998 from cattle isolates (11).

In Canada in 2014, the poultry industry eliminated the preventive use of ceftiofur in broilers hatcheries for the second time (4). On other hand, the administration in breeder flocks from the USA was ceased only in 2015. Following the first broiler cessation in 2005, a decline in the prevalence of cephalosporin-resistant *Salmonella* Heidelberg isolates on chicken meat was observed, although the effect on the prevalence of resistant *E. coli* was not clear, a decrease did not occur in all provinces tested (9). Recent studies have shown a decrease in the proportion of clinical isolates from chicken possessing ESBL/AmpC-associated resistance

genes after this second cessation in Canada (7, 13, 14). In addition, the prevalence of resistant *E. coli* from healthy broilers at farms markedly decreased within a year after ceftiofur cessation at hatcheries in Japan (5). A decrease in the prevalence of *Salmonella* isolates harboring *bla*_{CMY-2} in chicken meat was also observed in Japan in the same years (15). In Canada, some hatcheries completely stopped using antimicrobials following the cessation of ceftiofur for some flocks (16) while other hatcheries replaced it with lincomycin-spectinomycin, an antimicrobial combination (4, 7). The use of lincomycin-spectinomycin in hatcheries started in 2005, when ceftiofur were no longer used at this time, and has been alternating with ceftiofur since 2007. This use had been associated with cross resistance to gentamicin in Canada (7).

To our knowledge, there has been no convenient sampling study of healthy broiler flocks in Canada comparing the impact on resistant *E. coli* of the administration of ceftiofur, no preventive antimicrobial and replacement with lincomycin-spectinomycin at the hatchery. Hence, our objectives were to examine the effect of ceftiofur cessation and replacement with lincomycin-spectinomycin at the hatchery on the proportion of samples with *E. coli* possessing the ESBL/AmpC genes *bla*_{CMY-2}, *bla*_{SHV}, *bla*_{OXA}, *bla*_{CTX-M} and *bla*_{TEM}, and on the multidrug resistance profiles of these isolates in young chicks, broilers and their breeders of an integrated pyramid.

Material and Methods

1. Sampling

Two vertical samplings periods of meat chickens of an integrated pyramid in the province of Quebec in Canada were made. The first sampling period was between March and May 2014 when chicks were routinely receiving 0,08-0,2 mg of ceftiofur per egg as an *in ovo* injection (70, 150). The second sampling was done between June and October 2015, one year after this preventive administration of ceftiofur at the hatchery had ceased. Chicks on 16 of the 30 broilers flock in the 2015 sampling period received lincomycin and spectinomycin (2,5 mg of lincomycin and 5 mg of spectinomycin per chick (70)) *in ovo* whereas chicks on the remaining farms did not receive any preventive antimicrobial at the hatchery.

Breeder sampling

Eight broiler breeder flocks producing eggs at the same hatchery were conveniently selected for both sampling periods. In both periods, all breeder flocks received ceftiofur in the USA and were delivered in their first week of age in Canada. For both sampling years, three successive samplings within one month were made in the breeder flocks 31 to 57 weeks old. For fecal sampling, the floor of each breeder house was divided into four quarters, and approximately ten fresh fecal droppings were collected from each quarter, put on ice and delivered to the EcL laboratory of the Faculty of Veterinary Medicine at Saint-Hyacinthe, where they were kept overnight at 4 °C. The next day, feces of each quarter were mixed manually and 10 g of feces were mixed in 45 ml of peptone water (Oxoid Canada, Nepean, Ontario, Canada). After standing for 30 minutes, 8,5 ml of the peptone water suspension was collected and frozen with 1,5 ml of glycerol at -80 °C.

Broiler sampling

In the month following the beginning of the sampling of the eight broiler breeders, chicks from corresponding sampled breeder flocks were selected for sampling at hatch and at the end of the growing period. All the broilers flocks of the study were hatch at the same hatchery. A list of farms was obtained from the hatchery company. The first farmers who agreed to participate were recruited. So, unlike the breeder flocks, it was not all the same broiler flocks who participated during the two periods. Study farms housed 5000 to 30 000 chickens. All eggs were incubated at the same hatchery. The flocks receiving no antimicrobial or lincomycin-spectinomycin *in ovo* were from the same breeder in 2015. Shortly after hatch and placement into the delivery box, the paper under the chicks was collected to sample meconium. Papers were delivered to the EcL laboratory, where they were kept overnight at 4 °C. The next day, 8 to 10 pieces of 3 cm by 3 cm cardboard containing meconium were cut out and put in 30 ml of peptone water. The mixture was then incubated at 37 °C overnight. On the next day, 8,5 ml of the peptone water solution was mixed with 1,5 ml of glycerol and frozen at -80 °C. Upon chick delivery at the farm, care was taken to place the sampled chicks in a single and well identified pen to ensure traceability. Between 18 and 29 days of age, fecal sampling was done for each flock using the protocol previously described for the broiler breeder fecal sampling.

In 2014, during ceftiofur use, a total of 22 composite fecal samples from the 8 breeder flocks (one flock was sampled only once before going to slaughter), 20 composite meconium samples (4 meconium samples each covered the number of chicks needed for the production of two different broiler flocks, giving a total of 20 meconium samples that covered 24 broiler flocks) and 20 composite fecal samples of broiler flocks out of the 24 participating farms (traceability to the breeders was lost for 4 lots) were sampled. In 2015, a total of 24 samples from 8 breeder flocks, with corresponding meconium and composite fecal samples from 14 broiler chicken flocks for which no *in ovo* antimicrobials were administered and 16 flocks for which lincomycin-spectinomycin was administered *in ovo*, were taken.

2. Colony isolation of *Escherichia coli*

From the frozen samples, two different isolation protocols were used to obtain an indicator *E. coli* isolate collection and a potential ESBL/AmpC-producing isolate collection.

Indicator *E. coli* isolate collection

Samples were inoculated with a swab on MacConkey agar (Becton Dickinson and Company). After overnight incubation at 37 °C, five well-isolated lactose-positive colonies, when possible, were reinoculated on MacConkey agar and incubated at 37 °C overnight. Well-isolated colonies were then selected and incubated in Luria–Bertani (LB) (Becton Dickinson and Company) broth overnight at 37 °C. Finally, 750 µL of the bacterial suspension for each isolate was mixed with 750 µL of 30% glycerol and frozen at -80 °C.

Potential ESBL/AmpC-producing isolate collection

We used the protocol described previously by Agersø and colleagues with some modifications (120, 151). A volume of 50 µl of each thawed sample was inoculated in 5 ml of peptone water containing 1 mg/ml ceftriaxone (108). After incubation at 37 °C overnight, cultures were streaked on MacConkey agar plates with 1 mg/ml ceftriaxone. After another overnight incubation at 37 °C, 5 colonies were selected per sample (preferably lactose +) and inoculated overnight at 37°C on MacConkey agar containing 1 mg/ml ceftriaxone. Then, well isolated colonies on agar were placed in LB culture medium and incubated overnight at 37 °C. Finally,

750 µL of each bacterial suspension in LB medium was mixed with 750 µL of 30% glycerol and frozen at -80 °C for the 5 colonies.

3. DNA extraction and *uidA* PCR

For each isolate, DNA was extracted from the overnight culture in LB medium. DNA templates were prepared from the samples by boiled cell lysis for examination by PCR, as described previously by Maluta et al. (152). All isolates were confirmed by PCR as *E. coli* by detection of housekeeping gene *uidA*, which encodes a Beta-glucuronidase (Table S1). Control strain ECL7805 was used (153). PCR conditions used to detect *uidA* gene included an initial denaturation (95°C, 2 min) followed by 24 cycles of denaturation (94°C, 30 sec), annealing (65°C, 30 sec) and extension (72°C, 30 sec) and hold at (4°C).

4. Detection of antimicrobial resistance genes

Escherichia coli isolates positive for *uidA* were analyzed for the presence of *bla* genes by multiplex PCR. Five β-lactamase resistance genes (*bla*_{SHV}, *bla*_{TEM}, *bla*_{CMY-2}, *bla*_{OXA}, *bla*_{CTX-M}) (Table S1) were tested in a subset of *E. coli* isolates from the potential ESBL/AmpC-producing isolate collection (3 of 5 isolates maximum per sample for a total of 432 tested) and for all the *E. coli* isolates in the indicator collection (5 colonies maximum per sample with a total of 722 tested). The protocol was provided by the National Microbiology Laboratory of the Public Health Agency of Canada and used with some minor adjustments. The control strains ECL3482, PMON38 and CTX-M15 (154) were used.

5. Phenotypic antimicrobial susceptibility testing in the potential ESBL/AmpC-producing isolate collection

For each sample from the potential ESBL/AmpC-producing isolate collection, the first 2 of 3 isolates tested by PCR were selected for examination by the disk diffusion (Kirby Bauer) assay (total of 290 isolates), as previously described by the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Susceptibility of isolates was tested for 14 antimicrobials belonging to 10 classes as used in the Canadian Integrated Program for Antimicrobial Resistance Surveillance (CIPARS) for food producing animals and antimicrobials agents of interest in human and

veterinarian medicine (155), with the addition of spectinomycin (total of 15 antimicrobials covering 10 classes) (Table S2). Breakpoints were those recommended by CLSI in 2015 (M100-S25) for *Enterobacteriaceae* (156). There were three exceptions where recommendations in the CLSI in 2015 for animals (VET01S) were used: tetracyclines and ceftiofur, where the breakpoints selected were for *Enterobacteriaceae*, and spectinomycin, where the zone diameter interpretative standards used were for *Pasteurella multocida* (157). Intermediate and resistant strains were classified as non-susceptible. *Escherichia coli* strain ATCC 25922 was used as quality control for antimicrobial susceptibility testing.

Multi-drug resistance (MDR) was defined as non-susceptibility to at least one agent in three different antimicrobial classes and possible extreme drug resistance (XDR) as non-susceptibility to at least one agent in all but two or fewer antimicrobial classes tested, as suggested by Magiorakos et al. (135). In order to more precisely compare the level of MDR between groups, the level of multi-drug resistance for each sample was classified from 0 to 10, representing the number of antimicrobial classes to which the sample was non-susceptible.

6. Statistical Analysis

The unit of interest for statistical analysis was the flock, one pooled sample representing one flock. A sample was considered non-susceptible to an antimicrobial when at least one of its isolates demonstrated non-susceptibility. The associations between the various groups (*in ovo* administration of ceftiofur, no antimicrobial or lincomycin-spectinomycin) were tested using exact chi-square with SAS v.9.3 (Cary, N.C.). The alpha value was set at 0,05.

Results

1. Decreased proportion in indicator *E. coli* collection positive for $bla_{\text{CMY-2}}$ or $bla_{\text{CTX-M}}$ following cessation of *in ovo* administration of ceftiofur in hatchery

Before the cessation of ceftiofur, the proportion of samples with *E. coli* positive for $bla_{\text{CMY-2}}$ was very high for the meconium (90%), decreasing statistically to 60% for the broilers flocks ($p < 0,03$) and was 0% in breeders (Table 1). Similarly, the proportion of samples with *E. coli*

positive for *bla*_{CTX-M} was higher ($p < 0,08$) for the meconium (20%) compared to broilers (5%) and breeders (0%).

Interestingly, following cessation of ceftiofur and without the *in ovo* administration of lincomycin-spectinomycin, a decrease in the proportion of samples with *E. coli* positive for *bla*_{CMY-2} was observed in the meconium and broiler feces, being significant ($p = 0,002$) only for the meconium. The same trend was observed when comparing the proportion of samples with *E. coli* positive for *bla*_{CTX-M} in meconium and broiler feces, although this result is not statistically different. In 2015, the breeders had a low proportion of positive samples to *bla*_{CMY-2} (16%) and *bla*_{CTX-M} (0%). The proportions of meconium and broiler samples in 2015 with *E. coli* positive for *bla*_{CMY-2} or *bla*_{CTX-M} were not significantly different when comparing flocks receiving lincomycin-spectinomycin to those which received no antimicrobial *in ovo*. Following the cessation of ceftiofur, as observed in flocks not receiving any antimicrobial *in ovo*, flocks receiving lincomycin-spectinomycin showed a significant decrease in the proportion of samples harboring *E. coli* possessing the *bla*_{CMY-2} gene ($p < 0,01$) for the meconium and a decrease, although not significant, in the proportion of samples harboring *E. coli* possessing *bla*_{CMY-2} for the broiler feces. No significant differences were observed between groups for the proportion of samples with *E. coli* positive for the *bla*_{TEM} gene. Overall, the proportion of samples with *E. coli* positive for the *bla*_{SHV} gene was very low (Table S3). No samples with *E. coli* positive for the *bla*_{OXA} gene were detected.

2. High proportion of ceftriaxone-enriched samples from all sources before and after cessation of *in ovo* administration of ceftiofur harboring *E. coli* positive for *bla*_{CMY-2}

In contrast to the findings when examining the indicator *E. coli* collection from non-enriched ceftriaxone samples, almost all ceftriaxone-enriched samples ($n = 145$) harbored potential cephalosporin resistant *E. coli* (only one meconium sample was negative for the entire study) (Table 2). Almost all ceftriaxone-enriched samples demonstrating growth ($n = 144$) harbored *E. coli* positive for *bla*_{CMY-2} except one sample after the ceftiofur cessation which only harbored *E. coli* positive for *bla*_{CTX-M}. Although the *bla*_{CTX-M} gene was much less prevalent, it was present in all the production chain of both years. Few differences between flocks before and

after the cessation of *in ovo* administration of ceftiofur were observed with respect to the proportion of samples harboring *E. coli* isolates positive for *bla*_{CTX-M}, *bla*_{TEM} or *bla*_{CMY-2}, namely the proportion of samples harboring *E. coli* positive for *bla*_{CTX-M} ($p < 0,05$) or *bla*_{TEM} ($p < 0,01$), which were increased for pooled feces of broiler flocks receiving lincomycin-spectinomycin compared to flocks with no *in ovo* antimicrobial administration. As observed for the indicator samples, the proportion of ceftriaxone-enriched samples harboring *E. coli* positive for *bla*_{SHV} was very low (Table S3) and *bla*_{OXA} was not detected in any sample.

3. Antimicrobial non-susceptibility in ESBL/AmpC resistance gene positive *E. coli* isolates from ceftriaxone-enriched samples from newly hatched, broiler and breeder birds following the cessation of *in ovo* administration of ceftiofur and substitution with lincomycin-spectinomycin

Most (274/290) of the isolates from the ceftriaxone-enriched samples from all sources that were selected for antimicrobial susceptibility testing were positive for *bla*_{CMY-2} whereas 20/290 were positive for *bla*_{CTX-M}. One isolate was negative for *bla*_{CMY-2} and *bla*_{CTX-M} but positive for *bla*_{SHV} and *bla*_{TEM}. The isolates positive for *bla*_{CTX-M} were non-susceptible to a significantly lower number of different antimicrobials than those positive for *bla*_{CMY-2} ($p < 0,01$) or both *bla*_{CMY-2} and *bla*_{CTX-M} ($p < 0,0001$). Among the 15 different antimicrobials examined, the maximum number of antimicrobials for which non-susceptibility was observed in isolates positive for *bla*_{CTX-M} alone ($n=15$) was 8 whereas the maximum number of antimicrobials for which non-susceptibility was observed in isolates positive for *bla*_{CMY-2} alone ($n=269$) or for *bla*_{CMY-2} and *bla*_{CTX-M} ($n=5$) was 13 and 12 respectively.

Among samples, non-susceptibility for certain antimicrobials varied in the different production phases of the study. For flocks in which birds received ceftiofur *in ovo*, the proportion of samples with *E. coli* showing non-susceptibility in broiler feces was higher than the meconium samples ($p < 0,0001$) and their corresponding breeding flocks ($p < 0,001$) for trimethoprim-sulfamethoxazole. For flocks in which birds received ceftiofur *in ovo*, the proportion of samples with *E. coli* showing non-susceptibility in broilers was higher than in their corresponding breeding flocks ($p = 0,02$) for sulfisoxazole.

However, for flocks which received lincomycin-spectinomycin *in ovo*, a greater proportion of non-susceptibility was observed in the broiler flocks compared to their breeders, for the aminoglycoside and folate inhibitor classes. For gentamicin ($p < 0,02$) and spectinomycin ($p < 0,01$), a greater proportion of non-susceptibility was found in the meconiums compared to the breeders. For trimethoprim-sulfamethoxazole, a greater proportion of non-susceptibility was observed in broiler flocks compared to breeder samples ($p < 0,001$). For sulfisoxazole, a greater proportion of non-susceptibility was observed in both meconium ($p < 0,01$) and broilers ($p < 0,01$) compared to breeding flocks. No differences between phases were observed in flocks which received no antimicrobial *in ovo*.

4. Increased proportion of ceftriaxone-enriched samples with *E. coli* non-susceptible to antimicrobials of different classes following the cessation of *in ovo* administration of ceftiofur and substitution with lincomycin-spectinomycin

Thus, we observed that replacement of ceftiofur with lincomycin-spectinomycin for *in ovo* administration did not appear to affect the proportion of indicator samples harboring *E. coli* with the ESBL/AmpC resistance gene *bla*_{CMY-2}. As enrichment with ceftriaxone showed that *E. coli* isolates with the ESBL/AmpC resistance gene *bla*_{CMY-2} are ubiquitous in most examined samples, we wished to determine the effect of lincomycin-spectinomycin administration on the non-susceptibility of these isolates to different antimicrobial categories and on the level of MDR. As expected, with almost 100% of isolates positive for *bla*_{CMY-2} gene, resistance to penicillins with and without β -lactamases inhibitors, third generation cephalosporins and cephamycin was almost 100%, irrespective of the antimicrobial used at the hatchery. There was no difference in the proportion of samples harboring *bla*_{CMY-2}-positive *E. coli* non-susceptible for any of the six other antimicrobial classes in meconium or broiler feces samples between flocks before and after cessation of *in ovo* administration of ceftiofur when there was no replacement with lincomycin-spectinomycin, except for the non-susceptibility to trimethoprim-sulfamethoxazole in broiler feces where a significant decrease was observed following the ceftiofur cessation ($p = 0,001$).

On the other hand, there were a significantly greater proportion of samples harboring *bla*_{CMY-2}-positive *E. coli* non-susceptible to streptomycin, trimethoprim-sulfamethoxazole, chloramphenicol, and tetracyclines in broiler feces when lincomycin-spectinomycin was administered *in ovo* compared to when no antimicrobial was used (Table 3). The same trend could be seen in the meconium, although the results were not statistically different, with the exception of spectinomycin. For many of these antimicrobials, a significantly greater proportion of samples harboring *bla*_{CMY-2}-positive non-susceptible *E. coli* in meconium was observed when lincomycin-spectinomycin was administered *in ovo* compared to the administration of ceftiofur. A similar trend was observed in the broiler feces but was only significant for spectinomycin. Finally, neither the cessation of *in ovo* administration of ceftiofur nor replacement with lincomycin-spectinomycin affected the proportion of samples harboring *bla*_{CMY-2}-positive *E. coli* non-susceptible to fluoroquinolones (nalidixic acid and ciprofloxacin) and macrolides (azithromycin). There was a very low proportion of non-susceptibility to these antimicrobials in isolates of the potential ESBL/AmpC-producing *E. coli* collection.

5. Greater level of MDR in ESBL/AmpC resistance gene positive *E. coli* isolates in ceftriaxone-enriched samples from newly hatched, broiler and breeder birds following the cessation of *in ovo* administration of ceftiofur and substitution with lincomycin-spectinomycin

The proportion of ESBL/AmpC resistance gene positive *E. coli* isolates from ceftriaxone-enriched samples non-susceptible to 8 or more classes (referred to as possible extensively drug-resistant (XDR) (135)) was greater in value for broiler feces than in the meconium in 2014 before the cessation of the *in ovo* administration of ceftiofur (Figure 1). The proportion of possible XDR isolates in breeder feces in 2014 was similar to that in broiler feces. The number of possible XDR isolates in broiler feces following cessation of ceftiofur when no antimicrobial was administered *in ovo* was slightly lower than what was observed in broiler feces before the cessation of ceftiofur. In contrast, flocks receiving lincomycin-spectinomycin demonstrated a level of possible XDR similar to that that observed before ceftiofur cessation. Notably, all isolates in the lincomycin-spectinomycin treated flocks demonstrated non- β -

lactam non-susceptibility in addition to β -lactam (penicillins with and without β -lactamases inhibitors, third generation cephalosporins and cephamycin) non-susceptibility to 6 or more classes whereas those in flocks prior to cessation of ceftiofur administration or following cessation of ceftiofur when no antimicrobial was administered *in ovo* often showed only β -lactam non-susceptibility (4 or more classes) (Table 4). Thus, samples from meconium and broiler feces of chicks having received lincomycin-spectinomycin *in ovo* showed non-susceptibility to a higher number of antimicrobial classes than those of chicks having received ceftiofur or which did not receive any antimicrobial *in ovo*. Finally, possible XDR bacteria in flocks that had received lincomycin-spectinomycin almost always demonstrated non-susceptibility to spectinomycin and were mostly associated with non-susceptibility to other non- β -lactams such as gentamicin, streptomycin, sulfisoxazole and tetracycline (Table 4).

Discussion

The cessation of *in ovo* administration of ceftiofur in our study clearly decreased the prevalence of samples harboring indicator *E. coli* isolates positive for the ESBL/AmpC resistance genes *bla*_{CMY-2} and *bla*_{CTX-M} in the meconium of newly hatched birds. This finding shows a beneficial effect of the cessation of the use of ceftiofur, reinforcing the findings of other studies where a decrease in resistance to extended spectrum cephalosporins was observed (5, 9, 13). Nevertheless, we did not observe an effect in the broiler feces, as it was the case in a previous study, where broilers treated with ceftiofur *in ovo* had percentages of resistant *E. coli* isolates significantly higher. However, one limit to this study includes the absence of knowledge on the third generation cephalosporin status of the breeder flock (25). In addition, the substitution of ceftiofur with lincomycin-spectinomycin in the broiler hatchery did not have a significant impact on the presence of *bla*_{CMY-2} or *bla*_{CTX-M} in this collection, reinforcing the idea that these genes were selected mainly due to the use of ceftiofur. When we used a more sensitive approach by using enrichment with ceftriaxone, we found that almost all samples, irrespective of the production phase, harbored isolates positive for the ESBL/AmpC resistance genes, mostly *bla*_{CMY-2}, before the cessation of the use of ceftiofur, and this was not affected by the cessation, at least in the first year after it occurred.

We observed *E. coli* positive for *bla*_{CTX-M} across all the poultry production chain, suggesting that this gene is more prevalent in Canadian flocks than previously reported (7). Our results following ceftriaxone enrichment demonstrated that cephalosporin resistance genes were still present among the microbiota of chicken intestinal gut but that the prevalence was probably lower in the flocks following the cessation of ceftiofur. The lower prevalence of *bla*_{CTX-M} with respect to *bla*_{CMY-2} in our study is in contrast to the lower prevalence of *bla*_{CMY-2} reported in Europe (6). This could be due to the presence of different plasmids containing *bla*_{CTX-M} in Europe such as IncN, IncI, IncL/M and IncK types (8). Nevertheless, a more recent study in Europe showed a higher proportion of *bla*_{CMY-2} (158). The difference in relative predominance of the *bla*_{CTX-M} and *bla*_{CMY-2} genes could also be explained in part by differences in geographical distribution of these genes (25).

Although the *in ovo* administration of ceftiofur ceased in Canada in 2014, this practice was only stopped in parent flocks in the US in 2015 after the present study had been completed; hence, vertical transmission of resistance genes may have occurred and has been already study (25, 105, 106). In fact, the results of our study are similar to those obtained in Denmark, where the parent flocks which did not receive ceftiofur but for which the grandparent flocks received cephalosporins (120), demonstrated a 93% prevalence of cephalosporin resistant *E. coli* (most of the samples being positive for *bla*_{CMY-2}). Vertical transmission of APEC from breeders to their progeny is well known (3) and has been demonstrated recently in the Nordic countries where APEC ST117 O78:H4 was transmitted from grand-parent flocks to their broilers in different countries (77). In addition, Nilsson et al. demonstrated the vertical transmission of *E. coli* carrying *bla*_{CMY-2} from grand-parent flocks which had been exposed to ceftiofur to parent and broiler flocks which had never received ceftiofur (105). Zurfluh et al. demonstrated similar results where *E. coli* carrying *bla*_{CTX-M} were vertically transmitted from parent flocks to hatchery and broiler flocks (106). Horizontal transmission has also been reported for ESBL/AmpC-associated resistance genes which are found on horizontally transferable plasmids (132). Thus, the administration of ceftiofur *in ovo* to US breeders could have resulted in an increase in the proportion of resistance to third generation cephalosporins in broiler *E. coli* even though the administration of this antimicrobial had ceased in Canadian hatcheries. Further testing could show whether *E. coli* possessing *bla*_{CMY-2} in breeder flock are associated

with those of their offspring, notably by MLST or by whole genome sequencing. In the Danish study, a decrease in prevalence of samples positive for cephalosporin resistant *E. coli* to 27% in broiler flocks originating from breeders which did not receive ceftiofur was observed from 2010 to 2011 (120). The 2015 ceftiofur cessation in USA breeders could possibly decrease the prevalence of *E. coli* carrying the ESBL/AmpC resistance genes in Canadian breeders and then, in broilers. Finally, maintenance of the high proportion positive samples in the Canadian broilers at one year after the cessation of administration of ceftiofur could also be explained by environmental contamination which may have persisted after birds ceased to excrete *E. coli* positive for ESBL/AmpC resistance genes (158).

Our finding of an increased prevalence of non-susceptibility of *E. coli* to the aminoglycosides, phenicols, the tetracyclines and the folate inhibitors in 2015 for the meconium and broiler feces of birds receiving lincomycin-spectinomycin clearly showed that the use of this antimicrobial combination resulted in an increase in MDR among the cephalosporin resistant *E. coli*. These results suggested that there may be a co-selection phenomenon when using lincomycin-spectinomycin, which would explain the high MDR for this group. The association of non-susceptibility to spectinomycin with non-susceptibility to other non- β -lactams such as gentamicin, streptomycin, trimethoprim-sulfamethoxazole, sulfisoxazole, chloramphenicol and tetracyclines could be due to the presence of a plasmid or other transferable elements (integrons, transposons, insertion sequences) that carry *bla*_{CMY-2} and other resistance genes in addition to those encoding resistance to spectinomycin. In a study of *E. coli* isolates from clinical cases of colibacillosis in chickens in Québec, Canada, Chalmers et al (7) demonstrated that the use of spectinomycin could increase co-selection. Indeed, the presence of resistance to spectinomycin (*aac(3)-VI* gene) and gentamicin (*aadA*), an antimicrobial that is no longer routinely used in Canadian poultry, were associated statistically and located on a modified class 1 integron. Class 1 integron was found in different plasmid types like IncA/C, previously associated with multidrug resistant strains. These authors also demonstrated that the use of spectinomycin did not seem to select cephalosporin resistant *E. coli* or APEC. The *aac(3)-VI* and *bla*_{CMY-2} genes were negatively associated, but when present together, were generally located on the same plasmids (7). An increase of bacteria with co-selection of antimicrobial resistance and greater MDR would thus be expected with the use of

lincomycin-spectinomycin and could allow the emergence of a bacterial flora that contains more MDR and, possibly, XDR bacteria.

In a study of MDR *E. coli* harboring *bla*_{CMY-2} or *bla*_{CTX-M} from sick pigs in Canada, Jahanbakhsh et al (11) demonstrated the presence of class 1 integrons which were significantly associated with resistance to gentamicin, kanamycin, streptomycin, trimethoprim-sulfamethoxazole, sulfisoxazole, chloramphenicol and tetracycline. This study also demonstrated the presence of an IncA/C plasmid type positively associated with class 1 integron, resistance to gentamicin, kanamycin, streptomycin, trimethoprim-sulfamethoxazole, sulfisoxazole, chloramphenicol and tetracycline, in *E. coli* with resistance to at least one antimicrobial in eight different classes and the presence of *bla*_{TEM}. Furthermore, other plasmids such as IncFIB type had a positive association with IncA/C type whereas IncII plasmid type had a negative association (11). The presence of such plasmids in our study may explain why multidrug-resistant bacteria were selected when using lincomycin-spectinomycin at the hatchery. Studies in Japan and Netherlands also found IncA/C plasmids type harboring *bla*_{CMY-2} and resistance to non β -lactam antimicrobial (39, 158). The plasmids selected in our study may have contained *bla*_{CMY-2} genes and other resistance genes. Alternatively, certain clonal lineages may harbor one plasmid with the *bla*_{CMY-2} genes concomitantly with a second plasmid conferring resistance to non β -lactam antimicrobials. Plasmids of several incompatibility groups, such as as IncI γ , IncB/O, IncFIB, IncFIC and IncII types, have already been reported to contain *bla*_{CMY-2} genes alone (11, 39). Horizontal and vertical transmission of *bla*_{CMY-2} has already been reported (120). Further testing with whole genome sequencing is needed to evaluate if vertical transmission of *bla*_{CMY-2} and *bla*_{CTX-M} occurs between the breeders and broilers of our study.

We observed a significant decrease in non-susceptibility to trimethoprim-sulfamethoxazole in the broiler feces for the flocks which did not receive any antimicrobial *in ovo* following the cessation of ceftiofur, thus demonstrating the potential for a positive cessation effect for this class of antimicrobials. This decrease could be explained by a selective disadvantage of *bla*_{CMY-2} on certain plasmids at the animal level when ceftiofur is stopped and no antimicrobial is used subsequently (158). Furthermore, resistance to phenicols and tetracyclines were lower,

although not significantly, for these same flocks, showing a beneficial effect with respect to the prevalence of MDR. Nevertheless, no significant differences were seen for the meconium and broiler feces between flocks receiving ceftiofur prior to its cessation and flocks when no antimicrobial is used with respect to non-susceptibility to gentamicin, spectinomycin, sulfisoxazole, tetracyclines and chloramphenicol, which suggests that resistance to these antimicrobials is mainly due to the use of lincomycin-spectinomycin. However, antimicrobials received during rearing may also affect the variation in the prevalence of non-susceptibility to these antimicrobials. If broiler flocks not receiving antimicrobials *in ovo* have lower level of resistance to certain antimicrobials (such as trimethoprim-sulphamethoxazole), stopping antimicrobials at the hatchery could lead to clinically more effective antimicrobial treatments during fattening.

We observed little non-susceptibility to the fluoroquinolones (nalidixic acid and ciprofloxacin) and macrolides (azithromycin) in *E. coli* isolates obtained following ceftriaxone enrichment. This result was expected as these classes of antimicrobial agent were not approved for use in poultry in Canada during the years of our study, during which time ceftiofur, bacitracin, virginiamycin, avilamycin, and lincomycin-spectinomycin were the most commonly used antimicrobials(4). In addition, ceftriaxone enrichment is not a selective method for detection of quinolones or macrolides resistance (159, 160).

Overall, our results demonstrate a decrease in the prevalence of samples positive for cephalosporin-resistant *E. coli* harboring *bla*_{CMY-2} and *bla*_{CTX-M} after the ceftiofur cessation and replacement with lincomycin-spectinomycin. No differences were seen in the proportion of *bla*_{SHV}, *bla*_{OXA} and *bla*_{TEM}. On other hand, when samples were examined using the more sensitive ceftriaxone-enrichment, 99% of samples were shown to harbor cephalosporin-resistant *E. coli*, there has not yet been a reduction in the presence of *E. coli* carrying the ESBL/AmpC resistance genes one year after the ceftiofur cessation. Also, we observed a high proportion of positive samples containing multidrug resistant ESBL/AmpC *E. coli* in young chicks, broilers and breeders, with an increase in the proportion flocks positive for *E. coli* that are possibly extensively resistant when lincomycin-spectinomycin was used, which is a concern for public health.

Acknowledgments

This work was supported by Agriculture and Agri-Food Canada, and by Éleveurs de volailles du Québec, Programme Agri-Innovation. We thank Ghyslaine Vanier, Gabriel Desmarais, and Jocelyn Bernier-Lachance for their technical assistance, Benoît Lanthier for assistance in the field and Les Fonds du Centenaire of the faculty of veterinary medicine of Université de Montréal for their contribution.

References

1. Kemmett K, Williams NJ, Chaloner G, Humphrey S, Wigley P, Humphrey T. The contribution of systemic *Escherichia coli* infection to the early mortalities of commercial broiler chickens. *Avian pathology : journal of the WVPA*. 2014;43(1):37-42.
3. Giovanardi D, Campagnari E, Ruffoni LS, Pesente P, Ortali G, Furlattini V. Avian pathogenic *Escherichia coli* transmission from broiler breeders to their progeny in an integrated poultry production chain. *Avian pathology: journal of the WVPA*. 2005;34(4):313-8.
4. Agunos A, Leger DF, Carson CA, Gow SP, Bosman A, Irwin RJ, et al. Antimicrobial use surveillance in broiler chicken flocks in Canada, 2013-2015. *PloS one*. 2017;12(6):e0179384.
5. Hiki M, Kawanishi M, Abo H, Kojima A, Koike R, Hamamoto S, et al. Decreased Resistance to Broad-Spectrum Cephalosporin in *Escherichia coli* from Healthy Broilers at Farms in Japan After Voluntary Withdrawal of Ceftiofur. *Foodborne pathogens and disease*. 2015;12(7):639-43.
6. 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. *Veterinary microbiology*. 2010;145(3-4):273-8.
7. Chalmers G, Cormier AC, Nadeau M, Cote 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 Quebec, Canada. *Veterinary microbiology*. 2017;203:149-57.
8. Liebana E, Carattoli A, Coque TM, Hasman H, Magiorakos AP, Mevius D, et al. Public health risks of enterobacterial isolates producing extended-spectrum beta-lactamases or AmpC beta-lactamases in food and food-producing animals: an EU perspective of epidemiology, analytical methods, risk factors, and control options. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2013;56(7):1030-7.
9. Dutil L, Irwin R, Finley R, Ng LK, Avery B, Boerlin P, et al. Ceftiofur resistance in *Salmonella enterica* serovar Heidelberg from chicken meat and humans, Canada. *Emerging infectious diseases*. 2010;16(1):48-54.

10. Dierikx CM, van der Goot JA, Smith HE, Kant A, Mevius DJ. Presence of ESBL/AmpC-producing *Escherichia coli* in the broiler production pyramid: a descriptive study. PloS one. 2013;8(11):e79005.
11. Jahanbakhsh S, Smith MG, Kohan-Ghadr HR, Letellier A, Abraham S, Trott DJ, et al. Dynamics of extended-spectrum cephalosporin resistance in pathogenic *Escherichia coli* isolated from diseased pigs in Quebec, Canada. International journal of antimicrobial agents. 2016;48(2):194-202.
13. Caffrey N, Nekouei O, Gow S, Agunos A, Checkley S. Risk factors associated with the A2C resistance pattern among *E. coli* isolates from broiler flocks in Canada. Preventive veterinary medicine. 2017;148:115-20.
14. Gouvernement du Canada. PROGRAMME INTÉGRÉ CANADIEN DE SURVEILLANCE DE LA RÉSISTANCE AUX ANTIMICROBIENS (PICRA) 2016 [Available from: <https://www.canada.ca/fr/sante-publique/services/publications/medicaments-et-produits-sante/programme-integre-canadien-surveillance-resistance-antimicrobiens-bulletin.html?=&wbdisable=true>].
15. Kataoka Y, Murakami K, Torii Y, Kimura H, Maeda-Mitani E, Shigemura H, et al. Reduction in the prevalence of AmpC beta-lactamase CMY-2 in *Salmonella* from chicken meat following cessation of the use of ceftiofur in Japan. Journal of global antimicrobial resistance. 2017;10:10-1.
16. Chicken Farmers of Canada. The Antimicrobial Use Reduction Strategy 2018 [Available from: <https://www.chickenfarmers.ca/the-antimicrobial-use-reduction-strategy/>].
25. Baron S, Jouy E, Larvor E, Eono F, Bougeard S, Kempf I. Impact of third-generation-cephalosporin administration in hatcheries on fecal *Escherichia coli* antimicrobial resistance in broilers and layers. Antimicrobial agents and chemotherapy. 2014;58(9):5428-34.
39. Hiki M, Usui M, Kojima A, Ozawa M, Ishii Y, Asai T. Diversity of plasmid replicons encoding the bla(CMY-2) gene in broad-spectrum cephalosporin-resistant *Escherichia coli* from livestock animals in Japan. Foodborne pathogens and disease. 2013;10(3):243-9.
70. Agunos A, Leger D, Carson C. Review of antimicrobial therapy of selected bacterial diseases in broiler chickens in Canada. The Canadian veterinary journal = La revue veterinaire canadienne. 2012;53(12):1289-300.

77. Ronco T, Stegger M, Olsen RH, Sekse C, Nordstoga AB, Pohjanvirta T, et al. Spread of avian pathogenic *Escherichia coli* ST117 O78:H4 in Nordic broiler production. *BMC genomics*. 2017;18(1):13.
105. Nilsson O, Borjesson S, Landen A, Bengtsson B. Vertical transmission of *Escherichia coli* carrying plasmid-mediated AmpC (pAmpC) through the broiler production pyramid. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2014;69(6):1497-500.
106. Zurfluh K, Wang J, Klumpp J, Nuesch-Inderbinen M, Fanning S, Stephan R. Vertical transmission of highly similar bla CTX-M-1-harboring IncII plasmids in *Escherichia coli* with different MLST types in the poultry production pyramid. *Frontiers in microbiology*. 2014;5:519.
108. Aarestrup FM, Hasman H, Veldman K, Mevius D. Evaluation of eight different cephalosporins for detection of cephalosporin resistance in *Salmonella enterica* and *Escherichia coli*. *Microbial drug resistance (Larchmont, NY)*. 2010;16(4):253-61.
120. Agerso 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 pathogens and disease*. 2014;11(9):740-6.
132. Daehre K, Projahn M, Semmler T, Roesler U, Friese A. Extended-Spectrum Beta-Lactamase-/AmpC Beta-Lactamase-Producing *Enterobacteriaceae* in Broiler Farms: Transmission Dynamics at Farm Level. *Microbial drug resistance (Larchmont, NY)*. 2017.
135. Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG, et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 2012;18(3):268-81.
150. D. Janzen CFoC, M. Davies TFoC, J. Greydanus CHEP, P. Clarke EFoC, C. Evans CPEPC, R. Weiss CHF. Preventive Use of Category I Antibiotics in the Poultry and Egg Sectors 2013 [Available from: <http://bcchicken.ca/wp-content/uploads/2012/11/Antibiotic-FAQ-2013.pdf>].
151. Agerso 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. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2012;67(3):582-8.

152. 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. *Veterinary microbiology*. 2014;169(1-2):89-95.

153. Walk ST, Alm EW, Gordon DM, Ram JL, Toranzos GA, Tiedje JM, et al. Cryptic lineages of the genus *Escherichia*. *Applied and environmental microbiology*. 2009;75(20):6534-44.

154. Mataseje LF, Bryce E, Roscoe D, Boyd DA, Embree J, Gravel D, et al. Carbapenem-resistant Gram-negative bacilli in Canada 2009-10: results from the Canadian Nosocomial Infection Surveillance Program (CNISP). *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2012;67(6):1359-67.

155. CIPARS. CANADIAN INTEGRATED PROGRAM FOR ANTIMICROBIAL RESISTANCE SURVEILLANCE, 2015 ANNUAL REPORT 2015 [Available from: http://publications.gc.ca/collections/collection_2017/aspc-phac/HP2-4-2015-eng.pdf

141. [CLSI] Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fifth Informational Supplement M100-S25. 25 ed2015. p. 240.

156. [CLSI] Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals, CLSI supplement VET01S. In: VET01S Cs, editor. 3 ed2015. p. 128.

157. Dame-Korevaar A, Fischer EAJ, Stegeman A, Mevius D, van Essen-Zandbergen A, Velkers F, et al. Dynamics of CMY-2 producing *E. coli* in a broiler parent flock. *Veterinary microbiology*. 2017;203:211-4.

159. Hricova K, Roderova M, Pudova V, Hanulik V, Halova D, Julinkova P, et al. Quinolone-resistant *Escherichia coli* in Poultry Farming. *Central European journal of public health*. 2017;25(2):163-7.

160. Bohnert JA, Schuster S, Fahrnich E, Trittler R, Kern WV. Altered spectrum of multidrug resistance associated with a single point mutation in the *Escherichia coli* RND-type MDR efflux pump YhiV (MdtF). *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2007;59(6):1216-22.

Tables and Figures

Table 1. Effect of cessation of *in ovo* administration of ceftiofur and replacement with lincomycin-spectinomycin on the proportion of non-enriched ceftriaxone samples from newly hatched, broiler and breeder birds with *E. coli* isolates positive for ESBL/AmpC resistance genes

Sample origin	Before or after ceftiofur cessation in broiler	<i>In ovo</i> administration of:	No of samples (isolates) ^a	% samples with one or more isolates positive for:		
				<i>bla</i> _{TEM}	<i>bla</i> _{CMY-2}	<i>bla</i> _{CTX-M}
Meconium of newly hatched chicks	Before (2014)	Ceftiofur	20 (96)	45	90 ^b	20
	After (2015)	Nothing	14 (69)	71	36 ^c	0
	After (2015)	Lincomycin Spectinomycin	16 (80)	56	50 ^c	0
Pooled feces of broilers	Before (2014)	Ceftiofur	20 (100)	50	60	5
	After (2015)	Nothing	14 (70)	43	50	0
	After (2015)	Lincomycin Spectinomycin	16 (79)	69	44	6
Pooled feces of breeders	Before (2014)	Ceftiofur	22 (109)	64	0	0
	Before (2015)	Ceftiofur	24 (119)	60	16	0

^a All isolates tested were *uidA* positive (likely *E. coli*)

^{bc} Different letters in superscript in the same column and same sample origin indicate significantly different results

Table 2. Effect of cessation of *in ovo* administration of ceftiofur and the substitution with lincomycin-spectinomycin on the proportion of ceftriaxone-enriched samples from newly hatched, broiler and breeder birds with *E. coli* isolates positive for ESBL/AmpC resistance genes

Sample origin	Before or after ceftiofur cessation in broiler	<i>In ovo</i> administration of:	No of samples with growth (%) after ceftriaxone enrichment	No of isolates ^a	% samples with one or more isolates positive for:		
					<i>bla</i> _{TEM}	<i>bla</i> _{CMY-2}	<i>bla</i> _{CTX-M}
Meconium of newly hatched chicks	Before (2014)	Ceftiofur	19 (95)	57	26	100	16
	After (2015)	Nothing	14 (100)	40	43	93	7
	After (2015)	Lincomycin Spectinomycin	16 (100)	47	44	100	0
Pooled feces of broilers	Before (2014)	Ceftiofur	20 (100)	60	40	100	20
	After (2015)	Nothing	14 (100)	42	7 ^b	100	0 ^b
	After (2015)	Lincomycin Spectinomycin	16 (100)	48	56 ^c	100	31 ^c
Pooled feces of breeders	Before (2014)	Ceftiofur	22 (100)	66	45	100	14
	Before (2015)	Ceftiofur	24 (100)	72	67	100	8

^a All isolates tested were uidA positive (likely *E. coli*). For each sample, 2-3 isolates were tested

^{bc} Different letters in superscript in the same column and same sample origin indicate significantly different results

Table 3. Effect of cessation of *in ovo* administration of ceftiofur and substitution with lincomycin-spectinomycin on the proportion of ceftriaxone-enriched samples from newly hatched, broiler and breeder birds harboring antimicrobial non-susceptible in ESBL/AmpC resistance gene positive *E. coli* samples ^a

Sample origin	Before or after ceftiofur cessation in broiler	<i>In ovo</i> administration of:	No of samples (isolates)	Proportion(%) of non-susceptible samples by category ^b , by class ^c of antimicrobial and by antimicrobial ^d														
				Category I					Category II					Category III				
				FLQ		PEN/I		CPS	PEN		CPM	AMG		FOL		MACRO	PHE	TET
				NA	CIP	AMC	TIO	CRO	AMP	FOX	GEN	SPT	STR	SXT	SSS	AZM	CHL	TET
Meconium	Before (2014)	Ceftiofur	19 (38)	5	0	100	100	100	100	100	47 ^e	37 ^e	63 ^e	5 ^e	68 ^e	5	16	68
	After (2015)	Ceftiofur cessation	14 (28)	0	0	93	100	100	100	93	64	36 ^e	79	29	86	0	29	79
	After (2015)	Lincomycin Spectinomycin	16 (32)	6	0	100	100	100	100	100	88 ^f	81 ^f	100 ^f	38 ^f	100 ^f	0	38	88
Pooled feces of broilers	Before (2014)	Ceftiofur	20 (40)	15	0	100	100	100	100	100	45	25 ^e	85	65 ^e	85	10	25	85
	After (2015)	Ceftiofur cessation	14(28)	7	0	100	100	100	100	100	71	50	71 ^e	7 ^f	86	0	7 ^e	50 ^e
	After (2015)	Lincomycin Spectinomycin	16(32)	13	0	100	100	100	100	94	69	69 ^f	100 ^f	75 ^e	100	0	44 ^f	94 ^f
Pooled feces of breeders	Before (2014)	Ceftiofur in 2014	22 (44)	0	0	95	95	100	100	95	41	36	82	14	50	9	32	82
	Before (2015)	Ceftiofur in 2015	24 (48)	4	4	96	100	100	100	96	50	38	75	17	58	4	25	71

^a Tested by Kirby Bauer disk diffusion susceptibility test

^b Category of antimicrobial importance for humans: (I) Very High Importance; (II) High Importance; (III) Moderate Importance

^c Antimicrobial class: (FLQ) Fluoroquinolones; (PEN/I) Penicillins+ β Lactamases inhibitors; (CPS) Cephalosporines; (PEN) Penicillins; (CPM) Cephamycins; (AMG) Aminoglycosides; (FOL) Folate inhibitors; (MACRO) Macrolids; (PHE) Phenicol; (TET) Tetracyclines

^d Antimicrobials: (NA) Nalidixic acid; (CIP) Ciprofloxacin; (AMC) Amoxicillin/clavulanic acid; (TIO) Ceftiofur; (CRO) Ceftriaxone; (AMP) Ampicillin; (FOX) Cefoxitin; (GEN) Gentamicin; (SPT) Spectinomycin; (STR) Streptomycin; (SXT) Trimethoprim-sulfamethoxazole; (SSS) Sulfisoxazole; (AZM) Azithromycin; (CHL) Chloramphenicol; (TET) Tetracycline

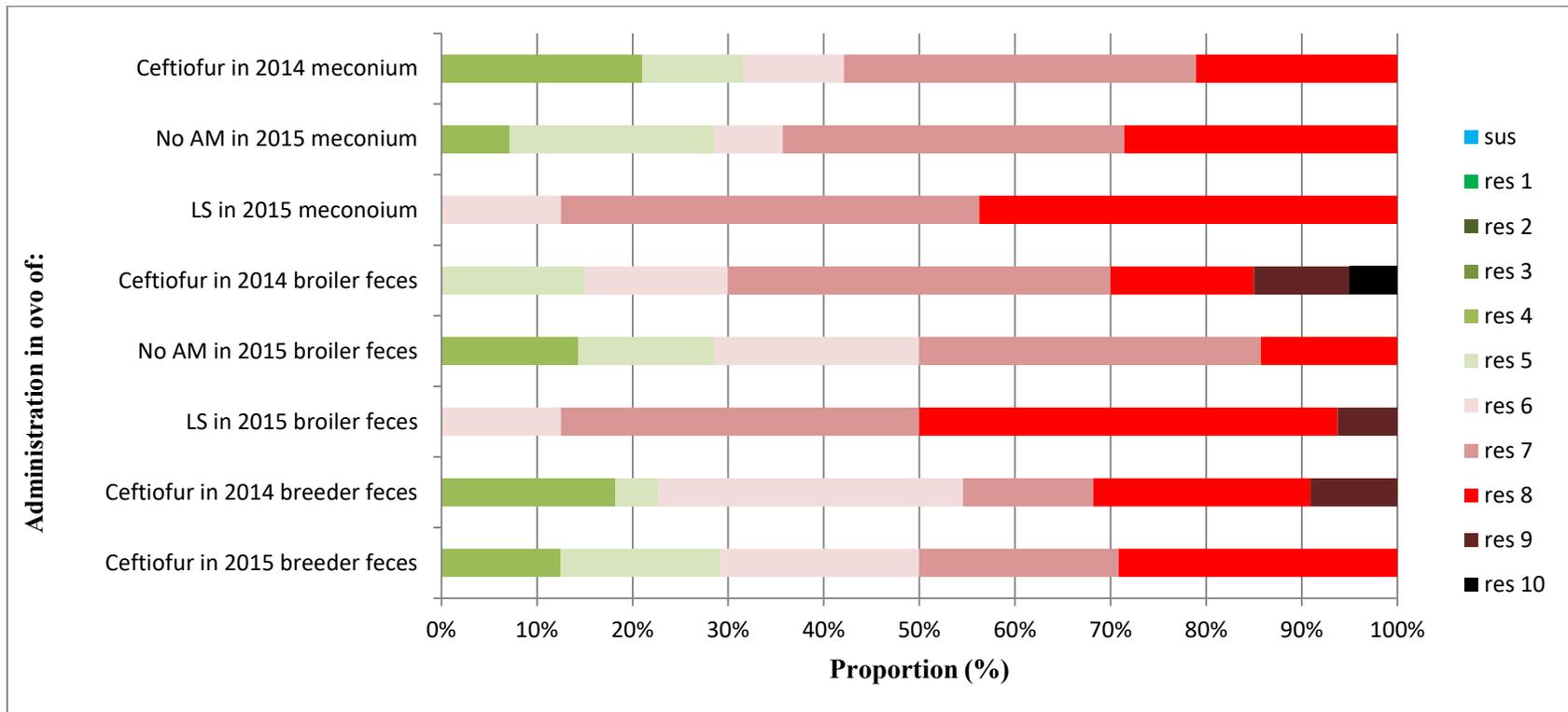
^{ef} Letters e and f in superscript in the same column and sample origin indicate significantly different results

Table 4. Effect of ceftiofur cessation and the substitution with lincomycin-spectinomycin on the proportion of antimicrobial phenotypic cross-resistance profiles in samples from newly hatched, broiler and breeder birds with *E. coli* of the ceftriaxone enriched collection

No of resistance	Phenotypic combinations	Administration <i>in ovo</i> of:							
		Ceftiofur			No antimicrobial			Lincomycin spectinomycin	
		2014		2015	2015		2015		
		Breeder (n=22)	Meconium (n=22)	Broiler feces(n=22)	Breeder (n=24)	Meconium (n=14)	Broiler feces(n=14)	Meconium (n=16)	Broiler feces(n=16)
5	AMC TIO CRO AMP FOX	4	4		3	1	2		
6	AMC TIO CRO AM FOX SSS		1			2	2		
	Other combinations ^a		1	1	3				
7	AMC TIO CRO AMP FOX STR TET	7	1	1	3	1			
	Other combinations	1	1	2		1			
8	AMC TIO CRO AMP FOX STR SSS TET	1	1						
	Other combinations			1	3		1	1	2
9	AMC TIO CRO AMP FOX STR SXT SSS TET		1	4	2	1		2	
	Other combinations			5	1	2	2	1	
10	AMC TIO CRO AMP FOX GEN STR CHL SSS TET		1			1	1		
	AMC TIO CRO AMP FOX GEN STR SSS TET SPT	2	5		3	2	4	3	2
	Other combinations		1	1	1		1		3
11	AMC TIO CRO AMP FOX GEN STR CHL SSS TET SPT	3	2		4			4	2
	AMC TIO CRO AMP FOX GEN STR SXT SSS TET SPT							2	2
	Other combinations	2		1			1	1	1
12	AMC TIO CRO AMP FOX GEN STR SXT CHL SSS TET SPT			1	1	3		2	4
	Other combinations	2		1					
13-14	Other combinations			2					

^aOther combinations are combinations which did not repeat or are less common

Figure 1 : Effect of cessation of *in ovo* administration of ceftiofur and replacement with lincomycin-spectinomycin on the proportion of multidrug resistance in ESBL/AmpC resistance gene positive *E. coli* isolates in ceftriaxone-enriched samples from newly hatched, broiler and breeder birds



LS: Lincomycin spectinomycin; No AM: no antimicrobial *in ovo*; sus: susceptible to all antimicrobial classes; res1-res10: resistance to one up to ten different antimicrobial classes

2014 is before and 2015 is after the cessation of ceftiofur in Canada

Supplemental material

Table 1S: Supplemental data: list of primers and control strains used in the PCR

Antimicrobial resistance factor	Gene	Primer	Amplicon size (bp)	Control strain	Reference
SHV-UP SHV-LO	<i>bla_{SHV}</i>	for CGCCGGGTTATTCTTATTTGTCGC rev TCTTTCCGATGCCGCCGCCAGTCA	1016	PMON38	(161, 162)
TEM-G TEM-H	<i>bla_{TEM}</i>	for TTGCTCACCCAGAAACGCTGGTG rev TACGATACGGGAGGGCTTACC	708	ECL3482 or CTX-M15	(161, 162)
CTX-U1 CTX-U2	<i>bla_{CTX-M}</i>	for ATGTGCAGYACCAGTAARGTKATGGC rev TGGGTRAARTARGTSACCAGAAYCAGCGG	593	CTX-M15	(161, 162)
OXA1-F OXA1-R	<i>bla_{OXA}</i>	for CGCAAATGGCACCAGATTCAAC rev TCCTGCACCAGTTTTCCCATACAG	464	CTX-M15	(161, 162)
CMY2-A CMY2-B	<i>bla_{CMY}</i>	for TGATGCAGGAGCAGGCTATTCC rev CTAACGTCATCGGGGATCTGC	323	ECL3482	(161, 162)
uidA for uidA rev	<i>uidA</i>	for CCAAAAGCCAGACAGAGT rev GCACAGCACATCAAAGAG	623	ECL7805	(32)

Table 2S: Supplemental data: list of antimicrobial disks used for Kirby Bauer assays

Antimicrobial disks	Concentration (μg)
Amoxicillin/Clavulanic acid	30
Ampicillin	10
Azithromycin	15
Cefoxitin	30
Ceftiofur	30
Ceftriaxone	30
Chloramphenicol	30
Ciprofloxacin	5
Gentamicin	10
Nalidixic acid	30
Spectinomycin	100
Streptomycin	10
Sulfisoxazole	250
Tetracycline	30
Trimethoprim-sulfamethoxazole	23,75

Table S3. Proportion of *E. coli* isolates positives to *bla*_{SHV} before and after cessation of *in ovo* administration of ceftiofur and with the substitution with lincomycin-spectinomycin in indicator and ceftriaxone-enriched collection from newly hatched, broiler and breeder birds with

Sample origin	Before or after ceftiofur cessation in broiler	<i>In ovo</i> administration of:	No of isolates tested in indicator collection	No of isolates positive for <i>bla</i> _{SHV}	No of isolates tested in ceftriaxone-enriched collection	No isolates positive for <i>Bla</i> _{SHV}
Meconium of newly hatched chicks	Before (2014)	Ceftiofur	96	0	57	0
	After (2015)	Nothing	69	0	40	0
	After (2015)	Lincomycin Spectinomycin	80	0	47	0
Pooled feces of broilers	Before (2014)	Ceftiofur	100	2	60	0
	After (2015)	Nothing	70	0	42	0
	After (2015)	Lincomycin Spectinomycin	79	0	48	1
Pooled feces of breeders	Before (2014)	Ceftiofur	109	1	66	0
	Before (2015)	Ceftiofur	119	0	72	1

Supplemental material references

161. Sary K. Les *Escherichia coli* pathogènes extra-intestinaux (ExPEC) et la résistance aux antimicrobiens des carcasses de poulets au détail au Vietnam : Master's thesis, Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Montréal, Saint-Hyacinthe, Canada. 2016 [Available from: <https://papyrus.bib.umontreal.ca/xmlui/handle/1866/13369>].
162. Mulvey MR, Grant JM, Plewes K, Roscoe D, Boyd DA. New Delhi metallo-beta-lactamase in *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*, Canada. *Emerging infectious diseases*. 2011; 17(1):103-6.
32. McDaniels AE, Rice EW, Reyes AL, Johnson CH, Haugland RA, Stelma GN, Jr. Confirmational identification of *Escherichia coli*, a comparison of genotypic and phenotypic assays for glutamate decarboxylase and beta-D-glucuronidase. *Applied and environmental microbiology*. 1996;62(9):3350-4.

Discussion

Suite à l'arrêt de l'utilisation du ceftiofur *in ovo* au couvoir, notre étude a clairement démontré une diminution de la proportion d'échantillons positifs pour des isolats producteurs d'ESBL/AmpC dans la collection d'isolats indicateurs. Les gènes testés et impliqués dans cette baisse sont le *bla_{CMY-2}* et le *bla_{CTX-M}*, particulièrement au niveau des méconiums des poussins fraîchement éclos. Cette observation démontre l'effet bénéfique de l'arrêt de l'utilisation de ceftiofur chez les poulets de chair et renforce les résultats obtenus dans d'autres études où la proportion de gènes de résistance aux céphalosporines chez les *E. coli* avait diminué (5, 9, 13). Néanmoins, nous n'avons pas observé cet effet lorsque l'on compare les résultats des poussins avec ceux des poulets de chair en fin d'élevage, comme déjà rapporté dans une autre étude, où les poulets de chair traités avec du ceftiofur *in ovo* avaient des pourcentages d'isolats d'*E. coli* résistants significativement plus élevés. Cependant, l'une des limites de cette étude est l'absence de connaissances sur l'administration de ceftiofur chez les reproducteurs. Aussi, l'étude comparait des tranches d'âge différentes de notre étude (25). De plus, le remplacement du ceftiofur par la lincomycine-spectinomycine n'a pas eu d'impact significatif sur la présence de *bla_{CMY-2}* ou *bla_{CTX-M}* dans la collection indicatrice comparativement aux troupeaux n'ayant reçu aucun antimicrobien *in ovo*, ce qui renforce l'idée que ces gènes sont surtout sélectionnés lors de l'utilisation de ceftiofur.

La deuxième collection avec l'enrichissement au ceftriaxone a été réalisée puisque cette technique est plus sensible pour détecter et isoler des *E. coli* résistants aux céphalosporines de 3^e génération. Contrairement aux résultats obtenus avec la collection indicatrice, la proportion de résistance parmi les échantillons de la collection avec l'enrichissement au ceftriaxone est demeurée très haute, presque 100% peu importe la phase de production. Cette proportion élevée, principalement due au gène *bla_{CMY-2}*, était présente avant l'arrêt du ceftiofur, mais n'était pas affectée par son arrêt, du moins un an après que l'utilisation de ceftiofur au couvoir ait cessé. Ce n'est pas la première fois qu'un pourcentage aussi haut est observé lors d'enrichissement au ceftriaxone (10, 25), mais un pourcentage toujours à 100% un an après l'arrêt dans toutes les phases d'élevage est élevé comparativement à certaines études européennes qui varie de 23 à 93% de prévalence chez les reproducteurs et 0 à 70% chez les poulets de chair en 2009 (10, 120).

Nous avons aussi observé plusieurs *E. coli* positifs pour *bla*_{CTX-M} dans toutes les phases de la pyramide avicole testées, suggérant que ce gène est plus prévalent dans les troupeaux de chair canadiens que précédemment rapporté (7). Nos résultats suite à l'enrichissement au ceftriaxone démontrent donc que les gènes de résistance aux céphalosporines sont toujours présents parmi la flore microbienne (les gènes demeurent dans les troupeaux malgré l'absence apparente d'une pression de sélection positive dans la collection enrichie au ceftriaxone), mais que leur prévalence était probablement plus faible chez les troupeaux suivant l'arrêt du ceftiofur *in ovo* au couvoir comme démontré dans la collection indicatrice. Cette différence entre les deux collections démontre la pertinence de réaliser plusieurs méthodes d'isolement avec les mêmes échantillons afin d'avoir une meilleure vue d'ensemble de la variabilité de la flore bactérienne. La plus faible proportion de *bla*_{CTX-M} par rapport à *bla*_{CMY-2} dans notre étude est à l'inverse de plusieurs études européennes (6) et pourrait être due à la présence de différents plasmides dominants en Europe qui contiendraient *bla*_{CTX-M}, comme les types IncN, IncI, IncL/M et IncK (8). Néanmoins, de nouvelles études en Europe démontrent aussi une proportion plus élevée de *bla*_{CMY-2} (158). La possibilité d'une répartition géographique à travers le monde de ces différentes résistances est connue, *bla*_{CTX-M} étant plus fréquent en Europe et dans certaines régions d'Asie (6, 25, 113, 114) alors que *bla*_{CMY-2} est plus fréquent en Amérique du Nord (8, 88). L'utilisation de différents antimicrobiens ou suppléments dans la diète dans chaque région ou simplement la distribution de ces gènes pourraient être en cause.

Bien que l'administration *in ovo* de ceftiofur a cessé en 2014 au Canada et que son usage hors étiquette a été banni aux États-Unis par le *Food and Drug Administration* en 2012, son utilisation par injection sous-cutanée à des poussins de un jour d'âge a été arrêtée chez les troupeaux reproducteurs canadiens en provenance des États-Unis seulement en 2015, soit après que l'échantillonnage de cette étude a été complété. Comme tous les poulets reproducteurs de type chair élevés au Canada proviennent de couvoirs américains, ceux-ci ont fort probablement été injectés par voie sous-cutanée avec du ceftiofur. Donc, une transmission verticale des gènes codant pour des ESBL/AmpC pourrait avoir eu lieu (25, 105, 106, 131). Ces résultats sont similaires à ceux obtenus au Danemark, où des troupeaux parents reproducteurs n'ayant pas reçu de ceftiofur étaient pourtant à 93% positifs pour des *E. coli*

résistants aux céphalosporines (avec la majorité d'entre eux possédant le gène *bla_{CMY-2}*), alors que les grands-parents avaient reçus du ceftiofur (120). Les poussins nouvellement éclos possèdent une population d'*E. coli* similaire à celle de leurs parents reproducteurs. La transmission verticale au niveau de certains APEC est déjà bien documentée (3) et a été démontrée à plusieurs reprises, notamment avec des cas récents en Europe du Nord d'APEC ST117 O78:H4 provenant de troupeaux de grands-parents s'étant répandus dans plusieurs autres pays (77). Nilsson et al. ont démontré aussi une transmission verticale d'*E. coli* possédant le gène *bla_{CMY-2}* de troupeaux de grands-parents exposés au ceftiofur, à leurs troupeaux de parents et de poulets de chair n'ayant jamais reçu de ceftiofur (105). Zurfluh et al. ont démontré des résultats semblables avec des *E. coli* possédant le gène *bla_{CMY-2}* transmis verticalement de troupeaux de parents reproducteurs aux couvoirs puis lors de l'élevage des poulets de chair (106). Projahn et al. ont observé dans leur étude que la transmission verticale d'*E. coli* avec ESBL/AmpC pourrait se produire de façon directe et indirecte dans les couvoirs (131). La transmission horizontale, quant à elle, a aussi été rapportée pour des souches possédant des gènes codant pour des ESBL/AmpC et ces résistances peuvent être transmises horizontalement à l'aide de plasmides (132). Donc, l'administration de ceftiofur à 1 jour d'âge pour les troupeaux de parents en provenance des États-Unis pourrait avoir provoqué l'augmentation de la proportion des résistances aux céphalosporines de 3^e génération chez leur progéniture, les poulets de chair canadiens, et ce, malgré le fait que le ceftiofur ne soit plus utilisé dans les couvoirs canadiens. Le retrait du ceftiofur aux États-Unis pourrait potentiellement diminuer la proportion d'échantillons positifs chez les troupeaux de poulets de chair au Canada. En effet, dans la même étude au Danemark, une diminution de prévalence à 27% des échantillons positifs pour des *E. coli* résistants aux céphalosporines chez les poulets de chair provenant des troupeaux de parent n'ayant pas reçu de ceftiofur a été observée entre 2010 et 2011 (120). Il serait intéressant de faire la même étude maintenant que les troupeaux de parents en provenance des États-Unis ne reçoivent plus de ceftiofur depuis 2015 afin d'évaluer si une diminution aussi importante serait observée dans les troupeaux canadiens, tant au niveau des reproducteurs que des poulets de chair. Plus de tests sont nécessaires pour démontrer si les *E. coli* positifs pour *bla_{CMY-2}* chez les reproducteurs sont associés à ceux retrouvés chez leurs poulets de chair, notamment par MLST ou par le séquençage du génome complet de ces souches. Finalement, le maintien d'une proportion élevée d'échantillons

positifs pour ces résistances pourrait être expliqué par des facteurs environnementaux (25). En effet, la contamination de l'environnement par des souches résistantes, seulement un an après le retrait de l'usage de ceftiofur au couvoir, peut expliquer pourquoi cette proportion est aussi haute parmi les troupeaux de poulets de chair canadiens, la contamination de l'environnement pouvant persister après que les oiseaux cessent l'excrétion d'*E. coli* possédant ces résistances (158). Des études ont déjà démontré que ces gènes peuvent persister dans l'environnement pendant plusieurs mois malgré l'absence d'excrétion de leurs hôtes par les fientes. La poussière et la litière peuvent aussi contenir ces souches sur une longue période (110). De plus, d'autres études ont rapporté qu'un nettoyage et une désinfection insuffisants entre les troupeaux de poulets de chair pouvaient provoquer une haute incidence d'ESBL/AmpC chez les prochains troupeaux de poulets de chair. Le grand nombre d'animaux et leur forte densité dans les poulaillers pourraient aussi contribuer à cette transmission au sein des troupeaux (113).

Dans cette étude, les patrons de multirésistance antimicrobienne ont été déterminés à l'aide d'antibiogramme (Kirby Bauer) seulement pour la collection enrichie au ceftriaxone pour augmenter la détection des isolats MDR et de possible XDR. Presque tous les isolats étaient positifs pour soit *bla*_{CMY-2} ou *bla*_{CTX-M} (celui négatif était positif pour *bla*_{SHV} et *bla*_{TEM}), étant donc tous des MDR dans cette collection selon la définition par Magiorakos et al. (135). Il aurait été fort intéressant de réaliser ce test dans la collection d'isolats indicateurs. La proportion des souches MDR et XDR pourraient possiblement être différente chez les *E. coli* génériques selon l'utilisation de ceftiofur, de lincomycine-spectinomycine ou lorsqu'aucun antimicrobien n'est utilisé *in ovo*.

L'augmentation de proportion de non-sensibilité des *E. coli* aux classes des aminoglycosides, des phénicolis, des tétracyclines et des inhibiteurs de folate en 2015 pour les poulets de chair ayant reçu la lincomycine-spectinomycine supporte que cette utilisation résulte en une augmentation du nombre de non-sensibilité des *E. coli* MDR et résistants aux céphalosporines. Tous les échantillons des troupeaux ayant reçus la lincomycine-spectinomycine n'étaient pas sensibles à moins de 6 différentes classes d'antimicrobiens comparativement aux autres qui pouvaient en avoir que 4 différentes. Il est donc évident que les troupeaux ayant reçus de la lincomycine-spectinomycine démontrent toujours d'autres résistances que seulement aux β -

lactamines. Ces résultats suggèrent la possibilité d'un phénomène de co-sélection lorsque la lincomycine-spectinomycine est utilisée, ce qui expliquerait la proportion élevée de MDR dans ce groupe. De plus, l'augmentation dans la proportion des gènes *bla*_{TEM} et *bla*_{CTX-M} dans le groupe ayant reçu la lincomycine-spectinomycine pourrait aussi s'expliquer par un phénomène de co-sélection accru lorsque cet antimicrobien est utilisé au couvoir. Il serait intéressant d'observer si ce phénomène de co-sélection est aussi présent dans la collection d'isolats indicateurs. Tout comme dans la collection suite à l'enrichissement avec du ceftriaxone, il serait possible que les troupeaux avec lincomycine-spectinomycine aient plus d'isolats MDR. Cependant, la co-sélection ne pourrait être prouvée qu'à la suite de test plus poussés, comme l'identification et le séquençage des plasmides responsables ou séquençage à haut débit pour vérifier si physiquement plusieurs gènes de résistance aux antimicrobiens sont présents chez les souches.

En outre, la non-sensibilité à la spectinomycine était toujours associée à d'autres résistances que les β -lactamines telles que la gentamicine, la streptomycine, le sulfisoxazole, le triméthoprime-sulphaméthoxazole, le chloramphénicol et la tétracycline. Cette co-sélection pourrait être due à la présence d'un plasmide ou d'éléments transférables (intégrons, transposons, séquences d'insertion) qui contiendraient *bla*_{CMY-2} et d'autres gènes de résistance en plus de celui codant pour la spectinomycine. Dans une étude sur des cas cliniques d'isolats d'*E. coli* présentant des signes de colibacillose chez les poulets de chair au Canada, Chalmers et al. (7) ont démontré que l'utilisation de la spectinomycine pourrait augmenter la co-sélection bactérienne (contrairement à notre étude où les échantillons provenaient de l'environnement d'oiseaux en santé). En effet, les gènes de résistance à la spectinomycine (*aac(3)-VI*) et à la gentamicine (*aadA*), un antimicrobien qui n'est plus utilisé de façon routinière au Canada, étaient fortement associés et localisés sur un intégron de classe 1. Cet intégron de classe 1 a été trouvé auprès de différents types de plasmides, notamment des plasmides de type IncA/C, déjà associés à des phénomènes de multirésistances dans d'autres études (39, 158). Ces auteurs ont aussi démontré que l'utilisation de la lincomycine-spectinomycine ne semblait pas sélectionner des *E. coli* résistants aux céphalosporines ou des APEC. Les gènes *aac(3)-VI* et *bla*_{CMY-2} étaient négativement associés, mais, lorsque présents ensemble dans une souche, étaient généralement localisés sur le même plasmide (7). Nos

résultats concordent avec cette étude, puisque tous les troupeaux dans toutes les phases de production testées ont démontré de la co-résistance. Lorsque la non-sensibilité à 10 antimicrobiens et plus était présente, les résistances à la spectinomycine et à la gentamicine étaient presque toujours présentes conjointement comme dans l'article mentionné ci-haut (7). De plus, chez les troupeaux ayant reçu la lincomycine-spectinomycine au couvoir, la non-sensibilité observée était plus élevée pour un minimum de 8 sur les 15 antimicrobiens testés (Table 4). Une augmentation des bactéries présentant de la co-sélection et plus d'isolats MDR serait donc à prévoir avec l'utilisation de la lincomycine-spectinomycine et pourrait permettre l'émergence d'une flore bactérienne qui contiendrait plus de MDR et possiblement de XDR. Des tests semblables à ceux réalisés par Chalmers et al. pourraient être réalisés pour mieux caractériser les plasmides ou les intégrons impliqués dans notre étude (7).

Dans une étude chez des porcs canadiens avec des *E. coli* MDR possédant *bla*_{CMY-2} ou *bla*_{CTX-M}, Jahanbakhsh et al. ont démontré la présence d'un intégron de classe 1 qui était significativement associé avec la résistance à la gentamicine, la kanamycine, la streptomycine, le triméthoprime-sulphaméthoxazole, le sulfisoxazole, le chloramphénicol et la tétracycline (la résistance à la spectinomycine n'était pas testée dans cette étude). Son étude a aussi démontré la présence d'un plasmide de type IncA/C qui était positivement associé à la résistance de ces 7 antimicrobiens et de cet intégron, mais aussi à des *E. coli* avec au moins une résistance à 1 antimicrobien de 8 différentes classes et à la présence de *bla*_{TEM}. De plus, d'autres types de plasmide comme IncFIB étaient positivement associés au plasmide IncA/C alors que d'autres types comme IncI avaient une association négative avec ceux-ci (11). La présence d'un plasmide avec des propriétés semblables à celui retrouvé chez le porc pourrait expliquer pourquoi des bactéries MDR ont été sélectionnées lors de l'utilisation de lincomycine-spectinomycine au couvoir dans notre étude. Plusieurs études, notamment au Japon et en Europe, ont démontré un plasmide de type IncA/C contenant *bla*_{CMY-2} et des résistances à des classes non β -lactamines (39, 158). Les plasmides sélectionnés pourraient avoir *bla*_{CMY-2} et les autres gènes de résistance. Une deuxième possibilité serait que certaines lignées clonales aient un premier plasmide contenant *bla*_{CMY-2} seulement présent de façon concomitante avec un deuxième plasmide conférant des résistances à des antimicrobiens autres que des β -lactamines (association entre les plasmides). Plusieurs groupes d'incompatibilité, comme les types IncI γ ,

IncB/O, IncFIB, IncFIC and IncI1, ont déjà été rapportés pour contenir *bla*_{CMY-2} sans posséder des résistances à d'autres classes d'antimicrobiens non β -lactamines (11, 39). Les transmissions horizontales et verticales de *bla*_{CMY-2} chez la volaille ayant déjà été étudiées, des tests supplémentaires seront nécessaires pour évaluer si une transmission verticale s'est produite parmi les échantillons de notre étude (120).

Pour les troupeaux n'ayant pas reçus d'antimicrobiens *in ovo* au couvoir, la non-sensibilité au triméthoprime-sulphaméthoxazole a diminué au niveau des fientes de poulets de chair, ce qui suggère qu'il y aurait potentiellement un effet positif lorsque l'utilisation du ceftiofur est arrêté au couvoir. Cette diminution, lorsqu'aucun antimicrobien n'est utilisé au couvoir, pourrait s'expliquer par une absence de sélection positive pour certains plasmides qui contiendraient *bla*_{CMY-2} et d'autres gènes de résistance (158). De plus, la non-sensibilité aux classes des phénicolés et des tétracyclines était la plus basse lorsqu'aucun antimicrobien n'était utilisé au couvoir et, bien que non significatif, démontre aussi l'effet bénéfique sur la proportion des MDR. Néanmoins, aucune différence statistique n'a été observée pour les méconiums et les fientes de poulets de chair entre les troupeaux recevant du ceftiofur ou aucun antimicrobien *in ovo* au couvoir au niveau de la non-sensibilité de toutes les classes d'antimicrobiens non β -lactamines testées (excepté dans les inhibiteurs de folate où ce n'était pas le cas pour le triméthoprime-sulphaméthoxazole), ce qui démontre que les résistances à ces classes d'antimicrobiens sont surtout influencées par l'utilisation de lincomycine-spectinomycine. Cependant, les antimicrobiens utilisés durant l'élevage peuvent aussi avoir influencés cette variation de résistances antimicrobiennes. Toutefois, si les troupeaux de poulets de chair n'ayant pas reçu d'antimicrobiens au couvoir ont moins de résistance à certains antimicrobiens (comme au triméthoprime-sulphaméthoxazole), arrêter toute administration d'antimicrobiens au couvoir pourrait mener éventuellement à de meilleurs réponses cliniques aux antimicrobiens lors de traitements curatifs. L'industrie avicole canadienne prend d'ailleurs les devants puisqu'en janvier 2019, elle prévoit l'arrêt des antimicrobiens de catégorie 2 utilisés de façon préventive chez les poulets de chair (Boulianne M., Université de Montréal, communication personnelle). Une diminution encore plus prononcée de la résistance serait donc possible dans le futur.

Des troupeaux reproducteurs à leur progéniture, pour ceux ayant reçus la lincomycine-spectinomycine, il y a eu en général une augmentation de non-sensibilité aux aminoglycosides et aux inhibiteurs des folates pour les poulets de chair par rapport à ce qui a été observé chez les parents. Cette augmentation de non-sensibilité des inhibiteurs des folates était aussi présente chez les poulets de chair ayant reçu le ceftiofur *in ovo* par rapport à leurs parents. Aucune augmentation de la non-sensibilité des parents aux troupeaux de poulets de chair sans antimicrobien au couvoir n'avait été observée. Ces résultats démontrent encore l'effet bénéfique de n'utiliser aucun antimicrobien au couvoir. En effet, la non-sensibilité des poulets de chair sans antimicrobien *in ovo* n'a pas augmenté pas par rapport à leurs parents. De plus, alors que la non-sensibilité des méconiums à la streptomycine, au triméthoprime-sulphaméthoxazole, à la tétracycline et au chloramphénicol était plus haute chez les troupeaux sans antimicrobien *in ovo* que ceux ayant reçu du ceftiofur au couvoir, les profils de non-sensibilité semblent s'inverser au niveau des fientes de poulets de chair, où ils étaient tous plus hauts chez les troupeaux ayant reçu de ceftiofur à ce niveau (différences non significatives). Ce changement pourrait être dû à des résistances acquises au couvoir, l'environnement pouvant être contaminé par les troupeaux qui recevaient la lincomycine-spectinomycine en 2015 (le même couvoir dans l'étude produisait dans la même période de temps des poussins avec lincomycine-spectinomycine et des poussins sans antimicrobien *in ovo*) et les poussins naissants étant plus réceptifs à la colonisation de leur tractus digestif (25). Par la suite, ayant eu moins de pression de sélection par l'administration d'antimicrobiens tel que la lincomycine-spectinomycine, cette non-sensibilité chez les poulets de chair sans antimicrobien *in ovo* pourrait avoir diminué pendant l'élevage.

Nous n'avons observé que très peu de non-sensibilité aux classes des fluoroquinolones (acide nalidixique et ciprofloxacine) et des macrolides (azithromycine) chez les isolats d'*E. coli* obtenus après l'enrichissement au ceftriaxone. Ces résultats étaient attendus puisque ces classes d'agents antimicrobiens ne sont pas approuvées pour utilisation chez la volaille au Canada durant les années de notre étude, où d'autres antimicrobiens (comme ceftiofur, bacitracine, virginiamycine, avilamycine, lincomycine-spectinomycine) ont été plus utilisés (4). De plus, l'enrichissement au ceftriaxone n'est pas une méthode sélective pour détecter des résistances aux macrolides et aux fluoroquinolones (159, 160). Néanmoins, ces résistances ont

été détectées pour ces 2 classes d'antimicrobiens au niveau de toutes les phases de production (reproducteurs, méconiums et poulets de chair) dans quelques troupeaux. Il sera important de poursuivre la surveillance de ces résistances chez la volaille, ces antimicrobiens étant de très grande importance pour les traitements en médecine humaine.

En plus de *bla*_{CTX-M} et *bla*_{CMY-2}, trois autres gènes d'ESBL ont été testés par PCR. Ne pas avoir détecté *bla*_{OXA-1} était un résultat attendu, ce gène n'étant que très peu rapportés au Canada (11, 163). Ce type d'ESBL est très préoccupant puisqu'il n'est pas inhibé par les inhibiteurs de β -lactamase comme les ESBL plus classiques (*bla*_{CTX-M}, *bla*_{SHV} et *bla*_{TEM}) et qu'il confère de la résistance aux céphalosporines de 4^e génération, qui sont utilisés en dernier recours en médecine humaine (112). Réaliser la détection d'un tel gène est important par rapport à son importance pour la santé publique.

Le gène *bla*_{TEM} a été détecté dans toutes les phases et toutes les périodes de l'étude. Ce gène confère des résistances à différentes β -lactamines tels que la pénicilline et l'ampicilline, mais ne confère pas de résistances aux inhibiteurs de β -lactamase, à la céphamycine ou rarement aux céphalosporines de 3^e génération chez quelques variantes. Tout comme *bla*_{OXA-1}, cette trouvaille concorde avec ce qui est rapporté dans la littérature au Canada (7, 112, 164). Certains troupeaux reproducteurs ont reçu des traitements antimicrobiens et antiparasitaires durant l'élevage tels que de la pénicilline et du fenbendazole. Une des limites de l'étude actuelle est que nous ne connaissons pas les traitements antimicrobiens reçus chez les poulets de chair autres que les traitements administrés au couvoir. Néanmoins, l'utilisation de pénicilline chez les reproducteurs et possiblement chez les poulets de chair pourrait expliquer pourquoi *bla*_{TEM} est aussi présent parmi les troupeaux échantillonnés. Cette hypothèse pourrait expliquer la différence statistique ($p < 0,02$) présente lorsque l'on compare la proportion d'échantillon positif pour *bla*_{TEM} dans la collection d'isolats indicateurs (57%) comparativement à la collection avec l'enrichissement au ceftriaxone (43%). En effet, l'enrichissement au ceftriaxone est une méthode spécifique et sensible pour détecter un sous-groupe d'isolats résistants aux céphalosporines de 3^e génération et non que les isolats résistants à l'ampicilline. Le microbiote en général (collection d'isolats indicateurs) pourrait avoir plus de résistance à l'ampicilline dû à *bla*_{TEM} que dû à *bla*_{CTX-M} ou *bla*_{CMY-2} à cause de

l'utilisation d'antimicrobien durant l'élevage, que ce soit l'utilisation de β -lactamines comme la pénicilline ou d'autres classes d'antimicrobien qui pourrait engendrer de la co-sélection antimicrobienne. La présence aussi importance de ce gène peut limiter les traitements faits durant l'élevage, causant des pertes économiques non négligeables (164).

Enfin, le gène *bla_{SHV}* a été détecté à différentes périodes avec une très faible proportion, comme déjà rapporté dans des troupeaux canadiens. (7, 165). Son spectre d'action est aussi étroit que *bla_{TEM}* chez certaines variantes ou possède un spectre étendu d'activité hydrolysante, y compris les monobactames et les carbapénèmes, aussi utilisés en dernier recours en médecine humaine (166). Bien que la proportion de ce gène soit très faible (Table S3), le seul isolat de la collection avec enrichissement au ceftriaxone qui était négatif pour *bla_{CTX-M}* et *bla_{CMY-2}* était positif pour ce gène. Ce gène étant fréquemment rapporté sur des plasmides avec des résistances à d'autres classes d'antimicrobien, l'importance clinique d'un tel isolat est aussi importante que les isolats multirésistants aux antimicrobiens présentant *bla_{CTX-M}* et *bla_{CMY-2}* (166).

Dans la revue de Liebana et al, les auteurs suggèrent cinq principales options pour tenter de diminuer globalement la prévalence des bactéries productrices d'ESBL/AmpC chez les animaux de production. **Premièrement**, arrêter ou du moins réduire l'utilisation de céphalosporines de dernières générations chez les animaux de production, ce qui est déjà en cours au Canada. **Deuxièmement**, l'administration de ces classes devrait être utilisée seulement par un vétérinaire qui suit la législation de son pays pour l'utilisation homologuée de ce médicament, ce qui est aussi le cas au Canada. **Troisièmement**, diminuer l'utilisation d'antimicrobiens en général. Plusieurs options s'offrent pour ce faire, soit d'implanter des systèmes de surveillance sur l'utilisation des antimicrobiens, de s'assurer de la transparence de l'administration en ferme (registre des prescriptions faites aux fermes), donner des traitements adaptés en utilisant adéquatement les tests diagnostiques pertinents, réaliser des formations continues aux principaux utilisateurs (vétérinaires et producteurs) et arrêter l'utilisation de prévention de masse à l'aide d'antimicrobiens (8) (comme le futur arrêt des antimicrobiens de catégorie 2 en 2019 chez la volaille). L'utilisation d'antimicrobiens chez les animaux destinés à l'alimentation varie beaucoup d'un pays à l'autre, et des lois abolissant leur utilisation est une

bonne étape comme l'interdiction en 2006 des promoteurs de croissance imposée par l'Union européenne ou l'arrêt de l'utilisation d'antimicrobiens de catégorie 1 au Canada en 2014 (14, 37). **Quatrièmement**, des mesures de contrôle contre la dissémination des souches résistantes devraient être réalisées. Pour ce faire, il serait possible d'instaurer des principes élevés de biosécurité à la ferme, de monitorer la transmission des souches ESBL/AmpC dans les industries pyramidales (en mettant l'accent sur les reproducteurs primaires) et d'augmenter l'hygiène de la chaîne de production alimentaire, différentes viandes pouvant être contaminé par ces souches (8, 70). **Cinquièmement**, un accent majeur devrait être porté sur l'utilisation d'antimicrobiens chez la volaille (étant l'industrie où l'on rapporte le plus de résistances antimicrobiennes), soit en mettant des restrictions particulières pour cette industrie (notamment en limitant le phénomène de co-sélection en agissant sur l'utilisation de tous les classes d'antimicrobien chez cette espèce), en implantant des mesures de contrôle limitant la contagion de bactéries productrices d'ESBL/AmpC du sommet de la pyramide et en augmentant la biosécurité des fermes entre les troupeaux pour empêcher la recirculation de ces résistances d'un troupeau aux suivants (8, 25). La persistance dans l'environnement et la recirculation locale ont déjà été démontrées auprès des isolats producteurs d'ESBL/AmpC chez la volaille pour une période de plus de 6 mois suite à l'arrêt de ceftiofur hors homologation (10). Persoons et al. ont déjà démontré plusieurs facteurs de risque pour le développement de telles résistances chez la volaille. Les facteurs de risques liés à la gestion des fermes, à la biosécurité, au couvoir, à la gestion des différents vecteurs possibles (oiseaux sauvages, humains, vermines, etc.) et la gestion du fumier devraient être évalués pour diminuer le risque d'éclosion et de propagation de telles résistances (96).

Plusieurs études ont aussi démontré un autre facteur d'importance qui peut influencer grandement la prévalence de ces souches. En effet, l'ajout de certains additifs alimentaires tels que la clinoptilolite minérale argileuse jouerait un rôle important dans la diversité clonale des souches d'*E. coli* possédant *bla*_{CMY-2} et d'autres résistances. En effet, la diversité polyclonale de ces souches et leur proportion ont diminué auprès d'un groupe ayant reçu la clinoptilolite minérale argileuse comparativement à un groupe contrôle, de même que les souches possédant des gènes de virulence ExPEC tels que *tsh* et *iucD* (167). D'un autre côté, certains autres additifs tels que le zinc pourraient avoir l'effet inverse en augmentant les multirésistances

(168). Des études sur différents additifs alimentaires pouvant influencer la sélection de résistances chez les souches d'*E. coli* et même de gènes de virulence ont déjà été réalisées (169-171). De nouvelles études pourraient être mises en place pour permettre dans le futur de diminuer les risques d'ExPEC multirésistants en utilisant des additifs adéquats et sans utiliser d'antimicrobiens.

Les ExPEC multirésistants sont reconnus comme un problème en soins hospitaliers car ils prolongent le temps d'hospitalisation dû à l'inefficacité des traitements et ils augmentent le taux de mortalité. Le développement d'alternatives aux antimicrobiens pour contrer ces risques de transmission demandent une compréhension adéquate de leur virulence, de leur risque de zoonose ainsi que des études épidémiologiques de ces différentes virulences et résistances tant chez l'humain que chez les animaux. Des vaccins pour contrôler ces infections seraient une solution qui permettrait de contrer des infections multirésistantes dans le futur (49). Ces vaccins pourraient aider au développement de substances bactéricides ou encore interagir avec les anticorps pour obtenir une réponse directement contre certains gènes de virulence spécifique, prévenant ainsi les infections dues à des ExPEC, sans perturber la flore intestinale commensale (47). Les ExPEC sont un groupe très diversifié et des nouvelles lignées d'ExPEC émergent continuellement, rendant un vaccin efficace universellement contre les ExPEC improbable. Par contre, l'identification de facteurs virulents d'importance majeure pour certains groupes d'ExPEC permettrait de sélectionner des cibles pour les vaccins. Une autre partie de la solution pour diminuer les risques de transmission d'ExPEC multirésistants à l'humain réside dans la compréhension de la dynamique de transmission de ces souches, non seulement entre les animaux réservoirs mais aussi à l'humain. Des études épidémiologiques sur le sujet doivent être réalisées pour identifier des facteurs qui permettraient de diminuer ces transmissions. Par exemple, la régie au niveau des abattoirs de poulet est une étape clé. Plusieurs mesures plus rigoureuses de salubrité des viandes pourraient être mises en place dans les abattoirs dans le but de diminuer la contamination par des *E. coli* sur la viande de poulet (37).

Des analyses plus poussées seront réalisées dans la suite de ce projet pour déterminer la cause exacte des phénomènes de co-résistance observés auprès des isolats de cette étude. Comme mentionné, les gènes *bla*_{CMY-2} et *bla*_{CTX-M} sont souvent localisés sur des plasmides. Les

plasmides impliqués seront identifiés, ainsi que les gènes additionnels de résistance qu'ils pourraient contenir. La découverte de plasmide de type IncA/C est à prévoir, ayant déjà été rapporté au Québec (12). Il serait aussi possible que deux plasmides soient présents, l'un contenant les gènes d'ESBL/AmpC et l'autre contenant d'autres résistances. Les types de plasmide contenant *bla*_{CMY-2}, des gènes de virulence et d'autres gènes de résistance pourront aussi être comparés aux gènes contenus dans les types de plasmide avec *bla*_{CTX-M} pour évaluer la raison pour laquelle les souches avec *bla*_{CTX-M} ont moins de résistance en général que les souches avec *bla*_{CMY-2}.

Les étapes suivantes de l'étude sont de vérifier auprès des troupeaux échantillonnés dans cette étude la présence d'*E. coli* multirésistants et potentiellement virulents dans une troisième collection bactérienne. Pour ce faire, d'autres échantillons qui n'ont pas été mentionnés dans l'article ont aussi été prélevés. Notamment, durant les cinq premiers jours d'élevage, un maximum de 6 poussins décédés avec des lésions macroscopiques concordant à l'omphalite ont été échantillonnés par troupeau. Les isolats provenant du sac vitellin des poussins avec l'omphalite serviront à créer une troisième collection bactérienne, nommée collection APEC. Pour cette collection, non seulement les gènes de résistance et les profils de résistance antimicrobienne seront testés, mais aussi les gènes de virulence associés, ce qui permettra de voir si l'arrêt du ceftiofur et son remplacement par la lincomycine-spectinomycine ont un impact sur les résistances des APEC. Il serait possible que des plasmides contiennent non seulement plusieurs gènes de résistance, mais aussi des gènes de virulence, la propagation de tels éléments génétiques mobiles pouvant rendre les traitements inefficaces au sein de l'industrie avicole, augmentant les coûts dus aux pertes d'efficacité de croissance et des traitements. Étant donné que certaines souches APEC ont été associées à des ExPEC humains, cette partie de la recherche sera très pertinente pour évaluer si les risques de toxi-infections alimentaires résistantes sont diminués avec l'arrêt du ceftiofur.

Finalement, une troisième phase du projet a eu lieu dans cette étude, où les troupeaux reproducteurs en 2015 ont reçu des additifs alimentaires. Ils ont été échantillonnés à nouveau ainsi que de nouveaux troupeaux de poulets de chair ayant reçus la lincomycine-spectinomycine. Le but de cette troisième phase de projet est donc de répéter les mêmes

comparaisons faites dans cette étude pour l'impact sur la multirésistance, mais aussi sur l'impact au niveau des souches virulentes avec une troisième collection APEC et, pour conclure, de pouvoir évaluer si l'ajout de cet additif alimentaire a un effet positif au niveau de la résistance ou de la virulence. Les plasmides et les isolats impliqués devront être analysés par différentes méthodes notamment par MLST, par électrophorèse sur gel en champ pulsé, par la détermination de leur phylogroupe et sérogrupe ou par le séquençage à haut débit, facilitant l'analyse d'autant d'isolats.

Conclusion

En conclusion, il y a une diminution de la proportion des *E. coli* possédant *bla*_{CMY-2} et *bla*_{CTX-M} après l'arrêt de l'utilisation du ceftiofur et lors du remplacement avec la lincomycine-spectinomycine. Aucune différence majeure n'a été observée dans les proportions de *bla*_{SHV}, *bla*_{OXA} et *bla*_{TEM}. Plusieurs études (5, 7, 9) ainsi que les rapports annuels du PICRA (155, 172) ont déjà rapporté une diminution de la proportion un an après l'arrêt chez les *E. coli* et les *Salmonella* lors de la réalisation de collection indicatrice. D'un autre côté, dans la collection avec l'enrichissement au ceftriaxone, 99% des échantillons possédaient des *E. coli* résistants aux céphalosporines de 3^e génération, démontrant que, au niveau des échantillons, il n'y a pas eu encore de réduction de la prévalence des *E. coli* producteurs d'ESBL/AmpC dans l'industrie avicole un an après le retrait du ceftiofur. Ces souches pouvant persister dans l'environnement pour une longue durée (110, 158), être transmises de façon verticale et horizontale (105, 106, 132) et d'autres études rapportant aussi une prévalence élevée à près de 100% (25), notamment chez des reproducteurs (10), il est difficile de prévoir combien de temps est nécessaire pour voir une diminution de la prévalence. À la lumière de nos résultats et de la situation actuelle, nous pouvons conclure qu'un an est probablement insuffisant pour voir une diminution. L'arrêt chez les troupeaux reproducteurs en 2015 en provenance des États-Unis pourrait possiblement diminuer cette proportion dans le futur. Il serait intéressant de refaire cet échantillonnage à présent que les troupeaux reproducteurs ne reçoivent plus de ceftiofur pour déterminer si une diminution plus importante de la prévalence de résistance est présente.

Finalement, les *E. coli* contenant des ESBL/AmpC chez les poussins naissants, les poulets de chair en élevage et leurs reproducteurs possédaient une très haute proportion de multirésistance à d'autres antimicrobiens que les β -lactamines, avec une augmentation de la proportion de possible XDR chez les troupeaux ayant reçu la lincomycine-spectinomycine, ce qui est une source d'inquiétude pour la santé publique. Avec l'augmentation des résistances antimicrobiennes à l'échelle mondiale, le potentiel de co-sélection de gènes de résistance et possiblement de gènes de virulence augmente. Cela peut représenter un problème important pour la gestion des maladies animales, mais cela peut également être particulièrement préoccupant pour la santé publique si l'utilisation d'antimicrobiens d'importance limitée pour la médecine humaine comme la spectinomycine co-sélectionne de la résistance aux

antimicrobiens de grande importance pour le traitement de maladies humaines tels que la gentamicine ou le ceftiofur. L'industrie avicole est aussi sur le point d'interdire l'utilisation en prévention d'antimicrobiens de catégorie 2 telle que la lincomycine-spectinomycine en 2019. Cette action pourrait permettre dans le futur de prévenir la sélection de souches multirésistantes chez la volaille et donc, sur leur viande qui est le vecteur principal vers le consommateur.

Finalement, ce projet était la première phase d'un plus grand projet qui évaluera non seulement la résistance antimicrobienne, mais aussi la virulence et les risques potentiels pour la santé publique. Ce projet essaiera de trouver des pistes de solutions pour diminuer ces risques en travaillant au niveau de l'alimentation des troupeaux reproducteurs directement. L'échantillonnage verticale de troupeaux à 3 moments différents dans les mêmes fermes au niveau des reproducteurs et de leurs poulets de chair associés à 3 différents moments pendant leur élevage est un processus laborieux, mais qui permettra d'évaluer la possibilité de transmission de souches virulentes et/ou résistantes dans la pyramide aviaire.

Références bibliographiques

1. Kemmett K, Williams NJ, Chaloner G, Humphrey S, Wigley P, Humphrey T. The contribution of systemic *Escherichia coli* infection to the early mortalities of commercial broiler chickens. *Avian pathology : journal of the WVPA*. 2014;43(1):37-42.
2. Hamdy AH, Kratzer DD, Paxton LM, Roberts BJ. Effect of a single injection of lincomycin, spectinomycin, and linco-spectin on early chick mortality caused by *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Avian diseases*. 1979;23(1):164-73.
3. Giovanardi D, Campagnari E, Ruffoni LS, Pesente P, Ortali G, Furlattini V. Avian pathogenic *Escherichia coli* transmission from broiler breeders to their progeny in an integrated poultry production chain. *Avian pathology : journal of the WVPA*. 2005;34(4):313-8.
4. Agunos A, Leger DF, Carson CA, Gow SP, Bosman A, Irwin RJ, et al. Antimicrobial use surveillance in broiler chicken flocks in Canada, 2013-2015. *PloS one*. 2017;12(6):e0179384.
5. Hiki M, Kawanishi M, Abo H, Kojima A, Koike R, Hamamoto S, et al. Decreased Resistance to Broad-Spectrum Cephalosporin in *Escherichia coli* from Healthy Broilers at Farms in Japan After Voluntary Withdrawal of Ceftiofur. *Foodborne pathogens and disease*. 2015;12(7):639-43.
6. 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. *Veterinary microbiology*. 2010;145(3-4):273-8.
7. Chalmers G, Cormier AC, Nadeau M, Cote 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 Quebec, Canada. *Veterinary microbiology*. 2017;203:149-57.
8. Liebana E, Carattoli A, Coque TM, Hasman H, Magiorakos AP, Mevius D, et al. Public health risks of enterobacterial isolates producing extended-spectrum beta-lactamases or AmpC beta-lactamases in food and food-producing animals: an EU perspective of epidemiology, analytical methods, risk factors, and control options. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2013;56(7):1030-7.
9. Dutil L, Irwin R, Finley R, Ng LK, Avery B, Boerlin P, et al. Ceftiofur resistance in *Salmonella enterica* serovar Heidelberg from chicken meat and humans, Canada. *Emerging infectious diseases*. 2010;16(1):48-54.
10. Dierikx CM, van der Goot JA, Smith HE, Kant A, Mevius DJ. Presence of ESBL/AmpC-producing *Escherichia coli* in the broiler production pyramid: a descriptive study. *PloS one*. 2013;8(11):e79005.
11. Jahanbakhsh S, Smith MG, Kohan-Ghadir HR, Letellier A, Abraham S, Trott DJ, et al. Dynamics of extended-spectrum cephalosporin resistance in pathogenic *Escherichia coli* isolated from diseased pigs in Quebec, Canada. *International journal of antimicrobial agents*. 2016;48(2):194-202.
12. Martin LC, Weir EK, Poppe C, Reid-Smith RJ, Boerlin P. Characterization of bla_{CMY-2} plasmids in *Salmonella* and *Escherichia coli* isolates from food animals in Canada. *Applied and environmental microbiology*. 2012;78(4):1285-7.
13. Caffrey N, Nekouei O, Gow S, Agunos A, Checkley S. Risk factors associated with the A2C resistance pattern among *E. coli* isolates from broiler flocks in Canada. *Preventive veterinary medicine*. 2017;148:115-20.

14. Gouvernement du Canada. PROGRAMME INTÉGRÉ CANADIEN DE SURVEILLANCE DE LA RÉSISTANCE AUX ANTIMICROBIENS (PICRA) 2016 [Available from: <https://www.canada.ca/fr/sante-publique/services/publications/medicaments-et-produits-sante/programme-integre-canadien-surveillance-resistance-antimicrobiens-bulletin.html?=&wbdisable=true>].
15. Kataoka Y, Murakami K, Torii Y, Kimura H, Maeda-Mitani E, Shigemura H, et al. Reduction in the prevalence of AmpC beta-lactamase CMY-2 in Salmonella from chicken meat following cessation of the use of ceftiofur in Japan. *Journal of global antimicrobial resistance*. 2017;10:10-1.
16. Chicken Farmers of Canada. The Antimicrobial Use Reduction Strategy 2018 [Available from: <https://www.chickenfarmers.ca/the-antimicrobial-use-reduction-strategy/>].
17. Tavárez MA, Solís de los Santos F. Impact of genetics and breeding on broiler production performance: a look into the past, present, and future of the industry. *Animal Frontiers*. 2016;6(4):Pages 37–41.
18. Hasan B, Faruque R, Drobni M, Waldenstrom J, Sadique A, Ahmed KU, et al. High prevalence of antibiotic resistance in pathogenic Escherichia coli from large- and small-scale poultry farms in Bangladesh. *Avian diseases*. 2011;55(4):689-92.
19. Pollock DL. A geneticist's perspective from within a broiler primary breeder company. *Poultry science*. 1999;78(3):414-8.
20. THIRUVENKADAN AK PR, PANNEERSELVAM S. Broiler breeding strategies over the decades: an overview. *World's Poultry Science Journal Cambridge University Press on behalf of World's Poultry Science Association*. 2011;67(2):309–36.
21. Zuidhof MJ, Schneider BL, Carney VL, Korver DR, Robinson FE. Growth, efficiency, and yield of commercial broilers from 1957, 1978, and 2005. *Poultry science*. 2014;93(12):2970-82.
22. Canadian Hatching Egg Producers. About CHEP 2011 [Available from: <http://chep-poic.ca/about.html>].
23. Conseil national pour les soins aux animaux d'élevage. Code pratique pour le soin et la manipulation des oeufs d'incubation, reproducteurs, poulets et dindons 2016 [Available from: http://www.nfacc.ca/pdfs/codes/poultry_code_FR.pdf].
24. Poultry research center, University of Alberta. Incubation and the Hatchery 2007 [plus précisément ce vidéo: <https://www.youtube.com/watch?v=6bVYBPHexrY>]. Available from: <https://poultry.ualberta.ca/about-us/videos/>.
25. Baron S, Jouy E, Larvor E, Eono F, Bougeard S, Kempf I. Impact of third-generation-cephalosporin administration in hatcheries on fecal Escherichia coli antimicrobial resistance in broilers and layers. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2014;58(9):5428-34.
26. Chen HD, Frankel G. Enteropathogenic Escherichia coli: unravelling pathogenesis. *FEMS microbiology reviews*. 2005;29(1):83-98.
27. Escobar-Paramo P, Grenet K, Le Menac'h A, Rode L, Salgado E, Amorin C, et al. Large-scale population structure of human commensal Escherichia coli isolates. *Applied and environmental microbiology*. 2004;70(9):5698-700.
28. Tenailon O, Skurnik D, Picard B, Denamur E. The population genetics of commensal Escherichia coli. *Nature reviews Microbiology*. 2010;8(3):207-17.
29. Lupindu AM. Isolation and characterization of Escherichia coli from animals, humans, and environment. 2017.

30. Manafi M, Kneifel W, Bascomb S. Fluorogenic and chromogenic substrates used in bacterial diagnostics. *Microbiological reviews*. 1991;55(3):335-48.
31. Vounba P, Arsenault J, Bada-Alamedji R, Fairbrother JM. 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. *PloS one*. 2019;14(3):e0214304.
32. McDaniels AE, Rice EW, Reyes AL, Johnson CH, Haugland RA, Stelma GN, Jr. Confirmational identification of *Escherichia coli*, a comparison of genotypic and phenotypic assays for glutamate decarboxylase and beta-D-glucuronidase. *Applied and environmental microbiology*. 1996;62(9):3350-4.
33. Stecher B, Hardt W-D. The role of microbiota in infectious disease. *Trends in microbiology*. 2008;16(3):107-14.
34. Bach JF. The hygiene hypothesis in autoimmunity: the role of pathogens and commensals. *Nature reviews Immunology*. 2018;18(2):105-20.
35. Bray J. Isolation of antigenically homogeneous strains of *Bact. coli neapolitanum* from summer diarrhoea of infants. *The Journal of Pathology*. 1945;57(2):239-47.
36. DebRoy C, Roberts E, Fratamico PM. Detection of O antigens in *Escherichia coli*. *Animal health research reviews*. 2011;12(2):169-85.
37. Manges AR, Johnson JR. Food-borne origins of *Escherichia coli* causing extraintestinal infections. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2012;55(5):712-9.
38. Clermont O, Bonacorsi S, Bingen E. Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. *Applied and environmental microbiology*. 2000;66(10):4555-8.
39. Hiki M, Usui M, Kojima A, Ozawa M, Ishii Y, Asai T. Diversity of plasmid replicons encoding the bla(CMY-2) gene in broad-spectrum cephalosporin-resistant *Escherichia coli* from livestock animals in Japan. *Foodborne pathogens and disease*. 2013;10(3):243-9.
40. 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. *Environmental microbiology reports*. 2013;5(1):58-65.
41. Clermont O, Gordon DM, Brisse S, Walk ST, Denamur E. Characterization of the cryptic *Escherichia* lineages: rapid identification and prevalence. *Environmental microbiology*. 2011;13(9):2468-77.
42. Walk ST. The "Cryptic" *Escherichia*. *EcoSal Plus*. 2015;6(2).
43. Rasko DA, Rosovitz MJ, Myers GS, Mongodin EF, Fricke WF, Gajer P, et al. The pangenome structure of *Escherichia coli*: comparative genomic analysis of *E. coli* commensal and pathogenic isolates. *Journal of bacteriology*. 2008;190(20):6881-93.
44. Hendrickson H. Order and disorder during *Escherichia coli* divergence. *PLoS genetics*. 2009;5(1):e1000335.
45. Tortora G, Funke, Case. *Microbiology: An introduction*. ERPI ed. inc Édrrp, editor: ERPI; 2003. 945 p.
46. Pitout JD. Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli*: A Combination of Virulence with Antibiotic Resistance. *Frontiers in microbiology*. 2012;3:9.
47. Russo TA, Johnson JR. Medical and economic impact of extraintestinal infections due to *Escherichia coli*: focus on an increasingly important endemic problem. *Microbes and infection*. 2003;5(5):449-56.

48. Wildschutte H, Wolfe DM, Tamewitz A, Lawrence JG. Protozoan predation, diversifying selection, and the evolution of antigenic diversity in Salmonella. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2004;101(29):10644-9.
49. Mellata M. Human and avian extraintestinal pathogenic Escherichia coli: infections, zoonotic risks, and antibiotic resistance trends. *Foodborne pathogens and disease*. 2013;10(11):916-32.
50. Smith JL, Fratamico PM, Gunther NW. Extraintestinal pathogenic Escherichia coli. *Foodborne pathogens and disease*. 2007;4(2):134-63.
51. Ewers C, Li G, Wilking H, Kiessling S, Alt K, Antao EM, et al. Avian pathogenic, uropathogenic, and newborn meningitis-causing Escherichia coli: how closely related are they? *International journal of medical microbiology : IJMM*. 2007;297(3):163-76.
52. Schlackow I, Stoesser N, Walker AS, Crook DW, Peto TE, Wyllie DH. Increasing incidence of Escherichia coli bacteraemia is driven by an increase in antibiotic-resistant isolates: electronic database study in Oxfordshire 1999-2011. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2012;67(6):1514-24.
53. Griebing TL. Urinary tract infection in women. In: *Urology, Diseases in America*. Litwin MS, Saigal CS (eds.). Washington, DC: NIH Publication. 2007:589-619.
54. Obata-Yasuoka M, Ba-Thein W, Tsukamoto T, Yoshikawa H, Hayashi H. Vaginal Escherichia coli share common virulence factor profiles, serotypes and phylogeny with other extraintestinal E. coli. *Microbiology (Reading, England)*. 2002;148(Pt 9):2745-52.
55. Maluta RP, Stella AE, Riccardi K, Rigobelo EC, Marin JM, Carvalho MB, et al. Phenotypical characterization and adhesin identification in Escherichia coli strains isolated from dogs with urinary tract infections. *Brazilian journal of microbiology : [publication of the Brazilian Society for Microbiology]*. 2012;43(1):375-81.
56. Zogg AL, Zurfluh K, Schmitt S, Nuesch-Inderbinen M, Stephan R. Antimicrobial resistance, multilocus sequence types and virulence profiles of ESBL producing and non-ESBL producing uropathogenic Escherichia coli isolated from cats and dogs in Switzerland. *Veterinary microbiology*. 2018;216:79-84.
57. Hutton TA, Innes GK, Harel J, Garneau P, Cucchiara A, Schifferli DM, et al. Phylogroup and virulence gene association with clinical characteristics of Escherichia coli urinary tract infections from dogs and cats. *Journal of veterinary diagnostic investigation : official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc*. 2018;30(1):64-70.
58. Yousefi A, Torkan S. Uropathogenic Escherichia coli in the Urine Samples of Iranian Dogs: Antimicrobial Resistance Pattern and Distribution of Antibiotic Resistance Genes. *BioMed research international*. 2017;2017:4180490.
59. Gaschignard J, Levy C, Romain O, Cohen R, Bingen E, Aujard Y, et al. Neonatal Bacterial Meningitis: 444 Cases in 7 Years. *The Pediatric infectious disease journal*. 2011;30(3):212-7.
60. Klinger G, Chin CN, Beyene J, Perlman M. Predicting the outcome of neonatal bacterial meningitis. *Pediatrics*. 2000;106(3):477-82.
61. Raymond J, Lopez E, Bonacorsi S, Poyart C, Moriette G, Jarreau PH, et al. Evidence for transmission of Escherichia coli from mother to child in late-onset neonatal infection. *The Pediatric infectious disease journal*. 2008;27(2):186-8.

62. Pilcher C, Smith ER. The effects of intramuscular and intrathecal administration of streptomycin in normal dogs and in dogs with meningitis due to *Escherichia coli*. *Annals of surgery*. 1949;129(6):810-9.
63. Li X, Zhang Z, Chang X, Wang X, Hu J, Lin Q, et al. Disruption of blood-brain barrier by an *Escherichia coli* isolated from canine septicemia and meningoencephalitis. *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases*. 2019;63:44-50.
64. Matter LB, Spricigo DA, Tasca C, Vargas AC. Invasin *gimB* found in a bovine intestinal *Escherichia coli* with an adherent and invasive profile. *Brazilian journal of microbiology* : [publication of the Brazilian Society for Microbiology]. 2015;46(3):875-8.
65. Giridharan VV, Simoes LR, Dagostin VS, Generoso JS, Rezin GT, Florentino D, et al. Temporal changes of oxidative stress markers in *Escherichia coli* K1-induced experimental meningitis in a neonatal rat model. *Neuroscience letters*. 2017;653:288-95.
66. de Kraker ME, Davey PG, Grundmann H. Mortality and hospital stay associated with resistant *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* bacteremia: estimating the burden of antibiotic resistance in Europe. *PLoS medicine*. 2011;8(10):e1001104.
67. Aung AK, Skinner MJ, Lee FJ, Cheng AC. Changing epidemiology of bloodstream infection pathogens over time in adult non-specialty patients at an Australian tertiary hospital. *Communicable diseases intelligence quarterly report*. 2012;36(4):E333-41.
68. Nemeth N, Berhes M, Kiss F, Hajdu E, Deak A, Molnar A, et al. Early hemorheological changes in a porcine model of intravenously given *E. coli* induced fulminant sepsis. *Clinical hemorheology and microcirculation*. 2015;61(3):479-96.
69. Hardie EM, Rawlings CA, Shotts EB, Jr., Waltman DW, Rakich PM. Lidocaine treatment of dogs with *Escherichia coli* septicemia. *American journal of veterinary research*. 1988;49(1):77-81.
70. Agunos A, Leger D, Carson C. Review of antimicrobial therapy of selected bacterial diseases in broiler chickens in Canada. *The Canadian veterinary journal = La revue veterinaire canadienne*. 2012;53(12):1289-300.
71. Schouler C, Schaeffer B, Bree A, Mora A, Dahbi G, Biet F, et al. Diagnostic strategy for identifying avian pathogenic *Escherichia coli* based on four patterns of virulence genes. *Journal of clinical microbiology*. 2012;50(5):1673-8.
72. Zanella A, Alborali GL, Bardotti M, Candotti P, Guadagnini PF, Martino PA, et al. Severe *Escherichia coli* O111 septicaemia and polyserositis in hens at the start of lay. *Avian pathology : journal of the WVPA*. 2000;29(4):311-7.
73. Omer M, Abusalab S, Gumaa M, Mulla S, Omer E, Jeddah I, et al. Outbreak of colibacillosis among broiler and layer flocks in intensive and semi intensive poultry farms in Kassala State, Eastern Sudan. *Asian Journal of Poultry Science*. 2010;4(4):173-81.
74. Stokholm NM, Permin A, Bisgaard M, Christensen JP. Causes of mortality in commercial organic layers in Denmark. *Avian diseases*. 2010;54(4):1241-50.
75. Yogaratnam V. Analysis of the causes of high rates of carcass rejection at a poultry processing plant. *The Veterinary record*. 1995;137(9):215-7.
76. 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 pathogens and disease*. 2012;9(1):37-46.

77. Ronco T, Stegger M, Olsen RH, Sekse C, Nordstoga AB, Pohjanvirta T, et al. Spread of avian pathogenic *Escherichia coli* ST117 O78:H4 in Nordic broiler production. *BMC genomics*. 2017;18(1):13.
78. Ewers C, Antao EM, Diehl I, Philipp HC, Wieler LH. Intestine and environment of the chicken as reservoirs for extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strains with zoonotic potential. *Applied and environmental microbiology*. 2009;75(1):184-92.
79. 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. *Journal of clinical microbiology*. 2008;46(12):3987-96.
80. Ewers C, Janssen T, Kiessling S, Philipp HC, Wieler LH. Rapid detection of virulence-associated genes in avian pathogenic *Escherichia coli* by multiplex polymerase chain reaction. *Avian diseases*. 2005;49(2):269-73.
81. Olsen RH, Frantzen C, Christensen H, Bisgaard M. An investigation on first-week mortality in layers. *Avian diseases*. 2012;56(1):51-7.
82. Pourbakhsh SA, Boulianne M, Martineau-Doize B, Dozois CM, Desautels C, Fairbrother JM. Dynamics of *Escherichia coli* infection in experimentally inoculated chickens. *Avian diseases*. 1997;41(1):221-33.
83. Ozaki H, Murase T. Multiple routes of entry for *Escherichia coli* causing colibacillosis in commercial layer chickens. *The Journal of veterinary medical science*. 2009;71(12):1685-9.
84. Fossum O, Jansson DS, Etterlin PE, Vagsholm I. Causes of mortality in laying hens in different housing systems in 2001 to 2004. *Acta veterinaria Scandinavica*. 2009;51:3.
85. Xavier DB, Broom DM, McManus CM, Torres C, Bernal FE. Number of flocks on the same litter and carcass condemnations due to cellulitis, arthritis and contact foot-pad dermatitis in broilers. *British poultry science*. 2010;51(5):586-91.
86. Schrader JS, Singer RS, Atwill ER. A prospective study of management and litter variables associated with cellulitis in California broiler flocks. *Avian diseases*. 2004;48(3):522-30.
87. Frost LS, Leplae R, Summers AO, Toussaint A. Mobile genetic elements: the agents of open source evolution. *Nature reviews Microbiology*. 2005;3(9):722-32.
88. Carattoli A. Resistance plasmid families in Enterobacteriaceae. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2009;53(6):2227-38.
89. Dunn JR, Gimeno IM. Current status of Marek's disease in the United States and worldwide based on a questionnaire survey. *Avian diseases*. 2013;57(2 Suppl):483-90.
90. Food and Drug Administration. New animal drugs: cephalosporin drugs: extralabel animal drug use, order of prohibition. *Federal Register*. 2008 [Available from: <http://edocket.access.gpo.gov/2008/E8-15052.htm>].
91. Burton HS, Abraham EP. Isolation of antibiotics from a species of *Cephalosporium*; cephalosporins P1, P2, P3, P4, and P5. *The Biochemical journal*. 1951;50(2):168-74.
92. Werth BJ. Cephalosporins 2018 [Available from: <https://www.merckmanuals.com/professional/infectious-diseases/bacteria-and-antibacterial-drugs/cephalosporins>].
93. Gouvernement du Canada. Utilisation de médicaments en dérogation des directives de l'étiquette (UMDDE) 2014 [Available from: <https://www.canada.ca/fr/sante-canada/services/medicaments-produits-sante/medicaments-veterinaires/utilisation-medicaments-derogation-directives-etiquette.html>].

94. Carattoli A. Animal reservoirs for extended spectrum beta-lactamase producers. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 2008;14 Suppl 1:117-23.
95. Vernimb GD, Bachmann H, Panitz E. Effect of gentamicin on early mortality and later performance of broiler and Leghorn chickens. *Avian diseases*. 1976;20(4):706-13.
96. Persoons D, Haesebrouck F, Smet A, Herman L, Heyndrickx M, Martel A, et al. Risk factors for ceftiofur resistance in *Escherichia coli* from Belgian broilers. *Epidemiology and infection*. 2011;139(5):765-71.
97. Organization WH. Critically important antimicrobials for human medicine: ranking of antimicrobial agents for risk management of antimicrobial resistance due to non-human use. 2017.
98. Chicken Farmers of Canada. LE POULET ET ANTIBIOTIQUES, PARLONS DES FAITS 2015 [Available from: <http://www.chickenfarmers.ca/wp-content/uploads/2015/10/AMU-Infographic-FR.pdf>].
99. MAPAQ. Règlement modifiant le Règlement sur l'administration de certains médicaments, Loi sur la protection sanitaire des animaux (chapitre P-42, a. 55.9, 1er al., par. 7° et 11°) 2018 [Available from: http://www.ecolog.com/daily_images/1004277704-1004278582.pdf].
100. Guenther S, Ewers C, Wieler LH. Extended-Spectrum Beta-Lactamases Producing *E. coli* in Wildlife, yet Another Form of Environmental Pollution? *Frontiers in microbiology*. 2011;2:246.
101. Diarrassouba F, Diarra MS, Bach S, Delaquis P, Pritchard J, Topp E, et al. Antibiotic resistance and virulence genes in commensal *Escherichia coli* and *Salmonella* isolates from commercial broiler chicken farms. *Journal of food protection*. 2007;70(6):1316-27.
102. Gouvernement du Canada. Section 1 : Programme intégré canadien de surveillance de la résistance aux antimicrobiens (PICRA) 2008 – Résistance aux antimicrobiens 2008 [Available from: <https://www.canada.ca/fr/sante-publique/services/surveillance/programme-integre-canadien-surveillance-resistance-antimicrobiens-picra/picra-2008-rapport-annuel/section-1-resistance-aux-antimicrobiens.html>].
103. ©Tous droits réservés. Programme Intégré Canadien de Surveillance de la Résistance aux Antimicrobiens (PICRA) 2008 – Résistance aux antimicrobiens. L'Agence de la santé publique du Canada, 2008; modification, 2011. Adapté et reproduit avec la permission du Ministre de la santé, 2018,.
104. Borjesson S, Jernberg C, Brolund A, Edquist P, Finn M, Landen A, et al. Characterization of plasmid-mediated AmpC-producing *E. coli* from Swedish broilers and association with human clinical isolates. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 2013;19(7):E309-11.
105. Nilsson O, Borjesson S, Landen A, Bengtsson B. Vertical transmission of *Escherichia coli* carrying plasmid-mediated AmpC (pAmpC) through the broiler production pyramid. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2014;69(6):1497-500.
106. Zurfluh K, Wang J, Klumpp J, Nuesch-Inderbinen M, Fanning S, Stephan R. Vertical transmission of highly similar bla CTX-M-1-harboring IncII plasmids in *Escherichia coli* with different MLST types in the poultry production pyramid. *Frontiers in microbiology*. 2014;5:519.

107. Lavilla S, Gonzalez-Lopez JJ, Miro E, Dominguez A, Llagostera M, Bartolome RM, et al. Dissemination of extended-spectrum beta-lactamase-producing bacteria: the food-borne outbreak lesson. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2008;61(6):1244-51.
108. Aarestrup FM, Hasman H, Veldman K, Mevius D. Evaluation of eight different cephalosporins for detection of cephalosporin resistance in *Salmonella enterica* and *Escherichia coli*. *Microbial drug resistance (Larchmont, NY)*. 2010;16(4):253-61.
109. Clinical And Laboratory Standards Institute. Performance Standards for antimicrobial susceptibility testing; twenty-third informational supplement 2013 [Available from: https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&cad=rja&uact=8&ved=2ahUKEwlvPeMnrTeAhXihOAKHc4_CU0QFjAAegQICBAC&url=https%3A%2F%2Fwww.researchgate.net%2Ffile.PostFileLoader.html%3Fid%3D55d77c2f614325f5d38b461b%26assetKey%3DAS%3A273836702928896%401442299165694&usg=AOvVaw2AjixRsC8xIqt2PCRF0jOs].
110. Abraham S, Kirkwood RN, Laird T, Saputra S, Mitchell T, Singh M, et al. Dissemination and persistence of extended-spectrum cephalosporin-resistance encoding Inc11-blaCTXM-1 plasmid among *Escherichia coli* in pigs. *The ISME journal*. 2018.
111. Smet A, Martel A, Persoons D, Dewulf J, Heyndrickx M, Catry B, et al. Diversity of extended-spectrum beta-lactamases and class C beta-lactamases among cloacal *Escherichia coli* Isolates in Belgian broiler farms. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2008;52(4):1238-43.
112. EFSA Panel on Biological Hazards. Scientific Opinion on the public health risks of bacterial strains producing extended-spectrum β -lactamases and/or AmpC β -lactamases in food and food-producing animals. *EFSA Journal*. 2011;9(8):2322.
113. Laube H, Friese A, von Salviati C, Guerra B, Kasbohrer A, Kreienbrock L, et al. Longitudinal monitoring of extended-spectrum-beta-lactamase/AmpC-producing *Escherichia coli* at German broiler chicken fattening farms. *Applied and environmental microbiology*. 2013;79(16):4815-20.
114. Touzain F, Le Devendec L, de Boissesson C, Baron S, Jouy E, Perrin-Guyomard A, et al. Characterization of plasmids harboring blaCTX-M and blaCMY genes in *E. coli* from French broilers. *PloS one*. 2018;13(1):e0188768.
115. Lopez-Cerero L, Egea P, Serrano L, Navarro D, Mora A, Blanco J, et al. Characterisation of clinical and food animal *Escherichia coli* isolates producing CTX-M-15 extended-spectrum beta-lactamase belonging to ST410 phylogroup A. *International journal of antimicrobial agents*. 2011;37(4):365-7.
116. Horton RA, Randall LP, Snary EL, Cockrem H, Lotz S, Wearing H, et al. Fecal carriage and shedding density of CTX-M extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* in cattle, chickens, and pigs: implications for environmental contamination and food production. *Applied and environmental microbiology*. 2011;77(11):3715-9.
117. Kt V, Wit B, Pelt W, Heederik D, Dj M. MARAN 2017: Monitoring of antimicrobial resistance and antibiotic usage in animals in the Netherlands in 2016. Combined with NETHMAP-2017: Consumption of antimicrobial agents and antimicrobial resistance among medically important bacteria in the Netherlands 2017.
118. Cloeckaert A, Praud K, Doublet B, Bertini A, Carattoli A, Butaye P, et al. Dissemination of an extended-spectrum-beta-lactamase blaTEM-52 gene-carrying Inc11 plasmid in various *Salmonella enterica* serovars isolated from poultry and humans in Belgium

and France between 2001 and 2005. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2007;51(5):1872-5.

119. Hopkins KL, Liebana E, Villa L, Batchelor M, Threlfall EJ, Carattoli A. Replicon typing of plasmids carrying CTX-M or CMY beta-lactamases circulating among *Salmonella* and *Escherichia coli* isolates. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2006;50(9):3203-6.

120. Agero 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 pathogens and disease*. 2014;11(9):740-6.

121. Borjesson S, Bengtsson B, Jernberg C, Englund S. Spread of extended-spectrum beta-lactamase producing *Escherichia coli* isolates in Swedish broilers mediated by an *incl* plasmid carrying *bla*(CTX-M-1). *Acta veterinaria Scandinavica*. 2013;55:3.

122. Baudry PJ, Nichol K, DeCorby M, Mataseje L, Mulvey MR, Hoban DJ, et al. Comparison of antimicrobial resistance profiles among extended-spectrum-beta-lactamase-producing and acquired AmpC beta-lactamase-producing *Escherichia coli* isolates from Canadian intensive care units. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2008;52(5):1846-9.

123. Chandramohan L, Revell PA. Prevalence and molecular characterization of extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in a pediatric patient population. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2012;56(9):4765-70.

124. Valverde A, Grill F, Coque TM, Pintado V, Baquero F, Canton R, et al. High rate of intestinal colonization with extended-spectrum-beta-lactamase-producing organisms in household contacts of infected community patients. *Journal of clinical microbiology*. 2008;46(8):2796-9.

125. Hilty M, Betsch BY, Bogli-Stuber K, Heiniger N, Stadler M, Kuffer M, et al. Transmission dynamics of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in the tertiary care hospital and the household setting. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2012;55(7):967-75.

126. Manges AR, Smith SP, Lau BJ, Nuval CJ, Eisenberg JN, Dietrich PS, et al. Retail meat consumption and the acquisition of antimicrobial resistant *Escherichia coli* causing urinary tract infections: a case-control study. *Foodborne pathogens and disease*. 2007;4(4):419-31.

127. Mora A, Herrera A, Mamani R, Lopez 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. *Applied and environmental microbiology*. 2010;76(21):6991-7.

128. Mesa RJ, Blanc V, Blanch AR, Cortes P, Gonzalez JJ, Lavilla S, et al. Extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in different environments (humans, food, animal farms and sewage). *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2006;58(1):211-5.

129. Buchholz U, Bernard H, Werber D, Bohmer MM, Renschmidt C, Wilking H, et al. German outbreak of *Escherichia coli* O104:H4 associated with sprouts. *The New England journal of medicine*. 2011;365(19):1763-70.

130. Bergenholtz RD, Jorgensen MS, Hansen LH, Jensen LB, Hasman H. Characterization of genetic determinants of extended-spectrum cephalosporinases (ESCs) in *Escherichia coli* isolates from Danish and imported poultry meat. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2009;64(1):207-9.

131. 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. *Applied and environmental microbiology*. 2017;83(1).
132. Daehre K, Projahn M, Semmler T, Roesler U, Friese A. Extended-Spectrum Beta-Lactamase-/AmpC Beta-Lactamase-Producing Enterobacteriaceae in Broiler Farms: Transmission Dynamics at Farm Level. *Microbial drug resistance (Larchmont, NY)*. 2017.
133. ©Tous droits réservés. Programme Intégré Canadien de Surveillance de la Résistance aux Antimicrobiens (PICRA). L'Agence de la santé publique du Canada, 2016. Adapté et reproduit avec la permission du Ministre de la santé, 2018.
134. Speksnijder D, Mevius D, Brusckhe C, Wagenaar J. Reduction of veterinary antimicrobial use in the Netherlands. The Dutch success model. *Zoonoses and public health*. 2015;62:79-87.
135. Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG, et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 2012;18(3):268-81.
136. Falagas ME, Koletsi PK, Bliziotis IA. The diversity of definitions of multidrug-resistant (MDR) and pandrug-resistant (PDR) *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of medical microbiology*. 2006;55(Pt 12):1619-29.
137. Falagas ME, Karageorgopoulos DE. Pandrug resistance (PDR), extensive drug resistance (XDR), and multidrug resistance (MDR) among Gram-negative bacilli: need for international harmonization in terminology. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2008;46(7):1121-2; author reply 2.
138. Kola A, Kohler C, Pfeifer Y, Schwab F, Kuhn K, Schulz K, et al. High prevalence of extended-spectrum-beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae in organic and conventional retail chicken meat, Germany. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2012;67(11):2631-4.
139. ACIA. Liste des rappels de produits de poulet crus panés et congelés en raison de la bactérie Salmonella : de juillet 2017 au présent 2019 [Available from: <http://www.inspection.gc.ca/aliments/information-pour-les-consommateurs/enquete-sur-la-salubrite-des-aliments/liste-des-rappels-de-produits-de-poulet-crus-panes/fra/1536716947924/1536717030715>].
140. Greger M. The human/animal interface: emergence and resurgence of zoonotic infectious diseases. *Critical reviews in microbiology*. 2007;33(4):243-99.
141. Johnson JR, Kuskowski MA, Smith K, O'Bryan TT, Tatini S. Antimicrobial-resistant and extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* in retail foods. *The Journal of infectious diseases*. 2005;191(7):1040-9.
142. Rodriguez-Siek KE, Giddings CW, Doetkott C, Johnson TJ, Fakhr MK, Nolan LK. Comparison of *Escherichia coli* isolates implicated in human urinary tract infection and avian colibacillosis. *Microbiology (Reading, England)*. 2005;151(Pt 6):2097-110.
143. 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. *Applied and environmental microbiology*. 2008;74(22):7043-50.

144. Jakobsen L, Hammerum AM, Frimodt-Moller N. Detection of clonal group A *Escherichia coli* isolates from broiler chickens, broiler chicken meat, community-dwelling humans, and urinary tract infection (UTI) patients and their virulence in a mouse UTI model. *Applied and environmental microbiology*. 2010;76(24):8281-4.
145. Johnson TJ, Kariyawasam S, Wannemuehler Y, Mangiamele P, Johnson SJ, Doetkott C, et al. The genome sequence of avian pathogenic *Escherichia coli* strain O1:K1:H7 shares strong similarities with human extraintestinal pathogenic *E. coli* genomes. *Journal of bacteriology*. 2007;189(8):3228-36.
146. 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. *Microbiology (Reading, England)*. 2009;155(Pt 5):1634-44.
147. Tivendale KA, Logue CM, Kariyawasam S, Jordan D, Hussein A, Li G, et al. Avian-pathogenic *Escherichia coli* strains are similar to neonatal meningitis *E. coli* strains and are able to cause meningitis in the rat model of human disease. *Infection and immunity*. 2010;78(8):3412-9.
148. Johnson TJ, Jordan D, Kariyawasam S, Stell AL, Bell NP, Wannemuehler YM, et al. Sequence analysis and characterization of a transferable hybrid plasmid encoding multidrug resistance and enabling zoonotic potential for extraintestinal *Escherichia coli*. *Infection and immunity*. 2010;78(5):1931-42.
149. Mellata M, Touchman JW, Curtiss R. Full sequence and comparative analysis of the plasmid pAPEC-1 of avian pathogenic *E. coli* chi7122 (O78:K80:H9). *PloS one*. 2009;4(1):e4232.
150. D. Janzen CFoC, M. Davies TFoC, J. Greydanus CHEP, P. Clarke EFoC, C. Evans CPEPC, R. Weiss CHF. Preventive Use of Category I Antibiotics in the Poultry and Egg Sectors 2013 [Available from: <http://bcchicken.ca/wp-content/uploads/2012/11/Antibiotic-FAQ-2013.pdf>].
151. Agerso 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. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2012;67(3):582-8.
152. 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. *Veterinary microbiology*. 2014;169(1-2):89-95.
153. Walk ST, Alm EW, Gordon DM, Ram JL, Toranzos GA, Tiedje JM, et al. Cryptic lineages of the genus *Escherichia*. *Applied and environmental microbiology*. 2009;75(20):6534-44.
154. Mataseje LF, Bryce E, Roscoe D, Boyd DA, Embree J, Gravel D, et al. Carbapenem-resistant Gram-negative bacilli in Canada 2009-10: results from the Canadian Nosocomial Infection Surveillance Program (CNISP). *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2012;67(6):1359-67.
155. CIPARS. CANADIAN INTEGRATED PROGRAM FOR ANTIMICROBIAL RESISTANCE SURVEILLANCE, 2015 ANNUAL REPORT 2015 [Available from: http://publications.gc.ca/collections/collection_2017/aspc-phac/HP2-4-2015-eng.pdf]

156. [CLSI] Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fifth Informational Supplement M100-S25. 25 ed2015. p. 240.
157. [CLSI] Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals, CLSI supplement VET01S. In: VET01S Cs, editor. 3 ed2015. p. 128.
158. Dame-Korevaar A, Fischer EAJ, Stegeman A, Mevius D, van Essen-Zandbergen A, Velkers F, et al. Dynamics of CMY-2 producing *E. coli* in a broiler parent flock. *Veterinary microbiology*. 2017;203:211-4.
159. Hricova K, Roderova M, Pudova V, Hanulik V, Halova D, Julinkova P, et al. Quinolone-resistant *Escherichia coli* in Poultry Farming. *Central European journal of public health*. 2017;25(2):163-7.
160. Bohnert JA, Schuster S, Fahnrich E, Trittler R, Kern WV. Altered spectrum of multidrug resistance associated with a single point mutation in the *Escherichia coli* RND-type MDR efflux pump YhiV (MdtF). *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2007;59(6):1216-22.
161. Sary K. Les *Escherichia coli* pathogènes extra-intestinaux (ExPEC) et la résistance aux antimicrobiens des carcasses de poulets au détail au Vietnam [Master's thesis, Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Montréal, Saint-Hyacinthe, Canada]2016.
162. Mulvey MR, Grant JM, Plewes K, Roscoe D, Boyd DA. New Delhi metallo-beta-lactamase in *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*, Canada. *Emerging infectious diseases*. 2011;17(1):103-6.
163. Mataseje LF, Boyd DA, Fuller J, Haldane D, Hoang L, Lefebvre B, et al. Characterization of OXA-48-like carbapenemase producers in Canada, 2011-14. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2018;73(3):626-33.
164. Devanga Ragupathi NK, Muthuirulandi Sethuvel DP, Shankar BA, Munusamy E, Anandan S, Veeraraghavan B. Draft genome sequence of blaTEM-1-mediated cephalosporin-resistant *Salmonella enterica* serovar Typhi from bloodstream infection. *Journal of global antimicrobial resistance*. 2016;7:11-2.
165. Pouget JG, Coutinho FJ, Reid-Smith RJ, Boerlin P. Characterization of bla(SHV) genes on plasmids from *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* isolates from Canadian food animals (2006-2007). *Applied and environmental microbiology*. 2013;79(12):3864-6.
166. Liakopoulos A, Mevius D, Ceccarelli D. A Review of SHV Extended-Spectrum beta-Lactamases: Neglected Yet Ubiquitous. *Frontiers in microbiology*. 2016;7:1374.
167. Jahanbakhsh S, Letellier A, Fairbrother JM. Circulating of CMY-2 beta-lactamase gene in weaned pigs and their environment in a commercial farm and the effect of feed supplementation with a clay mineral. *Journal of applied microbiology*. 2016;121(1):136-48.
168. Bednorz C, Oelgeschlager K, Kinnemann B, Hartmann S, Neumann K, Pieper R, et al. The broader context of antibiotic resistance: zinc feed supplementation of piglets increases the proportion of multi-resistant *Escherichia coli* in vivo. *International journal of medical microbiology : IJMM*. 2013;303(6-7):396-403.
169. Agga GE, Scott HM, Amachawadi RG, Nagaraja TG, Vinasco J, Bai J, et al. Effects of chlortetracycline and copper supplementation on antimicrobial resistance of fecal *Escherichia coli* from weaned pigs. *Preventive veterinary medicine*. 2014;114(3-4):231-46.

170. Uemura R, Katsuge T, Sasaki Y, Goto S, Sueyoshi M. Effects of zinc supplementation on Shiga toxin 2e-producing *Escherichia coli* in vitro. *The Journal of veterinary medical science*. 2017;79(10):1637-43.
171. Upadhyaya I, Upadhyay A, Kollanoor-Johny A, Mooyottu S, Baskaran SA, Yin HB, et al. In-feed supplementation of trans-cinnamaldehyde reduces layer-chicken egg-borne transmission of *Salmonella enterica* serovar enteritidis. *Applied and environmental microbiology*. 2015;81(9):2985-94.
172. CIPARS. Canadian Integrated Program for Antimicrobial Resistance Surveillance (CIPARS), 2016 Annual Report 2016 [Available from: http://publications.gc.ca/collections/collection_2018/aspc-phac/HP2-4-2016-eng.pdf].