

Université de Montréal

**Étude de la prévalence, de la pathogénicité, de la
résistance aux antimicrobiens de *Salmonella* et de
l'impact de certains facteurs de risque sur la présence
de *Salmonella* dans les élevages ovins du Québec**

Par

Schlasiva Cenatus

Département de pathologie et microbiologie

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 2023

© Schlasiva Cenatus, 2023

Université de Montréal

Département de pathologie et microbiologie, Faculté de médecine vétérinaire

Ce mémoire intitulé

Étude de la prévalence, de la pathogénicité, de la résistance aux antimicrobiens de *Salmonella* et de l'impact de certains facteurs de risque sur la présence de *Salmonella* dans les élevages ovins du Québec

Présenté par

Schlasiva Cenatus

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Guillaume St-Jean

Président-rapporteur

Mohamed Rhouma

Directeur de recherche

Julie Arsenault

Codirectrice de recherche

Marie-Lou Gaucher

Membre du jury

Résumé

Salmonella est un agent pathogène animal et zoonotique d'importance mondiale. Les infections causées par cette bactérie chez les animaux d'élevage peuvent être asymptomatiques ou se traduire par une gastro-entérite ou une maladie invasive. Chez les humains, les maladies d'origines alimentaires associées à *Salmonella* sont principalement causées par l'ingestion de produits d'origine animale contaminés. Cependant, aucune étude n'a déterminé la prévalence ou caractérisé le profil de virulence et d'antibiorésistance de *Salmonella* provenant des fermes ovines du Québec, alors que cette province détient le 2^{ème} plus grand cheptel ovin canadien. Ainsi, cette étude visait à estimer la prévalence des fermes ovines positives à *Salmonella* dans la province du Québec, à identifier les sérotypes circulant dans ces troupeaux, à caractériser le profil de virulence et de résistance aux antimicrobiens de souches de *Salmonella* isolées dans ces fermes et à évaluer l'influence de certains facteurs de risque (ex. la saisonnalité, la taille des troupeaux et le type de production) sur la prévalence de fermes ovines positives à *Salmonella* au Québec. Pour cela, 61 fermes ovines du Québec ont été sélectionnées aléatoirement et ont été échantillonnées. Un pool fécal provenant de 10 animaux a été prélevé par ferme. Des milieux sélectifs ont été utilisés pour isoler *Salmonella* dans chaque échantillon. La confirmation de *Salmonella* a été faite par des tests biochimiques suivis par la détection du gène *invA* par PCR et les sous-espèces ont été identifiées par PCR multiplex. Le rapport de prévalence a été calculé pour évaluer l'association entre les facteurs de risque et la présence de *Salmonella* dans les fermes. Le séquençage du génome complet de 76 isolats a permis d'identifier les sérotypes et de déterminer le profil de virulence et de résistance génotypique de ces isolats. La confirmation de la résistance phénotypique de différentes souches a été

effectuée en utilisant la méthode de diffusion en milieu solide (antibiogramme) et la méthode de dilution en milieu liquide. Les résultats indiquent que 83,6% (95% CI 74,3%-92,9%) des troupeaux sont porteurs de *Salmonella*. Le sérotype *Salmonella enterica* sous-espèce *diarizonae* 61 k:1, 5, (7) (Sheep associated *Salmonella diarizonae* (SASd) a été le seul sérotype identifié dans tous les isolats qui ont été séquencés. Aucun des facteurs de risque évalués n'était associée à la présence de *Salmonella*. En outre, aucun gène de résistance aux antimicrobiens n'a été identifié à partir de l'analyse des génomes séquencés et toutes les souches ont été révélées comme étant phénotypiquement sensibles aux différents antimicrobiens testés. De plus, des facteurs de virulence, comme les ilots de pathogénicité (SPI-1, SPI-2, SPI-3, SPI-5, SPI-9 et SPI-13) et le plasmide (IncX1), ont été identifiés chez les 84 SASd.

Cette étude est la première à rapporter que la prévalence des fermes ovines positives à *Salmonella* est élevée au Québec (83,6%). Seule la présence du sérotype 61 k:1, 5, (7) a été détectée. Finalement, toutes les souches de *Salmonella* isolées dans le cadre de cette étude étaient sensibles aux antimicrobiens testés.

Mots clés : *Salmonella*, ovins, prévalence, résistance aux antimicrobiens, virulence, séquençage du génome complet.

Abstract

Salmonella is a world-known animal and zoonotic pathogen. Infections caused by this bacterium in livestock can be asymptomatic or result in gastroenteritis or an invasive disease. In humans, food-related diseases associated with *Salmonella* are mainly caused by the ingestion of contaminated products of animal origin. However, no studies have determined the prevalence or characterized the virulence and antimicrobial resistance (AMR) profiles of *Salmonella* from sheep farms in Quebec, where the province holds the second largest sheep population in Canada. This study aimed to estimate the prevalence of *Salmonella*-positive sheep farms in the province of Quebec, to identify the serotypes circulating in these flocks, to characterize the virulence and AMR profiles of *Salmonella* strains isolated from these farms and to assess the influence of some potential risk factors on the prevalence of *Salmonella*-positive sheep farms in the province of Quebec. For this purpose, 61 sheep farms in Quebec were randomly selected and sampled. A fecal pool including samples from 10 animals was collected per farm. Selective culture media were used to isolate *Salmonella* in each sample. *Salmonella* was confirmed by biochemical tests followed by the detection of *invA* gene by PCR and the subspecies were identified by multiplex PCR. The prevalence ratio was calculated to assess the association between risk factors and the presence of *Salmonella* in farms. The Whole genome sequencing (WGS) of 76 isolates was used to determine the serotypes, the virulence and the AMR profile of these isolates. The confirmation of the phenotypic AMR of these isolates (n=76) was carried out using the Kirby–Bauer disk diffusion method (antibiogram) or the broth microdilution method. The results indicated that 83.6% (95% CI 74.3%-92.9%) of the flocks are carrier of *Salmonella* and only the *Salmonella enterica* subspecies *diarizonae* serotype 61: k: 1, 5,

(7) (sheep associated *S. diarizonae*, SASd) was identified. None of the tested risk factors was associated with *Salmonella* positivity at the flock level. In addition, no AMR genes were identified from the WGS data, and all strains were phenotypically sensitive to the various antimicrobials tested. In addition, virulence factors such as pathogenicity islands (SPI-1, SPI-2, SPI-3, SPI-5, SPI-9 and SPI-13) and plasmid (IncX1) have been identified in the sequenced strains.

This study was the first to report a high prevalence of *Salmonella*-positive sheep farms in Quebec (83.6%). Only the presence of serotype 61 k:1, 5, (7) was detected. Interestingly, all *Salmonella* strains isolated in this study were sensitive to the tested antimicrobials.

Keywords: *Salmonella*, sheep, prevalence, antimicrobial resistance, virulence, complete genome sequencing.

Table des matières

Résumé	3
Abstract	5
Table des matières	7
Liste des figures	10
Liste des tableaux	10
Matériels supplémentaires	11
Liste des sigles	12
Liste des abréviations	12
Remerciements	13
Introduction	14
Recensement de la littérature	17
1 Production ovine	18
1.1 Importance du secteur ovin à l'échelle mondiale	18
1.1.1 La laine	19
1.1.2 La viande	19
1.1.3 Le lait	20
1.2 Production ovine au Canada	20
1.3 Production ovine au Québec	21
2 Salmonella	23
2.1 Découverte et nomenclature	23
2.2 Caractéristiques	25
2.3 Méthodes d'isolement et d'identification	28
2.3.1 Techniques conventionnelles (culture bactérienne)	28
2.4 Caractérisation génétique de Salmonella	31
2.4.1 Réaction de polymérisation en chaîne (PCR)	34
2.4.2 Séquençage complet du génome ou « Whole Genome Sequencing » (WGS)	36
2.5 Pathogénicité	37
2.6 Virulence	38

2.6.1	Facteurs de virulence	38
2.6.2	Antigène capsulaire (VI)	39
2.6.3	Fimbriae	40
2.6.4	Flagelles	40
2.6.5	Ilots de pathogénicité (ou SPIs pour <i>Salmonella</i> Pathogenicity Islands)	41
2.6.6	Lipopolysaccharide (LPS)	42
2.6.7	Plasmides de virulence	42
2.6.8	Toxines	43
2.6.9	Autres facteurs de virulence	44
2.7	Sous-espèces et sérotypes retrouvés chez les ovins	44
2.7.1	Généralités chez les ovins	44
2.7.2	Au Canada	53
3	Les antimicrobiens en production ovine	54
3.1	Règlementation régissant l'utilisation des antimicrobiens chez les animaux d'élevage au Canada et au Québec	54
3.2	Antimicrobiens utilisés chez les ovins au Québec	56
3.3	Caractérisation de la résistance bactérienne aux antimicrobiens	60
3.3.1	Résistance phénotypique	63
3.3.2	Résistance génotypique	65
3.4	Portrait de résistance aux antimicrobiens de <i>Salmonella</i> chez les ovins	67
3.4.1	Portrait général	67
3.4.2	Portrait au Canada	69
	Hypothèses et objectifs	74
	Article scientifique 1	77
	Abstract	80
	Introduction	81
	Material and methods	83
	Results	86
	Discussion	87
	Conclusion	90
	Tables	90
	Supplementary materials	93
	Article Scientifique #2	94

Abstract	97
Introduction	98
Materials and methods	100
Results	106
Discussion	107
Conclusion	110
Declaration of interest	110
Acknowledgement	111
Tables	111
Supplementary materials	112
Discussion Générale	114
Discussion des résultats et des techniques utilisées	116
Originalité de l'étude	121
Perspectives	122
Conclusion	125
Bibliographie	127

Liste des figures

Figure I: Classification des espèces et des sous-espèces de <i>Salmonella</i> (36).....	25
Figure II: Représentation de la couche extracellulaire des bactéries à Gram négatif (image préparée par le logiciel Biorender).	27
Figure III: Visualisation des méthodes de détection et d'identification de <i>Salmonella</i> selon la méthode de l'Organisation internationale de normalisation (ISO) (41).	31
Figure IV : Chronologie de l'élaboration des méthodes sélectionnées pour la caractérisation moléculaire de <i>Salmonella</i> (42). MLVA; analyse du nombre variable de locus multiples en tandem; WGS; Whole genome sequencing (ou SCG en français); MLST; typage génomique multilocus.	34

Liste des tableaux

Tableau I : Caractéristiques biochimiques générales de <i>Salmonella</i> (6, 39).	27
Tableau II: Identification des sous-espèces de <i>Salmonella</i> par PCR multiplex (57).....	35
Tableau III: Prévalence de <i>Salmonella</i> chez les ovins dans plusieurs pays et état clinique des animaux échantillonnés (10, 90-94) (95).....	47
Tableau IV: Catégorisation des antimicrobiens selon leur importance en médecine humaine (Santé Canada) (113).	55
Tableau V: Liste des antimicrobiens homologués au Canada chez les ovins (113, 123-128).	57
Tableau VI: Liste des antimicrobiens utilisés hors-homologation chez les ovins au Canada (113, 123, 124, 126, 127).....	58

Tableau VII: Mécanismes de résistance aux antimicrobiens chez <i>Salmonella</i> (132, 136-143).	62
Tableau VIII: Profil de résistance phénotypique aux antimicrobiens chez certains isolats de <i>Salmonella</i> d'origine ovine provenant de plusieurs pays (89, 92-94, 100, 152).	70
Article scientifique #1	
Tab. 1: Oligonucleotides primers used for the identification of <i>Salmonella</i> subspecies by multiplex PCR.....	90
Tab. 2: Comparison of multiplex PCR and WGS results according to the detected genes. The gene <i>invA</i> was detected in all the isolates below.	92
Article scientifique #2	
Table 1 : Susceptibility testing of <i>Salmonella</i> strains (n=84) to some antimicrobials used in Quebec sheep farm.....	111
Table 2: Prevalence of <i>Salmonella</i> positive farms according to some risk factors associated with sheep farming management.	112

Matériels supplémentaires

Article scientifique #1

Sup. 1: Genes used to characterize the different <i>Salmonella</i> subspecies according to the modified approach developed by Lee et al. (57).....	93
--	----

Article scientifique #2

Supplement. 1 : Representation of the plasmid IncX1 shared by the <i>Salmonella</i> isolates (n=10).....	112
--	-----

Liste des sigles

CCAC : Canadian Council on Animal Care

CRSV : Chaire de recherche en salubrité des viandes

FVM : Faculty of Veterinary Medicine

MAPAQ : Ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation du Québec

Liste des abréviations

AMR : Antimicrobial resistance

BGS: Brilliant Green Sulpha

CMI: Concentration minimale inhibitrice

DNA: Deoxyribonucleic acid

EPT: Eau peptonée tamponnée

FBDs: Foodborne diseases

GNB: Gram-negative bacteria

MAP: *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis

MSRV: Modified Semisolid Rappaport-Vassiliadis

PCR : Polymerase Chain Reaction

RAM : Résistance aux antimicrobiens

SASd: Sheep Associated *Salmonella* diarizonae

SCG: Séquençage du Génome complet

SIFs: *Salmonella*-induced filaments

TBG: Tetrathionate Brilliant Green

TSA: Tryptone Soya Agar

VCS: Vacuole contenant *Salmonella*

WGS: Whole Genome Sequencing

XLD: Xylose Lysine Deoxycholate

Remerciements

Je remercie sincèrement mon directeur de recherche, Dr Mohamed Rhouma pour son encouragement, ses exhortations, mais surtout pour sa grande patience et sa disponibilité au cours de ces deux dernières années. Merci d'avoir partagé tes connaissances ainsi que ton admiration pour l'enseignement, la recherche et la rédaction avec moi.

Mes sincères remerciements à ma co-directrice, Dre Julie Arsenault de toujours avoir une solution à mes problèmes d'analyse et de gestion de données. Je ressortais toujours de son bureau soulagée et contente d'avoir appris de nouvelles façons de gérer mes documents!

Merci aux membres de la CRSV, surtout à William Thériault, d'avoir répondu à mes mille et unes questions au cours de ces deux années ainsi que pour son encouragement avec sa phrase : *Lâche pas la patate!* Merci à Dre Maud de Lagarde pour son aide précieuse avec les analyses bio-informatiques. Merci aux membres de mon comité-conseil, Dre Marie-Lou Gaucher, Dr John Morris Fairbrother et Dr Jean-Philippe Roy ainsi qu'aux membres du jury d'évaluation de ce mémoire.

Les mots ne suffisent pas pour exprimer ma gratitude envers mes parents pour leur sacrifice, leur support et leur amour jusqu'à présent. Merci à mes frères de m'avoir encouragée tout au long de cette période, bien que de façon très originale parfois! Un grand merci à mon époux pour son amour, son support et sa façon de m'encourager à atteindre mes objectifs.

Finalement, mes sincères remerciements à mon père céleste pour ces bienfaits envers moi et envers ma famille.

Introduction

En 2017, le cheptel ovin québécois était constitué de 98 252 agneaux, de 126 777 brebis de boucherie et de 6 188 brebis laitières (1). En 2018, la province du Québec détenait 769 entreprises agricoles en production ovine qui comptaient un total de 125 000 brebis, ce qui a permis de combler 51% de la demande de la province en viande ovine (2). Le cheptel ovin du Québec est concentré majoritairement dans 4 régions administratives qui regroupent 63 % des fermes ovines : le Bas-Saint-Laurent (25 %), l'Estrie (16 %), la Montérégie (11 %) et le Centre-du-Québec (11 %) (1). La production ovine au Québec est sujette à des infections par plusieurs microorganismes (3, 4). La bactérie *Salmonella* est un des pathogènes qui pourraient présenter un risque pour la production ovine, mais dont l'importance reste à documenter (4). *Salmonella* est un bacille à Gram négatif non sporulant, motile, anaérobie facultative, appartenant à la famille des *Enterobacteriaceae* (5, 6). Cette bactérie est fréquemment isolée chez les animaux domestiques et sauvages. Elle est largement répandue dans le contenu intestinal des animaux d'élevage tels que les volailles, les porcs et les bovins, ainsi que chez les animaux de compagnie, notamment les chats, les chiens, les oiseaux et les reptiles tels que les tortues. De plus, *Salmonella* est une bactérie omniprésente et résistante dans l'environnement. Ainsi, elle peut survivre plusieurs semaines dans un environnement sec et plusieurs mois dans l'eau (7). Le genre *Salmonella* comprend deux espèces (*Salmonella enterica* et *Salmonella bongori*) et six sous-espèces (6). L'espèce *enterica* est subdivisée en six sous-espèces (*enterica*, *salamae*, *arizonne*, *diarizone*, *houtenae* et *indica*, qui sont désignées par les chiffres romains I, II, IIIa, IIIb, IV et VI, respectivement) (6). *Salmonella enterica* comprend plus de 2600 sérotypes dont plus de 1500 appartiennent à la sous-espèce *S. enterica* sous-espèce *enterica* (6, 8, 9). Bien que la présence de *Salmonella* est très souvent asymptomatique, l'infection des animaux

d'élevage par certains sérotypes de ce genre bactérien pourrait conduire à des pertes économiques importantes, en raison d'une variété de symptômes cliniques (par exemple, entérite, septicémie, avortement) (7). Il est donc important de bien connaître les sérotypes de *Salmonella* présents dans une population pour en évaluer l'importance clinique et mettre en place les différentes stratégies permettant d'assurer un control efficace de ce pathogène. Ainsi, chez les ovins, certains sérotypes de *Salmonella* (ex. Abortusovis) peuvent causer des avortements, et la mort des agneaux infectés à la naissance, tandis que d'autres sérotypes de *Salmonella* (ex. *Salmonella enterica* subspecies *diarizonae* serotype 61: k: 1, 5, (7) (sheep associated *S. diarizonae*, SASd) sont généralement associés avec un portage asymptomatique (7, 10). Le traitement des animaux infectés peut être compliqué quand la souche qui infecte ces animaux est résistante aux antimicrobiens (11).

Bien que le Québec soit un important producteur de viande ovine et un producteur émergent de lait de brebis au Canada, le secteur ovin au Québec est souvent négligé quant à la caractérisation de certains agents pathogènes d'intérêt pour la santé ovine et la santé humaine, comme *Salmonella*. De plus, aucune donnée de prévalence pouvant contribuer à l'identification des fermes positives à *Salmonella* n'est disponible.

Les objectifs de ce projet étaient : 1) d'estimer la prévalence des fermes ovines positives à *Salmonella* au Québec, 2) d'identifier les sérotypes les plus prévalents au sein de ces élevages ainsi que de caractériser les facteurs de virulence et le profil de résistance aux antimicrobiens (RAM) des différentes souches de *Salmonella* isolées dans ces fermes, et 3) d'évaluer l'impact de certains facteurs de risque (ex. saisons, type de production, l'environnement des animaux et la taille du troupeau) sur la prévalence des fermes ovines positives à *Salmonella* au Québec.

Recensement de la littérature

1 Production ovine

Les ovins font partie des premiers animaux domestiqués après les chiens. En effet, les chèvres et les brebis ont été domestiquées pour la première fois en 9000 av. J-C dans les montagnes de Zagros, entre les deux pays connus aujourd'hui sous les noms de l'Iran et de l'Irak (12). Le but initial de l'élevage ovin était de fournir une source de revêtement pour l'homme (13). La production ovine s'est par la suite établie sur les cinq continents et constitue aujourd'hui une source économique importante dans plusieurs pays.

1.1 Importance du secteur ovin à l'échelle mondiale

Bien que le rendement en viande par rapport à la quantité d'aliments consommés (l'indice de conversion alimentaire) soit beaucoup plus faible chez les ovins par comparaison avec d'autres animaux d'élevage comme le poulet et le porc (14), la production ovine pourrait être avantageuse dans plusieurs régions du monde. En effet, dans un environnement peu favorable à d'autres types d'élevage (13) ou dans les régions où les ressources alimentaires sont limitées, comme c'est le cas dans certaines régions de l'Asie et de l'Afrique, la production ovine connaît un véritable succès (12). En 2017, il a été estimé que la population ovine dans le monde était de 1 milliard de têtes et que la majorité de ces animaux se répartissaient en Asie, en Amérique du Sud, au nord de l'Europe, en Australie et en Nouvelle-Zélande (15). Cette répartition de l'élevage ovin dépend de plusieurs facteurs, à savoir, l'environnement, la disponibilité de l'eau et du pâturage, la religion, la demande du marché local, etc. (12).

L'élevage ovin est destiné principalement à la production de la laine, de viande, de lait et de peaux (14). D'autres sous-produits provenant de ces animaux, comme le suif et le sang, sont parfois exploités (16).

1.1.1 La laine

Les ovins sont de grands producteurs de laine. La production mondiale était de 2,15 millions de tonnes de laine en 2006 (avec 2,1 kg de laine par animal) (12). L'Océanie détenait 36% de cette production et était suivie par l'Asie avec 33,4% (12). En 2006, il a été estimé que 60% de la laine produite mondialement était destinée à la fabrication des vêtements (17). Quoique ce produit est menacé par la production de la fibre synthétique, la demande pour la production de laine reste stable (14).

1.1.2 La viande

En 2006, la production mondiale de viande dans le secteur ovin était estimée à 8025 tonnes, avec plus de 60% de ce produit provenant de l'Asie et de l'Afrique (12). Cette production a connu une expansion dans les années subséquentes pour atteindre 14 millions de tonnes en 2017 (15). Cependant, la production ovine ne représentait que 3% de la production de viande globale (15). Deux types de viande sont produits dans le secteur ovin : la viande d'agneau provenant de jeunes animaux (moins de 1 an) et la viande de mouton qui provient des animaux adultes (1 an et plus) (14). La consommation de la viande ovine en 2017 à l'échelle mondiale était de 2,5 kg par personne (15), mais une diminution de cette consommation (-15%) a été rapportée de 2000 à 2019 (18). Au cours de l'année 2017, une augmentation des exportations depuis l'Océanie a aussi été enregistrée, avec l'Australie et la Nouvelle-Zélande étant les deux plus grands exportateurs de cette région (19).

1.1.3 Le lait

Dans la production ovine, le secteur laitier représente 20% de l'ensemble des ovins dans le monde (20). Environ 45, 29 et 25% du lait ovin est produit respectivement en Asie, en Europe et en Afrique, alors que l'Amérique du Nord et l'Amérique du Sud détiennent 0.9% de cette production (20). En 2016, il a été rapporté que les ovins produisent 1,9% du lait total dans le monde (20). Ce lait est principalement utilisé pour la production de fromage (14) dont les échanges commerciaux ont permis un revenu mondial de 374 millions de dollars en 2013 (20). Toutefois, il est estimé que ce secteur va connaître une croissance mondiale de 26% d'ici 2030 (20).

1.2 Production ovine au Canada

Les ovins ont été introduits au Canada dans les années 1600 dans les provinces du Québec et de la Nouvelle-Écosse (21). Cependant, la production ovine a été introduite plus tard dans l'ouest du pays (XIX^{ème} siècle) dans le but de répondre à la demande des premiers immigrants (21). C'est en 1931 que la production ovine atteint son point culminant au Canada avec 3,6 millions d'ovins, pour ensuite atteindre son niveau le plus faible en 1977 avec 560 000 ovins (21). Au début de l'année 2018, le secteur ovin au Canada comptait environ 837 000 ovins destinés principalement à la production de viande (1). Il est aussi à noter que le nombre d'ovins au Canada a connu une diminution de 3% de 2013 à 2017 (1). En 2017, la production ovine a permis de combler 39% des besoins du marché local en termes de viande ovine (1). Avec l'Ontario, le Québec détient plus de 50% de cette production au pays (1). L'approvisionnement du marché canadien en viande ovine dépend aussi de l'importation. En effet, Le Canada était le 11^{ème} importateur de viande ovine dans le monde en 2017 (1). De 2012 à 2017, la quantité de viande ovine importée au Canada a

augmenté de 48 % (1). Cette augmentation marque une expansion de l'importation de la viande ovine en Amérique du Nord depuis la Nouvelle-Zélande en 2017 (19) puisque cette dernière, avec l'Australie, sont à l'origine de 98% de la viande ovine importée au Canada (22). La production de lait est émergente au Québec et en Ontario où le lait produit est principalement utilisé pour la production de fromage (21).

1.3 Production ovine au Québec

La province du Québec est le deuxième plus grand producteur d'agneaux et de lait de brebis au Canada (1). En 2018, la province du Québec recensait 769 entreprises agricoles en production ovine qui comptaient un total de 125 000 brebis (2). De plus, le Québec est la province ayant le plus grand cheptel moyen par entreprise au pays (22). En 2021, les entreprises spécialisées en production ovine au Québec comptaient en moyenne 554 brebis (23).

Selon leur fertilité et leurs performances zootechniques, les ovins rencontrés dans les élevages ovins du Québec sont classés en race maternelle incluant les Dorsets (DP), les Polypays (PO), les Border Cheviot (BC), les Border Leicester (BL), les Icelandic (IL), les Kathadin (KA) et les North Country Cheviot (NC) et en race paternelle incluant les Suffolk (SU), les Hampshire (HA), les Dorper (DO), les Texel (TX), les Charollais (CO), les Ile de France (IF), les Oxford (OX), les Rouge de l'ouest (RO) et les Arcott Canadien (CD) (24-26). De plus, 3 types d'agneaux, selon leur poids, peuvent être retrouvés sur le marché québécois : l'agneau lourd (plus de 36,3 kg), l'agneau léger (entre 29,5 et 31.5 kg) et l'agneau de lait (moins de 29.5 kg) (2). La majeure partie des ovins sont destinés à la production de viande ce qui permet de combler environ 51% de la demande de la province

en viande ovine (1). La production de viande ovine en 2021 a été évaluée à 38 702 kg dans la province du Québec (23).

Le secteur laitier ovin est un secteur émergent dans la province. En 2018, la province du Québec comptait 25 entreprises ovines détentrices d'un permis d'exploitation qui ont produit 576 600 litres de lait principalement utilisé pour la production de fromage et de yogourt (1, 27).

La production de laine caractérise aussi le secteur ovin québécois. En effet, le Québec est la 3^{ème} province productrice de laine au pays et représentait 23% de la laine produite à l'échelle nationale en 2016 (27).

Bien que la rentabilité des entreprises de cette production soit un enjeu au Québec, le revenu annuel moyen de la relève du secteur ovin québécois a connu une augmentation de 67% de 2015 à 2018 (2). Une grande partie de l'argent des entreprises spécialisées dans la production ovine provient de la vente d'agneaux. Cependant, ces entreprises peuvent travailler dans d'autres domaines, complémentaires ou non à leur production principale (23).

La productivité de l'industrie ovine peut être influencée par divers facteurs, y compris le statut de santé des troupeaux. En effet, la présence de certains agents infectieux dans les fermes ovines peut être associée à des répercussions importantes en termes de bien-être et de productivité des ovins. Les troubles infectieux, en particulier ceux induits par des agents viraux, parasitaires et bactériens, peuvent entraîner des répercussions économiques importantes en raison de la diminution de la production, de l'augmentation des taux de mortalité et du coût des protocoles de traitement. La pasteurellose, principalement

provoquée par *Manheimia haemolytica* et *Pasteurella multocida*, ainsi que la fièvre Q, causée par *Coxiella burnetii*, illustrent les défis de la gestion des infections bactérienne dans la population ovine et soulignent l'impact significatif des maladies dans ces élevages, la complexité de leur contrôle et de leur prévention (28, 29). Les sections qui suivront fourniront une analyse de la bactérie *Salmonella*, en examinant ses implications potentielles pour la santé et la production ovine, ainsi que son impact sur la santé humaine.

2 *Salmonella*

2.1 Découverte et nomenclature

La bactérie *Salmonella* a été découverte dans les années 1800. En effet, *Salmonella* a été identifiée pour la première fois par Sohlerin en 1839 (30). Quelques années plus tard, soit en 1880, Karl Eberth a isolé *Salmonella* chez l'humain pour la première fois dans de petites masses retrouvées dans le tissu lymphatique de la région de l'iléon et de la rate d'un patient mort de la fièvre typhoïde (30). À cette époque, la bactérie isolée était connue sous le nom de *Typhoid bacillus* (6). C'est seulement en 1900 que le nom *Salmonella* fut adopté pour se référer à ce genre bactérien en l'honneur du bactériologiste américain Dr Daniel Elmer Salmon (6). Les recherches de Salmon et de son professionnel de recherche, Theobald Smith, ont permis d'isoler cette bactérie de l'intestin des porcs pour la première fois en 1884, de la cultiver et de déterminer sa morphologie (6, 30). L'isolement de la bactérie chez d'autres espèces animales a été réalisé ultérieurement. En 1892, *Salmonella* Typhimurium a été isolée chez la souris par Loeffler (30) alors que *Salmonella arizonae* a été isolée de l'intestin des reptiles en 1939 par Caldwell et Ryerson (31).

La classification des bactéries faisant partie du genre *Salmonella* a évolué au cours des décennies suivant sa découverte. En 1944, Earle K. Borman, C. A. Stuart and Kenneth M. Wheele ont proposé de diviser les salmonelles en 3 espèces en fonction des antigènes présents chez la bactérie (32). La première espèce, *Salmonella choleraesuis*, était identifiée par la présence de l'antigène somatique VII et des antigènes flagellaires c ou 5 (ou les deux) selon le schéma de Kauffmann-White (32). La deuxième espèce, nommée *Salmonella typhosa*, était caractérisée par la présence de l'antigène IX (ou VI) ou de l'antigène flagellaire d selon le même schéma (32). Finalement, la dernière espèce, *S. kauffmannii*, englobait les bactéries du genre *Salmonella* n'appartenant à aucune des deux espèces précédentes (32). En janvier 2005, le nom *Salmonella choleraesuis* a été officiellement remplacé par *Salmonella enterica* à cause de la confusion causée par cette appellation (33). Actuellement, à partir de l'analyse de la séquence 16S de l'ADN ribosomal de ce genre bactérien, *Salmonella* est subdivisée en deux sous-espèces, à savoir *Salmonella bongori* et *Salmonella enterica* (6, 8). *Salmonella enterica* comporte six sous-espèces (Figure I) : *S. enterica* sous-espèce *enterica* (I), *S. enterica* sous-espèce *salamae* (II), *S. enterica* sous-espèce *arizonae* (IIIa), *S. enterica* sous-espèce *diarizonae* (IIIb), *S. enterica* sous-espèce *houtenae* (IV); *S. enterica* sous-espèce *indica* (VI) (6, 34). Cependant, *S. bongori* ne contient qu'une sous-espèce (V) qui peut être retrouvée principalement chez les animaux à sang froid, mais aussi dans l'environnement (6, 33, 34). Les sous-espèces sont ensuite subdivisées en sérotypes. Selon le schéma standard de Kauffmann-White, plus de 2600 sérotypes de *Salmonella* dans le monde ont été identifiés, dont plus de 1500 appartenant à la sous-espèce *S. enterica* sous-espèce *enterica* (Figure I) (6, 8, 9). Les sérotypes (ou

sérovars) sont généralement caractérisés par une spécificité d'hôte et peuvent caractériser les symptômes cliniques observés chez l'hôte (35).

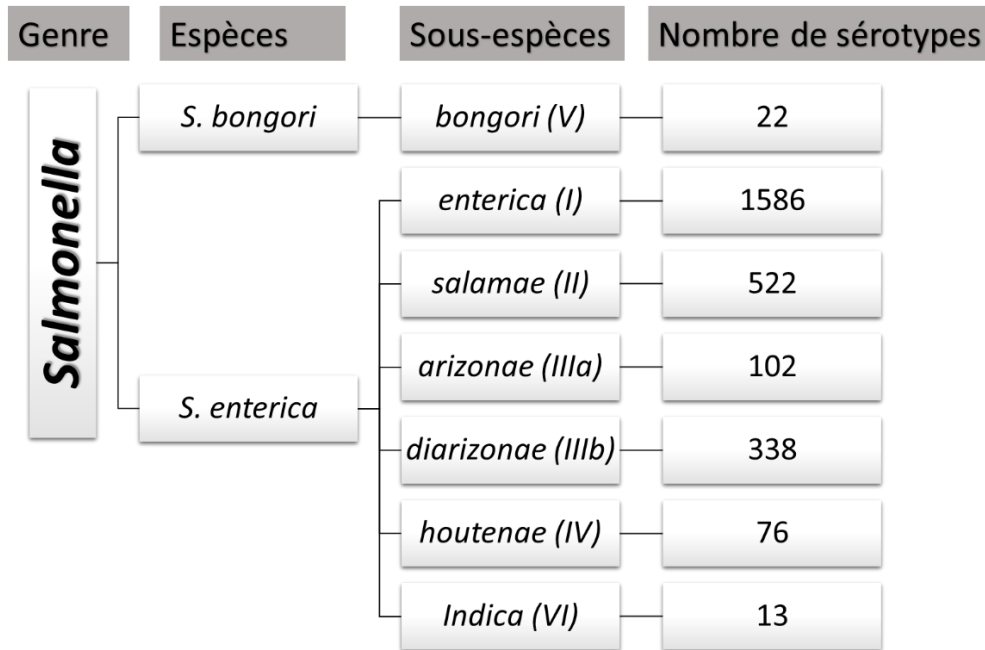


Figure I: Classification des espèces et des sous-espèces de *Salmonella* (36).

2.2 Caractéristiques

La bactérie *Salmonella* est un bacille à Gram négatif, motile et non-sporulant faisant partie de la famille des *Enterobacteriaceae* (5, 6). Elle mesure 2-3 µm de longueur et 0,4-0,6µm de largeur. La croissance optimale de *Salmonella* requiert un environnement avec une température de 35 à 37°C, un pH de 6,5 à 7,5, et une activité de l'eau (a_w) de 0.99 (9). Cependant, la bactérie peut survivre à des températures allant de 5 à 50°C (9).

La paroi cellulaire de *Salmonella* comporte une membrane externe et une membrane cytoplasmique séparées par une couche de peptidoglycane (37). Cette paroi est composée

de lipoprotéines, de lipides, de polysaccharides et de protéines (Figure II.) (6). En effet, la membrane externe est une bicouche hydrophobe contenant des molécules de lipopolysaccharide (LPS), des phospholipides et des protéines de surface comme celles formant des pores (37). La membrane interne quant à elle est une bicouche phospholipide contenant plusieurs enzymes responsables du métabolisme énergétique de *Salmonella* (37). Le peptidoglycane, composé de disaccharides répétitifs de N-acétylglucosamine (GlcNAc) et d'acide N-acétylmuramique (MurNAc) qui sont modifiés avec un peptide variable, soutient la structure et la fonction de la paroi cellulaire (38). De plus, la réticulation établie par la couche de peptidoglycane est essentielle pour maintenir une bonne intégrité de la paroi cellulaire (38). La paroi cellulaire de *Salmonella* contient aussi des endotoxines impliquées dans les réactions biologiques ou la virulence de la bactérie (6). Ses caractéristiques biochimiques sont résumées dans le Tableau I. Finalement, le genre *Salmonella* compte 46 antigènes somatiques (O) et 114 antigènes flagellaires (H) différents (36). La combinaison des antigènes O et H permet de définir le sérotype de la bactérie.

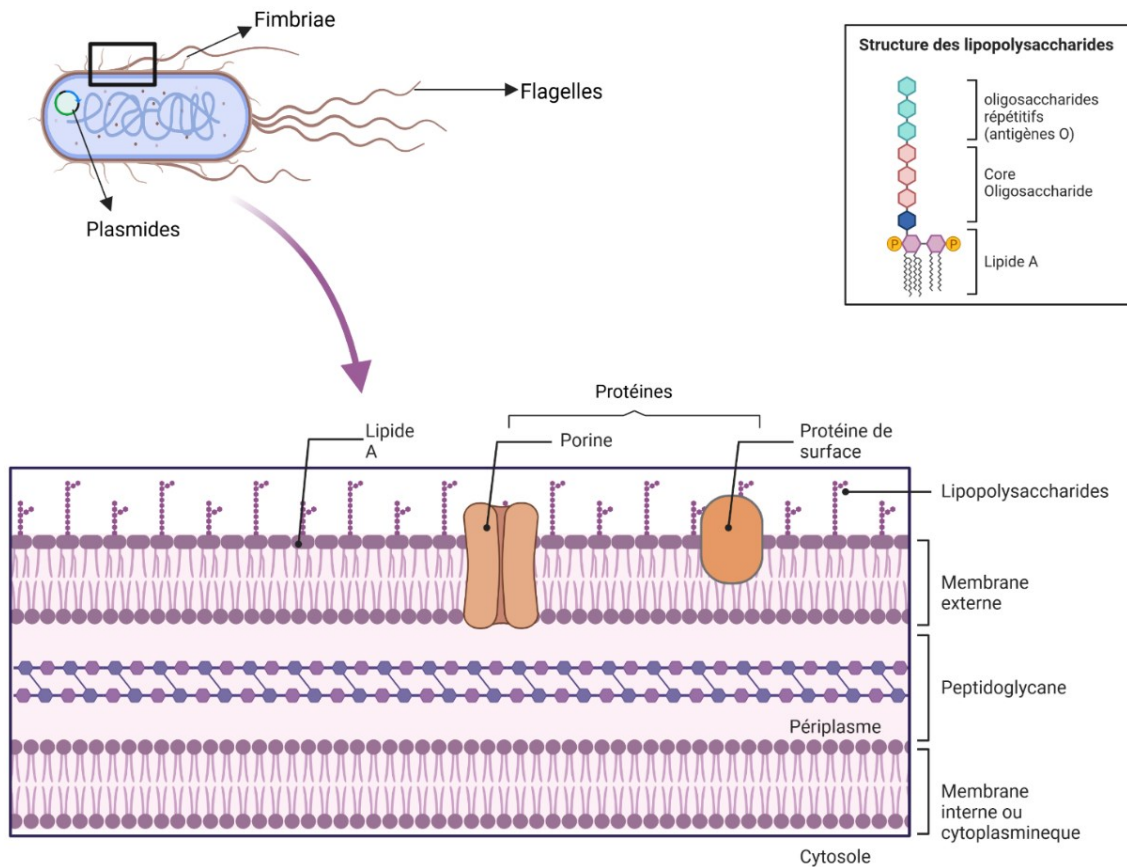


Figure II: Représentation de la couche extracellulaire des bactéries à Gram négatif (image préparée par le logiciel Biorender).

Tableau I : Caractéristiques biochimiques générales de *Salmonella* (6, 39).

Caractéristiques	Résultats
Citrate	Positif
Glucose	Positif
H ₂ S	Positif à l'exception de <i>S. Typhimurium</i>
Indole	Négatif
Lactose	Négatif à l'exception des <i>S. arizonae</i>

Caractéristiques	Résultats
Lysine décarboxylase	Positif
Malonate	Négatif à l'exception des <i>S. arizonae</i>
Oxydase	Négatif
Réduction du nitrate	Positif
Sucrose	Négatif
Uréase	Négatif

2.3 Méthodes d'isolement et d'identification

2.3.1 Techniques conventionnelles (culture bactérienne)

Les méthodes décrites dans la littérature scientifique et utilisées pour l'isolement de *Salmonella* spp. peuvent varier en fonction du type d'échantillon (39). Cependant, selon l'Organisation internationale de normalisation (ISO), les méthodes conventionnelles pour détecter la présence de *Salmonella* peuvent généralement être divisées en trois étapes qui sont l'isolement, l'identification et la désignation du sérovar de la bactérie (5). Ces étapes sont aussi résumées par l'Association française de normalisation (AFNOR) dans la norme NFU 47-102 (Figure III).

L'isolement de la bactérie chez les mammifères commence généralement par un pré-enrichissement non sélectif dans un milieu nutritif (l'eau peptonée tamponnée (EPT)). Cette étape favorise la croissance et la multiplication des salmonelles ainsi que la restauration de bactéries affaiblies (5). Cette étape est suivie par un enrichissement sélectif permettant de favoriser la croissance de *Salmonella* en inhibant la croissance d'autres bactéries. Cette étape se réalise en utilisant des milieux contenant des composés inhibiteurs

comme les sels biliaries, le thiosulfate, ou la novobiocine (40). Les milieux sélectifs généralement utilisés pour l'isolement de *Salmonella* sont : le bouillon à base de tétrathionate et milieu liquide ou semi-solide Rappaport Vassiliadis (RVS ou MSR) ou le bouillon à base de selenite F, le milieu xylose lysine désoxycholate (XLD) et la gélose Brilliant Green (BGA) (5). Les étapes suivantes consistent en l'identification de la bactérie par des réactions biochimiques, la PCR ou la spectroscopie. Pour les réactions biochimiques, des milieux comme le Triple Sugar Iron (TSI), le Lysine Iron Agar (LIA) et l'urée sont souvent utilisés pour l'observation des réactions biochimiques caractérisant la croissance de *Salmonella* spp. (Tableau I) (39).

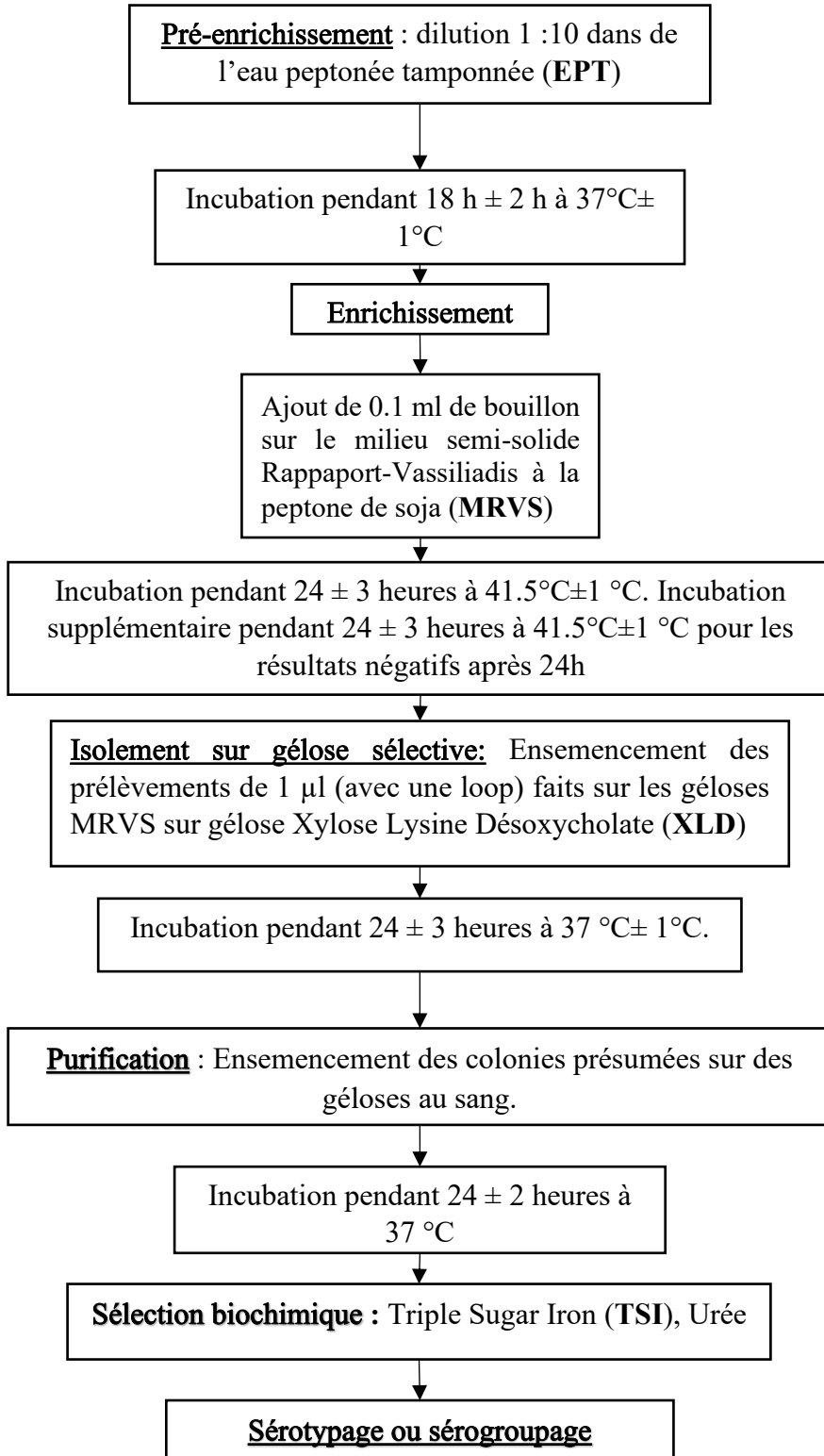


Figure III: Visualisation des méthodes de détection et d'identification de *Salmonella* selon la méthode de l'Organisation internationale de normalisation (ISO) (41).

2.4 Caractérisation génétique de *Salmonella*

Les méthodes moléculaires de classification des sérotypes de *Salmonella* n'ont pas cessé d'évoluer au cours des dernières décennies (Figure IV). Ces méthodes incluent le sérotypage classique par la méthode de White–Kauffman, l'électrophorèse en gel à champ pulsé (PFGE), l'analyse du nombre variable de locus multiples en tandem (MLVA), le typage génomique multilocus (MLST), la réaction de polymérisation en chaîne, le séquençage complet du génome (WGS ou SCG) et le CRISPR (42). La PCR et le SCG étant les deux méthodes utilisées dans cette étude, ils seront développés dans les sections 2.4.1 et 2.4.2.

La classification des sérotypes de *Salmonella* selon le schéma de Kauffmann et White consiste en l'utilisation de la technique d'agglutination, basée sur une combinaison d'antigènes somatiques O et flagellaires H, exprimés par la bactérie, pour la détection des sérotypes (43, 44). Pour cela, les colonies bactériennes isolées et purifiées, lorsque présentées à l'antisérum (O et/ou H), s'agglutinent selon les antigènes présents et exprimés chez la bactérie. Une variété de sérum sont disponibles commercialement (ex. OMA, OMB, OMC pour les antisérums O et HMA, HMB, HMC and H1 pour les antisérums H) (44). L'interprétation des résultats se fait grâce au tableau White-Kauffmann Le Minor qui renferme le profil des antigènes relatif aux sérotypes. Bien que le prix de cette méthode soit abordable, elle peut fournir une classification erronée pour les sérotypes rares et inhabituels de *Salmonella* et requiert plusieurs jours (42).

D'un autre côté, la technique PFGE a été utilisée pour identifier des sous-espèces de *Salmonella*, mais elle a aussi permis de déterminer la source des isolats et de construire la carte génétique du chromosome de la bactérie en obtenant des informations pertinentes à partir de l'ADN (45, 46). Cette technique implique la culture de cellules bactériennes, suivie par la libération de l'ADN des cellules en utilisant un mélange d'enzymes et de détergents (45). L'ADN est ensuite incubé avec des enzymes de restriction pour couper l'ADN afin d'identifier des séquences spécifiques de la bactérie. Ensuite, la longueur des fragments d'ADN obtenus suite à l'incubation sera déterminée par la vitesse de migration sur un gel d'agarose, ce qui permettra de déterminer l'empreinte génétique qui est distincte entre deux souches bactériennes (47).

Le MLVA est une technique utilisée pour générer une empreinte génétique d'ADN de la bactérie. Le MLVA consiste en une PCR pour détecter les ensembles de répétition tandem de nombre variable (VNTR) dans les cellules bactériennes (47). La taille des produits PCR est ensuite déterminée en utilisant une électrophorèse capillaire (47). La sortie de données, appelée électrophérogramme, montre l'ADN standard (ou de référence) en rouge et les tailles de produit PCR en bleu, vert et noir (47). Les tailles des produits PCR sont converties en types d'allèles en utilisant un logiciel spécial pour déterminer les ressemblances génétiques (47). Le MLVA requiert un protocole spécifique à chaque sous-espèce (47-49).

La MLST a été développée pour reconnaître les relations évolutives de *Salmonella* et déterminer les distributions des isolats clonaux dans divers environnements et hôtes (50). C'est une méthode adaptée pour les enquêtes épidémiologiques à long terme et pour évaluer la répartition mondiale des isolats selon leur génotype (51). La MLST est basée sur le principe de l'électrophorèse enzymatique multi-locus. Cette dernière consiste au

séquençage, par amplification, de régions d'ADN provenant de certains gènes de ménages pour caractériser une population bactérienne comme *Salmonella* (51). La variation des séquences, qui se traduira en différence allélique, est ensuite utilisée pour distinguer les différentes souches du genre bactérien (51).

Finalement, le CRISPR se définit comme des répétitions palindromiques courtes de séquence d'ADN regroupées et régulièrement espacées (52). Les loci CRISPR constituent une famille de séquences d'ADN répétées (53). Ces loci se distinguent par des répétitions directes (DR) d'ADN couvrant 24 à 47 paires de bases (bp) qui sont séparées par des séquences variables de 21 à 72 paires de bases (53). La présence des loci CRISPR et les séquences variables permettent de discriminer les bactéries ou même de discriminer les sérotypes d'un même genre bactérien. Chez *Salmonella*, les loci CRISPR1 et CRISPR2 sont séparés par moins de 20 kb (52) et les séquences séparant les DR peuvent varier de 1 à 55pb pour CRISPR-1 et de 0 à 32pb pour CRISPR-2 (52). Les polymorphismes CRISPR ont le potentiel d'être utilisés dans les laboratoires de microbiologie clinique et de santé publique pour le sous-typage en temps réel de certains sérotypes comme *S. Typhimurium* et pour la comparaison rapide des isolats de *Salmonella* (52). Toutefois, il manque des informations permettant d'identifier les sérotypes peu fréquents comme *S. diarizonae*.

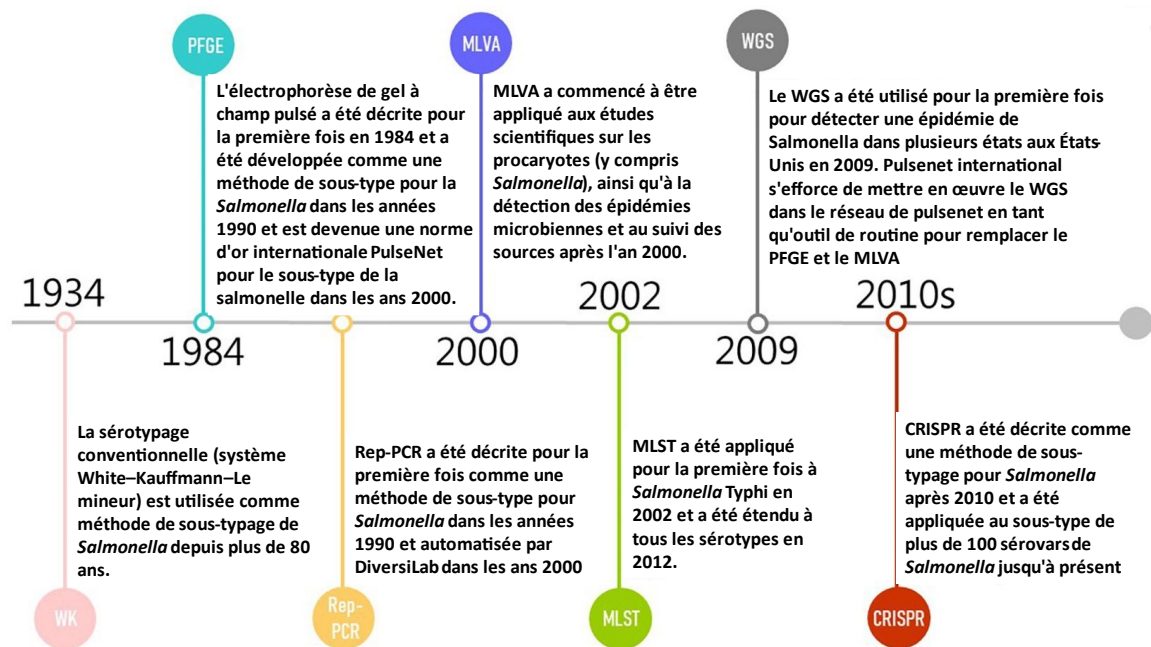


Figure IV : Chronologie de l'élaboration des méthodes sélectionnées pour la caractérisation moléculaire de *Salmonella* (42). MLVA; analyse du nombre variable de locus multiples en tandem; WGS; Whole genome sequencing (ou SCG en français); MLST; typage génomique multilocus.

2.4.1 Réaction de polymérisation en chaîne (PCR)

La réaction de polymérisation en chaîne (PCR) est utilisée aussi bien en diagnostic pour la détection d'un microorganisme dans un échantillon, que pour l'identification d'une bactérie après isolement en raison de la spécificité de cette technique (43). Ainsi, l'identification de *Salmonella* par les tests biochimiques est généralement suivie d'une PCR visant l'amplification du gène *invA* codant pour une protéine impliquée dans l'invasion de cellules épithéliales de l'hôte. En effet, chez *Salmonella*, le gène *invA* est un gène de ménage indicatif du genre puisqu'il existe chez tous les sérotypes de *Salmonella*, mais n'a pas de relation homologue avec d'autres bactéries (54). Toutefois, la PCR ne permet pas de différencier les bactéries vivantes de celles qui sont mortes (43). En outre, la PCR multiplex a été utilisée pour l'identification de *Salmonella* dans des échantillons. C'est une méthode qui permet

l'amplification et l'analyse de plusieurs gènes en même temps (55). Cette méthode permet de discriminer entre certains sérotypes de *Salmonella*. Par exemple, Xiong et al. ont mis au point une technique de PCR multiplex permettant d'identifier *S. Enteritidis*, *S. Pullorum/S. Gallinarum* et *S. Dublin* en ciblant 3 gènes simultanément (*tcpS*, *lygD* et *flhB*) (56). Le gène *tcpS* n'existe que chez ces 3 sérotypes, alors que les gènes *lygD* et *flhB* ne sont présents que chez respectivement *S. Enteritidis* et *S. Pullorum/S. Gallinarum* (56). La PCR multiplex est aussi utilisée pour l'identification des sous-espèces de *Salmonella*. En effet, cette technique a été utilisée par Lee et al. pour l'identification des différentes sous-espèces de *Salmonella* chez les reptiles en particulier (57). Leur méthode consiste à cibler six gènes (*invA*, *fljB*, *stn*, *mdcA*, *gatD* et *STM4057*) dont les différentes combinaisons obtenues permettent d'identifier les différentes sous-espèces de *Salmonella* (Tableau II). Les gènes *fljB*, *stn*, *mdcA*, *gatD* et *STM4057* codent respectivement pour la flagelline phase 2, l'entérotoxine de *Salmonella*, le malonate décarboxylase, le galactitol-1-phosphate déshydrogénase et la protéine putative de la membrane interne (57).

Tableau II: Identification des sous-espèces de *Salmonella* par PCR multiplex (57).

Gènes ciblés	I (<i>enterca</i>)	II (<i>salamae</i>)	IIIa (<i>arizonae</i>)	IIIb (<i>diarizonae</i>)	IV (<i>houtenae</i>)	V (<i>bongori</i>)
<i>fljB</i>	d	d	-	d	-	+
<i>mdcA</i>	-	+	+	+	-	-
<i>gatD</i>	+	+	-	-	-	+
<i>stn</i>	+	+	+	d	+	-

STM4057	+	-	-	-	-	-
<i>invA</i>	+	+	+	+	+	+

d : positif ou négatif

2.4.2 Séquençage du génome complet (SGC) ou « Whole Genome Sequencing » (WGS)

Le séquençage du génome complet (SGC) est une méthode fréquemment utilisée à l'échelle mondiale pour la caractérisation de divers microorganismes à la fois en médecine humaine et vétérinaire. En effet, ces dernières années, le coût de cette technologie a considérablement diminué et elle devient de plus en plus accessible pour une utilisation de routine dans les laboratoires de diagnostic et de recherche (58). Il s'agit d'une méthode moléculaire pouvant être utilisée pour l'identification des différents sérotypes de *Salmonella* en se basant sur la séquence complète de l'ADN bactérien (59). Trois outils ont été développés pour l'identification de *Salmonella* basé sur le SGC qui sont le *Salmonella* in silico Typing Resource (SISTR), le Sero-Seq, et le in silico 7-gene MLST ST (Multilocus Sequence Typing Sub-Typing) qui a été généré à l'aide de la plate-forme SISTR (60). De plus, le SGC permet d'obtenir des informations sur le bagage génétique du microorganisme comme les éléments codant pour la virulence et la résistance aux antimicrobiens des souches séquencées (40, 59). Cette approche a également été utilisée avec succès pour caractériser l'évolution des sous-espèces et des sérotypes de *Salmonella* en permettant la surveillance épidémiologique et le regroupement géographique des isolats appartenant à un même sérotypes (61). Le perfectionnement du SGC avec le « next generation sequencing » (NGS) permet l'utilisation de la technique au-delà de

l'identification bactérienne. Par exemple, la comparaison du génome de l'organisme exposé à différents environnements afin d'identifier la variation génétique de la bactérie dans certaines conditions, et ainsi, de déterminer les fonctions de ces gènes (61).

2.5 Pathogénicité

La bactérie *Salmonella* est une préoccupation en santé animale et publique. Elle serait responsable de 93.8 millions de cas cliniques et de 155,000 morts par année à l'échelle mondiale chez les humains (62). La dose infectieuse de *Salmonella* chez l'humain varie de 10^3 à 10^6 bacilles, cette dose étant principalement influencée par le statut immunitaire de l'hôte infecté. La période d'incubation de la maladie humaine peut varier selon que le sérotype en cause soit typhique ou non-typhique et selon la quantité d'inoculum ingéré (63). Les infections causées par *Salmonella* en médecine humaine sont classées en deux groupes : les salmonelloses typhiques et les salmonelloses non-typhiques. Le premier groupe comprend des sérotypes plus invasifs, soit les sérotypes Typhi et Paratyphi qui causent respectivement la fièvre typhoïde et la fièvre paratyphoïde (6). Ces sérotypes causent 20 millions de cas dont 220 000 morts par année à l'échelle mondiale, mais se limitent principalement aux pays du sud-est de l'Asie, de l'Amérique du Sud et de l'Afrique (64). Le second groupe (i.e., salmonelloses non-typhiques) comprend les sérotypes qui causent généralement une gastroentérite caractérisée par des signes cliniques comme la diarrhée, des crampes abdominales et des vomissements (6). Dans ces cas, les symptômes débutent entre 24 à 72 heures après l'ingestion de la bactérie (63). Bien que moins invasif, ce dernier groupe est l'une des 4 causes majeures de diarrhées chez les humains dans le monde. En effet, les *Salmonella* non-typhiques causent 78 millions d'infections, 59 000 décès et la perte de plus de 4 millions d'années de vie corrigées de l'incapacité chez les

humains (65). Dans 3 à 10% des cas, une salmonellose non-typhique peut causer une bactériémie qui peut entraîner d'autres complications, comme une endocardite, un choc septique, une infection du foie, de la rate, des voies biliaires et des voies urinaires, une lymphadénite mésentérique, une pneumonie, une ostéomyélite, un abcès pulmonaire ou cérébral, un empyème, une méningite et parfois la mort (66). Le risque de mortalité dans le cas d'une salmonellose dépend fortement du système immunitaire de l'hôte et de la virulence de la souche qui cause l'infection (36).

De façon générale, la salmonellose se manifeste chez les animaux de 4 façons : l'entérite, la septicémie, l'avortement et le portage asymptomatique (7). De plus, certains sérotypes pathogènes pour l'humain, comme les sérotypes Typhi et Paratyphi, ne représentent aucun danger pour les animaux. Cependant, d'autres sérotypes peuvent causer des infections avec des symptômes similaires à la fièvre typhoïde ou paratyphoïde chez certains animaux. C'est le cas d'une colonisation par *S. Enteritidis* ou *S. Typhimurium* chez la souris (67). Le sérotype *S. Choleraesuis* peut causer une infection paratyphoïde chez le porc (36). D'autres sérotypes peuvent causer des infections systémiques chez des animaux comme *S. Abortusovis* qui cause l'avortement et des mort-nés chez les ovins, *S. Dublin* qui cause l'anorexie, l'avortement ou la mort chez les bovins ainsi que *S. Gallinarum* qui cause la typhose aviaire chez la volaille (67, 68). D'autres sérotypes pathogènes pour les ovins seront discutés dans la section 2.7 ci-dessous.

2.6 Virulence

2.6.1 Facteurs de virulence

La pathogénicité de *Salmonella* dépend de sa virulence qui est assurée par différents facteurs nommés facteurs de virulence. Ces derniers assurent l'invasion des cellules de

l'hôte ainsi que la survie et la réplication de la bactérie dans ces cellules (69). Ces différents facteurs de virulence sont représentés par : la capsule (VI), les flagelles, les fimbriae, les ilots de pathogénicité, le lipopolysaccharides (LPS), les plasmides de virulence et les toxines (36).

2.6.2 Antigène capsulaire (VI)

Chez *Salmonella*, il existe deux types de polysaccharides capsulaires : la capsule Vi (également connue sous le nom d'antigène Vi) produite par *Salmonella* sérovar Typhi et la capsule O-Antigen produite par *Salmonella* non-typhique (66). La première est codée par l'îlot de pathogénicité 7 (SPI-7) (40, 70). Elle est composée de résidus d'acides N-acétylgalactosaminuronique liés au α -1,4 O-acétylgalactosaminuronique et est fixée à la surface cellulaire via une structure lipidique terminale réductrice (66). Elle diminue l'efficacité du système immunitaire de son hôte en masquant les molécules de lipopolysaccharide (LPS) et en empêchant l'adhésion des immunoglobulines M (IgM) à la surface de la bactérie, ce qui entrave la réponse inflammatoire et interfère avec la détection de la bactérie par les récepteurs de reconnaissance des agents pathogènes par le système immunitaire (66, 70). Par conséquent, la présence de l'antigène Vi empêche l'afflux de neutrophiles et permet à la bactérie de se disséminer par voie systémique afin de provoquer une bactériémie (66). La capsule O-antigène quant à elle est coréglée avec les fimbriae pour former une partie de la matrice extracellulaire de la bactérie (66). Elle constitue la couche la plus exposée du LPS qui est un assemblage modulaire d'unités oligosaccharidiques qui peuvent varier en fonction de la composition en sucres, ainsi que du nombre de leurs répétitions modales. Elle participe à la résistance de la bactérie à la dessiccation et à sa persistance dans l'environnement (66, 71). En effet, cet antigène

capsulaire est exprimé lorsque la bactérie est dans un environnement ayant des températures extrêmes, différentes de sa température de croissance optimale (66).

2.6.3 Fimbriae

Les fimbriae jouent un rôle important dans l'adhésion et l'invasion des cellules de l'hôte par *Salmonella* (36, 72). De plus, il a été rapporté que les fimbriae sont impliqués dans la formation de biofilms, la séroconversion, l'hémagglutination et l'interaction avec les macrophages de l'hôte (73). En se basant sur leur biogénèse, il existe 3 types de fimbriae chez *Salmonella* : les fimbriae de type IV, les fimbriae de type chaperon-placier et les fimbriae de type nucléation/précipitation (73). Il existe 38 regroupements de gènes spécifiques des fimbriae chez *Salmonella* dont les différentes distributions sont spécifiques à chaque espèce, sous-espèces et sérotype (73). De ce fait, l'identification des fimbriae chez un isolat participe à la différenciation des différentes souches de *Salmonella*. Par exemple, les fimbriae de type IV ne sont présents que chez *S. bongori* et les sérotypes Heidelberg, Typhi et Paratyphi de la sous-espèce *S. enterica*, avec une différence spécifique aux sous-unités retrouvées chez chacun (36, 72, 73). Parallèlement, des fimbriae de type chaperon-placier sont présents chez *S. Enteritidis* principalement (36, 72, 73).

2.6.4 Flagelles

Les flagelles sont composés de 3 parties : une partie basale qui traverse la paroi cellulaire et la membrane cytoplasmique, un long filament externe et une partie flexible qui sert de connexion entre les deux parties (74). Il est nécessaire pour la bactérie d'avoir plus de 70 gènes pour assurer la formation et le fonctionnement du flagelle, ce qui constitue une charge génomique importante (75). Les flagelles permettent le déplacement de la bactérie vers sa cible (motilité) et permettent une induction de la réponse immunitaire de l'hôte

(36). Ils font partie des « pathogen-associated molecular patterns (PAMPS)» qui stimulent la reconnaissance, la stimulation et l'invasion du système immunitaire de l'hôte par le microorganisme (74). En effet, chaque flagelle est constitué de 10 000 flagellines qui permettent aux cellules hôtes de déclencher une réponse immunitaire contre la bactérie (75). Chez *Salmonella*, le flagelle participe aussi à l'identification des différents sérotypes grâce à la présence de l'antigène flagellaire (H) (63).

2.6.5 Ilots de pathogénicité (ou SPIs pour *Salmonella* Pathogenicity Islands)

Les ilots de pathogénicité sont des blocs d'éléments génétiques (loci) retrouvés dans le chromosome de la bactérie qui codent pour des gènes responsables de la virulence de cette dernière et qui lui permettent d'endommager les cellules de l'hôte (36). En effet, 24 îlots de pathogénicité (SPIs) ont été identifiés chez *Salmonella* dans la littérature scientifique (36). Ces derniers sont impliqués dans l'expression des systèmes de sécrétion, des fimbriae, des flagelles et des capsules ainsi que dans la colonisation de l'hôte et la survie de la bactérie dans les cellules de l'hôte (36). Parmi ces ilots de pathogénicité, SPI-1 et SPI-2 ont été largement étudiés. Ces 2 ilots de pathogénicité codent pour les systèmes de sécrétion de type 3 (respectivement T3SS-1 et T3SS-2) qui participent à la colonisation des cellules épithéliales de l'intestin par *Salmonella* (76). En effet, le T3SS fonctionne comme une seringue moléculaire qui injecte les facteurs de virulence dans le cytosol de la cellule de l'hôte afin d'établir l'infection (77). Le SPI-1 consiste en une région de 40 Kb et inclut 39 gènes qui codent pour le T3SS-1, ses régulateurs ainsi que ses protéines effectrices (76). Il a un rôle majeur dans la colonisation et l'invasion des cellules épithéliales (70). Le SPI-2 est de 40 Kb et est impliqué dans la réplication et la survie intracellulaire de la bactérie (40, 69). Cette dernière implique le positionnement, le maintien et la régulation intracellulaire

de la vacuole contenant *Salmonella* (VCS) ainsi que la formation du *Salmonella-induced filaments* (SIFs) (69). Le SCV et le SIFS assurent la survie de *Salmonella* dans les cellules phagocytaires et non phagocytaires grâce à son rôle dans l'apport de nutriments à la cellule et dans la prolifération bactérienne (69).

2.6.6 Lipopolysaccharide (LPS)

Les lipopolysaccharides (LPS) sont des éléments importants dans la composition de la membrane externe de *Salmonella*. Ils forment une couche glycolipidique qui constitue majoritairement la couche externe de *Salmonella* (78). Ils sont composés de 3 couches : une partie lipidique interne (Lipid A), l'oligosaccharide au milieu et l'antigène O qui est la partie externe et variable des LPS (70). La longueur de l'antigène O peut varier en fonction de la température et de la concentration de fer dans le milieu bactérien (70). Le type d'antigène O est utile pour l'identification des différents sérotypes de *Salmonella*. Par exemple, l'antigène O varie entre les sérotypes *S. Paratyphi*, *S. Typhi* et *S. Typhimurium* (respectivement O2, O9 et O4) (70). En plus d'assurer son intégrité structurelle, les LPS permettent à la bactérie de coloniser l'intestin, de résister aux macrophages et de moduler la réponse immunitaire humorale de l'hôte (70). Ils participent à la virulence de la bactérie grâce à la sécrétion de toxines (79), ce qui sera discuté dans la section Toxines ci-dessous.

2.6.7 Plasmides de virulence

Des plasmides de virulence peuvent être retrouvés chez certaines souches de *Salmonella* appartenant aux sérotypes suivants, à savoir : Abortusovis, Abortusequi, Choleraesuis, Dublin, Enteritidis, Gallinarum/Pullorum, Paratyphi C, Sendai et Typhimurium (36). La présence des plasmides de virulence est généralement corrélée à une augmentation de la virulence chez ces souches (36). Les plasmides peuvent coder entre autres pour des

effecteurs modifiant le cytosquelette des cellules hôtes, pour des fimbriae ou pour la résistance aux antimicrobiens (36). Certains plasmides sont aussi impliqués dans la régulation des gènes de virulence. En effet, le gène plasmidique *Hha* retrouvé chez les SASd est impliqué dans la régulation des gènes acquis horizontalement ainsi que dans la régulation des gènes de virulence chez les *Enterobacteriaceae* (80). De plus, chez *Salmonella*, la protéine exprimée peut entraîner la mort cellulaire chez son hôte (80).

2.6.8 Toxines

La bactérie *Salmonella* produit à la fois des endotoxines et des exotoxines. L'endotoxine, la partie lipidique des LPS (lipide A) de *Salmonella*, provoque une diversité de réponses biologiques à la fois *in vivo* et *in vitro* (79). En effet, il a été rapporté que le lipide A seul peut être responsable de la pyrogénicité et de l'endotoxicité (81). Les exotoxines quant à elles peuvent être subdivisées en deux groupes : les cytotoxines et les entérotoxines. Les cytotoxines sont connues pour leur capacité à provoquer la mort cellulaire chez les mammifères (79). La cytotoxine sensible à la chaleur et à la trypsine peut être retrouvée chez *S. Choleraesuis*, *S. Enteritidis* et *S. Typhi*, mais la charge moléculaire de celle-ci varie en fonction des sérotypes (79). Une autre cytotoxine retrouvée chez *S. Typhi* est la toxine typhoïde, aussi connue sous le nom de toxine cytolétale distendant (CDT) (82). Elle a été détectée chez une douzaine de sérotypes non typhiques et est connue pour sa capacité à bloquer le cycle cellulaire chez son hôte, jusqu'à l'apoptose (82). L'entérotoxine la plus étudiée chez *Salmonella* est l'entérotoxine sensible à la chaleur codée par le gène *stn* (79). Ce gène est fréquent chez les sérotypes de *Salmonella* et contrairement aux autres toxines mentionnées, la présence du gène ne dépend pas de la sous-espèce ou du sérotype de la bactérie (83). De plus, quand le gène présent est

exprimé, la toxine n'est pas toujours sécrétée dans le milieu extracellulaire de la bactérie, ce qui rend la détection des *Salmonella* entérotoxigènes difficile (83). Le gène *stn* est impliqué dans la réplication de la bactérie et dans l'apparition des signes cliniques comme la diarrhée (79, 84).

2.6.9 Autres facteurs de virulence

D'autres facteurs peuvent contribuer à la virulence de *Salmonella*. En effet, certaines sous-espèces comme *S. enterica*, *S. arizonae*, *S. diarizonae* et *S. salamae* ont la capacité de former des biofilms, ce qui augmente leur persistance et leur résistance aux antimicrobiens (85, 86). Toutefois, *S. enterica* sous-espèce *salamae* est la plus apte à former des biofilms grâce à la production de cellulose et de « curli fimbriae » qui forment un réseau hydrophobe couvrant la matrice du biofilm, permettant ainsi la formation et la survie du biofilm sur des surfaces biotiques ou abiotiques (85). Chez *Salmonella*, la cellulose permet aussi la communication intercellulaire sur une longue distance, ce qui est bénéfique dans la formation de biofilm, mais augmente la sensibilité au chlore (85).

2.7 Sous-espèces et sérotypes retrouvés chez les ovins

2.7.1 Généralités chez les ovins

2.7.1.1 Sheep Associated Salmonella diarizonae (SASd)

Bien que la sous-espèce *S. enterica* soit souvent attribuée généralement à l'homme et aux animaux à sang chaud et que les autres sous-espèces soient attribuées aux animaux à sang froid, il est possible d'isoler les sous-espèces *arizonae*, *diarizonae* et *salamae* des animaux à sang chaud comme les ovins (87). En effet, le sérotype 61 k:1, 5, (7) de la sous-espèce *S. diarizonae*, connu sous le nom de *Salmonella arizonae* sérotype 61 :K:1,5,(7) dans les années 1900, est en général la sous-espèce la plus souvent détectée dans les amygdales des

ovins en santé et est fréquemment rapportée comme étant le sérotype de *Salmonella* le plus prévalent dans les échantillons de fèces de ces animaux (7, 10). Ce sérotype est fréquemment isolé chez les ovins dans des pays européens et asiatiques, en Australie et aux USA (10). Aussi connu sous le nom de « Sheep Associated *Salmonella diarizonae* (SASd) », ce sérotype est considéré adapté aux ovins et sa présence est souvent asymptomatique chez ces animaux (10, 87). Toutefois, il est aussi isolé à la suite de cas d'avortements, de rhinites, d'orchites ou lors d'inflammation de l'intestin chez les ovins (10, 87). Ces cas d'infection surviennent généralement après une situation de stress (transport des animaux, changement alimentaire, etc.) (87). De plus, une étude expérimentale a rapporté que l'ingestion du SASd par les ovins durant les premières semaines de vie peut causer une abomasite avec présence sous-épithéliale d'éosinophiles, de lymphocytes et de cellules plasmiques, le gonflement de la paroi intestinale ou une entérite fibrinohémorragique (88). Par ailleurs, le premier séquençage complet du génome de ce sérotype isolé chez les ovins en 2019 a permis de détecter la présence des îlots de pathogénicité SPI-1, SPI-2, SPI-3, SPI-4, SPI-5, SPI-9, SPI-12, SPI-13, SPI-18 (89), ainsi qu'un plasmide de virulence de 42,663 pb qui portait le gène codant pour la protéine modulatrice de l'hémolysine (*Hha*) (89). Par ailleurs, la présence majoritaire de SASd dans le microbiote des ovins est lié au fait que leur SPI-21 code pour des gènes synthétisant la pyocine qui a une activité antimicrobienne sur les autres les bactéries (87). Cependant, ce premier séquençage rapporte que la souche SASd est dépourvue du SPI-6 et du système de sécrétion T6SS impliqués dans l'invasion cellulaire et la survie au niveau des macrophages (87). Ce sérotype est peu rapporté dans les cas d'infections chez les humains, mais peut causer des cas de septicémie et de méningite ainsi que des infections endocervicales et des

infections du liquide cébrospinal, ainsi qu'une bactériémie et lymphadénite cervicale chez les enfants et les nouveau-nés (10). Chez les humains adultes, la gastroentérite et l'infection du sinus maxillaire peuvent être causés par la présence de cette sous-espèce (87). Elle peut être transmise aux humains par contact avec des animaux contaminés et via la consommation d'aliments contaminés 89(90) ce qui pourrait notamment impliquer les aliments d'origine ovine comme la viande et le lait.

Tableau III: Prévalence de *Salmonella* chez les ovins dans plusieurs pays et état clinique des animaux échantillonnés (10, 90-94) (95).

Pays	Prévalence des fermes ou des animaux positifs à <i>Salmonella</i> (type d'échantillon)	Taille d'échantillon	Sérotype identifié dans les échantillons	État clinique des animaux échantillonnés	Impact rapportée en santé humaine selon l'étude
Allemagne	82.2% (échantillon fécal)	90 fermes	<i>S.</i> IIIb 61:k:1,5,(7)	N/A	N/A
Espagne	90% (échantillon fécal et prélèvement nasal)	10 fermes	<i>S.</i> IIIb 61:k:1,5,(7)	N/A	N/A

Pays	Prévalence des fermes ou des animaux positifs à <i>Salmonella</i> (type d'échantillon)	Taille d'échantillon	Sérotype identifié dans les échantillons	État clinique des animaux échantillonnés	Impact rapportée en santé humaine selon l'étude
Éthiopie	48,5% (échantillon fécal)	165 agneaux (diarrhéiques)	N/A	N/A*	N/A
Suède	17,6% (échantillon fécal)	244 fermes	<i>S.</i> IIIb 61:k:1,5,(7)	N/A	N/A

Pays	Prévalence des fermes ou des animaux positifs à <i>Salmonella</i> (type d'échantillon)	Taille d'échantillon	Sérotype identifié dans les échantillons	État clinique des animaux échantillonnés	Impact rapportée en santé humaine selon l'étude
Suisse	80% des animaux positifs (échantillon nasal). 5% des animaux positifs (échantillon fécal)	31 animaux adultes	<i>S.</i> IIIb 61:k:1,5,(7)	Dyspnée, décharge nasale. Diarrhée	N/A

Pays	Prévalence des fermes ou des animaux positifs à <i>Salmonella</i> (type d'échantillon)	Taille d'échantillon	Sérotype identifié dans les échantillons	État clinique des animaux échantillonnés	Impact rapportée en santé humaine selon l'étude
USA	66,7% (tissu placentaire) 33,3% (tissu mammaire)	3 animaux adultes	<i>S.</i> IIIb 61:k:1,5,(7)	Avortement répétitif	N/A
USA	72,15% (échantillon fécal)	247 fermes	<i>S.</i> IIIb 61:k:1,5,(7)	N/A	N/A

N/A : n'a pas été rapporté; N/A* : ne peut pas être déterminé.

2.7.1.2 *Salmonella* Abortusovis

Un autre sérotype adapté et spécifique aux ovins est *Salmonella* Abortusovis de la sous-espèce *enterica* (4, 64). En effet, *S. Abortusovis* est le sérotype le plus rapporté dans les cas de salmonellose chez les ovins et entraîne des pertes économiques importantes dans ces élevages (4, 64). Il est endémique dans plusieurs pays asiatiques, européens et certains pays de l'Afrique et de l'Amérique latine, mais est peu rapporté en Amérique du Nord (4, 96-98). Toutefois, ce sérotype n'a pas été rapporté au Canada (96), bien qu'il soit une cause majeure d'avortements chez les ovins dans les pays asiatiques et européens (4). Dans un troupeau infecté, l'incidence de l'avortement varie entre 30% à 50% chez les brebis primipares ou les brebis nouvellement intégrées dans le troupeau (64, 98). Autre que l'avortement, la présence de *S. Abortusovis* chez les ovins se manifeste principalement par la mort des agneaux à la naissance et des infections postnatales chez les nouveaux nés (99). Ce sérotype cause cependant rarement des gastroentérites chez ces animaux (99). De plus, la présence de ce sérotype persiste jusqu'à 12 mois chez la brebis après son premier avortement (64). Sa présence dans un élevage doit être déclarée à l'Organisation mondiale de la santé animale (OMSA, fondée en tant qu'Office international des épizooties (OIE)) (99). Toutefois, la détection de ce sérotype peut être ardue à cause des difficultés pour l'isoler et de sa présence asymptomatique chez certains animaux (99). Par ailleurs, un vaccin constitué de *S. Abortusovis* inactivé s'est révélé efficace contre la forme virulente de ce sérotype chez les ovins (97). Le sérotype *S. Abortusovis* cause très rarement des infections chez les humains et semble avoir peu d'importance en santé publique (98).

2.7.1.3 Autres sérotypes

D'autres sérotypes de la sous-espèce *enterica* comme *S. Dublin*, *S. Typhimurium*, *S. Montevideo*, *S. Brandenburg* et *S. Indiana* peuvent causer des avortements chez les ovins infectés (4). Cependant, la prévalence de ces sérotypes est inférieure à la prévalence de SASd chez ces animaux (4). Certains de ces sérotypes, soit *S. Typhimurium* et *S. Indiana*, font partie des sérotypes les plus impliqués dans les cas de salmonellose chez les humains dans le monde (87). Le sérotype Newport est un autre sérotype important en santé humaine qui peut être présent dans le microbiote intestinal des ovins. En effet, une étude réalisée de 2013 à 2015 dans 4 abattoirs de la Turquie a démontré la présence des sérotypes Newport et Typhimurium dans 2% (n=200) des échantillons de fèces analysés (100) ce qui pourrait augmenter le risque de contamination de la viande destinée à la consommation humaine. Le sérotype Newport fait aussi partie des cinq sérotypes les plus rapportés dans les cas de salmonellose chez les humains globalement et est le troisième sérotype le plus prévalent dans les cas d'infection par *Salmonella* aux USA (101, 102). Finalement, *S. arizonae* est une autre sous-espèce rarement associée à des cas de salmonellose chez les ovins et chez l'homme, mais qui a parfois été isolée, avec une faible prévalence, dans les fèces et les produits laitiers provenant de ces animaux (103, 104). Sa présence chez les ovins est généralement asymptomatique chez les animaux en bonne santé, mais chez les animaux malades ou en état de stress (période de gestation, de mise-bas ou d'allaitement), cette sous-espèce peut entraîner un avortement, une gastroentérite ou une rhinite (104). La présence de *S. arizonae* est aussi problématique chez les humains immunodéprimés. En effet, cette sous-espèce est impliquée dans des cas de bactériémie, d'infection vasculaire ou du système nerveux central observés en médecine humaine (105). Ces cas d'infections ont

tous été observés chez des personnes (enfants ou adultes) immunodéprimées comme celles infectées par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) ou qui souffrent de maladies auto-immunes (105). La présence de ces différents sérotypes et sous-espèces de *Salmonella* chez les ovins indique qu'il pourrait être souhaitable de mettre en place un système de surveillance de cette bactérie qui sera bénéfique pour la protection de la santé humaine, mais aussi pour la santé ovine.

2.7.2 Au Canada

Au Canada, le sérotype SASd a été isolé de 10 fœtus ovins avortés ou mort-nés dans 4 fermes différentes de la Nouvelle-Écosse et de l'Île-du-Prince-Édouard en 1977 (106). L'analyse histologique de ces fœtus a révélé des lésions caractéristiques d'une placentite et d'une broncho-pneumonie (106). De plus, l'analyse des prélèvements vaginaux des brebis ayant avorté a démontré la présence de SASd jusqu'à 90 jours après l'avortement (106). Ce même sérotype a été rapporté plus tard, en 1989, en Alberta, chez des fœtus ovins avortés (107). Cependant, aucune lésion n'a été observée dans les tissus de ces fœtus. De plus, bien que le sérotype SASd était présent dans le troupeau en question, aucun des animaux n'était cliniquement atteint (107).

Une étude réalisée par Scott et al. de 2006 à 2008 en Ontario a rapporté la présence de *Salmonella* dans 1,5% (2/137) des échantillons fécaux prélevés des ovins (adultes et agneaux) des 50 fermes échantillonnées (108). Les deux sérotypes identifiés au cours de cette étude sont *S. Enteritidis* et *S. II Ib: 61:k1,5,(7)* (108). Cependant, aucun signe clinique associé à ces sérotypes n'a été rapporté chez les animaux échantillonnés. Toutefois, chez les humains, *S. Enteritidis* est un important pathogène. En effet, *S. Enteritidis* a été associée à 46,5% des cas d'éclosions d'origine alimentaire causées par *Salmonella* au Canada de

2008 à 2014 (109). Outre la gastroentérite généralement causée par ce sérotype chez les humains, les complications incluent la chorioamniotite, l'infection du fœtus, le choc septique (chez l'adulte ou le nouveau-né infecté lors de la grossesse), le syndrome de détresse respiratoire aiguë (SDRA) pendant la grossesse et l'avortement (110).

3 Les antimicrobiens en production ovine

L'utilisation des antimicrobiens chez les animaux d'élevage a commencé dans les années 50 (111). Ces molécules sont principalement utilisées à des fins prophylactiques, métaphylactiques, thérapeutiques (112).

3.1 Règlementation régissant l'utilisation des antimicrobiens chez les animaux d'élevage au Canada et au Québec

L'utilisation des antibiotiques chez les animaux est régie aussi bien au niveau fédéral qu'au niveau provincial. En effet, au niveau fédéral, Santé Canada a développé un système de classification des antimicrobiens selon leur importance en médecine humaine (Tableau IV) (113). Ce système de classification implique 4 catégories (I– très haute importance ; II – haute importance ; III– importance moyenne ; et VI– faible importance) et tient compte de l'indication thérapeutique de l'antimicrobien (par exemple, choix privilégié pour le traitement des infections humaines graves) et de la disponibilité des alternatives (par exemple, nombre limité de substituts disponibles) (113). En vertu d'un règlement canadien qui est entré en vigueur le 1^{er} décembre 2018, tous les antimicrobiens importants sur le plan médical (catégories I, II et III) utilisés chez les animaux d'élevage doivent faire l'objet d'une prescription vétérinaire afin d'en assurer un usage responsable (114). De plus, les indications d'usage comme facteurs de croissance ont été retirées des étiquettes de ces

antimicrobiens (115). En outre, certains antimicrobiens comme le chloramphénicol, ses sels et dérivés, les composés de 5-nitrofurane, ainsi que les composés de 5-nitro-imidazole sont interdits chez les animaux d'élevage au Canada (116).

Au niveau provincial, depuis février 2019, le gouvernement du Québec a interdit l'administration des antimicrobiens de catégorie I à des fins curatives chez les animaux de production si des traitements alternatifs sont disponibles (117, 118). De plus, la même réglementation interdit l'utilisation de ces antimicrobiens à des fins préventives chez les animaux d'élevage (117). Par ailleurs, certains secteurs de la production animale au Canada ont pris des initiatives permettant la réduction de l'utilisation prophylactique des antimicrobiens (119). En effet, l'industrie avicole a éliminé l'utilisation préventive d'antimicrobiens de catégorie I en 2014 et de catégorie II en 2018 (119, 120). Cette industrie se concentre maintenant sur la réduction de l'utilisation prophylactique des antimicrobiens de catégorie III (121).

Tableau IV: Catégorisation des antimicrobiens selon leur importance en médecine humaine (Santé Canada) (113).

Antimicrobiens par classe			
Très haute importance (I)	Haute importance (II)	Importance moyenne (III)	Faible importance (IV)
Carbapénèmes	Aminoglycosides (sauf agents topiques)	Aminocyclitols	Flavophospholipols
Céphalosporine-- de troisième et quatrième générations	Céphalosporine-- première et deuxième générations (et céphamycines)	Aminoglycosides (agents topiques)	Ionophores
Fluoroquinolones	Acide fusidique	Bacitracines	

Antimicrobiens par classe			
Très haute importance (I)	Haute importance (II)	Importance moyenne (III)	Faible importance (IV)
Glycopeptides	Lincosamides	Fosfomycine	
Glycylcyclines	Macrolides	Nitrofuranes	
Cétolides	Pénicillines	Phénicolis	
Lipopeptides	Quinolones (sauf fluoroquinolones)	Sulphonamides	
Monobactames	Streptogramines	Tétracyclines	
Nitroimidazoles (métronidazole)	Triméthoprime/sulfa méthoxazole	Triméthoprime	
Oxazolidinones			
Polymyxines (colistine)			
Combinaisons d'une pénicilline et d'un inhibiteur des β – lactamases			
Agents thérapeutiques antituberculeux			

3.2 Antimicrobiens utilisés chez les ovins au Québec

Au Canada, très peu d'antimicrobiens sont approuvés chez les ovins. En effet, seulement 13 antimicrobiens étaient homologués en production ovine au début des années 2000 (122). Selon le Centre d'expertise en production ovine du Québec (CEPOQ), en 2020, les antimicrobiens homologués en production ovine au Québec étaient au nombre de 8,

incluant le ceftiofur, le lasalocid sodique, la néomycine, l'oxytétracycline, la pénicilline, les sulfamides, les tétracyclines et la tilmicosin (Tableau V) (123). Toutefois, certains antimicrobiens sont utilisés hors homologation dans cette production. C'est le cas de l'ampicilline, de l'enrofloxacin, du florfenicol, de la gamithromycine, de la pénicilline G procaïne longue action, de la spectinomycine, de la tildipirosine, du triméthoprime-sulfaméthoxazole et de la tulathromycine (Tableau VI) (123).

Tableau V: Liste des antimicrobiens homologués au Canada chez les ovins (113, 123-128).

Catégories	Familles	Antimicrobiens	Spectre d'activité	Mode d'action
II	Aminoglycosides	Néomycine	Gram négatif (des exceptions). Gram positif (seulement les staphylocoques)	Bactéricide : inhibition de la synthèse des protéines bactérienne (liaison au sous-unité 30s)
II	Bêta-lactamines	Pénicilline	Gram positif (des exceptions) Effet limité sur les bactéries à Gram négatif.	Bactéricide : inhibition de la synthèse de la paroi bactérienne
I	Céphalosporines (Bêta-lactamines)	Ceftiofur	Large spectre	Bactéricide : inhibition de la synthèse de la paroi bactérienne
IV	Ionophores	Lasalocid sodique	Bactéries à Gram positif	Modification du mouvement des ions à travers la membrane. Coccidiostatique.
II	Macrolides	Tilmicosin	Large spectre	Bactéricide : liaison réversible au sous-unité 50s du ribosome de la bactérie (inhibition de la

Catégories	Familles	Antimicrobiens	Spectre d'activité	Mode d'action
				translocation du peptidyl-ARNt)
III	Sulfamides	Sulfamidés	Cocci à Gram positif	Bactériostatique : inhibition de la synthèse des folates
III	Tétracyclines	Oxytétracycline	Bactéries à Gram positif et négatif (exceptions chez les bactéries à Gram négatif)	Bactéricide : inhibition de la synthèse des protéines bactérienne (liaison au sous-unité 30s)
III		Tétracycline	Bactéries à Gram positif et négatif (exceptions chez les bactéries à Gram négatif)	Bactéricide : inhibition de la synthèse des protéines bactérienne (liaison au sous-unité 30s)

Tableau VI: Liste des antimicrobiens utilisés hors-homologation chez les ovins au Canada (113, 123, 124, 126, 127).

Catégorie	Famille	Antimicrobiens	Spectre d'activité	Mode d'action
II	Aminoglycosides	Spectinomycine	Bactéries à gram négatif et à Gram positif	Bactéricide : inhibition de la synthèse des protéines bactérienne (liaison au sous-unité 30s)

Catégorie	Famille	Antimicrobiens	Spectre d'activité	Mode d'action
I	Céphalosporines (Bêta-lactamines)	Ceftiofur (Excenel RTU)	Large spectre	Bactéricide : inhibition de la synthèse de la paroi bactérienne
II	Macrolides	Gamithromycin	Large spectre	Bactéricide : liaison réversible au sous-unité 50S du ribosome de la bactérie (inhibition de la translocation du peptidyl-ARNt)
II		Tildipirosine	Large spectre	Bactéricide : liaison réversible au sous-unité 50s du ribosome de la bactérie (inhibition de la translocation du peptidyl-ARNt)
II		Tulathromycine	Large spectre	Bactéricide : liaison réversible au sous-unité 50s du ribosome de la bactérie (inhibition de la translocation du peptidyl-ARNt)
II	Pénicillines (Bêta-lactamines)	Ampicilline	Bactérie à Gram positif et négatif	Bactéricide : inhibition de la synthèse de la paroi bactérienne

Catégorie	Famille	Antimicrobiens	Spectre d'activité	Mode d'action
II		Pénicilline G procaïne longue action	Bactérie à Gram positif (des exceptions) Effet limité sur les bactéries à gram négatif.	Bactéricide : inhibition de la synthèse de la paroi bactérienne
III	Phénicolés	Florfenicol	Bactérie à Gram négatif	Bactéricide : liaison au sous-unité 50S
II	Quinolones	Enrofloxacin	Large spectre	Bactéricide : inhibition de la réplication et de la transcription de l'ADN

3.3 Caractérisation de la résistance bactérienne aux antimicrobiens

L'introduction des antimicrobiens pour l'usage clinique a certainement été la plus grande avancée médicale du 20^e siècle. Toutefois, les avantages inestimables des antimicrobiens, tant chez l'homme que chez l'animal, sont de plus en plus menacés par la sélection et la propagation de la résistance aux antimicrobiens (RAM) (129). Certains rapports ont estimé qu'environ 26% des infections bactériennes en médecine humaine sont actuellement résistantes aux antimicrobiens de première intention (129). En conséquence, l'organisation mondiale de la santé (OMS) a estimé que la RAM serait la cause de 700 000 morts à l'échelle mondiale en 2019 et prévoit 10 millions de morts par année à partir de 2050 si des actions ne sont pas prises pour réduire cette menace (130). De plus, selon le « Centers for Disease Control and Prevention (CDC) », aux USA plus 23 000 morts surviennent suite à une infection par des organismes RAM chaque année (131). La bactérie *Salmonella* n'échappe pas à ce phénomène (Tableau VII). En effet, *Salmonella* a développé plusieurs

mécanismes de RAM incluant la modification de sa perméabilité membranaire, l'inactivation de l'antimicrobien (modification enzymatique) ou son exportation active (pompe à efflux) hors de la cellule bactérienne ainsi que la modification de la cible bactérienne de l'antimicrobien (Tableau VII (96)). Aux USA, en 2014, un rapport de surveillance a indiqué que les isolats de *Salmonella* (n=2127) provenant des humains étaient résistants principalement à la streptomycine (11,2%), à la tétracycline (10,4%), au sulfaméthoxazole (9,4%) et à l'ampicilline (9,1%) (132). Cependant, la résistance à la ceftriaxone, à l'azithromycine et à la ciprofloxacine était inférieure à 3 % (2,4%, >0,1% et 0,4%, respectivement) (132). Par ailleurs, cette même année, dans l'Union Européenne, la prévalence des isolats de *Salmonella* RAM provenant des humains infectés par cette bactérie était plus élevée. Entre autres, les résistances les plus couramment observées pour les 14 412 isolats humains étaient envers les tétracyclines (30,3 %), les sulfamides (28,6 %) et l'ampicilline (28,2 %) (132). Des prévalences de résistance plus faibles ont été rapportées pour le triméthoprim-sulfaméthoxazole (9,2 %), la ciprofloxacine (8,8 %), le chloramphénicol (6 %), la gentamicine (2,7 %) et le céfotaxime (1,1 %) (132). Différentes méthodes phénotypiques et génotypiques sont utilisées pour la caractérisation de la résistance aux antimicrobiens chez *Salmonella* (133-135).

Tableau VII: Mécanismes de résistance aux antimicrobiens chez *Salmonella* (132, 136-143).

Familles/classes d'antimicrobiens	Mécanismes de résistance	Gènes codant pour la résistance
Aminoglycosides	Modification enzymatique (AMs : AG N-acétyltransférases (AACs), AG O-nucléotidyltransférases (ANTs), et AG O-phosphotransférases (APHs) (16s ARNs méthylases)	<i>aadA</i> , <i>aph</i> , <i>aac</i> <i>armA</i> , <i>rmtC</i> et <i>rmtD</i>
Céphalosporines	Modification enzymatique (bêta-lactamase), modification de la cible, altération de la perméabilité membranaire	<i>bla_{SHV}</i> , <i>bla_{TEM}</i> , <i>bla_{CTX}</i> , <i>bla_{CMY}</i>
Chloramphénicol	Modification enzymatique (chloramphénicol transacétylase)	<i>Cat</i> (<i>catal</i> , <i>cata2</i> et certains variants <i>catB</i>) <i>cmlA</i> et <i>floR</i>
Quinolones et fluoroquinolones	Modification de la cible (topoisomérases de type II ADN gyrase/ topoisomérase IV), activation des pompes à efflux	<i>qnrB</i> , <i>qnrD</i> , <i>qnrS</i> , <i>oqxAB</i> , <i>gyrA</i> , <i>gyrB</i> , <i>parC</i> , et <i>parE</i>
Sulfonamides	Cible insensible (modification du synthase dihydrofolate (DHPS))	<i>sul</i> (<i>sul1</i> , <i>sul2</i> , et <i>sul3</i>)
Tétracyclines	Activation des pompes à efflux	<i>tet</i>
Triméthoprim-Sulfaméthoxazole	Cible insensible (dihydrofolate réductase), réduction de la perméabilité	<i>dfrA</i> et <i>sul</i>

3.3.1 Résistance phénotypique

La méthode de diffusion sur gélose utilisée par Alexander Fleming en 1920, nommée la méthode de gouttière de Fleming, a été le précurseur d'une série de méthodes développées par la suite pour déterminer la sensibilité des bactéries aux antimicrobiens (130, 133). Les premières modifications de la conception de Fleming dans les années 1940 consistait au remplacement de la gouttière précédemment utilisée par une tasse en verre pour la diffusion (« méthode de la coupe Oxford ») et à l'utilisation de papiers imprégnés d'antimicrobiens pour la diffusion de ceux-ci (130). Aujourd'hui, les différentes méthodes pour tester la sensibilité des antimicrobiens peuvent être regroupées en deux catégories : les méthodes de dilution dites méthodes quantitatives qui servent à déterminer la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) et les méthodes de diffusion dites méthodes qualitatives qui permettent de catégoriser les bactéries selon leur sensibilité à un antimicrobien (133, 134, 144).

3.3.1.1 Méthodes de dilution

Les méthodes de dilution permettent de déterminer la CMI d'un agent antimicrobien pour une bactérie donnée. La CMI se définit comme étant la plus faible concentration de cet antimicrobien permettant d'inhiber la croissance d'une bactérie dans des conditions de croissance appropriées (134, 145). Il existe deux méthodes de dilution basées sur les moyens d'incorporation de l'antimicrobien: l'incorporation de l'antimicrobien en milieu liquide (bouillon) et l'incorporation de l'antimicrobien en milieu solide (gélose) (133, 134). L'utilisation des deux milieux requiert une standardisation de la taille de l'inoculum bactérien (134). Cette standardisation se fait généralement en utilisant une solution saline stérile standardisée selon un étalon de standard 0,5 McFarland afin d'obtenir une

concentration ajustée de 5×10^5 CFU/ml de l'inoculum bactérien (134). Généralement exprimée en $\mu\text{g/ml}$, la CMI est utilisée pour rapporter les isolats comme sensibles ou résistants à l'antimicrobien testé selon les seuils recommandés par « *The Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)* » (134). Pour l'incorporation de l'antimicrobien en milieu liquide, une macrodilution ou une microdilution est possible selon la quantité de milieu utilisé (tube de 2 ml versus plaque de 96 puits) (145). La méthode de dilution en milieu solide (sur gélose) implique l'incorporation de différentes concentrations de l'agent antimicrobien à tester dans un milieu gélifié, suivie de l'ensemencement de l'inoculum microbien d'intérêt sur la gélose après solidification du milieu (145).

3.3.1.2 Méthodes de diffusion

Les méthodes de diffusion comprennent la méthode de Kirby-Bauer et la méthode de Stokes (133). La méthode de Kirby-Bauer aussi appelée la méthode des disques est une méthode simple, standardisée et peu coûteuse (146). Cependant, elle n'est pas applicable pour tous les antimicrobiens ou pour toutes les bactéries. Par exemple, elle ne permet pas de détecter la résistance à la colistine chez les bactéries à Gram négatif à cause de la propriété cationique de l'antimicrobien ainsi que son incapacité à diffuser dans l'agar pour produire un gradient de concentration (134, 147). La méthode du disque consiste premièrement à inoculer $1-2 \times 10^8$ CFU/ml (ou 0.5 McFarland) d'un inoculum pur de la bactérie à tester sur une gélose Mueller-Hinton (134, 146). Des disques commercialisés, avec des concentrations connues d'antimicrobiens à tester, sont ensuite déposés à la surface des géloses (146). Le diamètre d'inhibition, après incubation de la gélose est interprété selon les mesures pré-définies par le CLSI (134, 146). Le résultat est utilisé pour rapporter les isolats comme étant sensibles (S), intermédiaires (I) ou résistants (R) à l'antimicrobien

testé (134). La méthode de Stokes diffère de la méthode du disque par le fait que l'interprétation des diamètres d'inhibition obtenus se fait par rapport à un contrôle sensible à l'antibiotique (134).

Il est à noter que ces différentes méthodes phénotypiques utilisées pour déterminer la sensibilité des bactéries aux antimicrobiens sont longues à réaliser, ce qui retarde la prise de décision quant aux traitements appropriés en milieu clinique (148).

3.3.2 Résistance génotypique

Les méthodes de détection de la résistance bactérienne basées sur l'analyse moléculaire permettent d'identifier la présence d'un ou plusieurs gènes de résistance, mais aussi de caractériser certaines mutations ponctuelles caractéristiques de la résistance à un antimicrobien. Ces méthodes facilitent les investigations épidémiologiques, la surveillance de la RAM et permet de guider les stratégies thérapeutiques (135). Ces méthodes sont généralement plus rapides que celles basées sur la culture bactérienne (135). Néanmoins, la résistance génotypique n'est pas toujours corrélée à la résistance phénotypique en raison du défaut de l'expression des gènes identifiés.

3.3.2.1 La réaction de polymérisation en chaîne (PCR)

La PCR est l'une des méthodes moléculaires les plus utilisées pour la détection des gènes de résistance chez des souches bactériennes ou dans certains échantillons (135, 149). Différents types de PCR sont utilisés pour la détection de ces gènes. Elles sont généralement complémentaires aux tests de sensibilité phénotypique des isolats (135). La PCR conventionnelle est utilisée pour cibler un gène en particulier (Tableau VII). Cependant, elle est inefficace pour la détection des mutations ponctuelles (135). Des PCRs multiplex sont aussi utilisées pour la détection de plusieurs gènes de virulence ou de

résistance en un même cycle. En effet, des PCR multiplex ont été développées pour identifier simultanément de nombreux gènes codant pour la résistance aux céphalosporines et les carbapénèmes, tels que *bla_{KPC}*, *bla_{NDM}*, *bla_{IMP}*, *bla_{VIM}*, *bla_{AmpC}*, *bla_{TEM}*, *bla_{SHV}* et *bla_{OXA}* (149). La PCR en temps réel ou PCR quantitative (qPCR) est une autre méthode importante dans l'étude de la RAM. Bien qu'elle soit plus coûteuse, elle offre plusieurs avantages par rapport à la PCR conventionnelle. Ces avantages consistent à la mesure des données en temps réel, une plus grande sensibilité et un risque réduit de contamination (149). De plus, la qPCR peut également être utilisée pour la différenciation phénotypique des souches résistantes et sensibles grâce à sa capacité à mesurer le nombre de copies de gènes pendant la croissance bactérienne en présence d'antimicrobiens (149). En plus des coûts de maintenance élevée, les principaux inconvénients de la qPCR sont la diminution de sa sensibilité et sa spécificité avec l'augmentation de nombre de gènes ciblés ainsi que la disponibilité limitée de marqueurs fluorescents, ce qui limite le nombre de cibles possibles (150).

3.3.2.2 Autres méthodes moléculaires

D'autres méthodes moléculaires ont été développées pour l'investigation de la RAM chez les bactéries. Par exemple, l'amplification isotherme médiée par les boucles (LAMP) est l'une de ces méthodes. Elle se différencie de la PCR par une amplification à température constante permettant de générer jusqu'à 10^9 copies de produits en moins d'une heure (150). Des kits LAMP commerciaux sont disponibles pour la détection de gènes de résistance, tels que: *bla_{KPC}* et *bla_{NDM-1}* chez *K. pneumoniae* et *A. baumannii* (150). Une autre méthode moléculaire permettant de cibler plusieurs gènes de résistance en même temps sont les micropuces à ADN. Celles-ci permettent la détection des gènes codant pour certaines

enzymes comme les BLSE et les carbapénèmases grâce à l'hybridation de séquences d'oligonucléotides capables de sélectionner et d'amplifier des gènes spécifiques (*bla_{KPC}* par exemple) à partir de l'échantillon d'intérêt (150). En effet, le système Verigene® a développé des tests moléculaires basés sur cette technique pour le diagnostic rapide de certaines bactéries à Gram positif et Gram négatif, ainsi que de leurs gènes de résistance associés (*mecA*, *vanA*, *vanB*, *bla_{KPC}*, *bla_{NDM}*, *bla_{IMP}* et *bla_{VIM}*) (149). Cependant, cette méthode est coûteuse à cause de l'utilisation des lames de verres et des colorants fluorescents requis pour les analyses (135). Finalement, le SGC est une méthode moléculaire permettant de cibler l'ensemble des gènes de RAM connus ainsi que les mutations conduisant à ces résistances (135, 149). Il permet également d'ajouter rapidement de nouvelles séquences cibles à la base de données d'analyse ainsi que la possibilité d'effectuer une nouvelle analyse *in silico* rapide sur des isolats déjà séquencés (135). Toutefois, le prix et le temps d'attente pour les résultats font que cette méthode n'est pas toujours priorisée (149, 150). Différentes autres méthodes sont de plus en plus utilisées dans l'étude de la RAM. C'est le cas de la spectrométrie de masse MALDI-TOF qui permet de détecter les variations dans les spectres associés à l'antibiotique et des systèmes de biosenseur (approche microcalorimétrique) (150, 151).

3.4 Portrait de résistance aux antimicrobiens de *Salmonella* chez les ovins

3.4.1 Portrait général

En général, la prévalence de la résistance aux antimicrobiens (RAM) chez *Salmonella* est faible en production ovine. Cette prévalence peut varier selon le pays (Tableau VIII), le troupeau ou selon le sérotype isolé des animaux infectés. Par exemple, une étude qui a été réalisée en Suisse a rapporté une prévalence de 0,7 % de résistance phénotypique à

l'ampicilline chez des isolats de *Salmonella* issus des prélèvements nasaux obtenus de 141 fermes ovines (n=6810 animaux) (152). De même, une autre étude qui a été réalisée en Allemagne a rapporté que les 74 (82,2%) isolats de SASd isolés des fèces des ovins (n=270 pools d'au moins 10 animaux) étaient sensibles aux 13 des 14 antimicrobiens testés (94). Cependant, tous les isolats étaient résistants au sulfaméthoxazole (94). D'un autre côté, une prévalence élevée de la RAM a été rapportée en Turquie lors d'une étude réalisée chez les ovins en abattoir (100). En effet, cette étude a rapporté que 60% (n=10) des isolats de *Salmonella* provenant de différents organes (foie, reins, rate, etc.) étaient résistants à au moins un des antimicrobiens testés (100). De plus, une étude réalisée en Roumanie au sein de deux fermes ovines différentes a rapporté des prévalences de RAM de 54 % et 75 % dans la première (n=359) et la deuxième (n=120) ferme respectivement chez *S. Abortusovis* (4). Il faut noter que l'utilisation des antimicrobiens était plus élevée dans la seconde ferme par comparaison à la première (4). Une étude réalisée aux USA a rapporté que seulement 2 des 178 souches de *Salmonella diarizonae* isolées des échantillons de fèces ovines étaient résistantes à 1 des 15 des antimicrobiens testés qui était la streptomycine (93). Cependant, il a été observé, dans cette étude, que la résistance à au moins un antimicrobien chez les isolats de la sous-espèce *diarizonae* était plus faible (2/178) par comparaison aux autres sérotypes (19/60) de la sous-espèce *enterica* (93). Finalement, une étude qui a été réalisée en Allemagne en 2016 n'a rapporté aucune résistance chez SASd isolé d'un pool d'organes (poumon, foie, rein, rate et intestin grêle) d'un ovin mort contre les 11 antimicrobiens testés (89). Toutefois, un gène de résistance aux macrolides (*mdfA*) et un gène de résistance aux aminoglycosides (homologue du gène *aac(6')-Iaa*) ont été identifiés chez des isolats de

SASd phénotypiquement sensibles à ces deux familles d'antimicrobiens (89), illustrant la non-corrélation entre la résistance phénotypique et la résistance phénotypique.

3.4.2 Portrait au Canada

À notre connaissance, peu d'études se sont intéressées à la caractérisation du profil de la RAM chez *Salmonella* en production ovine au Canada. Scott et al. ont conduit une étude de 2006 à 2008 visant à dresser le profil de la RAM chez *Salmonella* dans les troupeaux ovins de l'Ontario (108). Aucun des isolats provenant des 51 fermes qui ont participé à cette étude n'était résistant aux antimicrobiens des classes I, II et III qui ont été testés dans le cadre de cette étude (108). Par ailleurs, l'étude réalisée par Avery en Alberta (2001) a rapporté que 3.17% des 189 isolats étaient résistants à 3 des 18 antimicrobiens testés chez les souches de *Salmonella* isolées des ovins (122). Parmi les 6 souches résistantes, 5 étaient résistantes à la streptomycine et une à l'amoxicilline ainsi qu'à la céphalothine. Toutes les souches résistantes appartenaient à la sous-espèce *diarizonae*.

Tableau VIII: Profil de résistance phénotypique aux antimicrobiens chez certains isolats de *Salmonella* d'origine ovine provenant de plusieurs pays (89, 92-94, 100, 152).

	Pays					
	Allemagne (2016)	Éthiopie (2019-2020)	Suisse (2017-2018)	Allemagne (2018)	Turquie (2013-2015)	USA (2011)
Type d'échantillon (nombre d'échantillons)	Pool d'organes (1 animal)	Prélèvement fécal	Prélèvement nasaux (681 animaux)	Pool fécal (270 pools d'au moins 10 animaux)	Carcasse, contenu fécal, ganglion lymphatique mésentérique, foie, rein, rate et vésicule biliaire (200 chacun provenant de 200 animaux)	Prélèvement fécal (pool de 6 animaux et prélèvement individuel)
État de santé des animaux	Mort	Diarrhée	Aucun signe clinique	Aucun signe clinique	Aucun signe clinique	N/A
Méthode de détection de la résistance aux antimicrobiens	Micro-dilution, détection de la CMI	Diffusion sur gélose (Kirby Bauer), antibiogramme	Micro-dilution, détection de la CMI	Micro-dilution, détection de la CMI	Diffusion sur gélose (Kirby Bauer), antibiogramme	Système semi-automatisé (Sensititre), détection de la CMI

	Pays					
	Allemagne (2016)	Éthiopie (2019-2020)	Suisse (2017-2018)	Allemagne (2018)	Turquie (2013-2015)	USA (2011)
Nombre d'isolats	1	80	146	74	10	238
Sérotype isolé	SASd	N/A	SASd	SASd	<i>S. Newport</i> (40%), <i>S. Typhimurium</i> (20%), <i>S. Kentucky</i> (20%), <i>S. Umbilo</i> (10%) et <i>S. Corvallis</i> (10%)	SASd (94%), autres sérotypes de <i>S. enterica</i> (6%)
Amikacine	N/A	N/A	N/A	N/A	-	N/A
Amoxicilline/acid e clavulanique	N/A	(80/80)	N/A	N/A	N/A	(0/238)
Ampicilline	(0/1)	(80/80)	(1/146)	(0/74)	+	(0/238)
Azythromycine	N/A	N/A	(0/146)	(0/74)	-	(0/238)
Céfépime	N/A	N/A	N/A	N/A	+	N/A

	Pays					
	Allemagne (2016)	Éthiopie (2019-2020)	Suisse (2017-2018)	Allemagne (2018)	Turquie (2013-2015)	USA (2011)
Céfotaxime	(0/1)	N/A	(0/146)	(0/74)	-	N/A
Céfoxitine	N/A	N/A	N/A	N/A	-	(0/238)
Ceftazidime	(0/1)	N/A	(0/146)	(0/74)	N/A	N/A
Ceftiofur	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	(0/238)
Ceftriaxone	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	(0/238)
Chloramphénicol	(0/1)	N/A	(0/146)	(0/74)	-	(0/238)
Ciprofloxacine	(0/1)	N/A	(0/146)	(0/74)	+	(0/238)
Colistine	(0/1)	N/A	(0/146)	(0/74)	N/A	N/A
Ertapénèm	N/A	N/A	N/A	N/A	-	N/A
Gentamicine	(0/1)	N/A	(0/146)	(0/74)	-	(0/238)
Kanamycine	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	(0/238)
Meropénème	N/A	N/A	(0/146)	(0/74)	N/A	N/A

	Pays					
	Allemagne (2016)	Éthiopie (2019-2020)	Suisse (2017-2018)	Allemagne (2018)	Turquie (2013-2015)	USA (2011)
Acide nalidixique	(0/1)	N/A	(0/146)	(0/74)	N/A	(0/238)
Norfloxacine	N/A	N/A	N/A	N/A	+	N/A
Pefloxacine	N/A	N/A	N/A	N/A	+	N/A
Piperacilline/tazo bactam	N/A	N/A	N/A	N/A	-	N/A
Streptomycine	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	(20/238)
Sulfaméthoxazole	(0/1)	N/A	(0/146)	(74/74)	+	N/A
Sulfisoxazole	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	-
Tétracycline	(0/1)	(30/80)	(0/146)	(0/74)	N/A	(19/238)
Tigécycline	N/A	N/A	(0/146)	(0/74)	+	N/A

N/A : Pas d'information; - : Sensible (nombre indéterminé); + : Résistant (nombre indéterminé); les ratios indiquent la résistance

Hypothèses et objectifs

Selon les dernières données publiées en 2017, le Québec détenait un cheptel ovin qui totalisait plus de 98 252 têtes, produisait 2 672 tonnes métriques de viande, soit 51% de la viande consommée dans la province, et qui générait des recettes de 52 M\$ annuellement (1, 2). Malgré l'importance économique de ce secteur pour le Québec, aucune étude n'a porté sur l'estimation de la prévalence de *Salmonella* et sur la caractérisation du profil de résistance aux antimicrobiens et de virulence de cette bactérie dans le secteur ovin du Québec.

Ainsi, les hypothèses de la présente étude étaient les suivantes :

1. Le microbiote fécal des ovins dans les fermes du Québec héberge différents sérotypes de *Salmonella*
2. Les souches de *Salmonella* isolées des fèces des ovins sont résistantes à certains antimicrobiens importants sur le plan médical et possèdent certains facteurs de virulence
3. La prévalence de *Salmonella* dans les troupeaux ovins du Québec varie en fonction de certains facteurs de risque

Les objectifs de la présente étude étaient :

1. D'estimer la prévalence des fermes positives à *Salmonella* dans les troupeaux ovins du Québec
2. D'identifier les différentes sous-espèces et sérotypes de *Salmonella* qui sont présents dans le microbiote fécal des animaux dans ces troupeaux
3. Caractériser le profil de résistance aux antimicrobiens et de virulence des souches de *Salmonella* provenant des troupeaux ovins du Québec

4. Évaluer l'impact de certains facteurs de risque (ex. saisons, type de production, l'environnement des animaux et la taille du troupeau) sur la prévalence des fermes ovines à *Salmonella* au Québec.

Article scientifique #1

En préparation pour le journal Cellular and Infection Microbiology (Frontiers)

**Comparison of multiplex-PCR and Whole-genome sequencing in the identification
of *Salmonella* isolates obtained from sheep feces**

Schlasiva Cenatus^{1,2}, Julie Arsenault^{1,2}, Isabelle Bernaques³, Sadjia Bekal³, William Thériault^{1,2}, Mohamed Rhouma^{1,2*}

- (1) Department of Pathology and Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, Université de Montréal, 3200 Sicotte, Saint-Hyacinthe, QC, J2S 2M2, Canada.
- (2) Groupe de recherche et d'enseignement en salubrité Alimentaire (GRESA), Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal, 3200 rue Sicotte, Saint-Hyacinthe, QC, J2S 2M2, Canada.
- (3) Institut National de Santé Publique du Québec (INSPQ), 190, boulevard Crémazie Est, Montréal, QC, H2P 1E2, Canada.

* Corresponding author. E-mail address: mohamed.rhouma@umontreal.ca

Author contributions

Conceptualization: Schlasiva Cenatus, Mohamed Rhouma, Julie Arsenault

Data curation: Schlasiva Cenatus, Isabelle Bernaques

Formal analysis: Schlasiva Cenatus, Mohamed Rhouma, Julie Arsenault, Isabelle Bernaques, Sadjia Bekal

Funding acquisition: Mohamed Rhouma, Julie Arsenault

Methodology: Schlasiva Cenatus, Mohamed Rhouma, William Thériault, Julie Arsenault

Project administration: Schlasiva Cenatus, Mohamed Rhouma, William Thériault, Julie Arsenault

Supervision: Mohamed Rhouma, Julie Arsenault

Validation: Mohamed Rhouma, Julie Arsenault

Writing – original draft: Schlasiva Cenatus

Writing – review & editing: Julie Arsenault, Isabelle Bernaques, William Thériault, Sadjia Bekal, Mohamed Rhouma

Abstract

Salmonella is a pathogen of concern for humans and animals. The genus *Salmonella* contains two species, six subspecies, and over 2600 serotypes. The use of reliable and rapid techniques for the identification of *Salmonella* subspecies and untimely their different serotype responsible for the disease and/or economic losses in farm animals is crucial for effective surveillance, prevention, and control of this microorganism. Certain techniques are widely used to identify *Salmonella* in sheep after its isolation on culture media, with the polymerase chain reaction (PCR) and the whole genomic sequencing (WGS) being the most reported techniques used for this purpose. The aim of the current study was to validate the efficacy of multiplex PCR (m-PCR) in the identification of *Salmonella* subspecies isolated from feces of adult Quebec sheep in comparison with the WGS results. A total of 76 *Salmonella* strains isolated from ovine feces. The subspecies of these strains was identified using the multiplex PCR targeting the *flixB*, *mdcA* and *stn* genes as well as by the WGS as the reference assay. All strains (n=76) were identified as *S. diarizonae* based on WGS. While the WGS identified all these strains (n=76) as *S. diarizonae*, the m-PCR identified 12 of the stains as *S. arizonae*, 6 strains as *S. houtenae* and could not speciate the remaining 15 strains. Using the m-PCR, *S. diarizonae* was adequately identified in only 43 (57,1%) of the 76 strains sequenced. This work emphasises the importance of validating m-PCR using large sample size prior to use in clinical settings or for surveillance. The improvement of the m-PCR by designing more specific and sensitive primers would also be required for future application in sheep production.

Key words: Multiplex-PCR, *Salmonella*, Whole-genome sequencing, sheep.

Introduction

The bacteria *Salmonella* is a pathogen of concern affecting both human and animals. The genus *Salmonella* belongs to the *Enterobacteriaceae* family and contains over 2600 serotypes that are distinguished by their distinct combinations of somatic and flagellar antigens (6). The *Salmonella* genus is divided into two species: *S. enterica* and *S. bongori*. Indeed, *Salmonella enterica* is comprised of six subspecies including *S. enterica*, *S. arizonae*, *S. diarizonae*, *S. houtenae*, *S. indica*, *S. salamae*, while *S. bongori* contains one subspecies, namely *S. bongori* (6). The majority of the well-characterized serotypes are grouped under *S. enterica*, and over 50% of the *Salmonella* pathogen serotypes responsible for infections in human and animals are categorised as *S. enterica* subsp. *enterica* (153). In farm animals, most *Salmonella* serotypes are associated with an asymptomatic carrier state (7). Nevertheless, there are certain serotypes that pose a serious threat to the health and well-being of farm animals, resulting in a considerable impairment of livestock performance and profitability (36, 67, 68). Likewise, in sheep, salmonellosis may be asymptomatic or associated with clinical symptoms, depending on serotype and other factors (e.g., host immunity, animal age) (4, 10, 64, 87). Indeed, *Salmonella enterica* subspecies *diarizonae* serotype 61: k: 1, 5, (7) (sheep associated *S. diarizonae*, SASd) is the most frequently identified serotypes in sheep and considered to be host adapted to these animals. Generally, sheep are asymptomatic carriers of SASd, but in some cases SASd may be associated with diarrhea, chronic proliferative rhinitis, orchitis/epididymitis and sporadic abortions and stillbirths (10, 87). On the other hand, other *Salmonella* serotypes are predominantly associated with clinical symptoms in sheep. For example, the serotype

S. Abortusovis considered the leading cause of abortion in ovine, and *S. Dublin* could both cause severe enteritis and dysentery in lambs (4, 64).

The identification of *Salmonella* subspecies and untimely their associated serotypes could provide valuable information regarding the on-farm strategies needed to prevent and control *Salmonella* infection, as different serotypes exhibit distinct virulence traits or may be linked to different sources of contamination (42). In addition, molecular characterization of the different *Salmonella* subspecies and serotypes is crucial for controlling *Salmonella* along the food chain. Within this framework, different techniques for identifying and classifying *Salmonella* subspecies and serotypes have been constantly evolving over the last two decades (42). In fact, Classical serotyping by the White–Kauffman method, pulsed field gel electrophoresis (PFGE), multi-locus sequence entry (MLST), chain polymerization reaction (PCR), complete genomic sequencing (WGS), and variable multi-tandem locus number analysis (MLVA) are some of these techniques (42). The conventional method of classification by the White–Kauffman method remains widely used in food safety and health diagnostic laboratories for routine identification due to its high sensitivity, reliability, and reasonable operating cost.(42, 43, 90). Other techniques such as the immunological, mass spectrometry based or molecular methods (e.g. PCR) for a rapid identification of *Salmonella* have been developed to reduce the temporal constraint (42). Ultimately, the choice of method for characterizing *Salmonella* subspecies and serotypes requires careful consideration of the target objective and financial resources, as well as the advantages and disadvantages associated with each approach. For instance, despite the fact that immunological-based tests provide *Salmonella* detection and identification that is both highly accurate and highly affine, the low stability of the antibody

and the test's vulnerability to cross-reactivity issues with *Salmonella* serotype were regarded as drawbacks of these methodologies (43) (154). More advanced molecular method such as the WGS is considered as the reference method because of enhanced sensitivity and specificity provided in the identification and the detection of *Salmonella*, as well as a significantly reduced detection time, often taking only a few hours but it still a costly technique (43, 155). Because of their advantages, the molecular methods are increasingly integrated in the identification of *Salmonella* subspecies and serotypes (155). Indeed, PCR was used for the confirmation of *Salmonella* isolates originating from sheep (156) while the WGS was frequently used for genome analysis or genomic comparison of the serotype 61:(k):1, 5, (7) (sheep associated *S. diarizonae*, SASd) in strains isolated from sick animals (10, 89) as well as a *Salmonella* serotyping method in sheep (156). The aim of the current study was to validate the efficacy of multiplex PCR (m-PCR) in the identification of *Salmonella* subspecies from feces of adult Quebec sheep compared to the WGS results.

Material and methods

Sampling

The research protocol for this study was approved by the Ethics Committee on Animal Use at Université de Montréal and adhered to Canadian Council on Animal Care recommendations (certificate #19-Rech-2007). The study included sheep farms in Quebec registered with the Ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation du Québec (MAPAQ).

Isolation and conservation of the strain of *Salmonella*

In the current study, 61 randomly selected sheep farms in Quebec were sampled, where a pool of fecal samples were collected from 10 sheep per farm. The fecal samples were stored at 4°C and transferred to the Chaire de Recherche en Salubrité des Viandes (CRSV) laboratory at the Faculty of Veterinary Medicine of the Université de Montréal for isolation of *Salmonella*. The fecal samples were proceeded using a pre-enrichment in buffered peptone water then an enrichment in both Modified Semisolid Rappaport-Vassiliadis (MSRV) agar plates and Tetrathionate Brilliant Green (TBG) bile broth. The isolation of *Salmonella* was done on brilliant green sulpha (BGS) and xylose lysine deoxycholate (XLD) agars, as previously described (157). At this stage of the study, isolates grown on these two media were considered as presumptive *Salmonella* strains and were stored in freezing medium (20 % glycerol) at -80°C for further analysis.

DNA extraction and m-PCR

For all the isolates gathered in this study, the bacterial DNA extraction was performed using the Chelex solution. Briefly, a solution of 10% Chelex was used to process 3 to 5 colonies from an overnight preculture on Tryptone Soya Agar (TSA) with 5% sheep blood at a temperature of 37 °C. The Chelex solution containing the colonies was subjected to vortexing for 10 seconds. Subsequently, two dry baths were employed for further processing. The first dry bath was set at a temperature of 55 °C and maintained for a period of 30 minutes, while the second dry bath was set at a temperature of 98 °C and maintained for a period of 15 minutes. Subsequently, the sample underwent centrifugation at a speed of 14,000 rpm for a duration of 5 minutes. The supernatant of the sample was gathered and then preserved at a temperature of -20 °C for the purpose of molecular analysis.

The identification of the presumptive *Salmonella* isolates as well as the determination of their subspecies was carried out by multiplex PCR, using primers previously published by Lee et al. (Tab. 1) (57). The composition of each PCR reaction was as follows: a total of 2.50 μ L (1X) of reaction buffer (Bio Basic, Markam, ON, Canada), 2.50 μ L (0.3 mM) of magnesium (Mg) solution, 0.75 μ L (0.3 mM) of deoxyribonucleotide triphosphate (dNTP), 0.2 μ L (1 U) of DNA Polymerase (BioBasic, Markam, ON, Canada), 1.88 μ L (0.75 μ M) of each *stn* primer pair, 1.25 μ L (0.5 μ M) of each *mdcA*, *gatD*, and *invA* primer pair, 0.63 μ L (0.25 μ M) of each STM4057 primer pair, and 2.0 μ L of the DNA sample were utilised. The total volume was modified by the addition of sterile distilled water for a final volume of 23 μ L. The gene *fliB* was amplified individually for visualisation purposes due to proximity to the gene *gatD* but using the same conditions as used for the multiplex PCR. For the negative control, the DNA template was substituted with sterile water. The positive controls used in this study consisted of both a *S. Typhimurium* (ATCC AC028) strain and a *S. diarizonae* strain (previously identified in our lab by WGS). The PCR reaction conditions consisted of an initial denaturation step at 95°C for a duration of 10 minutes. This was followed by 40 cycles of amplification, each consisting of denaturation at 95°C for 1 minute, annealing at 60°C for 1 minute, and extension at 72°C for 1 minute. Finally, a final extension step was performed at 72°C for a duration of 15 minutes. The PCR was carried out using a Mastercycler® nexus gradient thermocycler. Following amplification, a 10 μ L sample was subjected to electrophoresis in a 1.5% agarose gel that had been dyed with SYBR® Safe (Invitrogen, Burlington, ON, Canada). The amplification products were observed and captured with the use of UV lighting. The identification of the subspecies was based on the combination of genes identified. The serotyping by WGS of the first 10

strains isolated allowed to adjust the interpretation of the PCR results by modifying the profile required to identify the subspecies *S. diarizonae* Sup. 1: Genes used to characterize the different *Salmonella* subspecies according to the modified approach developed by Lee et al. (57). Sup. 1) but was not considered for validation of the m-PCR.

Whole-genome sequencing

Using the m-PCR results identifying the *Salmonella* subspecies, a total of 76 strains of *Salmonella* were randomly selected with one strain per farm according for each subspecies identified. These strains were submitted to WGS. For all the 76 strains submitted to WGS, the DNA extraction process involved the utilisation of the QiaSymphony device coupled with the DNA Mini Kit (Qiagen, Germantown, MD, USA). Sequencing on the NexSeq platform was conducted using the NextSeq 1000 v1 Reagent Cartridge (Illumina Inc, San Diego, CA, USA) after library preparation with the Nextera XT kit. Re-sequencing was performed on isolates exhibiting coverage levels below 40X. The assembly of genomes was conducted using BioNumerics v7.6.3 software, employing SPAdes v3.7.1 algorithm. A minimum contig length of 1000 was applied to ensure quality assessment, in accordance with the requirements provided by PulseNet Canada for nationwide surveillance of *Salmonella* spp. The process of predicting serotypes using genomic data was conducted using the Sequence Inference for Serotyping (SISTR) method (158). The blast+ tool was used to verify the presence of the PCR-targeted genes.

Results

In the present study, out of the 324 isolates gathered from the selective media, a total of 275 presumptive *Salmonella* isolates were confirmed as *Salmonella* strains by the multiplex PCR targeting the *invA* gene. These strains were subdivided, according to the

result of the multiplex PCR, into three subspecies (223 *S. diarizonae*, 15 *S. arizonae*, and 6 *S. houtenae*). However, the *Salmonella* subspecies was not identified, using the PCR multiplex, in 31 of the *Salmonella* stains. These latter were classified, at this stage of the study, as unknown *Salmonella* subspecies. These 4 groups of *Salmonella* subspecies, determined by the multiplex PCR, were considered for the selection of the *Salmonella* strains that were subjected to WGS. Briefly, one strains of each group was selected for each positive farm. Out of the 76 *Salmonella* strains sequenced by WGS, 74 were identified as *Salmonella enterica* subspecies *diarizonae* serotype 61: k: 1, 5, (7) (sheep associated *S. diarizonae*, SASd). The remaining two isolates were identified by WGS as *Atlantibacter hermannii* and *Morganella morganii*, respectively.

From the 74 strains identified as *S. diarizonae* by WGS, 43 (58,1%) were also identified as *S. diarizonae* by m-PCR. For the remaining 31 strains, 3 (4,05%) were identified as *S. houtenae*, 12 (16,2%) were identified as *S. arizonae* and 15 (20,3) were unable to be subclassified. The genes *fljB*, *mdcA*, and *stn* were not identified for 3 (4,05%) of the isolates. A total of 18 (20,9%) of the isolates were missing a combination of two genes on m-PCR results and 12 (16,2) were missing only the *flixB* gene (Tab. 2). Nevertheless, the BLAST+ genome analysis conducted on the 84 strains yielded results indicating the existence of the *invA*, *stn*, and *flixB* genes, which were the specific genes targeted by the m-PCR used for the identification of *S. diarizonae* subspecies (Tab. 2).

Discussion

In the present study, the multiplex PCR revealed the presence of three *Salmonella* subspecies: *S. diarizonae*, *S. arizonae*, *S. houtenae*, while the subspecies was unable to be

identified by this technique for 11% of the *Salmonella* strains. Considering the subspecies identified by m-PCR and the inability of the m-PCR to identify the subspecies of few *Salmonella* strains, 76 selected *Salmonella* strains were sequenced using the WGS in order to validate the multiplex PCR results. Nevertheless, the WGS outcomes revealed that ultimately, 84 strains were identified as belonging to the subspecies *S. diarizonae* serotype 61: k: 1,5, (7), known as the sheep associated *Salmonella diarizonae* and renowned for being adapted to these animals (87). Moreover, it should be noted that the genes that could be identified with WGS were not always identified by m-PCR, but the presence of the genes identified by PCR was confirmed by WGS. The difference between these two techniques in terms of *Salmonella* subspecies identification could be associated with several factors. Indeed, a variation of the sequence of the genes present in ovine *Salmonella* strains compared to the strains (isolated from reptile) used for the development of the multiplex PCR (57), and applied in the current study, could be a factor explaining the difference between the two methods. Furthermore, *Salmonella* is renowned for its capacity to undergo genomic modifications such as acquisition and losses of genes or pathogenicity island and single mutation that affects the function of some genes in order to adapt to its hosts (159, 160) that could affect the ability to detect the gene by PCR. However, an investigation of the sequences of the 84 *Salmonella* strains in BLAST+ with blastn revealed the presence of the targeted genes used for the multiplex PCR (*fljB*, *invA*, *mdcA*, and *stn*), which correspond to the profile indicated by Lee et al. for the *S. diarizonae* subspecies (57). On the other hand, it would be important to investigate mutations within genes (*fljB*, *mdcA*, or *stn*) that were not detected in ovine strains by the multiplex PCR, which could probably impair the primer's ability to align effectively with the sequence of the targeted

genes. Obviously, the effective application of PCR is dependent upon the specificity of the primers used, since they must possess a high affinity for the target gene (161). Consequently, the presence of mutations within the gene sequence can potentially impact the efficacy of PCR amplification. In this scenario, the utilisation of multiplex PCR is not advisable when the target gene sequence is unknown due to the inability to confirm the specificity of the primers. Hence, it is recommended to establish the genetic profile of the bacterium during the initial characterization process, enabling the identification or creation of novel primer variants based on the specific gene sequence of interest. This process might be economically challenging because it would require WGS to identify the sequence of the genes of interest. Eventually, the necessity for the development of novel primers may arise for multiplex PCR that could be used for the identification of *Salmonella* subspecies associated with sheep. For that, the sequence of the genes (*fljB*, *invA*, *mdcA*, and *stn*) identified from the SASd strains in the current study, could be used to design primers specific to these genes. The improvement of this method for ovine would be beneficial since the methods used for the subspecies and serotypes identification of *Salmonella* isolates in sheep are: WGS (10, 89) (156), Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) (46, 94, 162) or the White-Kauffman-Le Minor scheme (90, 93). These methods could be expensive (WGS), time consuming (PFGE, White-Kauffman-Le Minor scheme) or provide frequent misclassification (White-Kauffman-Le Minor scheme) (42). Furthermore, WGS is mostly used to identify the genetic features, AMR and virulence genes of the strains rather than as a classification method as it was done in this study (10, 89) (156). Although PCR targeting *invA* gene was used to confirm presumptive *Salmonella* isolates in ovine (156), m-PCR

was used for the first time in this study for the identification of *Salmonella* subspecies in strains of ovine origin.

Conclusion

In the present study, the m-PCR and WGS were used to identify *Salmonella* subspecies from ovine feces. The two methods yielded different outcomes, with m-PCR identified 3 subspecies (*S. diarizonae*, *S. arizonae*, *S. houtenae*) in the 86 strains analyzed, while the WGS identified only one *Salmonella* subspecies (*S. diarizonae*) in the same strain collection. This difference could be explained by the potential presence of mutations on the genes target by the multiplex PCR, which impacted the affinity of the primers. Thereby, new primers should be designed to improve the efficacy of the m-PCR for future uses to identify *Salmonella* subspecies in sheep. Accordingly, this method could be used as a preliminary screening method, especially in places with limited resources, to detect strains that would later be confirmed by a reliable methodology, such WGS.

Tables

Tab. 1: Oligonucleotides primers used for the identification of *Salmonella* subspecies by multiplex PCR.

Genes	Primers (5'-3')	Product size (bp)	References
<i>fliJ</i> [*]	ACGAATGGTACGGCTTCTGTAACC TACCGTCGATAGTAACGACTTCGG	526	(163)
<i>mdcA</i>	GGATGTACTCTTCCATCCCCAGT	728	(57)

	CGTAGCGAGCATCTGGATATCTTT		
<i>gatD</i>	GGCGCCATTATTATCCTATTAC CATTCCCGGCTATTACAGGTAT	501	(57)
<i>Stn</i>	CGATCCCTTTCCCGCTATCGGC GAATGAGACGCTTAAG	179	(57)
STM4057	GGTGGCCTCGATGATTCCCG CCCCTTGTAGCGAGCGCCG)	137	(57)
<i>invA</i>	ACAGTGCTCGTTTACGACCTGAAT AGACGACTGGTACTGATCGATAAT	244	(57)

*Primer changed in this study and tested separately due to the similar molecular weight with *gatD*.

Tab. 2: Comparison of multiplex PCR and WGS results according to the detected genes. The gene *invA* was detected in all the isolates below.

Number of isolates	No. of farms	Serotype and Subspecies		<i>flixB</i>		<i>mdcA</i>		<i>stn</i>	
		Subspecies (m-PCR)	Serotypes (WGS)	m-PCR	WGS	m-PCR	WGS	m-PCR	WGS
3	3	Unknown	SASd	-	+	-	+	-	+
3	3	Unknown	SASd	+	+	-	+	-	+
9	9	Unknown	SASd	-	+	+	+	-	+
42	36	<i>S. diarizonae</i>	SASd	+	+	+	+	-	+
1	1	<i>S. diarizonae</i>	SASd	+	+	+	+	+	+
12	12	<i>S. arizonae</i>	SASd	-	+	+	+	+	+
6	6	<i>S. houtenae</i>	SASd	-	+	-	+	+	+

Supplementary materials

Sup. 1: Genes used to characterize the different *Salmonella* subspecies according to the modified approach developed by Lee et al. (57).

Gènes ciblés	<i>S. enterica</i>	<i>S. salamae</i>	<i>S. arizonae</i>	<i>S. diarizonae</i>	<i>S. houtenae</i>	<i>S. bongori</i>
<i>flixB</i>	d	d	-	d	-	+
<i>mdcA</i>	-	+	+	+	-	-
<i>gatD</i>	+	+	-	-	-	+
<i>stn</i>	+	+	+	d	+	-
STM4057	+	-	-	-	-	-
<i>invA</i>	+	+	+	+	+	+

d: may be detected or not

+: detected

-: not detected

Modification: on the presence of *flixB* and *stn* for *S. diarizonae* accordingly to a first serotyping conducted using the WGS.

Article Scientifique #2

En préparation pour la revue Scientific report

First study on the prevalence, antimicrobial resistance, and pathogenicity of *Salmonella* in sheep flocks in the province of Quebec (Canada)

Schlasiva Cenatus^{1,2}, Julie Arsenault^{1,2}, Isabelle Bernaques³, Sadjia Bekal³, William Thériault^{1,2}, Mohamed Rhouma^{1,2*}

(1) Department of Pathology and Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, Université de Montréal, 3200 Sicotte, Saint-Hyacinthe, QC, J2S 2M2, Canada.

(2) Groupe de recherche et d'enseignement en salubrité Alimentaire (GRESA), Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal, 3200 rue Sicotte, Saint-Hyacinthe, QC, J2S 2M2, Canada.

(3) Institut National de Santé Publique du Québec (INSPQ), 190, boulevard Crémazie Est, Montréal, QC, H2P 1E2, Canada.

* Corresponding author. E-mail address: mohamed.rhouma@umontreal.ca

Author contributions

Conceptualization: Schlasiva Cenatus, Mohamed Rhouma, Julie Arsenault

Data curation: Schlasiva Cenatus, Isabelle Bernaques

Formal analysis: Schlasiva Cenatus, Mohamed Rhouma, Julie Arsenault, Isabelle Bernaques, Sadjia Bekal

Funding acquisition: Mohamed Rhouma, Julie Arsenault

Methodology: Schlasiva Cenatus, Mohamed Rhouma, William Thériault, Julie Arsenault

Project administration: Schlasiva Cenatus, Mohamed Rhouma, William Thériault, Julie Arsenault

Supervision: Mohamed Rhouma, Julie Arsenault

Validation: Mohamed Rhouma, Julie Arsenault

Writing – original draft: Schlasiva Cenatus

Writing – review & editing: Julie Arsenault, Isabelle Bernaques, William Thériault, Sadjia Bekal, Mohamed Rhouma

Abstract

Salmonellosis is a global concern in both human and animal health. Although *Salmonella* in farm animals is generally associated with asymptomatic carriage, this bacterium can also cause clinical illness with serious symptoms, leading to the death of infected animals as well as substantial economic losses. Given the growing economic importance of sheep production in Quebec, it is essential to carry out an initial study to characterize certain food borne bacteria in this animal production. The aim of the present study was to estimate, for the first time, the prevalence of sheep flocks carrying *Salmonella* in Quebec (Canada), to identify the predominant serotypes while determining the antimicrobial resistance (AMR) and virulence profile of the *Salmonella* strains isolated from these flocks and to evaluate the impact of certain risk factors on the presence of *Salmonella* in these flocks. A total of 61 Quebec sheep farms were randomly selected and sampled. In each flock, a pool comprising fecal samples from 10 animals randomly selected was obtained. Dilutions of each pooled fecal samples were plated on selective media to isolate *Salmonella* spp. while biochemical tests and the PCR (*invA* gene) were used to confirm *Salmonella* strains. The whole-genome sequencing (WGS) was used to identify *Salmonella* serotypes, as well as the AMR genes and virulence factors associated with the selected *Salmonella* strains. The phenotypic resistance profile of these strains was determined using the disk diffusion (Kirby–Bauer) and microdilution methods. Among the 61 sheep flocks, 83.6% (95% CI 0.743 to 0.929) of the flocks carried *Salmonella* spp. with only *Salmonella enterica* subsp. *diarizonae* serotype 61:k:1,5,(7) (SASd) being identified in the strains collection. The pathogenicity islands SPI-1, SPI-2, SPI-3, SPI-5, SPI-9, and SPI-13 were identified within the same strains. However, no AMR genes or phenotypic resistance were detected in any

of the tested *Salmonella* strains. In conclusion, only SASd serotype was identified in sheep flocks in Quebec, which is known to be adapted this species. Moreover, all *Salmonella* strains characterized in the current study were sensitive to the tested antimicrobials and had exhibited a poor potential for pathogenicity.

Keywords: *Salmonella*, prevalence, sheep, antimicrobial resistance, virulence, WGS.

Introduction

Salmonella enterica is an important pathogen for humans and animals, associated in some cases with severe gastroenteritis, septicemia and the death (6). Human sources of *Salmonella* infection principally include the ingestion of contaminated food or water, as well as the contact with infectious humans or animals, or with a contaminated environment (164, 165). In Canada, it has been estimated that 88,000 cases and 925 hospitalizations are caused by *Salmonella* every year (166). In the United States, about 1.35 million infections, 26,500 hospitalizations, and 420 deaths are reported every year as consequences of human infection with *Salmonella* (167).

Food-producing animals, particularly poultry, pigs and cattle, are the main reservoirs of the different *Salmonella* serotypes associated with human salmonellosis (160). Small ruminants (e.g., sheep and goats) have also been identified as potential carriers and asymptomatic shedders of *Salmonella* (160). However, the number of studies investigating the prevalence, at the farm level, of the different *Salmonella* serotypes in small ruminants is very limited. In fact, only a few studies have been carried out to determine the prevalence of *Salmonella* and identify its most prevalent serotypes on sheep farms. These studies were carried out mainly in Greece (168), Sweden (90, 168), Norway (169), USA (93), United

Kingdom (170) Germany (94) and Switzerland (162). In most of these studies, *Salmonella enterica* subspecies *diarizonae* serotype 61: k: 1, 5, (7) (sheep associated *S. diarizonae*, SASd) was the most frequently identified serotypes, but other *Salmonella* subspecies (e.g. *S. arizonae*) and serotypes (e.g., *S. Typhimurium*, *S. Derby*, *S. Montevideo*, *S. Abortusovis*) were also isolated from sheep (100, 104, 171). Furthermore, positive correlations between the detection of SASd and the size of the flock, the age of the animals and the spring season were reported (94, 152, 170, 172). It is noteworthy that SASd is considered to be host adapted to sheep. In fact, most sheep are asymptomatic carrier of SASd, however, this serotype has been associated in some cases with diarrhea, chronic proliferative rhinitis, orchitis/epididymitis, sporadic abortions, and stillbirths in sheep (10, 94). The pathogenicity islands of this serotype may vary according to the strains affecting the host and whether or not the strain causes clinical symptoms in its host (100, 104). However, the pathogenicity islands SPI-1 to SPI-5 seemed to be highly conserved in all *Salmonella diarizonae* isolates, irrespective of their country origin (94, 152, 170, 172). In parallel, few studies reported the involvement of SASd in severe human infections (e.g., urinary tract infection, endocervical infections in abortions and infection of cerebrospinal fluid of a newborn child) (173, 174). On the other hand, *Salmonella* presence in the gut microbiota of sheep could be a source of concern in terms of antimicrobial resistance (AMR) spread. Very few studies were carried out in sheep production worldwide to characterize the AMR profiles of *Salmonella* strains compared to other animal productions (108, 152, 172). The results of these studies generally reported a low prevalence of AMR among the *Salmonella* isolates tested against some selected antimicrobials (108, 152, 172). However, resistance to ampicillin in the *Salmonella* isolates in these studies was more frequently reported (152, 172).

In Canada, the national retail sale of sheep meat is steadily increasing, rising from 22.2 million kg in 2015 to 23.4 million kg per capita in 2019 (175). Domestic production covers about 39% of this market demand, with Quebec being the second largest producer of this animal commodity among Canadian provinces (1). Despite the growing economic importance of this animal production, there is a lack of information on the prevalence of *Salmonella* as well as on the AMR and virulence characteristics of *Salmonella* in Quebec sheep flocks. Therefore, the aim of the current study was to 1) estimate the prevalence of *Salmonella*-positive ovine farms in the province of Quebec, 2) evaluate the impact of some specific risk factors on the prevalence of *Salmonella* at the farm level, 3) identify the most prevalent *Salmonella* subspecies and serotypes in the ovine farms of Quebec, and 4) characterize the AMR and virulence profile of the *Salmonella* strains isolated from the sampled sheep flocks.

Materials and methods

The research protocol of the present study was reviewed and approved by the Ethics Committee on Animal Use of the *Université de Montréal* (certificate #19-Rech-2007). The protocol was performed in accordance with the guidelines of the Canadian Council on Animal Care (CCAC). The sheep farms participating in this cross-sectional study were initially recruited on a voluntary basis for a larger project aimed at evaluating the prevalence of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) in the ovine farms of Quebec. Only farms with at least 60 ewes at time of recruitment and registered with the *Ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation du Québec (MAPAQ)* were eligible. Registered farms needed to have an annual average revenue from agricultural activities of at least \$5,000 CAD.

Sampling

A total of 61 sheep farms in Quebec, randomly selected from the MAPAQ list, were sampled from August 2021 to March 2022. For each farm, fecal samples were collected directly from the rectum of 10 randomly selected ewes to obtain a pool of 15g of feces per farm. Only ewes had lambed at least once were sampled. This criterion was used considering the needs of the parallel ovine paratuberculosis study mentioned previously, as adult sheep being most predisposed to excreting the bacteria (MAP) in feces (176, 177). The collected fecal samples were kept at 4°C and transported to the laboratory of the *Chaire de recherche en salubrité des viandes* (CRSV) at the Faculty of Veterinary Medicine of the *Université de Montréal*.

Questionnaire on farm characteristics

A questionnaire was administered to farmers of each sheep farm after collecting the fecal samples with the purpose of collecting data pertaining to the farm characteristics and management. Only data pertaining to the sampling season, the number of animals per farm, the access to pasture and training courses, the production type, and the source of replacement ewe lambs were analysed for the present study.

***Salmonella* isolation and identification**

The isolation of *Salmonella* from the fecal samples was performed using the *Salmonella* isolation procedure described by Larivière-Gauthier et al. (157) with minor modifications. Briefly, 10 grams of each sample was pre-enriched at 37°C for 24 hours in buffered peptone water (Innovation diagnostics, Saint-Eustache, QC, Canada) in a 1:10 ratio. The pre-enriched culture was inoculated onto the surface of Modified Semisolid Rappaport-Vassiliadis (MSRV) agar plates (Innovation diagnostics, Saint-Eustache, QC, Canada) in

three equal drops each measuring 100 μ L and incubated at 41.5 °C for 24 hours under aerobic condition. After incubation, MSR/V plates were verified for any evidence of bacterial growth, which was indicated by the appearance of a white migratory zone. These plates were re-evaluated after an additional 24 hours of incubation if no migration zone was observed after the first incubation period. Parallely, 1 mL of the culture that has been enriched in peptone water was diluted into 9 mL of sterile tetrathionate brilliant green (TBG) bile broth from OXOID LTD (Fisher Scientific, Ottawa, ON, Canada) and has been incubated at 42.5 °C for 24 hours under aerobic condition. TBG and typical migration on MSR/V were sub-cultured on brilliant green sulphur (BGS) agar (Fisher scientific, Ottawa, ON, Canada) and xylose lysine deoxycholate (XLD) agar (Innovation diagnostics, Saint-Eustache, QC, Canada). TBG and positive MSR/V were inoculated on BGS agar (Fisher scientific, Ottawa, ON, Canada) and XLD agar (Innovation scientific, Saint-Eustache, QC, Canada). These latter were incubated at 37 °C for 24 hours under aerobic condition. BGS agars were incubated for an additional 24 hours when no growth was observed. When presumed colonies were available on BGS and/or XLD agar plates, 3 colonies per selective agar plate were recovered, for a total of 12 colonies recovered by fecal pool sample. Triple sugar iron agar (Innovation scientific, Ottawa, ON, Canada) and urea agar (Innovation scientific, Ottawa, ON, Canada) were used as biochemical tests to validate presumed colonies. Presumed *Salmonella* isolates identified by these biochemical tests were then confirmed by a multiplex PCR described below. The presumed *Salmonella* isolates were plated on sheep blood agar plates (Fisher Scientific, Ottawa, ON, Canada) and stored at -80°C in a Brucella agar freezing medium (Fisher Scientific, Ottawa, ON, Canada) containing 20% glycerol (Fisher Scientific, Ottawa, ON, Canada) until further analysis.

DNA extraction and multiplex PCR assay

Bacterial DNA extraction was performed using the Chelex 100 (BIO-RAD, Hercules, Canada) extraction method. In fact, for each isolate, 3 to 5 colonies from an overnight preculture, on Tryptone Soya Agar (TSA) with 5% of sheep blood at 37 °C, were all placed into 100 µL of a 10% of the Chelex solution and vortexed for 10 seconds. Then two dry baths were used, the first one for 30 min at 55 °C and the second one for 15 min at 98 °C. Then, the solution was centrifuged for 5 minutes at 16 000 g within 10 seconds. The supernatant was collected and stored at -20 °C for molecular analysis.

A multiplex PCR was performed to specifically identify the presumed *Salmonella* isolates by targeting the *invA* gene. The other genes (e.g., *stn*, *gatD*, *flixB* *mdcA* and STM4057) of this multiplex PCR were used to identify presumptive *Salmonella* subspecies for the selection of isolates submitted to WGS, using the primers and conditions described by Lee and al. (57, 178). The validation of the results of this characterisation was presented in a previous paper (178). The PCR reaction conditions had an initial denaturation at 95°C for 10 min, 40 cycles of amplification (denaturation at 95°C for 1 min, annealing at 60°C for 1 min, and extension at 72°C for 1 min), followed by a final extension at 72°C for 15 min. Reactions were conducted in a Mastercycler® nexus gradient thermocycler. After amplification, a 10 µL aliquot was submitted to electrophoresis in a 1.5% agarose gel stained with SYBR® Safe (Invitrogen, Burlington, ON, Canada). Amplification products were visualized and photographed under UV illumination.

Whole Genome Sequencing (WGS)

In the present study, one *Salmonella* strain per farm was randomly selected, using the Statistical Analysis Software (SAS). Indeed, for each presumptive *Salmonella* subspecies

identified by multiplex PCR and published in a previous article (178), a total of 76 *Salmonella* strains were selected. The WGS was performed to identify the *Salmonella* subspecies and serotypes as well as to characterize the virulence and the AMR profile of the selected strains (n=76). The WGS was conducted within the laboratories of the Institut National de Santé Publique du Québec (INSPQ). The QiaSymphony device along with the DNA Mini Kit (Qiagen, Germantown, MD, USA) were used to extract DNA from the isolates. The NextSeq 1000 v1 Reagent Cartridge (Illumina Inc, San Diego, CA, USA) was used for sequencing on the NexSeq platform after libraries were created using the Nextera XT kit. Re-sequencing was done on isolates with coverage lower than 40X. Genomes were assembled in BioNumerics v7.6.3 using SPAdes v3.7.1 with a minimum contig length of 1000 for quality assessment based on the PulseNet Canada guidelines for national *Salmonella* spp. surveillance. Serotype predictions, based on genomic data, were done through SISTR (158).

For the detection of AMR and virulence genes, the genomes of the 76 *Salmonella* strains were assembled using Shovill v1.0.4 (<https://github.com/tseemann/shovill>) with mostly default parameters except the average number reads (`--depth 100`). The quality was assessed using QUAST v5.0.2 (179). The annotation of the assembled genomes was done with Prokka v1.14.5 with mostly default parameters except `--mincontig 200` and `--gcode 11` (180). The AMR genes were detected using starAMR v0.9.1 (181) with default parameters with the ResFinder database (2022-05-24), The virulence genes were detected by ABRicate (<https://github.com/tseemann/abricate>) using the VFDB database (2023-06-01) with `--minid 80` and `--mincov 60`. Plasmid predictions were done through MOB-Recon v3.0.0 with default parameters (182). Chromosome maps were generated with BLAST

Ring Image Generator (BRIG) (183). Genomic islands were shown based on the integrated results from IslandViewer 4 (183). *Salmonella* pathogenicity islands (SPI) were detected via SPI Finder 2.0 with default parameters (184) .

Antimicrobial Susceptibility Testing

The antimicrobial susceptibility of the *Salmonella* strains was screened against antimicrobials used in sheep production in Quebec (Table 1). The Kirby-Bauer disc diffusion method on Mueller-Hinton (Fisher Scientific, Ottawa, ON, Canada) agar plates was used to assess the antimicrobial susceptibility of the 74 confirmed *Salmonella* strains to 6 antimicrobials. The 0.5 McFarland standard was used as reference to prepare the bacterial inoculum in sterile saline water from a 24h incubated agar for the antimicrobial disk diffusion susceptibility test (185). The discs of antimicrobials were dispensed onto the surface Muller-Hinton agar and the plates were incubated at 37 °C for 24 h under aerobic conditions. The zones of inhibition diameters were then measured with a ruler and interpreted according to the Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) guideline (186). The results were recorded as sensitive (S), resistant (R), or intermediate (I) based on CLSI or the guideline of the manufacturer. In the absence of a commercial disc for tulathromycin, the susceptibility of the *Salmonella* strains to this antimicrobial was determined using the microbroth dilution method according to the Clinical Laboratory Standards Institute reference values (186).

Statistical analysis

In the current study, a sheep farm was considered positive for *Salmonella* if at least one colony was isolated from the fecal sample and confirmed as *Salmonella* by PCR (*invA* gene). The prevalence with 95% confidence intervals (CI) of *Salmonella*-positive was

estimated. All farm characteristics were categorized. The prevalence ratio (PR) with 95% CI was used to evaluate the association strength between *Salmonella* status as the outcome and each farm characteristics, and the exact chi-square test was used to determine statistical significance. All statistical analysis were done using SAS 9.4.

Results

Sample description

A total of 61 sheep flocks were sampled throughout the study period ranging from August 2021 to March 2022, with the majority of flocks sampled during the fall season (Table 2). The farms were selected randomly across all the regions of Quebec.

Prevalence of *Salmonella*-positive farms and serotype identification

A total of 324 presumed *Salmonella* isolates were recovered from the 61 fecal samples. Then, 275 of the 324 isolates were confirmed as *Salmonella* using PCR by targeting the *invA* gene. A total of 76 isolates, including one randomly selected isolate for each PCR profiles observed in each farm, were submitted to the WGS. Of them, 74 were identified as *Salmonella enterica* subspecies *diarizonae* serotype 61: k: 1, 5, (7) (SASd). The remaining two isolates were identified as *Atlantibacter hermannii* and *Morganella morganii*, respectively. These 74 *Salmonella* isolates were distributed among 51 of the 61 farms, resulting in a prevalence of 83.6% (95% CI 0.743 to 0.929) of *Salmonella*-positive flocks.

Association between risk factors and *Salmonella*-positive farms

The distribution of the *Salmonella*-positive farms according to each farm characteristic was summarized in Table 2. Briefly, the prevalence of *Salmonella*-positive farms tended to be lower ($P=0.12$) when the animals did not have access to the outside environment for exercise or pasture than when the animals were always kept inside (PR=0.84, 95% CI: 0.66-1.03). No association was noted with other potential risk factors (Table 2).

Virulence factors associated with *Salmonella* strains.

In the present study, the sequenced *Salmonella* strains ($n=74$) shared the pathogenicity islands SPI-1, SPI-2, SPI-3, SPI-5, SPI-9, and SPI-13. Moreover, one conjugation plasmid (Supplement. 1), IncX1, measuring roughly 42.8 kbp, was shared by all the 74 *Salmonella* strains. This plasmid had the secretion system T4SS, while missing the virB3 of the virB operon. Nevertheless, no AMR genes were found on this plasmid.

Antimicrobial resistance profiles

In the present study, no AMR genes or point mutations were identified within the 74 *Salmonella* strains that had been submitted to WGS. Furthermore, all these strains were phenotypically susceptible to the 7 antimicrobials tested in the current study.

Discussion

The present study brings new insights into the prevalence of *Salmonella*-positive farms in Quebec as well as the characterisation of the AMR and virulence profile of *Salmonella* strains isolated from these farms. The fecal sampling in the present study was carried out over a period of 8 months and covered all the region of Quebec. The percentage of participation among contacted farmers was 66.7% for meat producers and 70% for milk

producers. Therefore, the result obtain is likely representative of our source population, which consists of ewe flocks in sheep farms including at least 60 ewes and registered with the MAPAQ. It is also likely representative of the four seasons in Quebec.

In the present study, 83.6% of the sampled farms were positive to *Salmonella*. This finding aligns with previous studies conducted on clinically healthy sheep considering fecal composite samples, which revealed high prevalence of *Salmonella*-positive farms of 83.2%, and 66.4% in the United States, and Germany, respectively (93, 94). However, another study reported a lower prevalence of *Salmonella*-positive farms when considering composite fecal samples originating from clinically healthy sheep in Sweden (17.6%) (90). Thus, the variation in the prevalence of *Salmonella*-positive farms between studies worldwide, could be attributed to several factors such as differences in management practices in sheep farms.

In the present study, there was a tendency of a higher risk of *Salmonella* positivity in farms where the animals had access to outdoor environments. This could be explain by the implication of wild animals in the dispersion of *Salmonella* (187, 188). Another explanation of this tendency could be the efficiency of the application of the biosecurity rules in the controlled environment of the farms where animals are enclosed (188, 189). On the other hand, no significant association was observed for *Salmonella*-positivity and the sampling season, the type of production or the size of the flocks. Thus, our findings diverged from the documented tendency of fluctuating *Salmonella*-positive farms, which is often influenced by variations in humidity and heat during different seasons (190). Although this trend was observed with *S. Dublin*, with a positive correlation between the detection of SASd and the Spring season was noticed (170). Our findings also differed

from another study reporting a correlation between the presence of SASd and the size of the sheep flocks (94).

In the current study, only the serotype SASd was identified in all the *Salmonella* strains characterized by the WGS. The presence of this serotype in sheep is more frequent in adult animals and is often reported as asymptomatic (152). However, it is sometimes reported as a cause of abortion in these animals (10, 191). The SASd could also cause diarrhea, chronic proliferative rhinitis, orchitis/epididymitis when affecting the sheep (10, 94, 152). In human, a limited number of investigations documented clinical diseases involving SASd. These diseases often include urinary tract infections, endocervical infections in abortions, and infections of the cerebrospinal fluid in newborn children (173, 174).

In the present study, the pathogenicity islands SPI-1, SPI-2, SPI-3, SPI-5, SPI-9, and SPI-13 were identified in all the 74 *Salmonella* isolates. The presence of these SPIs may indicate that the strains are able to induce persistent infections and adaptation in their hosts is enhanced, due to their effective invasion and survival mechanisms within the hosts' cell (76, 77) (192). The SPI-1, SPI-2, SPI-3, SPI-5 are present in many serotypes of the subspecies *diarizonae*, as well as in highly virulent serotypes as *S. Typhimurium* and *S. Typhi* (174). Nevertheless, these *S. Typhimurium* and *S. Typhi* possess supplementary SPIs, such as SPI-7, an important pathogenicity island which significantly contributes to the adherence and/or penetration of human epithelial cells, while also intensifying the inflammatory reaction in monocytes that is not present in our strains (174).

The results of the current study revealed that no AMR genes were identified by WGS, and no phenotypic resistance was identified, using the disc diffusion or the microdilution method within the 74 selected *Salmonella* strains. This finding corroborates previous

studies conducted in Canada (108) and in Switzerland (152) reporting the absence of AMR genes and confirmed the susceptibility of SASd isolates from ovine to the tested antimicrobials. In Quebec, the absence of AMR among the ovine *Salmonella* isolates could be attributed to the limited use of antimicrobials in sheep farming. However, the absence of AMR genes in the plasmid IncX1 is unexpected, given its well-established role in facilitating the acquisition and spread of AMR genes, such as *qnr* and *tet*, among various animal species and environments (193).

Conclusion

The present study reported for the first time that 83.6% of the sheep flocks in Quebec are carriers of *Salmonella* with the serotype 61:k 1.5, (7) being identified as the only one in the fecal microbiota of clinically healthy sheep. Nevertheless, according to SPIs identified through comprehensive analysis of the entire genome, the SASd strains found in this study showed limited pathogenicity. Genomic analysis of the strains also reported an absence of AMR genes, which was confirmed phenotypically using the susceptibility tests. The susceptibility of all *Salmonella* strains to the various antimicrobials tested in this study is an interesting finding. An investigation of the AMR profiles of other bacterial species (such as *E. coli*) would be important to consolidate this finding of low AMR prevalence in the Quebec sheep sector. An investigation of the antimicrobial use in these farms could bring additional information for the interpretation of the absence of AMR in these sheep farms.

Declaration of interest

The authors declare that they have no known financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgement

This research was supported by both the startup funds of Prof. Mohamed Rhouma (Université de Montréal) and was funded by a grant from the Agri-Food Innov'Action Program, a program resulting from the "Growing Forward 2" agreement between the Ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation du Québec (MAPAQ) and Agri-Food Canada (Project IA119054).

Tables

Table 1 : Susceptibility testing of *Salmonella* strains (n=84) to some antimicrobials used in Quebec sheep farm.

Antimicrobials categorization according to Health Canada (113)	Families	Antimicrobials
II	Beta-lactam	Ampicillin/Sulbactam (20µg)
I	Beta-lactam	Ceftiofur (30µg)
III	Phenol	Florfenicol (30µg)
II	Aminoglycosides	Neomycin (30µg)
III	Tetracyclines	Oxytetracycline (30µg)
III	Sulfonamides	Sulfamethoxazole-Trimethoprim (1,25/23,75µg)
II	Macrolides	Tulathromycin (10mg [*])

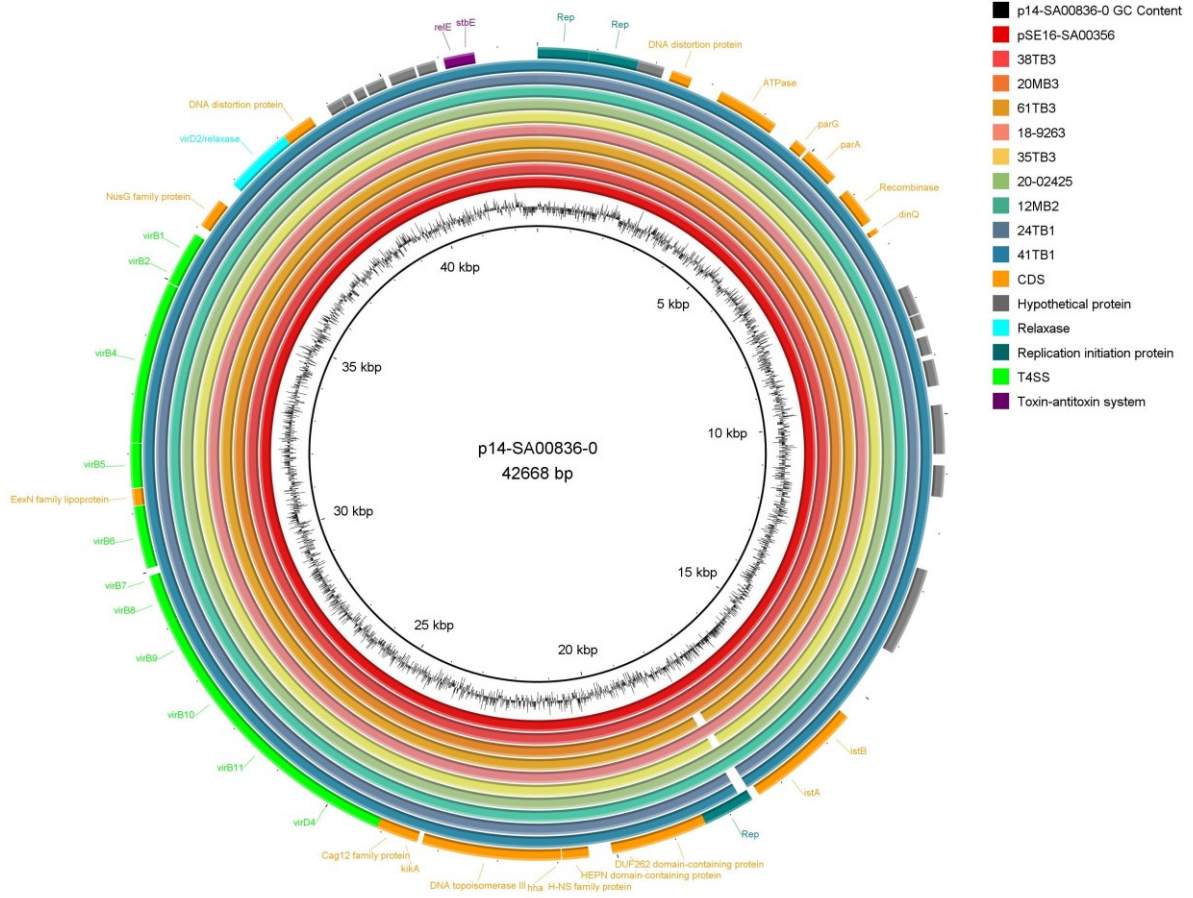
AMR: Antimicrobial resistance; S: Susceptible; * Concentration used to determine CMI

Table 2: Prevalence of *Salmonella* positive farms according to some risk factors associated with sheep farming management.

Risk factors	Number of farms sampled	Number of positive farms (%)	Prevalence ratio	95% CI	Exact Chi-square
Outdoor access					0.12
No	27	21 (77.8)	0.83	0.66-1.03	
Yes	34	32 (94.1)	Reference	Reference	
Main production					1.00
Milk	7	6 (85.7)	0.98	0.72-1.36	
Meat	54	47 (87.0)	Reference	Reference	
Source of replacement ewe lambs					1.00
Purchase	29	25 (86.2)	Reference	Reference	
Self-renewal	32	28 (87.5)	1.02	0.83-1.23	
Seasons of sampling					1.00
Summer	11	10 (90.9)	1.11	0.79-1.55	
Spring	4	4 (100)	1.22	0.93-1.61	
Fall	35	30 (85.7)	1.05	0.77-1.43	
Winter	11	9 (81.8)	Reference	Reference	
Flock size					0.86
≤150 ewes	30	26 (86.7)	Reference	Reference	
151 to 300 ewes	17	14 (82.4)	0.95	0.73-1.23	
>300	14	13 (92.9)	1.07	0.88-1.31	

Supplementary materials

Supplement. 1 : Representation of the plasmid IncX1 shared by the *Salmonella* isolates (n=10).



Discussion Générale

Le secteur ovin au Canada est important car il assure une production de 38 300 tonnes de viande, ce qui permet de couvrir plus de 39% de la consommation en viande ovine du pays, cette consommation étant estimée à 2.42 livres par personne (1). Alors que le rôle de certains animaux d'élevage (porcs, volailles et bovins) en tant que réservoirs de *Salmonella* a été largement décrit dans la littérature scientifique, l'importance des ovins dans l'épidémiologie de cette bactérie demeure peu documentée dans le monde, et encore moins au Canada. De plus, la sélection et la propagation de la résistance des bactéries aux antimicrobiens chez les animaux d'élevage, en particulier chez les bactéries zoonotiques telles que *Salmonella*, est une préoccupation mondiale. Considérant les enjeux de santé publique et animale liés à *Salmonella*, le manque de connaissances de cette bactérie dans les troupeaux ovins du Québec et le fait que cette province soit le deuxième plus grand producteur de viande ovine au Canada, il est donc nécessaire d'évaluer la présence et les caractéristiques de *Salmonella* dans les troupeaux ovins de la province.

Ce projet a permis d'estimer la prévalence des fermes positives à *Salmonella* dans la province du Québec, d'identifier la sous-espèce de *Salmonella* la plus prévalente au sein de ces troupeaux et de caractériser la virulence et la sensibilité de cette bactérie à certains antimicrobiens utilisés en élevage ovin au Québec. Il a aussi permis d'évaluer l'impact de certains facteurs en lien avec la régie d'élevage (ex. l'impact de la taille du troupeau, de la saison d'échantillonnage, du type de production et de l'accès à l'extérieur) sur la présence de *Salmonella* dans ces fermes.

Discussion des résultats et des techniques utilisées

Le premier objectif de ce projet était d'estimer la prévalence de *Salmonella* dans les troupeaux ovins du Québec. Pour cela, des fermes ont été sélectionnées aléatoirement à partir de la liste du MAPAQ compte tenu que cette liste était la seule disponible et accessible dans la province. Il est à noter que les fermes enregistrées au MAPAQ sont celles qui ont généré un revenu agricole brut annuel égal ou supérieur à 5 000 \$, ou qui sont en mesure de prouver qu'elles ont la capacité de générer ce revenu minimal brut annuel en disposant d'une quantité suffisante de facteurs de production, tels que la superficie de culture ou le nombre d'animaux (194). Ce projet a été associé à une étude connexe visant à estimer la prévalence du *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) dans les troupeaux ovins du Québec. Ainsi, les mêmes échantillons fécaux ont servi à détecter MAP par PCR et *Salmonella*. Dans l'ensemble du Québec, les agriculteurs dont l'activité principale est la production d'ovins ont un revenu annuel moyen de 114 600 \$ (2). De plus, l'adhésion au MAPAQ confère certains avantages comme le soutien technique des conseillers du MAPAQ, et d'autres avantages financiers provenant du gouvernement comme la réduction de certains frais et le support financier de certains organismes (194). Ainsi, l'échantillon est très probablement représentatif des élevages ovins commerciaux du Québec. Cependant, les élevages à revenu plus faible ou avec moins d'animaux que ce qui a été indiqué précédemment n'ont pas été inclus dans ce projet. Ainsi, par rapport à la population globale d'ovins au Québec, un biais de sélection, plus précisément un biais d'entrée sélective, pourrait alors être mentionné. L'inclusion des fermes de plus petite taille pourrait influencer la prévalence des fermes positives à *Salmonella* à la baisse vu la corrélation positive rapportée entre la présence de *Salmonella* dans les fermes et la taille

du troupeau dans d'autres études (90, 94). De ce fait, les résultats ne peuvent pas être inférés aux plus petits élevages parce que la taille de l'élevage. Il serait donc important de répéter la recherche de *Salmonella* dans ces fermes.

Bien que la sélection des fermes ait été aléatoire, la participation des fermes à l'étude dépendait de la réponse et de l'intérêt des éleveurs à y participer, ce qui aurait pu entraîner un biais de non-réponse ou de participation. Cependant, ce biais a été minimalisé selon le pourcentage de participation des éleveurs contactés qui était de 66.7% pour les producteurs de viande et 70% pour les producteurs de lait. Au total, 67% des fermes contactées ont accepté de participer à l'étude. Un autre biais de sélection aurait pu être un pourcentage de participation différent des fermes préalablement positive versus les fermes négatives à *Salmonella*. Cependant, ce facteur a été écarté, car le statut des fermes par rapport à la présence de *Salmonella* n'a pas été évalué au préalable lors de la sélection et qu'il est peu probable que le statut des fermes ait été connu des producteurs considérant qu'aucun cas de salmonellose ovine n'a été rapporté selon le bilan du Réseau d'Alerte et d'Information Zoosanitaire (RAIZO) du MAPAQ sur les diagnostics au Québec depuis 2013 (3).

Dans ce projet, *Salmonella* a été identifiée dans 85.2% des fermes ovines échantillonnées. Il est à noter que dans la littérature scientifique, plusieurs études se sont intéressées à l'estimation de la prévalence de *Salmonella* dans les fèces des ovins. Certaines de ces études ont rapporté une prévalence inférieure à ce qui a été trouvée dans notre projet (122), alors que d'autres rapportent une prévalence similaire (93-95). Certaines études illustrent une différence de prévalence d'élevages positifs selon l'unité d'échantillonnage (échantillon composite versus échantillon individuel). En effet, une étude réalisée aux USA par Dargatz et ses collaborateurs a révélé une prévalence de 69.5% de fermes positives à

Salmonella dans 95 troupeaux testés en analysant les échantillons composites de fèces récoltés (93). Cependant, l'analyse des échantillons individuels a permis d'estimer que 83.2% de ces fermes étaient positives (93). Ainsi, l'analyse des échantillons individuels améliore la sensibilité de la technique de détection de *Salmonella* basée sur la culture bactérienne (93). Cette différence concernant la prévalence de *Salmonella* dans ces fermes selon le type d'échantillon s'expliquerait par une dilution de la charge bactérienne dans les échantillons récoltés en posant l'hypothèse que certains animaux ne sont pas porteurs de *Salmonella*. Dans ce cas, bien que la prévalence des fermes positives dans notre projet soit élevée, une sous-estimation est possible. Il serait donc judicieux d'effectuer, dans une future étude, d'évaluer la perte de sensibilité des pools pour optimiser le nombre d'animaux à inclure par pool.

Une autre hypothèse expliquant la différence de prévalence des fermes positives est que cette bactérie est présente chez certains animaux à une concentration inférieure au seuil de détection de la technique utilisée. En effet, le seuil de détection pour la méthode à 4 phases successives (ISO/TS 6579- 2) utilisée dans ce projet est de 10 *Salmonella* par gramme d'échantillon (195, 196). Ces phases consistent entre autres à réaliser un pré-enrichissement en milieu liquide non sélectif, un enrichissement en milieu semi-solide sélectif comme MSRV, un isolement sélectif et une identification des sérotypes (195, 196). Cette technique est avantageuse car elle permet l'utilisation d'une méthode normée ayant une spécificité de 100% (195). De plus, le pré-enrichissement permet la croissance de toutes les bactéries, y compris *Salmonella*, avant de procéder à l'isolement, ce qui améliore la sensibilité de la méthode de détection. Cette sensibilité de détection reste toutefois imparfaite pour les très faibles concentrations de *Salmonella*. Une étude réalisée en

Australie a estimé la concentration moyenne de *Salmonella* spp. dans les fèces des ovins à 1,43 NPP/g (197) ce qui constitue un enjeu en utilisant cette méthode. La PCR multiplex développée par Lee et al. pour identifier les sous-espèces de *Salmonella* (57) a été utilisée pour identifier les isolats ayant des profils génétiques différents et pouvant correspondre à des sous-espèces différentes dans la présente étude afin de mieux guider la sélection des isolats pour le séquençage complet du génome. En effet, Lee et al. ont pu identifier efficacement les 7 sous-espèces de *Salmonella* en se basant sur le profil obtenu à partir de la présence d'une combinaison de 6 gènes, soient *fljB*, *invA*, *mdcA* et *stn*, STM4057, *gatD* (57). Cette méthode a permis d'identifier la présence des 3 sous-espèces (non enterica) suivantes: *S. diarizonae*, *S. arizonae*, *S. houtenae*. Les sérotypes de la sous-espèce *S. enterica* sont les plus fréquents chez les animaux à sang chaud (87). Toutefois, bien que les sous-espèces non-enterica de *Salmonella* se retrouvent généralement chez les animaux à sang froid comme les reptiles, elles peuvent aussi être isolées chez les animaux à sang chaud comme les ovins (87). Nous avons aussi déterminé que la sous-espèce *S. diarizonae* était la seule présente dans ces fermes. Cette sous-espèce est souvent rapportée comme étant la sous-espèce la plus prévalente chez les ovins en analysant les échantillons de fèces provenant de ces animaux (93-95).

Le séquençage du génome complet des 76 isolats, choisis selon une sélection aléatoire stratifiée parmi les sous-espèces, a rapporté l'identification d'une seule sous-espèce (*S. diarizonae*), en contredisant les résultats de la PCR multiplex. De plus, une analyse des séquences de nos souches dans BLAST+ avec blastn a permis de détecter la présence des gènes *fljB*, *invA*, *mdcA* et *stn* pour toutes les souches de *Salmonella* mais les gènes STM4057 et *gatD* étaient absents chez ces souches, ce qui correspond au profil indiqué par

Lee et al. (2009) pour la sous-espèce *diarizonae* (57). La différence entre le résultat de la PCR multiplex et du séquençage complet du génome dans l'identification des sous-espèces de *Salmonella* peut être attribuée à plusieurs facteurs. Premièrement, les souches de *Salmonella* ovine examinées dans l'étude peuvent avoir une différence dans la séquence des gènes ciblées comparé aux souches isolées des reptiles utilisées pour la mise au point de la m-PCR (57). En effet, *Salmonella* est connue pour ses modifications génomiques, telles que l'acquisition et la perte de gènes, et les mutations individuelles qui affectent la fonction du gène (159, 160). Ces facteurs pourraient influencer sur la capacité de détecter les gènes par la PCR. Cependant, l'analyse des séquences des 84 souches de *Salmonella* de cette étude dans BLAST+ avec blastn a révélé la présence de gènes ciblés utilisés pour la PCR multiplex (*fljB*, *invA*, *mdcA*, et *stn*), ce qui correspond au profil indiqué par Lee et al. (2009) pour la sous-espèce *S. diarizonae*. Il serait donc crucial de rechercher les mutations dans les gènes qui n'ont pas été détectées sur les souches ovines analysées par la m-PCR et qui auraient pu altérer la capacité des amorces à s'aligner efficacement sur la séquence de gènes ciblée, ce qui pourrait affecter la sensibilité de la PCR multiplex dans la détection des sérotypes chez les ovins. En effet, l'efficacité de la PCR dépend de l'affinité des amorces utilisées à la séquence ciblée (161). Ainsi, les mutations dans la séquence des gènes peuvent potentiellement affecter l'efficacité de l'amplification PCR.

La base de données VFDB (*virulence factor database*) utilisée pour identifier les gènes de virulence est un outil important pour l'identification des facteurs de virulence chez plusieurs bactéries et continuellement mis à jour (198). Toutefois, le pipeline de VFDB rapporte uniquement les homologues des facteurs de virulence connus (qu'ils soient étroitement liés ou divergents) en faisant une comparaison avec des génomes de référence

plutôt que faire la prédiction de novo de tout nouveau les facteurs de virulence de la bactérie (199). De plus, un nombre limité de génomes de référence est disponible pour cette comparaison et aucun génome de la sous-espèce *diarizonae* n'est disponible. Il est donc probable que certains facteurs de virulence présents dans nos souches n'aient pas été identifiés.

Les résultats de sensibilité phénotypique, dans la présente étude, ont rapporté également que les 74 souches de *Salmonella* étaient sensibles aux antimicrobiens testés par la méthode de Kirby-Bauer ou par la méthode de microdilution (CMI). Ce résultat pourrait être expliqué par une utilisation limitée des antimicrobiens en élevage ovin au Québec. En effet, compte tenu que très peu d'antimicrobiens sont homologués en élevage ovin, la pression de sélection sur les bactéries intestinales des animaux échantillonnés aurait pu être limitée. De plus, d'autres études ont rapporté des résultats similaires, indiquant que les salmonelles isolées des ovins étaient sensibles aux antimicrobiens testés par la méthode de microdilution (CMI) (108, 152). Toutefois, une étude visant à évaluer l'usage des antimicrobiens dans l'élevage ovin au Québec pourrait aider à mieux décrire l'usage des antimicrobiens dans ce secteur.

Originalité de l'étude

Cette étude est la première au Québec à estimer la prévalence de *Salmonella*, à identifier les sérotypes de ce genre bactérien et à établir le profil de virulence et de résistance aux antimicrobiens de cette bactérie dans les troupeaux ovins de la province et à évaluer l'effet de certaines caractéristiques de l'élevage sur la prévalence des fermes positives à *Salmonella*.

Bien que les réactions PCRs multiplex soient souvent utilisées comme méthode de détection de *Salmonella*, elles sont généralement appliquées pour l'identification des sérotypes de la sous-espèce *S. enterica* et, à notre connaissance, ne sont pas utilisées pour l'identification de sous-espèce de *Salmonella* chez les ovins. Dans cette étude, en utilisant la méthode publiée par Lee et al. (2009), nous avons pu évaluer la fiabilité de la m-PCR utilisée dans l'identification des sous-espèces de *Salmonella* à l'aide du séquençage complet du génome de 76 souches. Cette étape nous a permis de souligner la nécessité de combiner des méthodes d'identification de *Salmonella* pour confirmer nos résultats. Le séquençage complet du génome des souches sélectionnées (n=76) nous a aussi permis de caractériser leur profil de RAM et de virulence. Le séquençage du génome complet a aussi été utilisé par Uelze et al. dans le même but mais seulement pour une seule souche provenant d'un ovin (89). À l'aide de cette étape, nous avons souligné la nécessité de combiner des méthodes d'identification de *Salmonella* pour confirmer nos résultats.

Finalement, notre étude est la première au Canada, à notre connaissance, à présenter le résultat du séquençage complet du sérotype 61:k1,5,(7) de la sous-espèce *S. diarizonae* isolée des ovins.

Perspectives

À la suite des résultats contradictoires entre la PCR multiplex utilisée dans mon projet et le séquençage du génome complet, il sera important d'optimiser la technique de PCR multiplex pour les applications futures visant à identifier les sous-espèces de *Salmonella* chez les ovins. La conception d'amorce avec une grande affinité aux gènes ciblés suivit d'un changement calculé de la température d'hybridation pourrait augmenter la sensibilité

de la technique (200). Par ailleurs, la réaction PCR multiplex pourrait être remplacée par CRISPR-SeroSeq afin de pouvoir identifier les sérotypes les moins prévalents dans les échantillons. La CRISPR-SeroSeq est un outil de séquençage de nouvelle génération basé sur des amplicons qui permet la détection de tous les sérotypes présents dans un échantillon de culture mixte en se basant sur l'identification et la répétition des espaceurs CRISPR (201).

Dans le cadre d'une future étude, il serait aussi important de réaliser des échantillonnages dans différents abattoirs de la province du Québec dans le but d'établir un lien entre les sérotypes trouvés en ferme et ceux identifiés à l'abattoir, en mettant de l'avant une approche qui permettrait de mieux révéler la diversité des sérotypes présents dans les échantillons analysés. Des études ont démontré la présence de *Salmonella* dans les échantillons de fèces et de carcasses ovines prélevées à l'abattoir (156, 162). Une sélection aléatoire parmi les abattoirs permettra d'évaluer la présence de *Salmonella* dans les produits de consommation d'origine ovine avant que ces derniers atteignent les consommateurs en analysant les carcasses des moutons. Les différents échantillons à analyser pourraient être le contenu intestinal et des échantillons de viandes et de certains viscères comme le foie. De plus, l'identification des différents sérotypes à l'abattoir déterminera si des mesures supplémentaires seront requises à cette étape de la chaîne de production pour limiter la contamination des travailleurs ainsi que des consommateurs.

Finalement, l'évaluation d'autres bactéries comme *Escherichia coli* dans les troupeaux ovins et en abattoirs ovins serait important. En effet, certains pathotypes de cette bactérie peuvent infecter les animaux ainsi que les humains causant des manifestations cliniques

parfois graves en médecine humaine, comme le syndrome hémolytique et urémique par exemple (SHU) (202).

Conclusion

Ce projet de recherche nous a permis de caractériser, pour la toute première fois, la prévalence de *Salmonella* dans les troupeaux ovins du Québec. Ainsi, dans notre étude, nous avons démontré que dans les 61 fermes ayant participé à l'étude, 83.2% étaient positives à *Salmonella*. Ce résultat est similaire à ce qui a déjà été rapporté dans la littérature provenant de deux pays, à savoir l'Allemagne et les USA.

Le séquençage complet du génome de 74 souches de *Salmonella* a permis de déterminer qu'elles appartenaient toutes à la sous-espèce *S. diarizonae* alors que la PCR multiplex n'a pu identifier efficacement que 43 (57,1%) de ces souches. Ceci nous a permis de mettre l'accent sur l'importance de confirmer les résultats de m-PCR avec d'autres méthodes moléculaires plus avancées.

Nous avons aussi identifié un seul sérotype de *Salmonella*, le 61:k 1,5,(7) aussi connu sous le nom de *Sheep Associated Salmonella diarizonae* (SASd), qui est souvent rapporté comme étant le plus prévalent dans les troupeaux ovins. La présence de ce sérotype dans l'intestin de ces animaux est souvent asymptomatique, mais celui-ci peut provoquer parfois des infections intestinales et extraintestinales allant de la diarrhée jusqu'à la mort des animaux infectés. Toutefois, l'analyse du génome de différentes souches isolées par la méthode du séquençage complet du génome (SCG) a indiqué que la virulence de ces souches est faible. De plus, les résultats du SCG ont indiqué qu'aucun gène de RAM n'était présent chez les souches de *Salmonella* caractérisées dans la présente étude. Ces résultats ont été confirmés phénotypiquement par les méthodes de Kirby-Bauer ou de microdilution.

Bibliographie

1. **Ministère de l’Agriculture, des Pêcheries et de l’Alimentation du Québec (MAPAQ)**. Portrait-diagnostic sectoriel de l'industrie ovine au Québec 2019. Disponible de: <https://www.mapaq.gouv.qc.ca/fr/Publications/MonographieovineWEB.pdf>.
2. **Lapointe L**. La production ovine au coeur des régions du Québec BIOCLIPS. 2019. Disponible de: https://www.mapaq.gouv.qc.ca/SiteCollectionDocuments/Bioclips/BioClips2019/Volume_27_no36.pdf.
3. **Lebœuf A**. Bilan réseau petits ruminants 2013-2020 2021. Disponible de: https://cdn-contenu.quebec.ca/cdn-contenu/adm/min/agriculture-pecheries-alimentation/sante-animale/surveillance-controle/raizo/reseau-petitsruminants/RA_bilan_petitsruminants_2013-2020_MAPAQ.pdf.
4. **Pall E, Olah D, Chira A, Duca G, Spînu M, Şandru CD, Cenariu M, Ungureanu E, Vasiu A**. Ethio-epidemiological analysis of an abortigenic outbreak of salmonellosis in sheep. *Veterinary Medicine*. 2022.
5. **Oludairo O, Kwaga J, Kabir J, Abdu P, Gitanjali A, Perets A, Cibin V, Lettini A, Aiyedun J**. A review of the International Organization for Standardization (ISO) guidelines for the detection of *Salmonella* from faeces. *Journal of Applied Veterinary Sciences*. 2022. 0(0):0-0.

6. **Oludairo O, Kwaga J, Kabir J, Abdu P, Gitanjali A, Perrets A, Cibin V, Lettini A, Aiyedun J.** Review of *Salmonella* characteristics, history, taxonomy, nomenclature, Non Typhoidal Salmonellosis (NTS) and Typhoidal Salmonellosis (TS). *Zagazig veterinary journal*. 2022. 50(2):160-171.
7. **Inés R, Luis Pedro F, José Calasanz J, Marta Ruiz de A, Héctor R, José Antonio V, Delia L.** *Salmonella enterica* subsp. *diarizonae* serotype 61:k:1:5:(7) a host adapted to sheep. In: Alexandre L, Patricia R, Carlos Manuel F, editors. *Salmonella spp.* Rijeka: IntechOpen 2021. p. Ch. 9.
8. **Ajmera A, Shabbir N.** *Salmonella*. StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing
Copyright 2022, StatPearls Publishing LLC. 2022.
9. **Anses.** Caractéristiques et sources de *Salmonella* spp. 2021. 1-4].
10. **Hyeon J-Y, Helal ZH, Polkowski R, Heishima M, Kim J, Lee D-H, Risatti GR.** Genetic features of *Salmonella enterica* subspecies *diarizonae* serovar 61:k:1,5 isolated from abortion cases in sheep, United States, 2020. *Research in veterinary science*. 2021. 138:125-136.
11. **Hutchings MI, Truman AW, Wilkinson B.** Antibiotics: past, present and future. *Current opinion in microbiology*. 2019. 51:72-80.
12. **Zygoiannis D.** Sheep production in the world and in Greece. *Small ruminant research : the journal of the International Goat Association*. 2006. 62(1-2):143-147.

13. **Morris S.** Economics of sheep production. *Small ruminant research : the journal of the International Goat Association*. 2009. 86(1-3):59-62.
14. **Davey A, Fisher R.** Live sheep export trade: review of the draft regulation impact statement. ; 2020.
15. **Morris ST.** Overview of sheep production systems. *Advances in sheep welfare*: Elsevier. 2017. p. 19-35.
16. **Wiedemann SG, Ledgard SF, Henry BK, Yan M-J, Mao N, Russell SJ.** Application of life cycle assessment to sheep production systems: investigating co-production of wool and meat using case studies from major global producers. *The international journal of life cycle assessment*. 2015. 20(4):463-476.
17. **Cottle D.** World sheep and wool production. Series éditeur: Nottingham University Press, Nottingham, UK; 2010.
18. **Whitton C, Bogueva D, Marinova D, Phillips C.** Are we approaching peak meat consumption? analysis of meat consumption from 2000 to 2019 in 35 countries and its relationship to gross domestic product. *Animals*. 2021.
19. **Inn-ovin.** La filière ovins viande 2017. . Disponible : https://www.inn-ovin.fr/wp-content/uploads/2017/10/Animal_Ovin_Reperes_2016.pdf.
20. **Pulina G, Milán MJ, Lavín MP, Theodoridis A, Morin E, Capote J, Thomas DL, Francesconi AHD, Caja G.** Invited review: Current production trends, farm

structures, and economics of the dairy sheep and goat sectors. *Journal of dairy science*. 2018. 101(8):6715-6729.

21. **Castonguay F.** Sheep farming 2015. Disponible : <https://www.thecanadianencyclopedia.ca/en/article/sheep-farming>.

22. **Gouvernement du Québec.** Monographie de l'industrie ovine du Québec. 2014. . Disponible : <https://collections.banq.qc.ca/ark:/52327/bs2388739>.

23. **Line Belleau J-FD, Raymond Alie, Simon Boulet, Lorraine Carrier, Eva Ketelsen, Michel Lecours, David Ouellet, et Raphaëlle Rodrigue.** Étude sur le coût de production- agneaux 2021. <https://www.cecpa.qc.ca/?rub=2&typeProduction=9&typeRapport=&datePublication=#liste>; 2023.

24. **Michaud C.** Race pure. CEPOQ. 2018. . Disponible : https://cepoq.com/wp-content/uploads/2019/06/Race-maternelle-et-terminale_OQ_ete_2018.pdf.

25. **Société des éleveurs de moutons de race pur au Québec.** Race maternelle 2023. Disponible : <https://www.semrpq.net/race/maternelle/>.

26. **Société des éleveurs de moutons de race pur au Québec.** Les races paternelles 2023. Disponible : <https://www.semrpq.net/race/parternelle/>.

27. **Gouvernement du Québec.** Élevage ovine (agneau). 2021. . Disponible : <https://www.quebec.ca/agriculture-environnement-et-ressources->

[naturelles/agriculture/industrie-agricole-au-quebec/productions-agricoles/elevage-ovin-agneau](https://www.nature.com/subjects/naturelles/agriculture/industrie-agricole-au-quebec/productions-agricoles/elevage-ovin-agneau).

28. **Webster D, Haase D, Marrie TJ, Campbell N, Pettipas J, Davidson R, Hatchette TF.** Ovine-associated Q fever. *Epidemiol Infect.* 2009;137(5):744-751.

29. **Besser TE, Frances Cassirer E, Highland MA, Wolff P, Justice-Allen A, Mansfield K, Davis MA, Foreyt W.** Bighorn sheep pneumonia: sorting out the cause of a polymicrobial disease. *Preventive veterinary medicine.* 2013;108(2-3):85-93.

30. **Rao S, Bashir L, Abrar M, ul Haq MA, Qayyum HT.** A review on history and detection of *Salmonella enterica* Typhi. *The journal of microbiology and molecular genetics.* 2021. 2(2):37-46.

31. **Rs P, Archana B, Prabhat Kiran K, Vikrant N.** An outbreak of gastroenteritis by *Salmonella enterica* subspecies *diarizonae*. *Archives of Clinical Gastroenterology.* 2020. 6(1):010-012.

32. **Borman EK, Stuart C, Wheeler KM.** Taxonomy of the family *Enterobacteriaceae*. *Journal of bacteriology.* 1944. 48(3):351-367.

33. **Su L, Chiu C.** *Salmonella*: clinical importance and evolution of nomenclature. *Chang Gung medical journal.* 2007. 30(3):210.

34. **Daniel Hurley MPM, Séamus Fanning, Marta Martins.** *Salmonella*–host interactions – modulation of the host innate immune system. *frontiers in immunology.* 2014.

35. **Gal-Mor O, Boyle EC, Grassl GA.** Same species, different diseases: how and why typhoidal and non-typhoidal *Salmonella enterica* serovars differ. *Frontiers in microbiology*. 2014. 5:391.
36. **Cheng RA, Eade CR, Wiedmann M.** Embracing diversity: differences in virulence mechanisms, disease severity, and host adaptations contribute to the success of nontyphoidal *Salmonella* as a foodborne pathogen. *Frontiers in microbiology*. 2019. 10:1368.
37. **Impey RE, Hawkins DA, Sutton JM, Soares da Costa TP.** Overcoming intrinsic and acquired resistance mechanisms associated with the cell wall of Gram-negative bacteria. *Antibiotics*. 2020. 9(9):623.
38. **Apostolos AJ, Pires MM.** Impact of crossbridge structure on peptidoglycan crosslinking: A synthetic stem peptide approach. *Methods in Enzymology*. 2022. 665:259-279.
39. **Wallace H. Andrews (ret.) HW, Andrew Jacobson, Beilei Ge, Guodong Zhang, and Thomas Hammack.** BAM Chapter 5: *Salmonella* 2022. . Disponible : <https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-chapter-5-salmonella#D9>.
40. **Almeida MBC.** *Salmonella* en filière porcine : dynamique d'infection, pouvoir colonisateur et virulence. 2018.
41. **International Organization for Standardization (ISO).** Microbiology of food and animal feeding stuffs — horizontal method for the detection of *Salmonella* spp. 2007.

Disponible :

<https://cdn.standards.iteh.ai/samples/42109/a683834b409e4b0aad71b39a406f9602/ISO-6579-2002-Amd-1-2007.pdf>.

42. **Tang S, Orsi RH, Luo H, Ge C, Zhang G, Baker RC, Stevenson A, Wiedmann M.** Assessment and comparison of molecular subtyping and characterization methods for *Salmonella*. *Frontiers in microbiology*. 2019;10

43. **Awang MS, Bustami Y, Hamzah HH, Zambry NS, Najib MA, Khalid MF, Aziah I, Abd Manaf A.** Advancement in *Salmonella* detection methods: from conventional to electrochemical-based sensing detection. *Biosensors*. 2021. 11(9):346.

44. **Maoudombaye T, Bodering A, Malloum MSA, Ndoutamia G, Ngakou A.** Serotyping Isolated Strains of *Salmonella* for Consumption in the Eastern Logone Province in Chad. *International Journal of Applied Sciences and Biotechnology*. 2019;7(1):43-48.

45. **Parizad EG, Parizad EG, Valizadeh A.** The application of pulsed field gel electrophoresis in clinical studies. *J Clin Diagn Res*. 2016;10(1):De01-04.

46. **Alvseike O, Vardund T, Lindstedt B, Heir E, Eriksson E, Kapperud G.** Molecular epidemiology and population genetics of *Salmonella* subspecies *diarizonae* in sheep in Norway and Sweden. *Epidemiology and Infection*. 2004;132(2):253-261.

47. **CDC.** Multiple Locus Variable-number Tandem Repeat Analysis (MLVA) 2016. Disponible :

<https://www.cdc.gov/pulsenet/pathogens/mlva.html#:~:text=What%20is%20MLVA%20>

[%28Multiple%20Locus%20Variable-Number%20Tandem%20Repeat,generate%20a%20DNA%20fingerprint%20or%20a%20bacterial%20isolate.](#)

48. **Lindstedt BA, Vardund T, Aas L, Kapperud G.** Multiple-locus variable-number tandem-repeats analysis of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium using PCR multiplexing and multicolor capillary electrophoresis. *J Microbiol Methods*. 200459(2):163-172.

49. **CDC.** PulseNet standard operating procedure for pulseNet MLVA of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis-Applied biosystems genetic analyzer 3500 platform 2013. Disponible : <https://www.cdc.gov/pulsenet/pdf/se-abi-3500-508c.pdf>.

50. **Yan S, Zhang W, Li C, Liu X, Zhu L, Chen L, Yang B.** Serotyping, MLST, and Core Genome MLST Analysis of *Salmonella enterica* From Different Sources in China During 2004–2019. *Frontiers in microbiology*. 202112

51. **Zakaria Z, Hassan L, Sharif Z, Ahmad N, Ali RM, Husin SA, Hazis NHbA, Sohaimi NFM, Bakar SA, Garba B.** Analysis of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis isolates from chickens and chicken meat products in Malaysia using PFGE, and MLST. *BMC Veterinary Research*. 202016(1):393.

52. **Fabre L, Zhang J, Guigon G, Le Hello S, Guibert V, Accou-Demartin M, de Romans S, Lim C, Roux C, Passet V.** CRISPR typing and subtyping for improved

laboratory surveillance of *Salmonella* infections. *Public Library of Science one*. 20127(5):e36995.

53. Fabre L, Zhang J, Guigon G, Le Hello S, Guibert V, Accou-Demartin M, De Romans S, Lim C, Roux C, Passet V, Diancourt L, Guibourdenche M, Issenhuth-Jeanjean S, Achtman M, Brisse S, Sola C, Weill F-X. CRISPR Typing and Subtyping for Improved Laboratory Surveillance of *Salmonella* Infections. *Public Library of Science one*. 20127(5):e36995.

54. **Wang C, Xu Z, Hou X, Wang M, Zhou C, Liang J, Wei P.** Rapid, sensitive, specific, and visual detection of *Salmonella* in retail meat with loop-mediated isothermal amplification, targeting the *invA* gene. *Journal of food protection*. 2022. 85(1):6-12.

55. **Gupta N.** DNA extraction and polymerase chain reaction. ; 2019. Apr-Jun 2019.

56. **Xiong D, Song L, Tao J, Zheng H, Zhou Z, Geng S, Pan Z, Jiao X.** An efficient multiplex PCR-based assay as a novel tool for accurate inter-serovar discrimination of *Salmonella* Enteritidis, *S. Pullorum/Gallinarum* and *S. Dublin*. *Frontiers in microbiology*. 2017. 8:420.

57. **Lee K, Iwata T, Shimizu M, Taniguchi T, Nakadai A, Hirota Y, Hayashidani H.** A novel multiplex PCR assay for *Salmonella* subspecies identification. *Journal of applied microbiology*. 2009. 107(3):805-811.

58. **Leekitcharoenphon P, Nielsen EM, Kaas RS, Lund O, Aarestrup FM.** Evaluation of whole genome sequencing for outbreak detection of *Salmonella enterica*. *Public Library of Science one*. 2014. 9(2):e87991.
59. **Thung TY, Lee E, Wai GY, Pui CF, Kuan CH, Premarathne JMKJK, M N, Tan CW, T.T.H M, O.S.B R, D.R W, New CY, R S.** A review of culture-dependent and molecular methods for detection of *Salmonella* in food safety. *Food research*. 2019. 3(6):622-627.
60. **Ibrahim GM, Morin PM.** *Salmonella* Serotyping Using Whole Genome Sequencing. *Frontiers in microbiology*. 2018. 9:2993.
61. **Ricke SC, Kim SA, Shi Z, Park SH.** Molecular-based identification and detection of *Salmonella* in food production systems: current perspectives. *Journal of applied microbiology*. 2018. 125(2):313-327.
62. **Park CJ, Andam CP.** Distinct but intertwined evolutionary histories of multiple *Salmonella enterica* subspecies. *Microbial systems*. 2020. 5(1):e00515-00519.
63. **Gouvernement du Canada.** Fiche technique santé-sécurité : agents pathogènes – *Salmonella enterica* spp. 2010. . Disponible : <https://www.canada.ca/fr/sante-publique/services/biosecurite-biosurete-laboratoire/fiches-techniques-sante-securite-agents-pathogenes-evaluation-risques/salmonella-enterica.html>.

64. **Foster N, Tang Y, Berchieri A, Geng S, Jiao X, Barrow P.** Revisiting persistent *Salmonella* infection and the carrier state: what do we know? *Pathogens*. 2021. 10(10):1299.
65. **Stevens MP, Kingsley RA.** *Salmonella* pathogenesis and host-adaptation in farmed animals. *Current opinion in microbiology*. 2021. 63:52-58.
66. **Perera SR, Sokaribo AS, White AP.** Polysaccharide vaccines: a perspective on non-typhoidal *Salmonella*. *Polysaccharides*. 2021. 2(3):691-714.
67. **Wiedemann A, Virlogeux-Payant I, Chaussé A-M, Schikora A, Velge P.** Interactions of *Salmonella* with animals and plants. *Frontiers in microbiology*. 2015. 5:791.
68. **Uzzau S, Brown DJ, Wallis T, Rubino S, Leori G, Bernard S, CasadesÚS J, Platt DJ, Olsen JE.** Host adapted serotypes of *Salmonella enterica*. *Epidemiology & Infection*. 2000. 125(2):229-255.
69. **Knuff-Janzen K, Tupin A, Yurist-Doutsch S, Rowland JL, Finlay BB.** Multiple *Salmonella*-pathogenicity island 2 effectors are required to facilitate bacterial establishment of its intracellular niche and virulence. *Public Library of Science one*. 2020. 15(6):e0235020.
70. **Azimi T, Zamirnasta M, Sani MA, Soltan Dallal MM, Nasser A.** Molecular mechanisms of *Salmonella* effector proteins: a comprehensive review. *Infection and Drug Resistance*. 2020. Volume 13:11-26.

71. **Gibson DL, White AP, Snyder SD, Martin S, Heiss C, Azadi P, Surette M, Kay WW.** *Salmonella* produces an O-Antigen capsule regulated by agfD and important for environmental persistence. *Journal of bacteriology*. 2006. 188(22):7722-7730.
72. **Quan G, Xia P, Zhao J, Zhu C, Meng X, Yang Y, Wang Y, Tian Y, Ding X, Zhu G.** Fimbriae and related receptors for *Salmonella* Enteritidis. *Microbial pathogenesis*. 2019. 126:357-362.
73. **Karine D, France D.** *Salmonella* fimbriae: what is the clue to their hairdo? In: Mihai M, editor. Current topics in *Salmonella* and salmonellosis. Rijeka: IntechOpen 2017. p. Ch. 4.
74. **Felgner S, Spöring I, Pawar V, Kocijancic D, Preusse M, Falk C, Rohde M, Häussler S, Weiss S, Erhardt M.** The immunogenic potential of bacterial flagella for *Salmonella*-mediated tumor therapy. *International journal of cancer*. 2020. 147(2):448-460.
75. **Minamino T, Morimoto YV, Kawamoto A, Terashima H, Imada K.** *Salmonella* flagellum. *Salmonella - A Re-emerging Pathogen*: InTech 2018.
76. **Lou L, Zhang P, Piao R, Wang Y.** *Salmonella* Pathogenicity Island 1 (SPI-1) and its complex regulatory network. *Frontiers in cellular and infection microbiology*. 2019. 9
77. **Vishwakarma V, Pati NB, Ray S, Das S, Suar M.** TTSS2-deficient mutant of *Salmonella* Typhimurium exhibits significant systemic attenuation in immunocompromised hosts. *Virulence*. 2014. 5(2):311-320.

78. **Ahmer BM, Gunn JS.** Interaction of *Salmonella* spp. with the intestinal microbiota. *Frontiers in microbiology*. 2011. 2:101.
79. **van Asten AJAM, van Dijk JE.** Distribution of “classic” virulence factors among *Salmonella* spp. *FEMS immunology and medical microbiology*. 2005. 44(3):251-259.
80. **Jaiswal S, Paul P, Padhi C, Ray S, Ryan D, Dash S, Suar M.** The *Hha-TomB* toxin-antitoxin system shows conditional toxicity and promotes persister cell formation by inhibiting apoptosis-like death in *S. Typhimurium*. *Scientific Reports*. 2016. 6(1):1-14.
81. **Hitchcock PJ, Leive L, Mäkelä P, Rietschel ET, Strittmatter W, Morrison D.** Lipopolysaccharide nomenclature-past, present, and future. *Journal of bacteriology*. 1986. 166(3):699-705.
82. **Rodriguez-Rivera LD, Bowen BM, den Bakker HC, Duhamel GE, Wiedmann M.** Characterization of the cytolethal distending toxin (typhoid toxin) in non-typhoidal *Salmonella* serovars. *Gut pathogens*. 2015. 7(1):19.
83. **Ali A, Sarmah R, Rahman H, Saikia GK.** Factors influencing production of *Salmonella* enterotoxin (*Stn*). *International journal of chemical studies*. 2020. 8(2):1158-1161.
84. **Farouk MM, El-Molla A, Salib FA, Soliman YA.** Epidemiology of *Salmonella* species in diarrheic sheep and goats. *Pakistan journal of zoology*. 2021. 54:1-9.

85. **Ćwiek K, Bugla-Płoskońska G, Wieliczko A.** *Salmonella* biofilm development: structure and significance. *Advances in hygiene & experimental medicine/Postępy higieny i medycyny doświadczalnej*. 2019. 73
86. **Vysakh A, Midhun SJ, Jayesh K, Jyothis M, Latha MS.** Studies on biofilm formation and virulence factors associated with uropathogenic *Escherichia coli* isolated from patient with acute pyelonephritis. *Pathophysiology : the official journal of the International Society for Pathophysiology / ISP*. 2018. 25(4):381-387.
87. **Lamas A, Miranda JM, Regal P, Vázquez B, Franco CM, Cepeda A.** A comprehensive review of non-*enterica* subspecies of *Salmonella enterica*. *Microbiological research*. 2018. 206:60-73.
88. **Chatzopoulos DC, Vasileiou NGC, Ioannidi KS, Katsafadou AI, Mavrogianni VS, Michael CK, Katsarou EI, Karavanis E, Papadopoulos N, Sbiraki A, Athanasiou LV, Billinis C, Fthenakis GC.** Experimental Study of the Potential Role of *Salmonella enterica* subsp. *diarizonae* in the Diarrhoeic Syndrome of Lambs. *Pathogens*. 2021. 10(2)
89. **Uelze L, Borowiak M, Deneke C, Jacobs C, Szabó I, Tausch SH, Malorny B.** First complete genome sequence and comparative analysis of *Salmonella enterica* subsp. *diarizonae* serovar 61:k:1,5,(7) indicates host adaptation traits to sheep. *Gut pathogens*. 2019. 11(1)
90. **Sörén K, Lindblad M, Jernberg C, Eriksson E, Melin L, Wahlström H, Lundh M.** Changes in the risk management of *Salmonella enterica* subspecies *diarizonae* serovar

61:(k):1, 5, (7) in Swedish sheep herds and sheep meat due to the results of a prevalence study 2012. *Acta Vet Scand.* 2015. 57(1):6.

91. **Stokar-Regenscheit N, Overesch G, Giezendanner R, Roos S, Gurtner C.** *Salmonella enterica* subsp. *diarizonae* serotype 61:k:1,5,(7) associated with chronic proliferative rhinitis and high nasal colonization rates in a flock of Texel sheep in Switzerland. *Preventive veterinary medicine.* 2017. 145:78-82.

92. **Gebeyehu DT.** The foodborne diseases antimicrobial resistance development in food animals: A case of *Salmonella* isolates from diarrheic sheep in and around Gondar city, Ethiopia: A cross-sectional study. 2020.

93. **Dargatz DA, Marshall KL, Fedorka-Cray PJ, Erdman MM, Koprak CA.** *Salmonella* prevalence and antimicrobial susceptibility from the National Animal Health Monitoring System Sheep 2011 study. *Foodborne Pathogens and Disease.* 2015. 12(12):953-957.

94. **Methner U, Moog U.** Occurrence and characterisation of *Salmonella enterica* subspecies *diarizonae* serovar 61: k: 1, 5, (7) in sheep in the federal state of Thuringia, Germany. *BMC Veterinary Research.* 2018. 14(1)

95. **Figueras L, Ferrer LM, González JM, Bueso JP, Ramos JJ, Rubira I, Burian E, Lacasta D.** Prevalence of *Salmonella enterica* subsp. *diarizonae* serotype 61:k:1:5:(7) in nasal secretions and stool of sheep flocks with and without cases of chronic proliferative rhinitis. *Veterinary Microbiology.* 2020. 247:108767.

96. **World Organisation for Animal Health (OIE)**. Animal health information World Animal Health Information Database (WAHIS Interface). 2013. . Disponible : https://former.woah.org/wahis_2/public/wahid.php/Diseaseinformation/statusdetail.
97. **Edmondson MA, Roberts JF, Baird AN, Bychawski S, Pugh DG**. Chapter 8 - Theriogenology of Sheep and Goats. In: Pugh DG, Baird AN, editors. Sheep and Goat Medicine (Second Edition). Saint Louis: W.B. Saunders 2012. p. 150-230.
98. **The Center for Food Security & Public Health**. *Salmonella* Abortusovis. 2017.
99. **Amagliani G, La Guardia ME, Dominici S, Brandi G, Omiccioli E**. *Salmonella* Abortusovis: an epidemiologically relevant pathogen. *Current Microbiology*. 2021. 79(1):3.
100. **Cetin E, Temelli S, Eyigor A**. Nontyphoid *Salmonella* prevalence, perovar distribution and antimicrobial resistance in slaughter sheep. *Food Science of Animal Resources*. 2020. 40(1):21-33.
101. **Crim SM, Chai SJ, Karp BE, Judd MC, Reynolds J, Swanson KC, Nisler A, McCullough A, Gould LH**. *Salmonella enterica* serotype Newport infections in the United States, 2004-2013: increased incidence investigated through four surveillance systems. *Foodborne Pathogens and Disease*. 2018. 15(10):612-620.
102. **Paudyal N, Pan H, Wu B, Zhou X, Zhou X, Chai W, Wu Q, Li S, Li F, Gu G, Wang H, Hu Q, Xu X, Li Y, Yue M**. Persistent asymptomatic human infections by *Salmonella enterica* serovar Newport in China. *mSphere*. 2020. 5(3):e00163-00120.

103. **Chaves-Lopez C, De Angelis M, Martuscelli M, Serio A, Paparella A, Suzzi G.** Characterization of the *Enterobacteriaceae* isolated from an artisanal Italian ewe's cheese (Pecorino Abruzzese). *Journal of applied microbiology*. 2006. 101(2):353-360.
104. **Adla Benzaouche ASD, Amine Abdelli, Dalila Tarzaali, Ali Dahmani, Ali Berbar, Naima Sahraoui.** Prevalence and risk factors of *Salmonella* spp. in ovine flocks in the central region of Algeria. *Veterinaria*. 2021. 70(3)
105. **Lee Y-C, Hung M-C, Hung S-C, Wang H-P, Cho H-L, Lai M-C, Wang J-T.** *Salmonella enterica* subspecies *arizonae* infection of adult patients in Southern Taiwan: a case series in a non-endemic area and literature review. *BioMed Central infectious diseases*. 2016. 16(1)
106. **Long JR, Finley GG, Clark MH, Rehmtulla AJ.** Ovine fetal infection due to *Salmonella arizonae*. *The Canadian veterinary journal*. 1978. 19(9):260-263.
107. **Pritchard J.** Alberta. *Salmonella arizonae* in sheep. *The Canadian veterinary journal*. 1990. 31(1):42.
108. **Lisa Scott PM, Richard J. Reid-Smith, Brent P. Avery, Scott A. McEwen, Catherine S. Moon, and Olaf Berke.** Antimicrobial resistance in fecal generic *Escherichia coli* and *Salmonella* spp. obtained from Ontario sheep flocks and associations between antimicrobial use and resistance. *The Canadian Journal of Veterinary Research*. 2012.

109. **Bélangier P, Tanguay F, Hamel M, Phypers M.** Foodborne illness: an overview of foodborne outbreaks in Canada reported through outbreak summaries: 2008-2014. *Canada Communicable Disease Report.* 2015. 41(11):254.
110. **Liu B, Zhang X, Ding X, Bin P, Zhu G.** The vertical transmission of *Salmonella* Enteritidis in a One-Health context. *One Health.* 2023. 16:100469.
111. **Van TTH, Yidana Z, Smooker PM, Coloe PJ.** Antibiotic use in food animals worldwide, with a focus on Africa: pluses and minuses. *Journal of global antimicrobial resistance.* 2020. 20:170-177.
112. **Rhouma M, Tessier M, Aenishaenslin C, Sanders P, Carabin H.** Should the increased awareness of the One Health approach brought by the COVID-19 pandemic be used to further tackle the challenge of antimicrobial resistance? *Antibiotics.* 2021. 10(4):464.
113. **Gouvernement du Canada.** Catégorisation des médicaments antimicrobiens basée sur leur importance en médecine humaine 2009 updated 2021-10-19. Disponible : <https://www.canada.ca/fr/sante-canada/services/medicaments-produits-sante/medicaments-veterinaires/resistance-antimicrobiens/categorisation-medicaments-antimicrobiens-basee-leur-importance-medecine-humaine.html>.
114. **Government of Canada.** Responsible use of medically important antimicrobials in animals. 2021. . Disponible : <https://www.canada.ca/en/public-health/services/antibiotic-antimicrobial-resistance/animals/actions/responsible-use-antimicrobials.html>.

115. **Gouvernement du Québec.** Réglementation sur l'utilisation des antibiotiques chez les animaux. 2023. . Disponible : <https://www.quebec.ca/agriculture-environnement-et-ressources-naturelles/sante-animale/usage-antibiotiques/reglementation>.
116. **Gouvernement du Canada.** Liste de médicaments interdits. 2004. updated 2005-08-26. Disponible : <https://www.canada.ca/fr/sante-canada/services/medicaments-produits-sante/medicaments-veterinaires/liste-medicament-interdit.html>.
117. **Gouvernement du Québec.** Règlement sur l'administration de certains médicaments 2022. Disponible de: <https://www.legisquebec.gouv.qc.ca/fr/document/rc/P-42,%20r.%201%20/>.
118. **Roy J-P, Archambault M, Desrochers A, Dubuc J, Dufour S, Francoz D, Paradis M-È, Rousseau M.** New Quebec regulation on the use of antimicrobials of very high importance in food animals: implementation and impacts in dairy cattle practice. *The Canadian veterinary journal*. 2020. 61(2):193.
119. **Gouvernement du Canada.** Lutter contre la résistance aux antimicrobiens et optimiser leur utilisation : un cadre d'action pancanadien. 2017. Disponible : <https://www.canada.ca/fr/sante-canada/services/publications/medicaments-et-produits-sante/lutter-contre-resistance-antimicrobiens-optimiser-utilisation-cadre-action-pancanadien.html#a1.2>.
120. **Chicken farmers of Canada.** Chicken and antibiotics let's chat about the facts. 2021. Disponible : <https://www.chickenfarmers.ca/wp-content/uploads/2021/05/AMU-Infographic.pdf>.

121. **Chicken Farmers of Canada**. Canadian chicken industry reduces antimicrobial use 2018. Disponible : <https://www.chickenfarmers.ca/wp-content/uploads/2018/04/AMU-Strategy-One-pager-Version-3.0.pdf>.
122. **Avery BP**. Antimicrobial use in sheep and antimicrobial resistance among *Salmonella spp.* and *Escherichia coli* from cull ewes in Alberta : University of Guelph; 2003.
123. **CEPOQ**. Guide d'utilisation des médicaments en santé ovine 2020. Disponible : <https://cepoq.com/?s=fiche+pharmacie+ovine&lang=fr>.
124. **Haggett EF, Wilson WD**. Overview of the use of antimicrobials for the treatment of bacterial infections in horses. *Equine Veterinary Education*. 2008. 20(8):433-448.
125. **Sasseville D**. Neomycin. *Dermatitis : contact, atopic, occupational, drug*. 2010. 21(1):3-7.
126. **Arsic B, Barber J, Čikoš A, Mladenovic M, Stankovic N, Novak P**. 16-membered macrolide antibiotics: a review. *International journal of antimicrobial agents*. 2018. 51(3):283-298.
127. **Dognon SR, Douny C, Salifou CFA, Ahounou GS, Dognon J, Sessou P, Karim AYA, Karim IYA, Scippo M-L**. Qualité des antibiotiques vétérinaires utilisés en Afrique de l'Ouest et méthodes de détection de leurs résidus dans les denrées alimentaires. *Journal of animal and plant sciences*. 2018. 36(2):5858-5877.

128. **Suybeng B, Charmley E, Gardiner CP, Malau-Aduli BS, Malau-Aduli AEO.** Methane emissions and the use of desmanthus in beef cattle production in Northern Australia. *Animals : an open access journal from MDPI*. 2019. 9(8):542.
129. **Rhouma M, Soufi L, Cenatus S, Archambault M, Butaye P.** Current insights regarding the role of farm animals in the spread of antimicrobial resistance from a One Health perspective. *Veterinary Sciences*. 2022. 9(9):480.
130. **Khan ZA, Siddiqui MF, Park S.** Current and emerging methods of antibiotic susceptibility testing. *Diagnostics*. 2019. 9(2):49.
131. **Dadgostar P.** Antimicrobial resistance: implications and costs. *Infection and Drug Resistance*. 2019. 12:3903-3910.
132. **McDermott PF, Zhao S, Tate H.** Antimicrobial resistance in nontyphoidal *Salmonella*. *Microbiology spectrum*. 2018. 6(4):6.4.16.
133. **Lalitha M.** Manual on antimicrobial susceptibility testing. Series éditeur2004. 454-456 p.
134. **Jorgensen JH, Turnidge JD.** Susceptibility test methods: dilution and disk diffusion methods. : ASM Press 2015. p. 1253-1273.
135. **Anjum MF, Zankari E, Hasman H.** Molecular methods for detection of antimicrobial resistance. *Microbiology spectrum*. 2017. 5(6):33-50.

136. **Alexander KA, Warnick LD, Wiedmann M.** Antimicrobial resistant *Salmonella* in dairy cattle in the United States. *Veterinary Research Communications*. 2009. 33(3):191-209.
137. **Wang Y, Ge H, Wei X, Zhao X.** Research progress on antibiotic resistance of *Salmonella*. *Food Quality and Safety*. 2022. 6
138. **Lu X, Zeng M, Zhang N, Wang M, Gu B, Li J, Jin H, Xiao W, Li Z, Zhao H.** Prevalence of 16S rRNA methylation enzyme gene *armA* in *Salmonella* from outpatients and food. *Frontiers in microbiology*. 2021:969.
139. **Zhang Y, Zhang N, Wang M, Luo M, Peng Y, Li Z, Xu J, Ou M, Kan B, Li X.** The prevalence and distribution of aminoglycoside resistance genes. *Biosafety and Health*. 2023.
140. **Ramirez MS, Tolmasky ME.** Aminoglycoside modifying enzymes. *Drug resistance updates : reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy*. 2010. 13(6):151-171.
141. **Chaudhari R, Singh K, Kodgire P.** Biochemical and molecular mechanisms of antibiotic resistance in *Salmonella spp.* *Research in Microbiology*. 2022. 174(1):103985.
142. **Shaheen A, Tariq A, Iqbal M, Mirza O, Haque A, Walz T, Rahman M.** Mutational diversity in the quinolone resistance-determining regions of type-II topoisomerases of *Salmonella* serovars. *Antibiotics*. 2021. 10(12):1455.

143. **Yu K, Wang H, Cao Z, Gai Y, Liu M, Li G, Lu L, Luan X.** Antimicrobial resistance analysis and whole-genome sequencing of *Salmonella enterica* serovar Indiana isolate from ducks. *Journal of global antimicrobial resistance*. 2022. 28:78-83.
144. **Vazquez-Pertejo MT.** AntibioGramme 2022. Available from: <https://www.merckmanuals.com/fr-ca/professional/maladies-infectieuses/diagnostic-biologique-des-maladies-infectieuses/antibiogramme>.
145. **Balouiri M, Sadiki M, Ibsouda SK.** Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of pharmaceutical analysis*. 2016. 6(2):71-79.
146. **Reller LB, Weinstein M, Jorgensen JH, Ferraro MJ.** Antimicrobial susceptibility testing: a review of general principles and contemporary practices. *Clinical infectious diseases*. 2009. 49(11):1749-1755.
147. **Catry B, Cavaleri M, Baptiste K, Grave K, Grein K, Holm A, Jukes H, Liebana E, Navas AL, Mackay D, Magiorakos A-P, Romo MAM, Moulin G, Madero CM, Pomba MCMF, Powell M, Pyörälä S, Rantala M, Ružauskas M, Sanders P, Teale C, Threlfall EJ, Törneke K, van Duijkeren E, Edo JT.** Use of colistin-containing products within the European Union and European Economic Area (EU/EEA): development of resistance in animals and possible impact on human and animal health. *International journal of antimicrobial agents*. 2015. 46(3):297-306.
148. **Abdou Mohamed MA, Kozłowski HN, Kim J, Zagorovsky K, Kantor M, Feld JJ, Mubareka S, Mazzulli T, Chan WCW.** Diagnosing antibiotic resistance using nucleic acid enzymes and gold nanoparticles. *ACS Nano*. 2021. 15(6):9379-9390.

149. **Gajic I, Kabic J, Kekic D, Jovicevic M, Milenkovic M, Mitic Culafic D, Trudic A, Ranin L, Opavski N.** Antimicrobial susceptibility testing: a comprehensive review of currently used methods. *Antibiotics*. 2022. 11(4):427.
150. **Gerace E, Mancuso G, Midiri A, Poidomani S, Zummo S, Biondo C.** Recent advances in the use of molecular methods for the diagnosis of bacterial infections. *Pathogens*. 2022. 11(6):663.
151. **Florio W, Baldeschi L, Rizzato C, Tavanti A, Ghelardi E, Lupetti A.** Detection of antibiotic-resistance by MALDI-TOF mass spectrometry: an expanding area. *Frontiers in cellular and infection microbiology*. 2020. 10:572909.
152. **Weber M, Zanolari P, Ardüser F, Stucki D, Akarsu H, Overesch G.** Prevalence and antimicrobial resistance of *Salmonella enterica* subsp. *diarizonae* serovar 61:k:1,5,(7) in Swiss sheep flocks. *Preventive veterinary medicine*. 2022. 206:105697.
153. **Hawwas HAE-H, Aboueisha A-KM, Fadel HM, El-Mahallawy HS.** *Salmonella* serovars in sheep and goats and their probable zoonotic potential to humans in Suez Canal Area, Egypt. *Acta Veterinaria Scandinavica*. 2022;64(1):1-13.
154. **Dehghani B, Rasooli I, Gargari SLM, Nadooshan MRJ, Owlia P, Nazarian S.** Immunogenicity of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis virulence protein, InvH, and cross-reactivity of its antisera with *Salmonella* strains. *Microbiological research*. 2013;168(2):84-90.

155. **Yoshida C, Gurnik S, Ahmad A, Blimkie T, Murphy SA, Kropinski AM, Nash JH.** Evaluation of Molecular Methods for Identification of *Salmonella* Serovars. *J Clin Microbiol.* 2016;54(8):1992-1998.
156. **Atlaw NA, Keelara S, Correa M, Foster D, Gebreyes W, Aidara-Kane A, Harden L, Thakur S, Fedorka-Cray PJ.** Evidence of sheep and abattoir environment as important reservoirs of multidrug resistant *Salmonella* and extended-spectrum beta-lactamase *Escherichia coli*. *International journal of food microbiology.* 2022. 363:109516.
157. **Larivière-Gauthier G, Thibodeau A, Letellier A, Yergeau É, Fravallo P.** *Salmonella* shedding status of the sow affects the microbiota of their piglets at weaning. *Journal of applied microbiology.* 2019. 126(2):411-423.
158. **Yachison CA, Yoshida C, Robertson J, Nash JHE, Kruczkiewicz P, Taboada EN, Walker M, Reimer A, Christianson S, Nichani A, Nadon C.** The Validation and Implications of Using Whole Genome Sequencing as a Replacement for Traditional Serotyping for a National *Salmonella* Reference Laboratory. *Frontiers in microbiology.* 2017. 8:1044.
159. **Langridge GC, Fookes M, Connor TR, Feltwell T, Feasey N, Parsons BN, Seth-Smith HM, Barquist L, Stedman A, Humphrey T, Wigley P, Peters SE, Maskell DJ, Corander J, Chabalgoity JA, Barrow P, Parkhill J, Dougan G, Thomson NR.** Patterns of genome evolution that have accompanied host adaptation in *Salmonella*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2015;112(3):863-868.

160. **Hoelzer K, Moreno Switt AI, Wiedmann M.** Animal contact as a source of human non-typhoidal salmonellosis. *Vet Res.* 201142(1):34.
161. Canene-Adams K. General PCR. *Methods Enzymol.* 2013529:291-298.
162. **Zweifel C, Zychowska MA, Stephan R.** Prevalence and characteristics of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*, *Salmonella* spp. and *Campylobacter* spp. isolated from slaughtered sheep in Switzerland. *International journal of food microbiology.* 2004. 92(1):45-53.
163. **Amini K, Mobasseri P.** Detection and molecular identification of plasmid virulence genes in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium isolated from human and animals by multiplex PCR method. *Journal of Medical Bacteriology.* 2019. 8(3-4):31-39.
164. **Pires SM, Vigre H, Makela P, Hald T.** Using Outbreak Data for Source Attribution of Human Salmonellosis and Campylobacteriosis in Europe. *Foodborne Pathogens and Disease.* 20107(11):1351-1361.
165. **Chanamé Pinedo L, Mughini-Gras L, Franz E, Hald T, Pires SM.** Sources and trends of human salmonellosis in Europe, 2015–2019: An analysis of outbreak data. *International journal of food microbiology.* 2022379:109850.
166. **Government of Canada.** Infographic: Food-related illnesses, hospitalizations and deaths in Canada. 2016. Disponible : <https://www.canada.ca/en/public-health/services/publications/food-nutrition/infographic-food-related-illnesses-hospitalizations-deaths-in-canada.html>.

167. CDC. *Salmonella* 2023. Disponible : <https://www.cdc.gov/salmonella/index.html>.
168. **Chatzopoulos DC, Sarrou S, Vasileiou NGC, Ioannidi KS, Peteinaki E, Valiakos G, Tsokana CN, Papadopoulos E, Spyrou V, Mavrogianni VS, Giannakopoulos A, Sbiraki A, Lacasta D, Bueso JP, Athanasiou LV, Billinis C, Fthenakis GC.** Dissemination of intestinal pathogens between lambs and puppies in sheep farms. *Small ruminant research : the journal of the International Goat Association*. 2016. 141:5-10.
169. **Sandberg M, Alvseike O, Skjerve E.** The prevalence and dynamics of *Salmonella enterica* IIIb 61:k:1,5,(7) in sheep flocks in Norway. *Preventive veterinary medicine*. 2002. 52(3-4):267-275.
170. Davies R, Evans S, Preece B, Chappell S, Kidd S, Jones Y. Increase in *Salmonella enterica* subspecies diarizonae serovar 61: k: 1, 5,(7) in sheep. *The Veterinary Record*. 2001;149(18):555-557.
171. **Wirz-Dittus S, Belloy L, Hüsey D, Waldvogel AS, Doherr MG.** Seroprevalence survey for *Salmonella Abortusovis* infection in Swiss sheep flocks. *Preventive veterinary medicine*. 2010;97(2):126-130.
172. Atlaw NA, Keelara S, Correa M, Foster D, Gebreyes W, Aidara-Kane A, Harden L, Thakur S, Fedorka-Cray PJ. Evidence of sheep and abattoir environment as important reservoirs of multidrug resistant *Salmonella* and extended-spectrum beta-lactamase *Escherichia coli*. *International journal of food microbiology*. 2022;363:109516.

173. **Uelze L, Borowiak M, Flieger A, Simon S, Tausch SH, Malorny B.** Complete Genome Sequence of *Salmonella enterica* subsp. *diarizonae* Serovar 61:k:1,5,(7) Strain 14-SA00836-0, Isolated from human urine. *Microbiol Resour Announc.* 2020. 9(36)
174. **Giner-Lamia J, Vinuesa P, Betancor L, Silva C, Bisio J, Soletto L, Chabalgoity JA, Puente JL, Soncini FC, García-Vescovi E, Flores G, Pedraza J, Yim L, García C, Astocondor L, Ochoa T, Hinostroza N, Pucciarelli MG, Hernández-Alvarez A, del Moral V, García-del Portillo F, The Salmonella CN.** Genome analysis of *Salmonella enterica* subsp. *diarizonae* isolates from invasive human infections reveals enrichment of virulence-related functions in lineage ST1256. *BMC Genomics.* 2020(1):373.
175. **Government of Canada.** Customized report service – Market Overview – Canadian lamb and sheep meat and related product trends 2021. Disponible : <https://agriculture.canada.ca/en/sector/animal-industry/red-meat-and-livestock-market-information/customized-report-service-market-overview-canadian-lamb-and-sheep-meat-and-related-product-trends#e>.
176. **Bauman CA, Jones-Bitton A, Menzies P, Toft N, Jansen J, Kelton D.** Prevalence of paratuberculosis in the dairy goat and dairy sheep industries in Ontario, Canada. *The Canadian veterinary journal.* 2016. 57(2):169-175.
177. **Collins M.** Paratuberculosis in Ruminants. Merck Manual. 2022. Disponible : <https://www.merckvetmanual.com/digestive-system/intestinal-diseases-in-ruminants/paratuberculosis-in-ruminants>.

178. Schlasiva Cenatus JA, Isabelle Bernaques, Sadjia Bekal, William Thériault, Mohamed Rhouma. Comparison of multiplex-PCR and Whole-genome sequencing in the identification of Salmonella isolates obtained from sheep feces. *Frontiers in cellular and infection microbiology*. 2024
179. **Gurevich A, Saveliev, V., Vyahhi, N., Tesler, G.** QUASt: quality assessment tool for genome assemblies. *Bioinformatics*. 2013. 29:1072-1075.
180. **Seemann T.** Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics*. 2014. 30(14):2068-2069.
181. **Bharat A, Petkau A, Avery BP, Chen JC, Folster JP, Carson CA, Kearney A, Nadon C, Mabon P, Thiessen J, Alexander DC, Allen V, El Bailey S, Bekal S, German GJ, Haldane D, Hoang L, Chui L, Minion J, Zahariadis G, Domselaar GV, Reid-Smith RJ, Mulvey MR.** Correlation between Phenotypic and In Silico Detection of Antimicrobial Resistance in *Salmonella enterica* in Canada Using Staramr. *Microorganisms*. 2022. 10(2)
182. **Robertson J, Bessonov K, Schonfeld J, Nash JH.** Universal whole-sequence-based plasmid typing and its utility to prediction of host range and epidemiological surveillance. *Microbial Genomics*. 2020. 6(10)
183. **Alikhan NF, Petty NK, Ben Zakour NL, Beatson SA.** BLAST Ring Image Generator (BRIG): simple prokaryote genome comparisons. *BMC Genomics*. 2011. 12:402.

184. **Roer L, Hendriksen RS, Leekitcharoenphon P, Lukjancenko O, Kaas RS, Hasman H, Aarestrup FM.** Is the Evolution of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* Linked to Restriction-Modification Systems? *Microbial systems*. 20161(3)
185. **Richard Schwalbe LS-M, Avery C. Goodwin,** editor. Antimicrobial susceptibility testing protocols. 2007.
186. **Wayne P.** Clinical and Laboratory Standards Institute: Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: 20th informational supplement 2010.
187. **Moré E, Ayats T, Ryan PG, Naicker PR, Keddy KH, Gaglio D, Witteveen M, Cerdà-Cuéllar M.** Seabirds (Laridae) as a source of *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp. and antimicrobial resistance in South Africa. *Environ Microbiol*. 201719(10):4164-4176.
188. **Jori F, Hernandez-Jover M, Magouras I, Dürr S, Brookes VJ.** Wildlife–livestock interactions in animal production systems: what are the biosecurity and health implications? *Animal Frontiers*. 202111(5):8-19.
189. **Youssef DM, Wieland B, Knight GM, Lines J, Naylor NR.** The effectiveness of biosecurity interventions in reducing the transmission of bacteria from livestock to humans at the farm level: a systematic literature review. *Zoonoses and public health*. 202168(6):549-562.
190. **Nielsen LR.** Within-herd prevalence of *Salmonella* Dublin in endemically infected dairy herds. *Epidemiol Infect*. 2013141(10):2074-2082.

191. **Schnydrig P, Overesch G, Regli W, Bee A, Rodriguez-Campos S.** *Salmonella enterica* subspecies *diarizonae* serovar 61:(k): 1, 5,(7) as cause of caprine abortion. *Small Ruminant Research*. 2018;166:78-82.
192. **Amavisit P, Lightfoot D, Browning GF, Markham PF.** Variation between Pathogenic Serovars within *Salmonella* Pathogenicity Islands. *Journal of bacteriology*. 2003;185(12):3624-3635.
193. **Hayer SS, Casanova-Higes A, Paladino E, Elnekave E, Nault A, Johnson T, Bender J, Perez A, Alvarez J.** Global distribution of fluoroquinolone and colistin resistance and associated resistance markers in *Escherichia coli* of swine origin—a systematic review and meta-analysis. *Frontiers in microbiology*. 2022;13:834793.
194. **Ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation (MAPAQ).** Enregistrement des exploitations agricoles. 2023. Disponible : <https://www.mapaq.gouv.qc.ca/fr/Productions/enregistrement/Pages/enregistrement.aspx>.
195. **Plateforme, de surveillance de la chaîne alimentaire.** Méthodes analytiques - *Salmonella* spp. Annexe 6 2019. Disponible : <https://www.plateforme-sca.fr/sites/default/files/2020-09/6-Annexe BD-1.pdf>.
196. **International Organization for Standardization (ISO).** Microbiologie des aliments — méthode horizontale pour la recherche, le dénombrement et le sérotypage des *Salmonella*. 2012. Disponible : <https://www.iso.org/obp/ui/#iso:std:iso:ts:6579:-2:ed-1:v1:fr>.

197. **Duffy LL, Small A, Fegan N.** Concentration and prevalence of *Escherichia coli* O157 and *Salmonella* serotypes in sheep during slaughter at two Australian abattoirs. *Aust Vet J.* 2010. 88(10):399-404.
198. **Liu B, Zheng D, Zhou S, Chen L, Yang J.** VFDB 2022: a general classification scheme for bacterial virulence factors. *Nucleic Acids Research.* 202150(D1):D912-D917.
199. **Liu B, Zheng D, Jin Q, Chen L, Yang J.** VFDB 2019: a comparative pathogenomic platform with an interactive web interface. *Nucleic Acids Research.* 201947(D1):D687-D692.
200. **Moezi P, Kargar M, Doosti A, Khoshneviszadeh M.** Multiplex touchdown PCR assay to enhance specificity and sensitivity for concurrent detection of four foodborne pathogens in raw milk. *Journal of applied microbiology.* 2019. 127(1):262-273.
201. **Thompson CP, Doak AN, Amirani N, Schroeder EA, Wright J, Kariyawasam S, Lamendella R, Shariat NW.** High-resolution identification of multiple *Salmonella* serovars in a single sample by using CRISPR-SeroSeq. *Applied and environmental microbiology.* 2018. 84(21):e01859-01818.
202. **Ma Y, Ding S, Fei Y, Liu G, Jang H, Fang J.** Antimicrobial activity of anthocyanins and catechins against foodborne pathogens *Escherichia coli* and *Salmonella*. *Food Control.* 2019. 106:106712.