

Université de Montréal

**Prévalence, description et facteurs de risque de l'antibiorésistance dans les fermes  
québécoises de bovins laitiers**

Par

Jonathan Massé

Département de pathologie et microbiologie

Faculté de médecine vétérinaire

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

Octobre 2023

© Jonathan Massé, 2023

Université de Montréal

Département de pathologie et microbiologie, Faculté de médecine vétérinaire

---

*Cette thèse intitulée*

**Prévalence, description et facteurs de risque de l'antibiorésistance dans les fermes québécoises de bovins laitiers**

*Présentée par*

**Jonathan Massé**

*A été évaluée par un jury composé des personnes suivantes*

**Gustavo Zamberlam**

Président-rapporteur

**Marie Archambault**

Directrice de recherche

**Simon Dufour**

Codirecteur

**David Francoz**

Codirecteur

**Juan Carlos Arango Sabogal**

Membre du jury

**Aurélien Madouasse**

Examineur externe

## Résumé

La résistance aux antimicrobiens (RAM) est un problème de santé publique mondial avec des répercussions importantes en médecine vétérinaire et humaine. Elle est classiquement associée à une surutilisation des antimicrobiens. Les bactéries commensales des animaux et des humains, tel *Escherichia coli*, sont souvent utilisées comme bactéries indicatrices pour surveiller la RAM. Parmi les mécanismes de résistance de *E. coli*, la production de  $\beta$ -lactamases à spectre étendue (BLSE) ou de type AmpC est particulièrement inquiétante. Ces enzymes peuvent inactiver une classe d'antimicrobien de très haute importance en santé humaine également utilisée en médecine vétérinaire : les céphalosporines de 3<sup>e</sup> génération. La prévalence générale de la RAM ainsi que la présence de *E. coli* producteur de BLSE/AmpC dans les troupeaux laitiers québécois sont inconnues. De plus, la transmission de ces bactéries résistantes et les facteurs de risque associés à leurs excréctions par les bovins laitiers sont actuellement peu documentés. L'objectif général de cette thèse était d'explorer la RAM par une étude transversale observationnelle sur des fermes québécoises de bovins laitiers sélectionnées aléatoirement ( $n = 101$ ). La première étape du projet constituait à décrire la prévalence de cette RAM pour la bactérie *E. coli* isolée des matières fécales des animaux (vaches en lactation, veaux pré-sevrage) et de l'environnement (fosse à fumier). La prévalence de RAM observée pour les *E. coli* indicateurs était faible (<5%) pour les antimicrobiens de très haute importance en médecine humaine (céphalosporines de 3<sup>e</sup> génération et fluoroquinolones). Cependant, il y avait une prévalence élevée (85%) de fermes avec la présence d'au moins un *E. coli* producteur de BLSE/AmpC. La RAM était particulièrement importante pour les *E. coli* isolés chez les veaux pré-sevrage. Pour la deuxième étape, cette RAM était analysée au niveau génétique par le séquençage du génome entier des *E. coli* les plus résistants. La grande majorité de la RAM (>95%) était expliquée par des mutations ou des gènes de résistance. Certains de ceux-ci étaient à proximité l'un de l'autre et leur configuration laissait supposer qu'une partie de ces gènes étaient présents sur des éléments génétiques mobiles. De plus, il y avait une dissémination clonale de *E. coli* résistant entre les fermes. La dernière étape constituait à déterminer des facteurs de risque (utilisation des antimicrobiens

ou pratiques à la ferme) de la RAM. Grâce à des analyses multivariées utilisant l'intelligence artificielle, il a été possible d'observer des facteurs de risque significatifs associés à la taille de la ferme et à la santé des animaux. Bref, un portrait de la situation de la RAM est maintenant établi dans les troupeaux de bovins laitiers du Québec pour 2017. Il s'agit d'un phénomène complexe qui ne se limite pas simplement à un lien direct avec l'utilisation des antimicrobiens. Ces travaux serviront de bases pour suivre l'évolution temporelle de la RAM. De plus, des études prospectives pourraient être réalisées afin de confirmer les impacts des observations notées dans cette thèse. L'ensemble de ces informations seront déterminantes en vue d'établir des mesures concrètes pour tenter de limiter cette importante problématique.

**Mots clés** : résistance aux antimicrobiens, bovin, veau, ferme laitière, *Escherichia coli*, gène de résistance, facteur de risque, clone, transmission, céphalosporine de 3<sup>e</sup> génération

## Abstract

Antimicrobial resistance (AMR) is a global public health problem with major repercussions in both veterinary and human medicine. It is classically associated with the overuse of antimicrobials. Animal and human commensal bacteria, such as *Escherichia coli*, are often used as indicator bacteria to monitor AMR. Among the resistance mechanisms of *E. coli*, the production of an extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL) or AmpC-type is of particular concern. These enzymes can inactivate a class of antimicrobials of great importance in human health also used in veterinary medicine: third-generation cephalosporins. The overall prevalence of AMR and the presence of ESBL/AmpC-producing *E. coli* are unknown in Québec dairy herds. Furthermore, the transmission of these resistant bacteria and the risk factors associated with their excretion by dairy cattle are currently poorly documented. The overall objective of this thesis was to explore AMR through an observational cross-sectional study on randomly selected Québec dairy farms (n = 101). The first step of the project was to describe the prevalence of AMR for *E. coli* isolated from animal feces (lactating cows, pre-weaned calves) and the environment (manure pit). The prevalence of AMR observed for indicator *E. coli* was low (<5%) for antimicrobials of very high importance in human medicine (third-generation cephalosporins and fluoroquinolones). However, there was a high prevalence (85%) of farms with at least one ESBL/AmpC-producing *E. coli*. AMR was particularly high for *E. coli* isolated from pre-weaned calves. In the second step, AMR was analyzed at the genetic level by whole genome sequencing of the most resistant *E. coli* isolates. The vast majority of AMR (>95%) was explained by mutations or resistance genes. Some of these were in close proximity to each other, and their configuration suggested that some of these genes were present on mobile genetic elements. In addition, there was clonal dissemination of resistant *E. coli* between farms. The final step was to identify risk factors (antimicrobial use or farm practices) for AMR. Using artificial intelligence methods for multivariate analyses, it was possible to identify significant risk factors associated with farm size and the health of animals. In summary, our results provide a portrait of the AMR situation in Québec dairy herds. This complex phenomenon is not simply limited to a direct link with antimicrobial use. This work

will serve as a baseline for monitoring the temporal evolution of AMR. In addition, prospective studies could be carried out to confirm the impacts of the observations noted in this thesis. All this information will be decisive in establishing concrete measures to try and limit this major problem.

**Keywords:** Antimicrobial resistance, cattle, calf, dairy farm, *Escherichia coli*, resistance gene, risk factor, clone, transmission, third-generation cephalosporin

# Table des matières

Résumé.....	3
Abstract.....	5
Table des matières.....	7
Liste des tableaux.....	11
Liste des figures .....	13
Liste des sigles et des abréviations.....	15
Dédicace.....	18
Remerciements.....	19
L'avant-propos .....	20
Chapitre 1 – Revue de littérature .....	22
1.1. Les antimicrobiens .....	23
1.1.1. Généralité .....	23
1.1.2. Mécanisme d'action.....	24
1.1.3. Classification des antimicrobiens en médecine vétérinaire.....	25
1.1.3.1. Organisation mondiale de la santé.....	26
1.1.3.2. Organisation mondiale de la santé animale.....	29
1.1.3.3. Santé Canada .....	29
1.1.4. Les antimicrobiens de Catégorie I au Canada pour les bovins laitiers .....	30
1.1.4.1. Céphalosporine de 3 <sup>e</sup> génération.....	31
1.1.4.2. Fluoroquinolones.....	35
1.1.5. Utilisation des antimicrobiens chez les bovins laitiers .....	37
1.1.5.1. Antimicrobiens homologués au Canada.....	37
1.1.5.2. Portrait de l'utilisation des antimicrobiens au Canada .....	39
1.1.5.3. Portrait de la situation au Québec .....	41
1.1.5.4. Règlement encadrant les antimicrobiens de catégorie I au Québec .....	43
1.2. La résistance aux antimicrobiens .....	44
1.2.1. Généralité et évolution .....	44
1.2.2. <i>Escherichia coli</i> – bactérie indicatrice de la résistance aux antimicrobiens .....	45

1.2.3.	Mécanismes généraux : phénotype et génotype .....	47
1.2.3.1.	Diminution de la concentration intracellulaire .....	48
1.2.3.2.	Modification de la cible .....	50
1.2.3.3.	Inactivation enzymatique .....	52
1.2.3.4.	Réversibilité de la résistance .....	53
1.2.3.5.	Particularité : Céphalosporine de 3 <sup>e</sup> génération .....	53
1.2.3.6.	Particularité : Fluoroquinolones .....	56
1.2.4.	Transmission de la résistance aux antimicrobiens .....	60
1.2.5.	Méthodes pour tester la résistance aux antimicrobiens .....	64
1.2.5.1.	Seuils d'interprétation .....	66
1.2.5.2.	Séquençage du génome entier .....	68
1.3.	Surveillance de la résistance aux antimicrobiens .....	69
1.3.1.	Généralité .....	69
1.3.2.	Surveillance nationale pour les bovins laitiers .....	69
1.3.3.	Situation chez les bovins laitiers au Québec .....	73
1.3.4.	Facteurs de risque de la résistance aux antimicrobiens chez les bovins laitiers .....	76
Chapitre 2 – Hypothèses et Objectifs .....		79
Chapitre 3 – Prévalence de la résistance aux antimicrobiens (article 1) .....		82
3.1.	Abstract .....	84
3.2.	Introduction .....	85
3.3.	Materials and methods .....	86
3.4.	Results .....	91
3.5.	Discussion .....	94
3.6.	Funding .....	99
3.7.	Acknowledgments .....	100
3.8.	Contribution to the Field .....	101
3.9.	Tables .....	102
3.10.	Figures .....	108
Chapitre 4 – Description génétique de la résistance aux antimicrobiens (article 2) .....		114
4.1.	Abstract .....	116



4.2.	Introduction.....	117
4.3.	Materials and Methods.....	118
4.4.	Results .....	121
4.5.	Discussion.....	126
4.6.	Conclusions.....	132
4.7.	Simple Summary.....	132
4.8.	Supplementary Materials.....	133
4.9.	Funding.....	133
4.10.	Data Availability Statement.....	133
4.11.	Tables.....	134
4.12.	Figures.....	138
Chapitre 5 – Facteurs de risque de la résistance aux antimicrobiens (article 3).....		144
5.1.	Abstract .....	146
5.2.	Introduction.....	146
5.3.	Materials and Methods.....	149
5.4.	Results .....	153
5.5.	Discussion.....	157
5.6.	Conclusions.....	161
5.7.	Interpretive summary .....	162
5.8.	Supplementary materials.....	162
5.9.	Acknowledgments.....	162
5.10.	Tables.....	163
5.11.	Figures.....	168
Chapitre 6 – Discussion.....		175
6.1.	Discussion générale des résultats présentés .....	176
6.2.	Limites du projet .....	181
6.3.	Perspectives futures.....	185
Chapitre 7 – Conclusion .....		189
Bibliographie.....		191
Annexes.....		206

Annexe 1 – Questionnaire pour les éleveurs de bovins laitiers.....	207
Annexe 2 – Résultats supplémentaires de concentration minimale inhibitrice pour la polymyxine B et E .....	224
Annexe 3 – Résultats supplémentaires de la répartition du nombre de veaux par pool de fumier .....	225
Annexe 4 – Formulaire d'éthique .....	226
Annexe 5 – Article <i>Klebsiella</i> .....	228

# Liste des tableaux

## Chapitre 1 – Revue de littérature

<b>Tableau 1.</b> Classification ajustée de certains antimicrobiens selon leur importance pour différentes organisations ou pays.....	28
<b>Tableau 2.</b> Importance des antimicrobiens selon leur utilisation en médecine humaine par Santé Canada .....	30
<b>Tableau 3.</b> Classification des céphalosporines en génération selon leurs principales caractéristiques.....	33
<b>Tableau 4.</b> Liste des antimicrobiens homologués pour les bovins au Canada.....	38

## Chapitre 3 – Prévalence de la résistance aux antimicrobiens (article 1)

<b>Table 5.</b> Minimum inhibitory concentration for medically important antimicrobials, according to the WHO, of 593 <i>Escherichia coli</i> isolated from calf or cow feces or manure pit of 101 dairy farms in Québec, Canada.....	102
<b>Table 6.</b> Antimicrobial resistance patterns of 593 <i>Escherichia coli</i> isolated from calf or cow feces or manure pit of 101 dairy farms in Québec Canada. ....	104
<b>Table 7.</b> Phenotypic resistance and presence of associated antimicrobial resistance genes for the most multidrug resistant <i>Escherichia coli</i> (n=8) isolated from calf of 101 dairy farms in Québec, Canada. ....	106
<b>Table 8.</b> Number of positive samples with a presumptive ESBL/AmpC <i>Escherichia coli</i> .....	107

## Chapitre 4 – Description génétique de la résistance aux antimicrobiens (article 2)

<b>Table 9.</b> Minimum inhibitory concentration for a selection of the most resistant <i>Escherichia coli</i> (n = 118) isolated from manure from 101 dairy farms in Québec, Canada. ....	134
<b>Table 10.</b> Proportion positive for AMR genes or AMR-associated mutations with their related phenotypic resistance among a selection of the most resistant <i>Escherichia coli</i> (n = 118) isolated from manure from 101 dairy farms in Québec, Canada. ....	135
<b>Table 11.</b> Agreement (number of isolates) observed between antimicrobial resistance phenotypes and genotypes for a selection of the most resistant <i>Escherichia coli</i> (n = 118) isolated from manure at 101 dairy farms in Québec, Canada. ....	136
<b>Table 12.</b> List of discordance observed between antimicrobial resistance phenotypes and genotypes.....	137

## Chapitre 5 – Facteurs de risque de la résistance aux antimicrobiens (article 3)

**Table 13.** Description of variables included as risk factors for antimicrobial resistance (AMR) on 101 dairy farms in Québec, Canada..... 163

**Table 14.** Results of univariate logistic (for presence of ESBL/AmpC producing *Escherichia coli* (CTX)) and Poisson regression (for number of resistances in indicator *E. coli*) models describing the unconditional associations between various potential risk factors and four antimicrobial resistance outcomes using data obtained from up to 101 dairy herds in Québec, Canada. .... 165

## Liste des figures

### Chapitre 1 – Revue de littérature

<b>Figure 1.</b> Schéma simplifié de différents antimicrobiens avec leurs cibles d'action.....	25
<b>Figure 2.</b> Structure moléculaire des $\beta$ -lactamines.....	32
<b>Figure 3.</b> Mécanisme de polymérisation de la paroi bactérienne de peptidoglycane.....	34
<b>Figure 4.</b> Structure chimique de quinolone et de certaines fluoroquinolones.....	35
<b>Figure 5.</b> Mécanisme d'action des fluoroquinolones sur la synthèse de l'ADN bactérien.....	36
<b>Figure 6.</b> Vente d'antimicrobiens pour différentes espèces animales au Canada en 2021.....	40
<b>Figure 7.</b> Vente d'antimicrobiens au Canada par province en 2021.....	42
<b>Figure 8.</b> Mécanismes de résistance naturelle (intrinsèque) aux antimicrobiens.....	48
<b>Figure 9.</b> Diminution de la perméabilité membranaire des bactéries.....	49
<b>Figure 10.</b> Modification de la cible bactérienne des antimicrobiens.....	51
<b>Figure 11.</b> Inactivation enzymatique des antimicrobiens.....	52
<b>Figure 12.</b> Transmission de la résistance aux antimicrobiens entre bactéries.....	61
<b>Figure 13.</b> Éléments génétiques mobiles présents chez les bactéries.....	62
<b>Figure 14.</b> Méthode de diffusion en disque pour détecter la résistance de deux bactéries ...	65
<b>Figure 15.</b> Méthode de microdilution en bouillon pour détecter la résistance d'une bactérie	65
<b>Figure 16.</b> Exemple d'un seuil épidémiologique pour <i>E. coli</i> envers le ceftiofur.....	67
<b>Figure 17.</b> Exemple de graphique interactif obtenu à partir du NARMS.....	72

### Chapitre 3 – Prévalence de la résistance aux antimicrobiens (article 1)

<b>Figure 18.</b> ESBL/AmpC phenotypes by disk diffusion method derived from MIC by the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing definition. ....	108
<b>Figure 19.</b> Proportion of farms with a least one resistant (intermediate and resistant combined) <i>Escherichia coli</i> from any sample or any season from 101 dairy farms from Québec, Canada.....	109
<b>Figure 20.</b> Proportion of resistant (intermediate and resistant combined) <i>Escherichia coli</i> isolated from calves (■; n=195), cows (■; n=202), and manure pits (■; n=196) from 101 dairy farms from Québec, Canada.....	110
<b>Figure 21.</b> Distribution of susceptible and resistant profiles for <i>Escherichia coli</i> isolated from calves (■; n=195), cows (■; n=202), and manure pits (■; n=196) from 101 dairy farms from Québec Province, Canada.....	111
<b>Figure 22.</b> Distribution of phenotype ESBL (■), AmpC (■), ESBL+AmpC (■), or other (■) in <i>Escherichia coli</i> isolated from calves, cows and manure pits from 101 dairy farms from Québec Province, Canada.....	112

**Figure 23.** Antimicrobial resistance gene profiles of randomly selected ESBL ( $n=4$ ) or AmpC ( $n=4$ ) producing *Escherichia coli* isolated from calf or cow feces or manure pit of 101 dairy farms in Québec, Canada. .... 113

#### Chapitre 4 – Description génétique de la résistance aux antimicrobiens (article 2)

**Figure 24.** Correlation between an increase in the minimum inhibition concentration (MIC) and the presence of an antimicrobial resistance gene or resistance-associated mutation for third-generation cephalosporins and (fluoro)quinolones for a selection of the most resistant *Escherichia coli* ( $n = 118$ ) isolated from manure at 101 dairy farms in Québec, Canada. .... 139

**Figure 25.** Fixed contiguous resistance genes and mobile genetic elements found with ResFinder, PointFinder, PlasmidFinder, and MGE finder from the Center for Genomic Epidemiology platform for a selection of the most resistant *Escherichia coli* ( $n = 118$ ) isolated from manure from 101 dairy farms in Québec, Canada. .... 140

**Figure 26.** Phylogenetic tree created by CSIPhylogeny from the Center for Genomic Epidemiology by *E. coli* ( $n = 86$ ). .... 142

**Figure 27.** Geographical distribution of isolates according to the definition of: (A) Clonal lineage: isolates with the same sequence type (ST), serogroup, phylogroup, and fimH gene. (B) Clone: isolates with 12 or fewer SNP differences from each other. .... 143

#### Chapitre 5 – Facteurs de risque de la résistance aux antimicrobiens (article 3)

**Figure 28.** Estimated relationships between the estimated number of resistances in sentinel *Escherichia coli* from fecal samples of lactating cow and multiple risk factors. .... 168

**Figure 29.** Estimated relationships between the probability of the presence of ESBL/AmpC producing *Escherichia coli* in fecal samples from (A and B: cow and C: calf) and risk factors 169

**Figure 30.** Estimated relationships between the estimated number of resistances in sentinel *Escherichia coli* from pre-weaned calves' fecal samples and risk factors. .... 170

**Figure 31.** Representation of the most important variables in the first five dimensions (Dim) of the Factor analysis of mixed data from 96 dairy herds in Québec, Canada. .... 171

**Figure 32.** Clusters of farms according to the first two dimensions of the Factor analysis of mixed data from 96 dairy herds in Québec, Canada. .... 173

**Figure 33.** Predicted probabilities for the presence of ESBL/AmpC producing *Escherichia coli* (*E. coli*) in fecal samples from cows (A) and calves (B) and predicted number of resistances in *E. coli* in fecal samples from cows (C) and calves (D) as function of cluster membership in up to 96 dairy herds in Québec, Canada. .... 174

## Liste des sigles et des abréviations

AAC	Aminoglycoside acetyltransférase
AMC	Amoxicillin-acide clavulanique
AMP	Ampicilline
AmpC	AmpC $\beta$ -lactamase
ANT	Aminoglycoside nucleotidyltransférase
APH	Aminoglycoside phosphotransférase
AZM	Azithromycine
BLSE/ESBL	$\beta$ -lactamase à spectre étendue / Extended-spectrum $\beta$ -lactamase
CHL	Chloramphénicol
CIP	Ciprofloxacine
CLSI	Clinical & Laboratory Standards Institute
CMI/MIC	Concentration minimale inhibitrice / Minimum inhibitory concentration
CRO	Ceftriaxone
DAN	Danofloxacine
DCDbovCA	Doses définies de traitement canadiennes pour la quantification de l'utilisation des antimicrobiens pour les bovins / Canadian defined course doses for quantification of antimicrobial usage in cattle
DDDbovCA	Doses définies journalières canadiennes pour la quantification des antimicrobiens pour les bovins / Canadian defined daily doses for quantification of antimicrobial usage in cattle
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ENR	Enrofloxacine
EUCAST	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
EUSR	European Union Summary Report
FAMD	Factor analysis of mixed data
FAO	Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture

FFC	Florfénicol
FIS	Sulfisoxazole
FOX	Céfoxitine
FRQNT	Fonds de recherche du Québec - Nature et technologies
GEN	Gentamicine
HCFAMD	Hierarchical clustering based on factor analysis of mixed data
ICE	Élément Intégratif Constitutif / Integrative constitutive element
In	Intégron
IS	Séquence d'insertion / Insertion sequence
MAPAQ	Ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation du Québec
MDR	Multirésistance / Multi-drug resistance
MEM	Méropénème
MLST	Multi-locus-sequence-typing
NAL	Acide nalidixique
NARMS	National Antimicrobial Resistance Monitoring System (États-Unis)
NEO	Néomycine
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
OMSA	Organisation Mondiale de la Santé Animale
PICRA/CIPARS	Programme intégré canadien de surveillance de la résistance aux antimicrobiens / Canadian Integrated Program for Antimicrobial Resistance Surveillance
PRP	Pentapeptide repeat proteins
QRDR	Quinolone Resistant-Determining Region
RAM/AMR	Résistance aux antimicrobiens / Antimicrobial resistance
RVMVA	Rapports sur les ventes de médicaments vétérinaires antimicrobiens
SGE/WGS	Séquençage du génome entier / Whole genome sequencing
SNP	Single nucleotide polymorphism



SPT	Spectinomycine
STR	Streptomycine
SXT	Triméthoprim-Sulfaméthoxazole
TET	Tétracycline
TIO	Ceftiofur
Tn	Transposon

## Dédicace

À mon père qui est malheureusement parti trop vite

Tu es la raison pour laquelle cette thèse est terminée aujourd'hui

Ton implication, ta persévérance et ton positivisme furent mon modèle

La voie que tu as tracée, je l'ai suivie pendant un court instant pour cette thèse

Même si tu n'as pas pu voir l'aboutissement, je sais que tu en es très fier

J'ai l'impression qu'une partie de moi est disparue avec ton départ

Mais une partie de toi demeurera toujours avec moi

Je t'aimerai pour toujours et à jamais.

## Remerciements

À mes co-directeurs, David Francoz et Simon Dufour, et ma directrice Marie Archambault pour m'avoir encouragé et supporté tout le long du trajet effectué.

À mes collaborateurs, Jean-Philippe Roy, John M. Fairbrother, Ghyslaine Vanier, Maud de Lagarde, Julie Arsenault et Pablo Valdes Donoso pour leurs avis et points de vue des plus pertinents.

À Hélène Lardé, la personne que j'ai appris à découvrir et à apprécier lors de notre aventure (extrANTIBIOrdinaire) sur les fermes laitières du Québec. Ta motivation et ton implication sont une véritable source d'inspiration.

Aux microbiologistes du laboratoire de bactériologie, Julie-Hélène Fairbrother, Marie-Lou Gauthier, Olivia Labrecque et Serge Messier pour le partage de leurs précieuses connaissances et leur indulgence concernant mon parcours atypique, ainsi qu'aux techniciennes du laboratoire de bactériologie pour le support dans ma formation.

Aux personnes de la faculté parfois oubliées, étudiants et étudiantes, techniciennes, coordonnatrices de réseau, personnel de soutien pour leur influence positive pendant toutes mes années à la faculté.

À ma famille qui ne comprend pas toujours ce que je fais exactement, mais qui m'encourage et croit en moi peu importe.

À mes amis pour leur support au cours des dernières années et pour les aventures extracurriculaires des plus palpitantes.

À ma conjointe Roxane pour m'avoir félicité dans mes hauts et pour m'avoir remonté dans mes bas.

Aux organismes subventionnaires pour le support financier : CRSNG, FRQNT, Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal, regroupement FRQNT Op+lait, programme Innov'Action.

Et finalement, aux membres du jury d'évaluation de cette thèse, Gustavo Zamberlam, Juan Carlos Arango Sabogal et Aurélien Madouasse pour leur temps et leur lecture critique menant à l'amélioration de cette thèse.

## L'avant-propos

En 2016, j'étais à ma cinquième année au Doctorat de 1<sup>er</sup> cycle en médecine vétérinaire à la Faculté de médecine vétérinaire de l'Université de Montréal. Parmi mes stages à option, j'ai décidé de faire un stage en recherche de 6 semaines dans le laboratoire de bactériologie de Dre Marie Archambault sur les mammites bovines à *Klebsiella* et les diarrhées équine et porcines à *Clostridium difficile*. Ce stage fut une révélation, je savais que je voulais continuer dans le domaine de la bactériologie!

Heureusement pour moi, une équipe de chercheurs chapeauté par Dre Archambault venait d'obtenir une subvention importante à travers le programme Innov'Action Agroalimentaire, mis en œuvre dans le cadre de l'Entente Canada-Québec Cultivons l'avenir 2, pour le projet intitulé : « Prévalence, cause et contrôle de l'antibiorésistance sur les fermes laitières québécoises ». Ainsi, c'est à partir de l'automne 2016 que mon parcours de recherche et de lutte à la résistance aux antimicrobiens a réellement commencé. Je me permets de décrire ce parcours ici puisqu'il ne suit pas la voie classique et que celui-ci a eu une influence importante sur mon travail. Après avoir fait un passage accéléré de la maîtrise au doctorat à l'automne 2017, j'ai eu l'honneur (malgré le travail supplémentaire qui en a découlé) de commencer un programme de résidence en bactériologie clinique à l'automne 2018 pour lequel j'ai obtenu mon diplôme à l'hiver 2022. Lors de cette résidence, j'ai réalisé les impacts réels et dramatiques que la résistance aux antimicrobiens peut avoir sur les animaux. Je me souviendrai toujours d'un cas de septicémie chez un veau pour lequel la bactérie responsable de l'infection (*Escherichia coli*) était résistante à tous les antimicrobiens testés. Il n'y avait donc aucun traitement possible! Au cours de ces 4 années de résidence, j'ai vu une quantité inquiétante de bactéries multirésistantes isolées chez plusieurs espèces animales.

Le thème principal de cette thèse, qui est la résistance aux antimicrobiens, est un phénomène particulièrement inquiétant au niveau mondial pour la santé humaine, la santé des animaux et la santé des écosystèmes. Malheureusement, les données étaient fragmentaires pour les troupeaux québécois de bovins laitiers d'où la pertinence de ce travail. Comme décrit dans le titre, cette thèse est divisée en trois grandes parties soit la prévalence de la résistance aux antimicrobiens, une description génétique de celle-ci ainsi que l'établissement de certains facteurs de risque de cette résistance. Sans être directement intégré à cette thèse, j'ai également inclus en annexe un article sur les mammites à *Klebsiella* chez des bovins laitiers. J'ai commencé les travaux sur ce dernier sujet lors de ma maîtrise et publié l'article durant le début de mon PhD. Bien que le sujet principal sort du cadre de cette thèse, il montre l'impact clinique que peut avoir la résistance aux antimicrobiens chez les bovins laitiers.

Avant de débiter, je voulais également mentionner ici un autre fait notable dans mon parcours que fut la grande bataille que mon père a menée pendant 2 ans contre le cancer. Celle-ci s'étant terminée par son décès prématuré au printemps 2022. Le chemin et les épreuves que j'ai parcourus ont teinté cette thèse, laquelle je suis particulièrement fier d'avoir réussi à compléter aujourd'hui.

## **Chapitre 1 – Revue de littérature**

## 1.1. Les antimicrobiens

La découverte des antimicrobiens par l'homme a révolutionné la médecine et son combat envers les différentes infections bactériennes depuis environ un siècle. Cette section décrit sommairement ces impressionnantes molécules en présentant les généralités, les mécanismes d'action, les différentes classifications ainsi que l'utilisation de celles-ci en médecine vétérinaire pour les bovins laitiers en particulier. Il y aura un accent notable sur certains antimicrobiens particulièrement importants en médecine humaine également utilisés en médecine vétérinaire.

### 1.1.1. Généralité

Les termes antibiotique et antimicrobien sont souvent utilisés comme synonyme alors qu'il existe une différence entre ceux-ci. Un antibiotique est défini comme une substance de faible poids moléculaire produit par des microorganismes pour inhiber la croissance ou éliminer d'autres microorganismes (1). Cette définition s'élargit pour inclure les molécules synthétiques et semi-synthétiques pour le terme antimicrobien. Cependant, la définition n'est pas uniforme pour tous les auteurs, certains sont moins catégoriques dans la définition d'antimicrobien. Pour certains, le terme antibiotique serait une molécule organique qui inhibe ou tue les microbes grâce à des interactions spécifiques avec une cible bactérienne, sans considération de la source de la molécule (2). Selon cette définition, les molécules synthétiques sont considérées comme des antibiotiques. Afin de simplifier la lecture de cette thèse, le terme antimicrobien sera utilisé pour la suite de cet ouvrage selon la définition suivante : molécules qui inhibent la croissance ou éliminent les microorganismes en causant peu ou pas de dommage à l'animal (1). Bien que le terme microorganisme inclut les bactéries, champignons et parasites, le sujet de cette thèse se limitera à l'effet antibactérien de ces molécules.

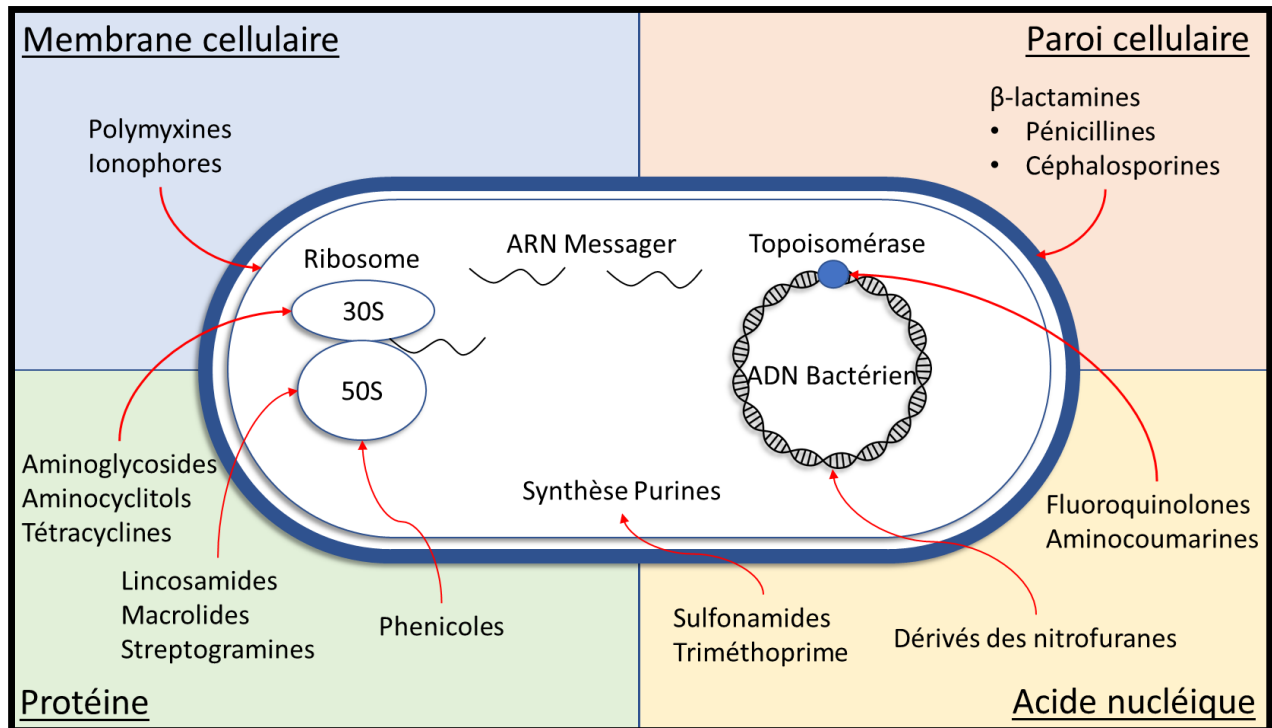
La découverte des antimicrobiens remonte aux années 1928 par le Britannique Alexander Fleming. La première molécule décrite était la pénicilline (molécule synthétisée par un champignon pour éliminer les bactéries) (1). Bien que cette observation ait été faite par l'homme il y a moins d'un siècle, ces molécules seraient produites par les microorganismes depuis plusieurs millions d'années et elles seraient un processus adaptatif de survie très

important (3, 4). À la suite des années 1930, de nombreuses molécules avec un effet antimicrobien intéressant ont fait leurs apparitions en médecine. La première à être synthétisée et commercialisée fut le sulfamide en 1935. Après la Seconde Guerre mondiale, de nouvelles classes d'antimicrobiens comme les aminoglycosides, les tétracyclines et les macrolides ont été ajoutés à la pharmacopée humaine puis vétérinaire. La création de molécules synthétiques comme les quinolones en 1962 a augmenté de façon plus importante l'arsenal médical contre les maladies infectieuses. Malgré un nombre très important d'antimicrobiens actuellement homologués chez l'humain, il y a une diminution importante du nombre de molécules nouvellement commercialisées depuis les années 2000 (1, 5).

### 1.1.2. Mécanisme d'action

L'activité antibactérienne est classiquement décrite selon deux types : bactériostatique et bactéricide. Un effet bactériostatique inhibe la croissance d'une certaine bactérie alors qu'un effet bactéricide tue la bactérie. Ces définitions ne sont pas absolues et sont variables selon la concentration de l'antimicrobien, le site d'infection, ainsi que de la bactérie ciblée (1). Cependant, certaines classes d'antimicrobiens sont reconnues pour une action bactéricide (ex. :  $\beta$ -lactamine, aminoglycoside) ou bactériostatique (tétracycline, phénicole). Ces classes d'antimicrobiens sont distinguées selon leur similarité chimique ainsi que leur site d'action au niveau de la bactérie. Il existe quatre grands sites d'action soit la paroi cellulaire, la membrane cellulaire, les protéines et les acides nucléiques (1) (Figure 1). Peu importe le site d'action, la plupart des antimicrobiens ciblent une protéine spécifique pour interrompre sa fonction. Malheureusement, ces mécanismes d'action entraînent un désavantage à long terme : si, pour une raison ou une autre, l'antimicrobien ne réussit pas à atteindre son site d'action, la bactérie ne sera pas affectée par celui-ci. Cet effet est décrit comme de la résistance aux antimicrobiens (RAM). Ce thème central à cette thèse sera abordé dans une section ultérieure (*cf.* section 1.2. – La résistance aux antimicrobiens).





**Figure 1.** Schéma simplifié de différents antimicrobiens avec leurs cibles d'action

### 1.1.3. Classification des antimicrobiens en médecine vétérinaire

Afin de limiter l'apparition de la RAM (*cf.* section 1.2. – La résistance aux antimicrobiens) pour certaines molécules, des actions mondiales ont eu lieu afin de limiter l'utilisation des antimicrobiens pour les animaux non humains. Une réunion mixte d'experts de la FAO (Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture), de l'OMS (Organisation mondiale de la santé) et de l'OMSA (Organisation mondiale de la santé animale) a eu lieu à Rome en 2007 (6) afin d'examiner les antimicrobiens utilisés dans l'agriculture ainsi qu'en médecine humaine et vétérinaire. Une classification des antimicrobiens selon leur importance a alors été établie. Cependant, cette classification est variable selon l'organisation d'intérêt. Cette thèse se limitera à la classification par l'OMS et l'OMSA sans inclure la portion agriculture qui est en dehors du sujet de cet ouvrage.

#### 1.1.3.1. Organisation mondiale de la santé

À la suite de cette réunion d'experts, l'OMS a développé un document d'information portant sur le classement des antimicrobiens d'importance médicale pour la gestion des risques de la RAM due à une utilisation non humaine. La dernière version (6<sup>e</sup> version) de 2019 est celle qui est la plus à jour à la rédaction de cet ouvrage. La version 7 (2023) est en cours de rédaction, mais seule la version préliminaire est actuellement disponible et ne sera pas incluse ici puisqu'il pourrait y avoir des changements. Ce classement est utile pour l'évaluation des risques et les stratégies de gestion des risques pour limiter la RAM par les différents pays (7). L'élaboration de cette liste est basée sur deux critères (7) :

- Critère 1 : Classe d'antimicrobiens qui constitue la seule ou l'une des rares options thérapeutiques disponibles pour soigner des infections bactériennes graves chez l'homme
- Critère 2 : Classe d'antimicrobiens utilisée pour traiter les infections humaines causées par : 1) des bactéries qui peuvent être transmises à l'homme à partir de sources non humaines, ou 2) des bactéries qui peuvent acquérir des gènes de résistance à partir de sources non humaines.

La liste des antimicrobiens de l'OMS est divisée en trois catégories : importance critique si l'antimicrobien correspond aux deux critères, très important s'il répond à l'un des deux critères et important s'il ne répond à aucun des deux critères. De plus, pour la catégorie d'importance critique, trois facteurs de priorité sont appliqués pour déterminer si ces antimicrobiens sont les plus prioritaires ou hautement prioritaires (7) :

- Facteur de priorité 1 : Nombre élevé de personnes dans la communauté ou dans certaines populations à haut risque (p. ex. les patients hospitalisés atteints d'infections graves) touchées par des maladies pour lesquelles les choix d'antimicrobiens sont très limités.

- Facteur de priorité 2 : Utilisation très fréquente de la classe d'antimicrobiens pour une quelconque indication en médecine humaine ou dans certains groupes à haut risque (p. ex. les patients hospitalisés atteints d'infections graves), puisqu'une telle utilisation peut favoriser la sélection d'une résistance.
- Facteur de priorité 3 : Classe d'antimicrobiens utilisée pour traiter des infections humaines pour lesquelles il existe déjà de nombreuses preuves de transmission de bactéries résistantes (p. ex. *Salmonella* spp. non-typhique et *Campylobacter* spp.) ou de gènes de résistance (élevés pour *E. coli* et *Enterococcus* spp.) à partir de sources non humaines.

Si une classe d'antimicrobien correspond à ces trois facteurs de priorité, elle est considérée comme la plus prioritaire. Selon ces critères et les facteurs de priorité, il existe cinq classes d'antimicrobiens d'importance critique les plus prioritaires soit : quinolones (incluant les fluoroquinolones), céphalosporines de 3<sup>e</sup> et 4<sup>e</sup> génération, polymyxines, macrolides et glycopeptides. Puisque les glycopeptides (exemple : vancomycine) ne sont pas homologués pour les animaux au Canada, ils ne seront pas abordés davantage. Le tableau 1 résume les différentes classes d'antimicrobiens selon l'importance des antimicrobiens en médecine humaine. Afin de faciliter la lecture du tableau, les catégories d'importances selon plusieurs organismes ou pays ont été converties en chiffres arabes.

**Tableau 1.** Classification ajustée de certains antimicrobiens selon leur importance pour différentes organisations ou pays

Classes d'antimicrobiens	Exemples d'antimicrobiens	OMS <sup>1</sup> (2019)	Santé Canada <sup>2</sup> (2009)	OMSA <sup>3</sup> (2021)
Céphalosporines (3 <sup>e</sup> et 4 <sup>e</sup> générations)	Ceftiofur, Ceftriaxone, Céfotaxime	1	1	1
Fluoroquinolones	Enrofloxacin, Ciprofloxacine, Danofloxacine	1	1	1
Polymyxines	Colistine, Polymyxine B	1	1	2
Macrolides	Azithromycine, Tylosine, Gamithromycine	1	2	1
Quinolones	Acide Nalidixique	1	2	2
Pénicillines (aminopénicillines - inhibiteurs $\beta$ -lactamase)	Amoxicilline - acide clavulanique	2	1	1
Aminoglycosides	Gentamicine, Streptomycine, Néomycine	2	2	1
Aminoglycosides (topiques)		2	3	1
Pénicillines (aminopénicillines)	Ampicilline	2	2	1
Streptogramines	Virginiamycine	3	2	3
Céphalosporines (1 <sup>re</sup> et 2 <sup>e</sup> générations)	Céphapirine	3	2	2
Céphamycine	Céfoxitine	3	2	NA
Pénicillines (anti-staphylococciques)	Cloxacilline	3	2	1
Pénicillines (spectre étroit)	Pénicilline G	3	2	1
Combinaison d'antagonistes de la voie des folates	Triméthoprime-sulfa.	3	2	1
Antagonistes de la voie des folates	Sulfisoxazole, Triméthoprime	3	3	1
Lincosamides	Pirlimycine	3	2	2
Phénicoles	Chloramphénicol, Florfénicol	3	3	1
Tétracyclines	Tétracycline	3	3	1
Dérivés des nitrofuranes	Nitrofurazone	4	3	NA
Aminocyclitols	Spectinomycine	4	3	1
Ionophores	Monensin, Lasalocide, Salinomycine	5	4	2
Aminocoumarines	Novobiocine	5	NA	3

<sup>1</sup>Classification selon l'Organisation mondiale de la santé ajustée en numéro selon 1 : antimicrobiens d'importances critiques les plus prioritaires, 2 : antimicrobiens d'importances critiques hautement prioritaires, 3 : antimicrobiens très importants, 4 : antimicrobiens importants, 5 : antimicrobiens non utilisés chez l'homme

<sup>2</sup>Classification selon Santé Canada ajustée en numéro selon 1 : Catégorie I – Très haute importance, 2 : Catégorie II – haute importance, 3 : Catégorie III – importance moyenne, 4 : Catégorie IV – Faible importance

<sup>3</sup>Classification selon l'Organisation mondiale de la Santé animale ajuster en numéro selon 1 : Agents antimicrobiens d'importance critique en médecine vétérinaire, 2 : Agents antimicrobiens très importants en médecine vétérinaire, 3 : Agents antimicrobiens importants en médecine vétérinaire.

NA : Non applicable

### 1.1.3.2. Organisation mondiale de la santé animale

Afin de compléter la liste d'importance par l'OMS, l'OMSA a également établi une liste des antimicrobiens d'importance en médecine vétérinaire. Cette liste est établie selon 2 critères (8) :

- Critère 1. Taux de réponse au questionnaire concernant les agents antimicrobiens importants en médecine vétérinaire. Ce critère a été atteint lorsqu'une majorité de pays ayant répondu (plus de 50 %) ont indiqué dans le questionnaire que la classe d'agents antimicrobiens était importante.
- Critère 2. Traitement d'affections animales graves et disponibilité d'agents antimicrobiens de substitution. Ce critère a été rempli lorsque les composés de la classe considérée ont été identifiés comme essentiels contre des infections spécifiques et que les solutions thérapeutiques de substitution étaient insuffisantes ou inexistantes.

La liste d'importance de l'OMSA est divisée en trois catégories : agents antimicrobiens d'importance critique en médecine vétérinaire si la classe répond aux deux critères, agents antimicrobiens très importants en médecine vétérinaire si la classe répond à l'un des deux critères et agents antimicrobiens importants en médecine vétérinaire si la classe ne correspond à aucun des deux critères. Le tableau 1 présente la liste d'importance des classes d'antimicrobiens selon l'OMSA. Afin de faciliter la lecture du tableau, les catégories d'importances ont été converties en chiffres arabes. Si l'on compare la liste de l'OMS à celle de l'OMSA, certaines classes sont considérées de la plus haute importance pour les deux organismes soit les céphalosporines de 3<sup>e</sup> et 4<sup>e</sup> génération, les fluoroquinolones et les macrolides.

### 1.1.3.3. Santé Canada

Les listes d'importance présentées par l'OMS et l'OMSA sont des outils pour aider les différents pays dans l'élaboration de stratégie de lutte et de gestion du risque de la RAM. Après la réunion d'experts de 2007 et la publication des premières versions des listes d'importance, Santé Canada a établi son propre classement des antimicrobiens selon leur importance en médecine humaine en 2009 (9). Les deux critères pris en compte pour le classement des antimicrobiens

ainsi que la catégorie d'importance associée sont présentés dans le tableau 2. Les médicaments de faible importance (Catégorie IV) ne sont pas homologués actuellement pour les humains et sont seulement utilisés chez les animaux.

**Tableau 2.** Importance des antimicrobiens selon leur utilisation en médecine humaine par Santé Canada

Catégorie	Option préférée de traitement d'infections graves chez l'humain	Absence ou rareté de médicaments de remplacement
I – Très haute importance	Oui	Oui
II – Haute importance	Oui	Non
III – Importance moyenne	Non	Non / Oui
IV – Faible importance	Sans objet	Sans objet

Le tableau 1 présente la liste d'importance des classes d'antimicrobiens selon Santé Canada. Malgré plusieurs différences dans la classification pour certains antimicrobiens, Santé Canada suit grossièrement la liste de l'OMS. Les différences observées sont causées par la divergence dans le second critère pour chacun des deux organismes. L'OMS considère l'aspect zoonotique de transmission de la résistance comme un critère alors que Santé Canada considère les médicaments de remplacement comme un critère. Même si la liste de Santé Canada est la plus ancienne parmi les trois listes présentées (2009), c'est celle-ci qui sera prise en compte pour cet ouvrage puisque cette liste a des répercussions réglementaires au Canada.

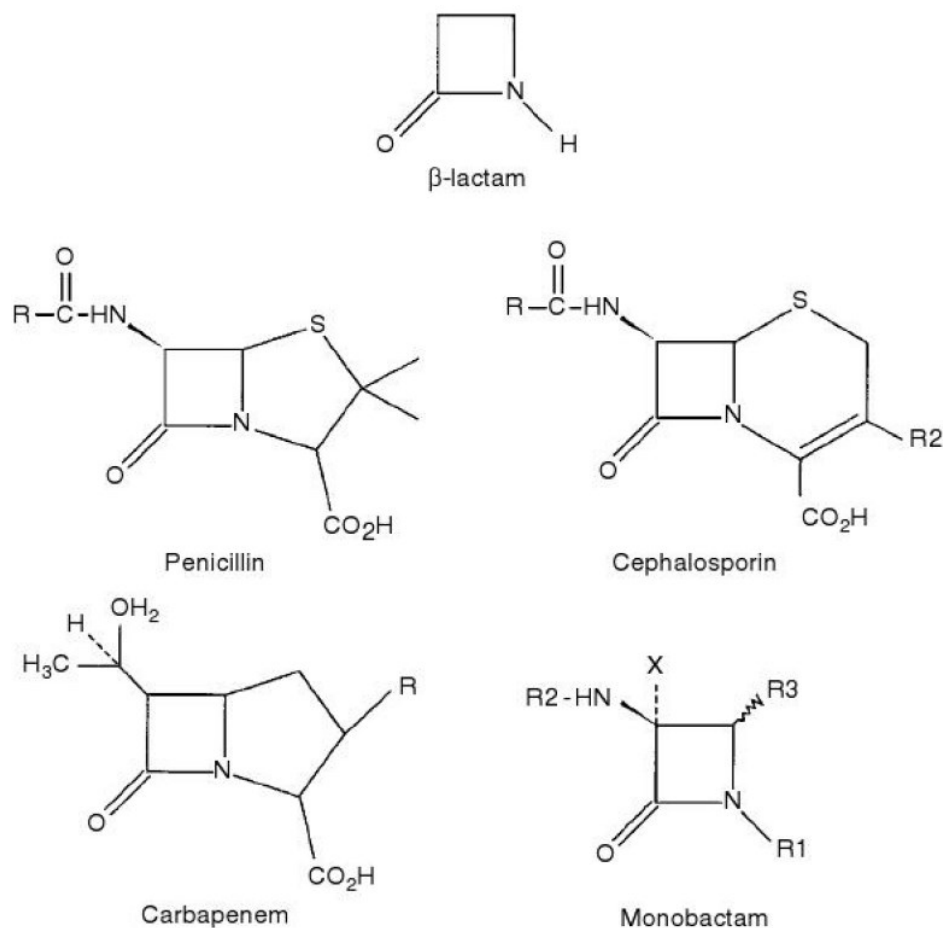
#### 1.1.4. Les antimicrobiens de Catégorie I au Canada pour les bovins laitiers

La liste complète des antimicrobiens de catégorie I par Santé Canada comprend 13 classes d'antimicrobiens, mais la majorité de ceux-ci n'ont pas de molécules homologuées au Canada pour les bovins qui est l'espèce animale d'intérêt de cette thèse. De cette liste, seulement deux classes ont au moins une molécule homologuée chez le bovin soit les céphalosporines de 3<sup>e</sup> génération et les fluoroquinolones. Il existait également une troisième classe (polymyxine B), mais le produit contenant cette molécule n'est plus commercialisé au Canada (*cf.* section

1.1.5.1. - Utilisation des antimicrobiens chez les bovins laitiers). L'utilisation des deux antimicrobiens de catégorie I doit être limitée dans la population animale canadienne et le suivi du niveau de résistance est important pour les troupeaux. Puisque ces deux antimicrobiens seront davantage détaillés dans cette thèse, les deux prochains sous-chapitres décriront spécifiquement ces deux antimicrobiens.

#### 1.1.4.1. Céphalosporine de 3<sup>e</sup> génération

Les  $\beta$ -lactamines sont la classe la plus vaste des antimicrobiens jusqu'à présent. Leur caractéristique commune est le noyau  $\beta$ -lactamine (Figure 2). Cette structure est présente dans le premier antibiotique découvert (la pénicilline) et des modifications apportées à la structure de celle-ci ont permis d'améliorer le spectre d'action, la pharmacocinétique, en plus d'augmenter leur résistance envers les  $\beta$ -lactamases (enzymes dégradant les  $\beta$ -lactamines qui ont été découvertes peu de temps après l'utilisation de la pénicilline dans les années 1940). Cette classe d'antimicrobiens comprend quatre membres : les pénicillines, les céphalosporines, les carbapénèmes et les monobactames (1). La structure moléculaire de ces membres est présentée à la figure 2. Parmi les quatre membres, seules les pénicillines et les céphalosporines ont une homologation chez les bovins au Canada. Parmi les molécules homologuées, seules les céphalosporines de 3<sup>e</sup> génération sont considérées de très haute importance en santé humaine par Santé Canada. De façon générale, les céphalosporines sont divisées en génération selon leur année de découverte et leur spectre d'action. Les caractéristiques générales de chacune des générations sont présentées dans le tableau 3.



**Figure 2.** Structure moléculaire des  $\beta$ -lactamines

Image reproduite avec permission de John Wiley & Sons provenant de (1). L'autorisation de reproduction a été transmise par le Copyright Clearance Center, Inc.

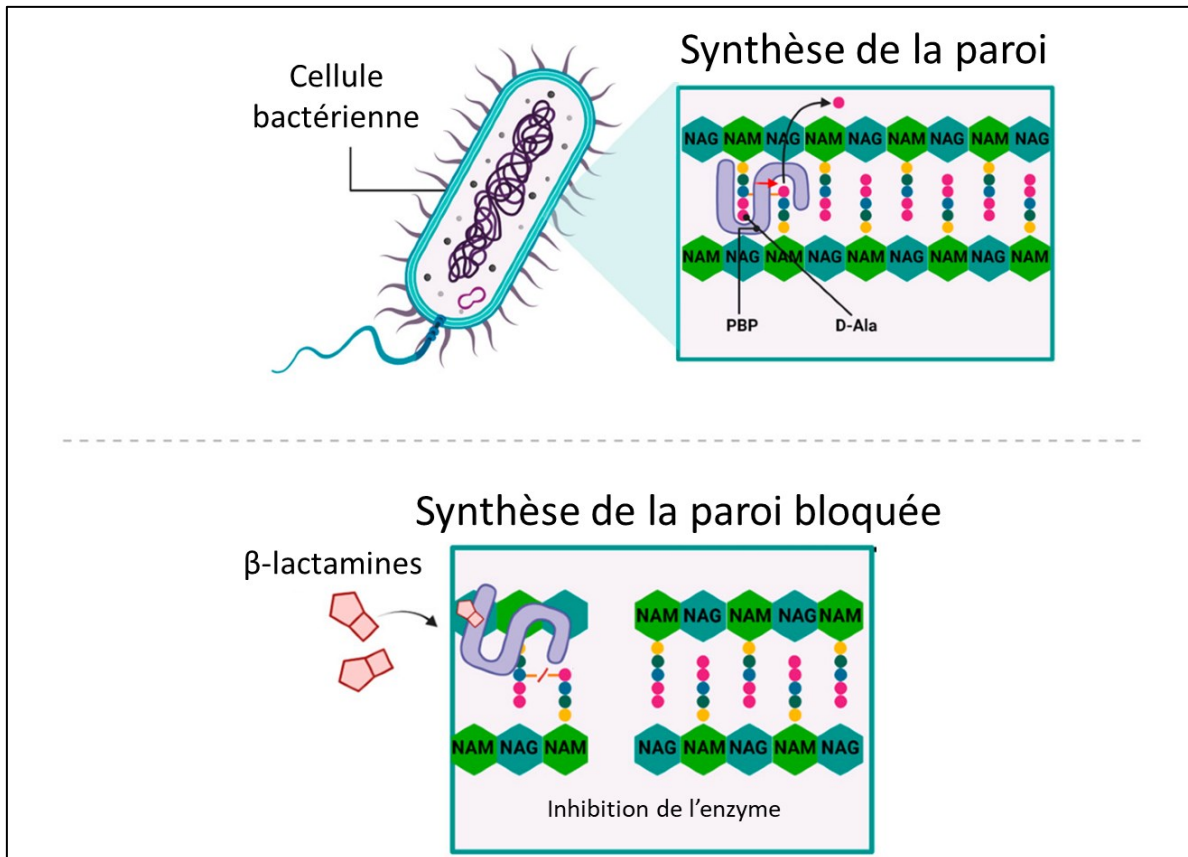
Les céphalosporines de 3<sup>e</sup> génération comprennent, entre autres, le céfotaxime, la ceftazidime, la ceftriaxone, la cefpodoxime et le ceftiofur. Ces molécules sont d'ailleurs fréquemment interchangeables afin de tester la RAM chez les *Enterobacteriaceae* pour cette sous-classe d'antimicrobiens (1). Bien que certaines de ces molécules soient uniquement homologuées en médecine vétérinaire (ceftiofur) et en médecine humaine (ceftriaxone) (10), celles-ci sont similaires et il est nécessaire de suivre l'utilisation de certaines molécules en médecine vétérinaire, même si la molécule n'est pas utilisée en médecine humaine.



**Tableau 3.** Classification des céphalosporines en génération selon leurs principales caractéristiques  
Traduit et adapté de (1)

Génération	Caractéristiques	Exemple de molécules
1 <sup>ère</sup>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Administrée par voie parentérale ou orale</li> <li>• Résistante aux <math>\beta</math>-lactamases des <i>Staphylococcus</i></li> <li>• Sensible ou modérément résistante aux <math>\beta</math>-lactamases des <i>Enterobacteriaceae</i></li> <li>• Modérément active</li> </ul>	céphalotine, céphapirine, céphalexine
2 <sup>e</sup>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Administrée par voie parentérale</li> <li>• Résistante à plusieurs <math>\beta</math>-lactamases</li> <li>• Modérément active</li> </ul>	céfoxitine
3 <sup>e</sup>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Administrée par voie parentérale ou orale</li> <li>• Résistante à plusieurs <math>\beta</math>-lactamases</li> <li>• Très active</li> <li>• Certaines molécules sont actives contre <i>Pseudomonas aeruginosa</i></li> </ul>	céfotaxime, ceftiofur, ceftriaxone, ceftazidime, cefpodoxime
4 <sup>e</sup>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Administrée par voie parentérale</li> <li>• Résistante contre les <math>\beta</math>-lactamases des <i>Staphylococcus</i>, <i>Enterobacteriaceae</i> et <i>Pseudomonas</i></li> <li>• Très active</li> </ul>	céfépime, cefquinome

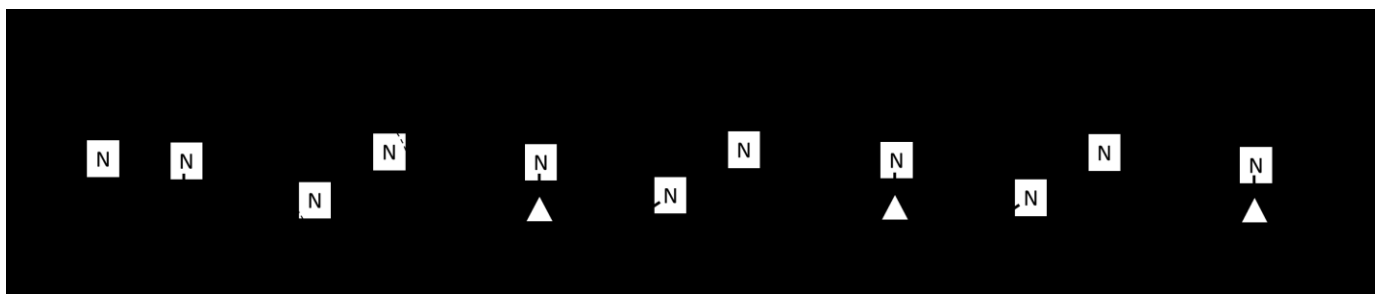
L'action principale des  $\beta$ -lactamines est d'inhiber la polymérisation du peptidoglycane. Celui-ci est une composante essentielle de la paroi cellulaire des bactéries à Gram positif et il est présent dans une mince couche interne des bactéries à Gram négatif. Un résumé du mécanisme ainsi que de l'action des  $\beta$ -lactamines sont présentés dans la figure 3. Lorsqu'il y a présence de  $\beta$ -lactamines, il y a une instabilité dans la paroi cellulaire. Cette dernière étant fragilisée, il y a lyse bactérienne et mort cellulaire (11). L'action de l'antimicrobien est bactéricide et temps dépendant (1).



**Figure 3.** Mécanisme de polymérisation de la paroi bactérienne de peptidoglycane  
 Une des dernières étapes de cette synthèse est médiée par une enzyme, nommée PBP (Penicillin-Binding Protein), qui agit comme transpeptidase et carboxypeptidase. Elle est impliquée dans la formation de ponts covalents entre les chaînes pour stabiliser la structure de la paroi et ainsi crée le peptidoglycane. Le lien covalent entre la  $\beta$ -lactamine et le PBP entraîne l'inactivation de ce dernier et un arrêt d'intégration du peptidoglycane à la paroi cellulaire. NAG : N-acétylglucosamine, NAM : acide N-acétylmuramique. Image traduite et modifiée à partir de (11).

#### 1.1.4.2. Fluoroquinolones

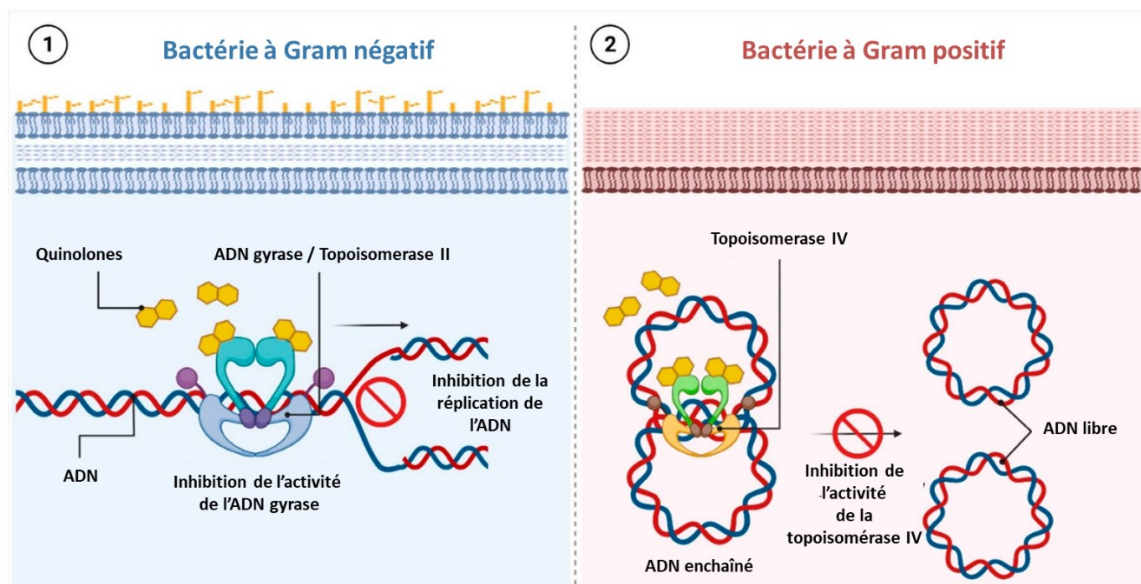
Les quinolones sont des antimicrobiens synthétiques découverts pour la première fois en 1962. La première molécule de cette classe fut l'acide nalidixique, mais en raison de limitations importantes (spectre étroit, propriété pharmacocinétique décevante, toxicité), celle-ci était peu attrayante cliniquement. L'ajout d'un atome de fluor ainsi qu'un groupement pipérazine à la structure des quinolones (Figure 4) a grandement amélioré le spectre d'action et les paramètres pharmacocinétiques de celle-ci (bonne absorption orale, grand volume de distribution, long temps de demi-vie, pénétration importante dans les tissus) (1, 12). Toutes les fluoroquinolones sont considérées de très haute importance en santé humaine par Santé Canada. Comme les céphalosporines de 3<sup>e</sup> génération, certaines molécules de la famille des fluoroquinolones sont uniquement homologuées pour une utilisation en médecine vétérinaire (enrofloxacin, danofloxacin) alors que d'autres sont uniquement homologués pour une utilisation en médecine humaine (ciprofloxacin) (10). Ces molécules sont très semblables (Figure 4) et il est donc nécessaire de suivre l'utilisation des fluoroquinolones utilisées en médecine vétérinaire.



**Figure 4.** Structure chimique de quinolone et de certaines fluoroquinolones

Les fluoroquinolones perturbent la synthèse de l'ADN bactérien en agissant au niveau de deux topoisomérases de type II : la gyrase et la topoisomérase IV. Celles-ci sont composées de deux sous-unités codées par un gène chacune. La structure de l'enzyme est un hétérotétramère de type A<sub>2</sub>B<sub>2</sub>. L'ADN gyrase et la topoisomérase IV sont composées des sous-unités GyrA<sub>2</sub> GyrB<sub>2</sub> et ParC<sub>2</sub> ParE<sub>2</sub>, respectivement (1). Ces deux enzymes sont impliquées dans le retrait du superenroulement de l'ADN lors de la réplication et de la transcription de l'ADN. Le mécanisme ATP dépendant implique le transport d'un segment d'ADN à travers une coupure transitoire

d'un deuxième double brin d'ADN (aussi appelé porte ou segment G pour « gate »). Une fois que le transport du segment d'ADN est complété, le segment G doit être fermé afin de maintenir l'intégrité du génome. Les fluoroquinolones agissent au niveau de cette porte en formant un complexe avec le segment G qui est alors stabilisé et ne peut plus se fermer (11). Il y a un blocage à la fourche de réplication et un arrêt de la réplication bactérienne (Figure 5). La gyrase serait responsable de retirer le superenroulement en avant de la fourche de réplication alors que la topoisomérase IV serait impliquée dans le détachement de l'ADN nouvellement synthétisé (Figure 5) (11).



**Figure 5.** Mécanisme d'action des fluoroquinolones sur la synthèse de l'ADN bactérien. Les fluoroquinolones inhibent l'action de l'ADN gyrase chez les bactéries à Gram négatif [1] alors qu'il inhibe la topoisomérase IV chez les bactéries à Gram positif [2]. Image traduite et modifiée à partir de (11).

L'effet des fluoroquinolones est considéré comme bactériostatique à faible dose chez les bactéries en multiplication cellulaire. Par contre, d'autres mécanismes moins bien connus seraient responsables d'un effet bactéricide à une dose plus élevée. Il y aurait une instabilité importante au niveau des acides nucléiques et les mécanismes de réparation cellulaire seraient rapidement excédés par les dommages entraînant éventuellement la mort cellulaire (12). L'ADN gyrase serait la cible principale des fluoroquinolones pour les bactéries à Gram négatif

et la topoisomérase IV serait plus souvent affectée pour les bactéries à Gram positif (13, 14). Par contre, certains auteurs contredisent cette conclusion, car elle serait trop générale et n'inclut pas les particularités de combinaison de chaque espèce bactérienne et de chaque molécule (12).

#### 1.1.5. Utilisation des antimicrobiens chez les bovins laitiers

##### 1.1.5.1. Antimicrobiens homologués au Canada

Il existe de nombreux antimicrobiens homologués chez les bovins au Canada. Selon la base de données des produits pharmaceutiques de Santé Canada (consulté en juin 2023) (10), 12 classes d'antimicrobiens avec au moins un produit homologué sont actuellement sur le marché chez les bovins (laitiers ou non) (Tableau 4).

Il est important de mentionner que certains produits ne sont plus commercialisés au Canada depuis quelques années. Le produit intra-mammaire pour vache en lactation Special Formula 17900-Forte® est en état dormant depuis le 19 juillet 2021. Ce produit était le seul produit homologué contenant de la polymyxine B (antimicrobien de catégorie I - de très haute importance en santé humaine selon Santé Canada) et de la dihydrostreptomycine (aminoglycoside). En plus de ces deux antimicrobiens, il contenait de la pénicilline G et de la novobiocine (aminocoumarin). Le seul autre produit qui contenait de la novobiocine était Novodry plus® (produit intra-mammaire pour vache tarie) qui est également dans un état dormant depuis le 19 juillet 2021. Ce produit contenait également de la pénicilline G. Le Pirsue® (produit intra-mammaire pour vache en lactation) était le seul produit homologué avec de la pirlymicine (lincosamine), mais il est en état dormant depuis le 13 juillet 2022. Ainsi, le récent retrait de ces trois produits entraîne une diminution de trois classes d'antimicrobiens (aminocoumarin, lincosamine et polymyxine) pour le traitement des bovins au Canada. Cependant, la virginiamycine est un antimicrobien nouvellement commercialisé (29 juin 2019) comme prémélange médicamenteux pour une administration orale indiqué pour réduire l'incidence d'abcès au foie chez les bovins de boucherie élevés en parc d'engraissement.

**Tableau 4.** Liste des antimicrobiens homologués pour les bovins au Canada  
(En date de juin 2023)

Classe (sous-classe)	Molécule(s)	Voie(s) d'administration
Aminoglycosides	Gentamicine, néomycine	injectable, intra-utérine, orale
Antagonistes de la voie des folates	Sulfaguanidine, sulfamérazine, sulfaméthazine, sulfanilamide, sulfathiazol, trimétoprime-sulfadoxine	injectable, orale
$\beta$ -lactamines – Pénicillines	Ampicilline, pénicilline G Cloxacilline	injectable intra-mammaire tarie
$\beta$ -lactamines – Céphalosporine (1 <sup>er</sup> génération)	Céphapirine	Intra-mammaire lactation, intra-mammaire tarie, intra-uterine
$\beta$ -lactamines – Céphalosporine (3 <sup>e</sup> génération )	Ceftiofur	intra-mammaire lactation, intra-mammaire tarie, injectable
Dérivés des nitrofuranes	Nitrofurazone	topique
Fluoroquinolones	Danofloxacin, enrofloxacin, marbofloxacin	injectable
Ionophores	lasalocid, monensin, salinomycine	orale
Macrolides	Gamithromycine, tildipirosine, tilmicosin, tulathromycine, tylosine	injectable
Phénicoles	Florfénicol	injectable
Streptogramines	Virginiamycine	orale
Tétracyclines	Chlortétracycline, oxytétracycline, tétracycline	injectable, orale, topique

Pour les antimicrobiens de très haute importance en médecine humaine selon Santé Canada, seules les céphalosporines de 3<sup>e</sup> génération et les fluoroquinolones sont homologuées pour une utilisation chez les bovins au Canada. Pour les céphalosporines de 3<sup>e</sup> génération, seul le ceftiofur a une homologation pour les bovins au Canada (10). Il existe actuellement deux grands types de produits contenant cet antimicrobien. Le premier est une injection sous-

cutanée ou intramusculaire homologuée pour traiter les maladies respiratoires bovines (fièvre du transport, pneumonie), la nécrobacillose interdigitée (piétin, pododermatite) ou la métrite post-partum. Il est important de mentionner que le temps de retrait dans le lait est de zéro jour pour cet antimicrobien injecté systématiquement. Le deuxième type de produit est intramammaire. Il existe un traitement chez les vaches tarées pour les mammites sous-cliniques et un traitement chez les vaches en lactation pour les mammites cliniques (10).

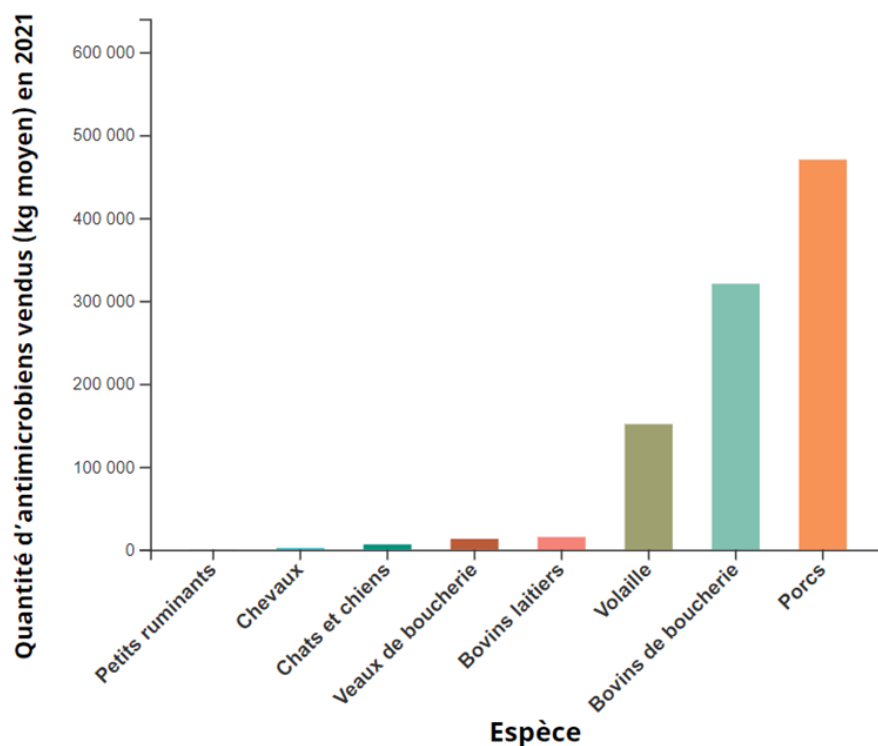
Pour les fluoroquinolones, trois produits sont homologués (enrofloxacin, danofloxacin et marbofloxacin) pour le traitement de la maladie respiratoire bovine pour les bovins qui ne sont pas en lactation. Le produit contenant la marbofloxacin (Forcyl®) a été homologué relativement récemment (2019-03-21) et ce produit n'était pas homologué au moment des expérimentations menant à cette thèse, il ne sera pas abordé d'avantage.

Il existe donc 30 molécules qui peuvent être administrées pour les bovins au Canada. Cependant, il est possible pour un médecin vétérinaire de prescrire des médicaments à un animal en dehors des directives de l'étiquette. Par exemple, un produit utilisé chez les porcs pourrait être administré chez un bovin. L'utilisation hors homologation d'un produit, ainsi que toutes les conséquences associées à cette utilisation sont de la responsabilité du médecin vétérinaire prescripteur. Cette pratique est complexe puisqu'il faut tenir compte du retrait dans la viande et le lait (si applicable) et que les données sont parfois fragmentaires pour établir ces seuils. Il est donc possible d'utiliser d'autres antimicrobiens que ceux homologués, mais cette pratique était marginale chez les bovins laitiers durant la période de réalisation de cette thèse (15).

#### 1.1.5.2. Portrait de l'utilisation des antimicrobiens au Canada

Le Programme intégré canadien de surveillance de la résistance aux antimicrobiens (PICRA) de l'Agence de la santé publique du Canada et le système de Rapports sur les ventes de médicaments vétérinaires antimicrobiens (RVMVA) de Santé Canada sont les deux entités responsables de recueillir les ventes annuelles d'antimicrobiens importants sur le plan médical qui sont destinées à être utilisées chez les animaux. L'information est recueillie annuellement et la consultation est maintenant disponible en ligne via quelques tableaux interactifs

disponibles à l'adresse <https://sante-infobase.canada.ca/ventes-antimicrobiens-veterinaires/> (16). L'information présentée est pour le nombre d'antimicrobiens par secteur ou selon la vente totale par classes d'antimicrobiens. Il est possible de constater que la consommation totale est relativement stable depuis 2018 pour les bovins laitiers. La quantité d'antimicrobiens vendus par année (en kg) était de 16 544 en 2018, 18 967 en 2019, 18 816 en 2020 et 15 147 en 2021. En comparant avec toutes les espèces animales, les bovins laitiers sont la quatrième espèce consommant le plus d'antimicrobien derrière le porc, le bovin de boucherie et la volaille (Figure 6). Une lacune importante de cette comparaison est l'unité de mesure prise pour les comparaisons qui est en kg d'antimicrobien (peu importe l'espèce animale étudiée). Il ne tient pas compte du poids de l'animal ou des doses administrées pour celui-ci. Une dose définie pour les bovins au Canada a été développée pour représenter une dose journalière (DDDbovCA) ou une dose pour un traitement complet (DCDbovCA) (17). Ces doses seraient plus représentatives de la situation réelle.



**Figure 6.** Vente d'antimicrobiens pour différentes espèces animales au Canada en 2021. Quantité (kg moyen) d'antimicrobiens médicalement importants vendus par les fabricants et les importateurs, par espèce, au Canada en 2021. Graphique provenant de (16)



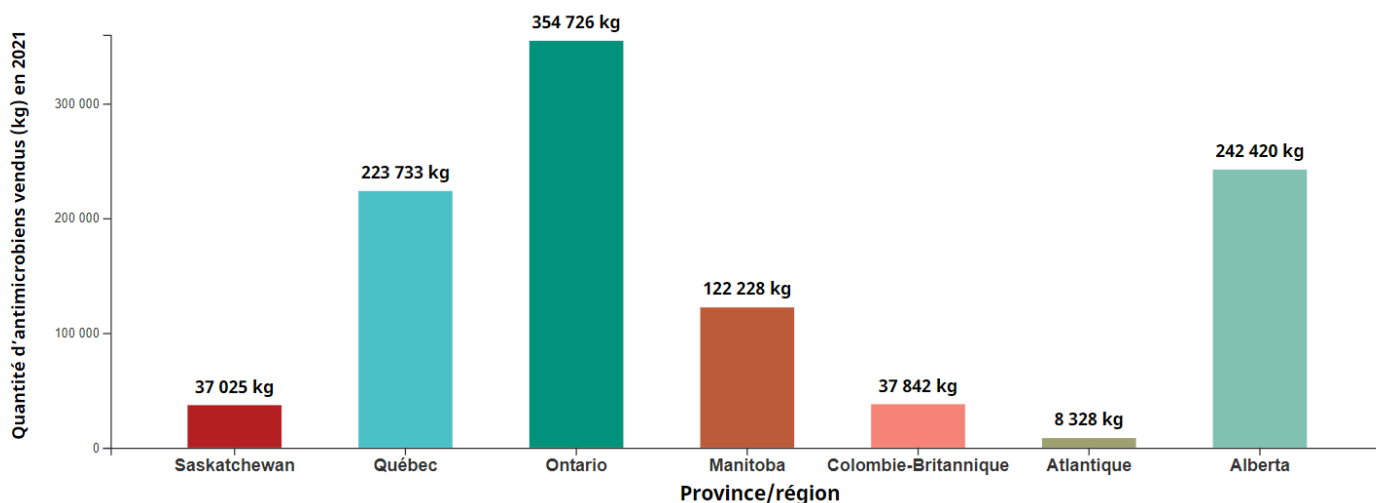
En plus de ce site d'information, des données sont également disponibles dans le sommaire et les faits saillants du PICRA. Cependant, les données de consommation des antimicrobiens sont limitées à l'année 2019 pour l'instant puisque la surveillance des antimicrobiens à la ferme a uniquement débuté depuis quelques années pour les bovins laitiers. Pour l'instant, les données officielles présentées sont fragmentaires pour les bovins laitiers du Canada. Les seuls faits saillants disponibles (rapport 2020 pour l'année de surveillance 2019) rapportent une utilisation des antimicrobiens de catégorie I en injection et intra-mammaire pour les bovins laitiers. Les céphalosporines de 3e génération sont les antimicrobiens de catégorie I les plus souvent utilisés suivis par des petites quantités de fluoroquinolones et de polymyxine B (18).

Un portrait global de la situation a été fait dans une étude de 2012 (19). Les antimicrobiens les plus utilisés dans l'industrie laitière étaient les céphalosporines, les pénicillines et les tétracyclines. Ces trois classes d'antimicrobiens comptent pour plus de 50% des produits utilisés sur les fermes. La majorité des fermes (64-98%) ont utilisé l'un de ces 3 produits au cours de la période d'étude de 2 ans. Pour l'utilisation des antimicrobiens de très haute importance en médecine humaine, les fluoroquinolones ont été utilisées chez 5% des fermes du projet et la quantité utilisée était négligeable. La situation est très différente pour le ceftiofur, il a été utilisé chez 90% des fermes du projet et en quantités importantes (plus de 15% des antimicrobiens utilisés). La prise de données s'étalait entre 2007 et 2008 et les pratiques d'utilisation ont possiblement évoluées avec la mise en place de la catégorisation des antimicrobiens en 2009.

#### 1.1.5.3. Portrait de la situation au Québec

L'information du PICRA-RVMVA disponible en ligne présente également la situation par province. Le Québec est le troisième consommateur d'antimicrobiens en 2021 après l'Ontario et l'Alberta (Figure 7). Malheureusement, il n'est pas possible de distinguer par espèce animale et il est donc impossible de savoir la situation au Québec pour les bovins laitiers. Ma collègue de PhD (Hélène Lardé) a déterminé le portrait de l'utilisation des antimicrobiens sur 101 fermes laitières du Québec. La description complète est disponible dans sa thèse (20) et ses

articles décrivant la situation pour les antimicrobiens autre que les aliments (21) et dans les aliments (22). En résumé, un taux moyen de 537 DCDBovCA/100 vaches laitières-année a été observé. En d’autres mots, 537 traitements antimicrobiens complets étaient administrés annuellement pour un troupeau standard de 100 vaches laitières adultes. La plupart des antimicrobiens étaient administrés par la voie intra-mammaire. Peu de fermes utilisaient des antimicrobiens médicalement importants dans l’alimentation des animaux. Un total de 88 DCDBovCA/100 vaches laitières-année d’antimicrobien de catégorie I était utilisé. La totalité était pour la polymyxine B (54 DCDBovCA/100 vaches laitières-année) et le ceftiofur (35 DCDBovCA/100 vaches laitières-année). Les fluoroquinolones n’étaient pas utilisées sur ces 101 fermes (0 DCDBovCA/100 vaches laitières-année) (15). Puisque le produit contenant la polymyxine B n’est plus commercialisé et qu’il y a un nouveau règlement (*cf.* section 1.1.5.4. - Règlement encadrant les antimicrobiens de catégorie I au Québec), la quantité utilisée à l’heure actuelle devrait s’approcher de 0.



**Figure 7.** Vente d’antimicrobiens au Canada par province en 2021

Quantité d’antimicrobiens médicalement importants vendus par les fabricants et les importateurs, par province/région, au Canada, en 2021. Graphique provenant de (16)

#### 1.1.5.4. Règlement encadrant les antimicrobiens de catégorie I au Québec

Les données présentées dans la dernière section pour l'utilisation des antimicrobiens au Québec proviennent d'une étude réalisée en 2018. Cependant, le portrait de la situation pour l'utilisation a changé pour les bovins laitiers et pour toutes les espèces animales de production puisqu'un règlement provincial est entré en vigueur le 25 février 2019 (23). Ce règlement sur l'administration de certains médicaments se retrouve dans la Loi sur la protection sanitaire des animaux (chapitre P-42) et celle-ci stipule que :

« 1.1. L'administration, à des fins curatives, d'un médicament appartenant à l'une des classes d'antimicrobiens de «Catégorie I: Très haute importance» à un animal destiné ou dont les produits sont destinés à la consommation humaine, est réservée aux seuls cas où il appert, notamment à la suite de la réalisation d'un antibiogramme, que l'administration d'un médicament d'une classe autre que celles de cette catégorie ne permettra pas de traiter la maladie. L'expression «classes d'antimicrobiens de «Catégorie I: Très haute importance»» réfère aux classes publiées sur le site Internet de Santé Canada issues de la catégorisation des médicaments antimicrobiens basée sur l'importance de ces médicaments en médecine humaine.

1.2. Est interdite l'administration à des fins préventives d'un médicament appartenant à l'une des classes d'antimicrobiens de «Catégorie I: Très haute importance» à un animal destiné ou dont les produits sont destinés à la consommation humaine. L'interdiction prévue au premier alinéa ne s'applique toutefois pas dans le cas d'un animal ne présentant aucun signe de maladie si cet animal fait partie d'un groupe restreint comprenant des animaux malades pouvant, conformément aux dispositions de l'article 1.1, être traités au moyen d'un médicament appartenant à l'une des classes d'antimicrobiens de «Catégorie I: Très haute importance» et s'il y a un risque sérieux de propagation de la maladie en raison de la proximité des animaux. »

En bref, ce règlement limite l'usage des antimicrobiens de catégorie I de très haute importance en santé humaine selon Canada pour les animaux de consommation. Depuis cette date, une diminution importante des antimicrobiens de catégorie I a été notée sans évidence d'une augmentation des autres antimicrobiens (24). Les résultats présentés dans cette thèse proviennent d'une acquisition de données antérieure au règlement de 2019 et permettent donc de faire un portrait « pré-réglementation » de la RAM.

## 1.2. La résistance aux antimicrobiens

Malheureusement, l'utilisation des antimicrobiens chez l'homme, l'animal et dans l'environnement a eu une conséquence majeure: la RAM ou l'antibiorésistance des bactéries d'importances médicales. Cette problématique, que j'ai abordée rapidement dans le chapitre précédent, sera approfondie dans cette section qui décrit les généralités, l'utilisation de *E. coli* comme bactérie indicatrice, les mécanismes généraux, la transmission et la description des méthodes utilisées pour tester cette RAM en laboratoire. Comme pour le chapitre précédent, il y aura un accent notable sur certains antimicrobiens particulièrement importants en médecine humaine qui sont utilisés en médecine vétérinaire (céphalosporines de 3<sup>e</sup> génération et fluoroquinolones).

### 1.2.1. Généralité et évolution

La RAM a été observée peu de temps après l'utilisation des premiers antimicrobiens. En effet, des souches bactériennes produisant une pénicillinase (conférant de la résistance à la pénicilline) ont été observées dans les années 1940 (25) peu de temps après la découverte de la pénicilline. À ce jour, cette RAM est présente pour toutes les classes d'antimicrobiens actuellement utilisés (2). Comme la production des antimicrobiens par les microorganismes, la RAM est un processus adaptatif de survie des bactéries (4). De toute évidence, ce phénomène serait bien antérieur à la découverte des premiers antimicrobiens par l'homme. La RAM serait apparue au même moment que les antimicrobiens produits naturellement par les microorganismes. En effet, des bactéries provenant de cave isolée (26) ou de région avec du pergélisol (4, 27) possèdent de la résistance en absence de toute activité humaine (3). Les gènes de résistance seraient donc présents chez les bactéries et l'utilisation des antimicrobiens chez les humains, les animaux et dans l'environnement accélérerait la sélection naturelle envers les souches résistantes. Un nouveau terme a d'ailleurs fait son apparition en 2006 pour décrire les gènes de résistance présents dans toutes les bactéries d'un certain milieu: le résistome (28).

Cette problématique s'est constamment répendue et aggravée à travers le monde depuis maintenant plusieurs années. L'OMS considère la RAM comme « l'une des plus graves menaces

pesant sur la santé mondiale, la sécurité alimentaire et le développement » (29). Selon une estimation de 2016, le nombre de décès attribuable à la RAM pourrait dépasser la mortalité liée au cancer d'ici 2050. Le coût associé à ce problème a été estimé à 100 billions de dollars américains et 50 millions de décès par années d'ici 2050 (30).

### 1.2.2. *Escherichia coli* – bactérie indicatrice de la résistance aux antimicrobiens

Bien que la RAM soit décrite chez de très nombreuses espèces bactériennes, certaines bactéries sont plus propices à être étudiées que d'autres. Parmi ces bactéries, *E. coli* est l'une des bactéries la plus fréquemment décrite dans les études portant sur l'antibiorésistance. Elle possède de nombreuses caractéristiques intéressantes telles que son caractère ubiquitaire, son potentiel pathogène, sa facilité à transmettre des gènes de résistance, sa manipulation facile en laboratoire et son utilisation par de nombreux organismes de surveillance.

Premièrement, cette bactérie est considérée ubiquitaire puisqu'il s'agit d'un habitant normal du système gastro-intestinal des humains, des animaux et se retrouve fréquemment dans l'environnement de ceux-ci (31). Lorsque *E. coli* est retrouvé dans l'environnement, il est considéré comme une contamination fécale de l'eau et de l'environnement. Pour déterminer la qualité microbienne de l'eau, la vérification repose sur l'analyse de microorganismes indicateurs de contamination fécale et *E. coli* qui est décrit comme le microorganisme de choix (32). Son ubiquité facilite sa comparaison et permet d'inclure tous les aspects d'une seule santé (humain, animal et environnement). L'aspect environnement est souvent la portion négligée de cette triade, mais il a été récemment suggéré que *E. coli* soit également intégré comme bactérie indicatrice de la RAM pour l'environnement (33).

Deuxièmement, bien que la très grande majorité des *E. coli* soit des commensaux présents dans l'intestin, un petit nombre de *E. coli* est considéré comme une bactérie pathogène et peut être impliqué dans de nombreux processus pathologiques chez l'humain et les animaux (31, 34). Grâce à ses nombreux facteurs de virulence (fimbriae, capsule, entérotoxine, etc.), cette bactérie est responsable de nombreuses problématiques cliniques (diarrhée, infection opportuniste, septicémie potentiellement mortelle si non traitée, etc.). Certains de ces *E. coli*

ont également des potentiels zoonotiques. Cette bactérie possède donc un potentiel pathogène important.

Troisièmement, cette bactérie a une facilité pour transmettre les gènes de résistance grâce à des éléments génétiques mobiles comme la conjugaison impliquant la transmission de plasmide (*cf.* section 1.2.4. - Transmission de la résistance aux antimicrobiens). Il a été démontré qu'il est possible de faire un passage de gènes de résistance entre un *E. coli* considéré non pathogène et des bactéries pathogènes (35).

Quatrièmement, *E. coli* est une bactérie qui est facilement manipulable en laboratoire. Elle croit sur de nombreux milieux de culture simple (gélose Columbia, McConkey) et elle produit de moyennes colonies grises après 24 heures d'incubation à 37°C. Elle peut facilement se conserver dans des milieux de congélation pour de longues périodes et elle peut facilement survivre dans l'environnement. La manipulation facile de cette bactérie en laboratoire est intéressante puisque des installations simples peuvent permettre son isolement. De nombreux pays (avec des moyens financiers parfois limités) peuvent se permettre de travailler avec cette bactérie pour déterminer la RAM. Cet avantage est très important lorsqu'il est nécessaire de comparer les résultats sur la RAM dans un contexte de surveillance entre de nombreux pays.

Finalement, *E. coli* est actuellement utilisé comme microorganismes sentinelles pour répertorier la RAM dans de très nombreux programmes de surveillance de plusieurs pays (Canada : PICRA (36), États-Unis : NARMS (37), France : Résapath (38), Suède : Swedres-Svarm (39), etc.). En plus de la surveillance effectuée, de nombreuses études utilisent *E. coli* pour caractériser cette RAM. Le principal avantage est qu'il est facile de comparer les différentes données entre les pays et les études.

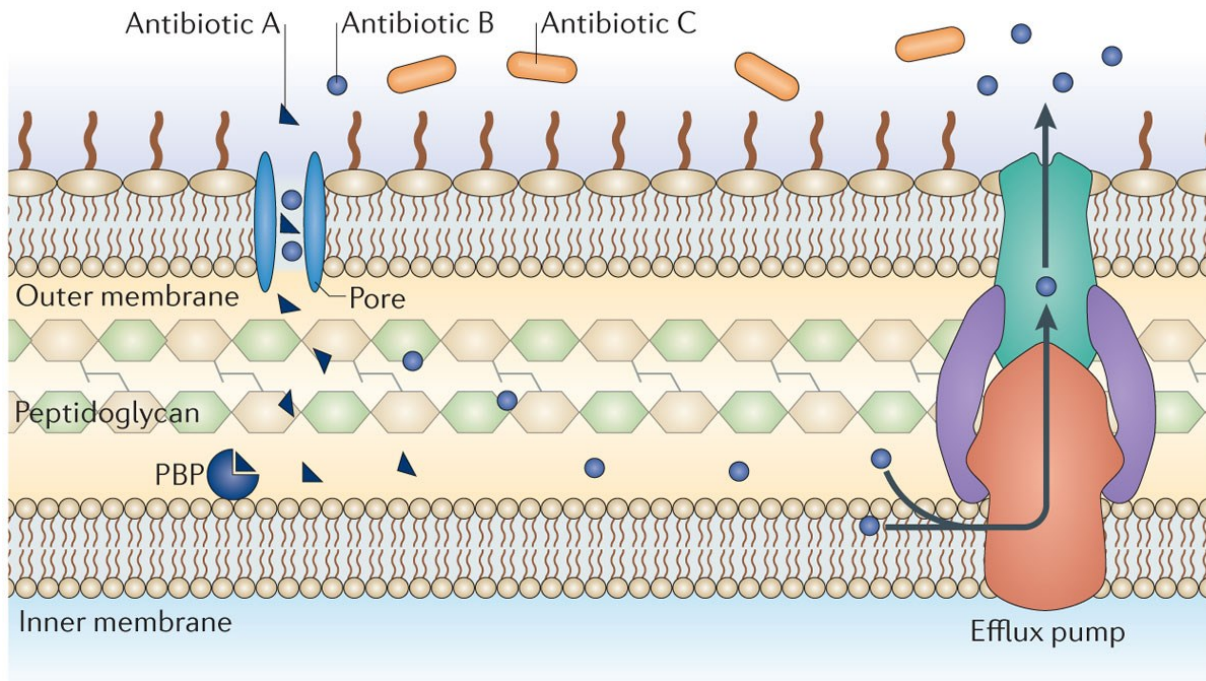
Malheureusement, la RAM ne se limite pas à une seule espèce bactérienne. D'autres bactéries sont rapportées par les organismes de surveillance, surtout celles avec un potentiel zoonotique important (*Campylobacter spp.* ou *Salmonella spp.*). De plus, il y a certaines bactéries à Gram positif (*Enterococcus spp.*) qui sont retrouvées comme agents commensaux du système digestif et qui peuvent être indicateur de la RAM. Si nous sortons du contexte de bactérie

indicateur, il y a un important groupe de bactéries qui est fréquemment associé à de la RAM en milieu hospitalier (surtout humain pour l'instant). Ces bactéries sont connues sous le nom de l'acronyme ESKAPE (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Enterobacter* spp.) (40). Ces bactéries sont fréquemment rapportées dans des études sur la RAM.

Bref, *E. coli* est une très bonne bactérie indicatrice de la RAM, même si cette problématique ne se limite pas à cette seule bactérie. Pour le reste de cette thèse, il y aura un accent important sur cette bactérie, autant pour la revue de littérature que dans les articles présentés dans le cadre de ces travaux.

### 1.2.3. Mécanismes généraux : phénotype et génotype

La RAM se divise en deux grandes catégories : la résistance naturelle (ou intrinsèque) ou acquise (ou extrinsèque). La résistance naturelle est commune à une espèce ou à un groupe de bactéries qui ont une propriété structurelle ou métabolique particulière (Figure 8) (3, 11). Par exemple, les bactéries à Gram négatif ont une membrane externe qui empêche certaines molécules (exemple : vancomycine qui serait l'antimicrobien C dans la figure 8) de pénétrer la cellule et d'agir sur leur site d'action. Selon certains auteurs (2), ce type de résistance inclut également une augmentation du nombre de copies d'un gène présent chez la bactérie (p. ex. la résistance au sulfamide et au triméthoprime peut être causée par une amplification du gène codant pour la voie de l'acide folique affectée). La résistance acquise se produit suite à une mutation génétique ou un transfert horizontal de gènes (*cf.* section 1.2.4. - Transmission de la résistance aux antimicrobiens). Les mécanismes de résistance acquise sont divisés en trois grands groupes : 1 - Diminution de la concentration intracellulaire par une diminution de perméabilité ou une pompe à efflux, 2 - modification de la cible de l'antimicrobien par une mutation génétique ou une modification post-traductionnel et 3 - Inactivation bactérienne par hydrolyse ou modification. Les mécanismes précis de résistance pour les  $\beta$ -lactamines et les fluoroquinolones seront décrits à la fin de cette section.



Nature Reviews | Microbiology

**Figure 8.** Mécanismes de résistance naturelle (intrinsèque) aux antimicrobiens

La figure montre de la résistance naturelle d'une bactérie à Gram négatif pour les antimicrobiens de la classe des  $\beta$ -lactamines. L'antimicrobien A peut pénétrer la membrane externe de la bactérie par une porine et atteindre son site d'action (PBP : Penicillin Binding protein) dans le périplasme.

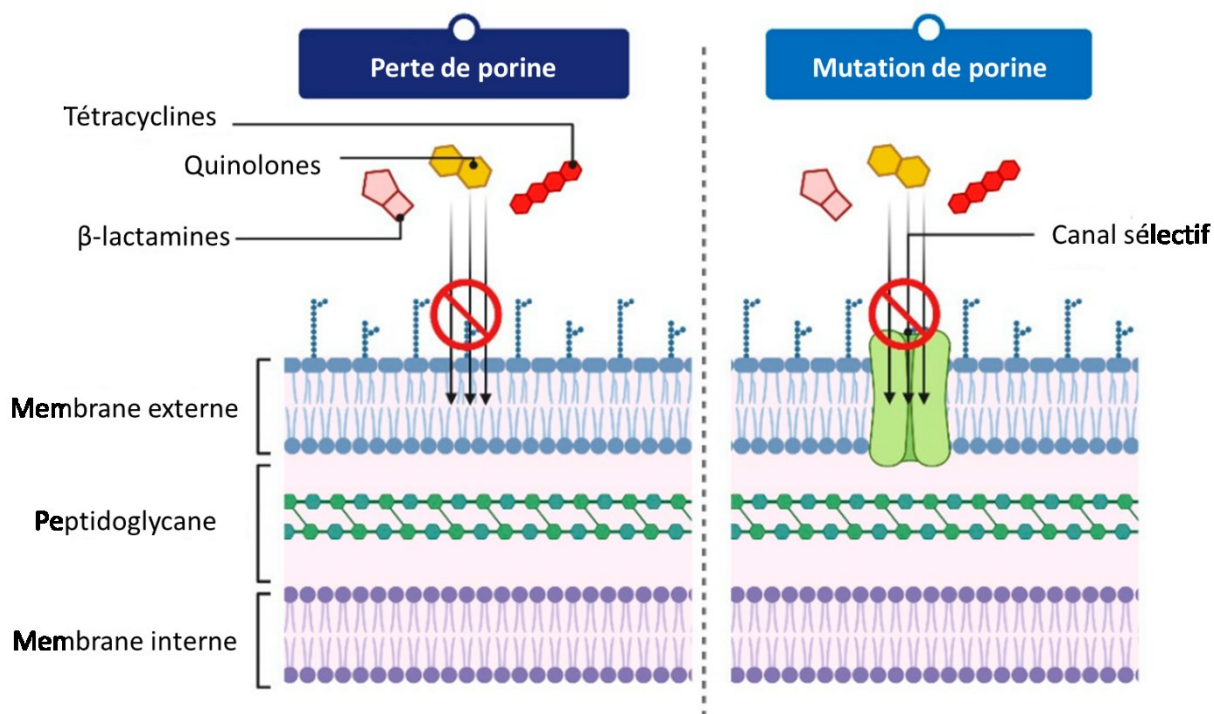
L'antimicrobien B réussit également à atteindre le périplasme, mais ne peut se lier à son site actif à cause d'une pompe à efflux non spécifique qui expulse l'antimicrobien de la bactérie. L'antimicrobien C ne peut pas traverser la membrane externe et est incapable d'atteindre sa cible. Figure reproduite avec la permission de Springer Nature provenant de (3).

#### 1.2.3.1. Diminution de la concentration intracellulaire

La diminution de la perméabilité membranaire est un mécanisme de résistance majoritairement employé par les bactéries à Gram négatif. Les bactéries à Gram positif sont naturellement beaucoup plus perméables que les bactéries à Gram négatif en raison de la différence de composition et de structure importante au niveau de la membrane externe. Cette membrane est particulièrement imperméable pour plusieurs nutriments et molécules (incluant les antimicrobiens hydrophiles) qui ne peuvent pas traverser et atteindre le milieu intracellulaire des bactéries à Gram négatif. Afin de favoriser l'entrée d'éléments essentiels à la croissance bactérienne, il existe des porines permettant le transport non sélectif qui peut également être utilisé par les antimicrobiens. Un des mécanismes de résistance non spécifique



est la diminution du nombre de porines ou une augmentation de la sélectivité afin de limiter la quantité d'antimicrobiens voyageant vers l'intérieur de la cellule (Figure 9) (3, 11).



**Figure 9.** Diminution de la perméabilité membranaire des bactéries

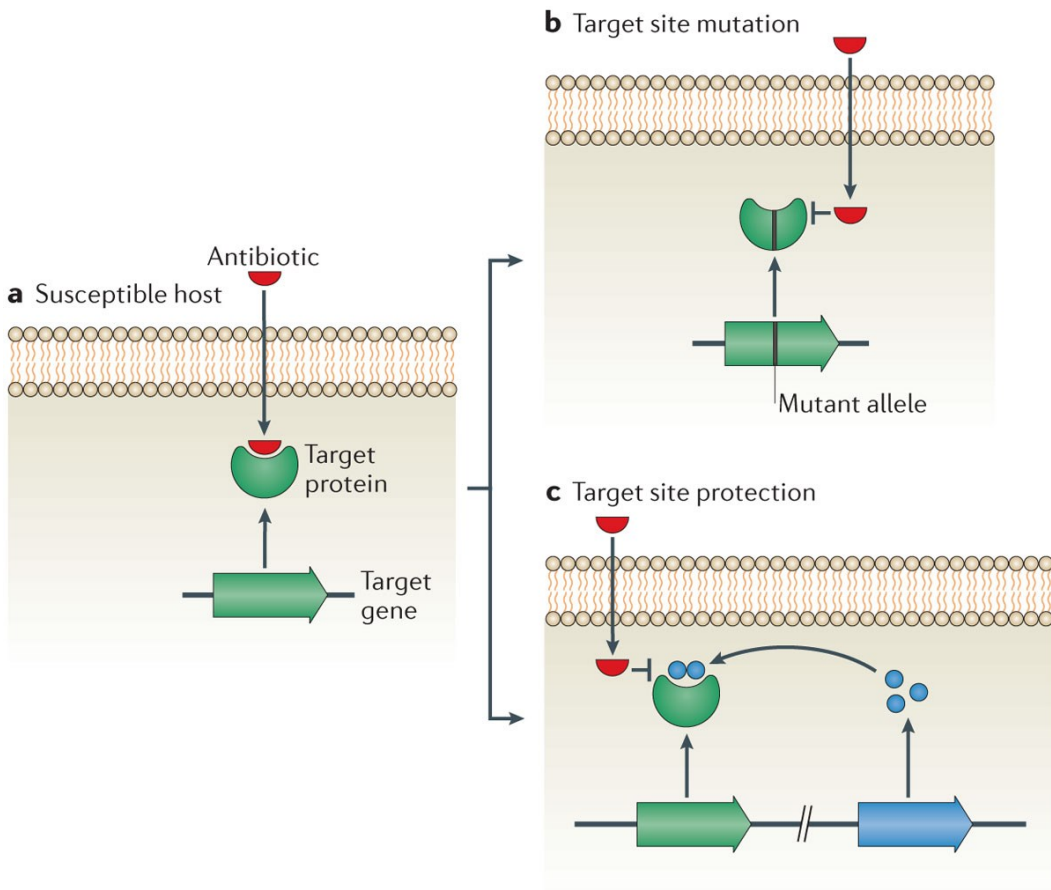
Diminution de la perméabilité membranaire des bactéries à Gram négatif par une diminution du nombre de porine ou une augmentation de la sélectivité de celles-ci. Image traduite et modifiée de (11)

Une modification dans les pompes à efflux est la deuxième façon de diminuer la concentration intracellulaire d'un antimicrobien. Encore une fois, ce sont les bactéries à Gram négatif et leur membrane externe imperméable qui utilisent davantage ce mécanisme de RAM. Ces pompes sont des protéines permettant le transport actif de plusieurs molécules intracellulaire vers le milieu extracellulaire. Certaines sont très sélectives comme celles pour les tétracyclines qui incluent un groupe de pompe contenant 12 segments transmembranaires échangeant un proton contre une molécule de tétracycline. Ce groupe inclut les pompes à efflux tet(A) et tet(B), qui confère une résistance pour les tétracyclines. Ce mécanisme est le plus fréquemment retrouvé pour les bactéries à Gram négatif (41) pour la résistance envers les tétracyclines. D'autres types de pompes ciblent un éventail beaucoup plus large de molécules.

Par exemple, la pompe à efflux AcrAB-TolC, qui est normalement présente chez plusieurs *Enterobacteriaceae*, peut subir une mutation dans l'un de ses régulateurs (*marR* qui est un répresseur) (14, 42). Il y a alors augmentation de l'expression de cette pompe qui entraîne une résistance importante envers plusieurs classes d'antimicrobiens (3).

#### 1.2.3.2. Modification de la cible

L'effet d'un antimicrobien dépend de la spécificité de la liaison entre celui-ci et sa cible. Une modification de cette cible par mutation ou une protection de celle-ci peut avoir un impact important sur l'effet de l'antimicrobien (Figure 10). Si la cible subit une mutation, il doit y avoir un changement structurel de l'enzyme pour diminuer l'affinité envers l'antimicrobien sans modifier sa fonction. La mutation de la cible peut être interprétée très largement, il peut s'agir d'un gène alternatif codant pour une enzyme fonctionnelle, mais sans affinité pour l'antimicrobien. Par exemple, les gènes *sul1* et *sul2* codent pour l'enzyme cible modifiée des sulfamides (dihydroptéroate synthétase : DHPS). Ces gènes sont très fréquents comme mécanisme de résistance pour les bactéries à Gram négatif (43). La mutation peut également être ponctuelle dans le gène et affecter un seul acide aminé de l'enzyme cible. L'exemple classique est décrit pour des mutations à des endroits précis dans des gènes de la topoisomérase au niveau des sites *gyrA* et *parC* qui confèrent de la résistance pour les fluoroquinolones (14).



Nature Reviews | Microbiology

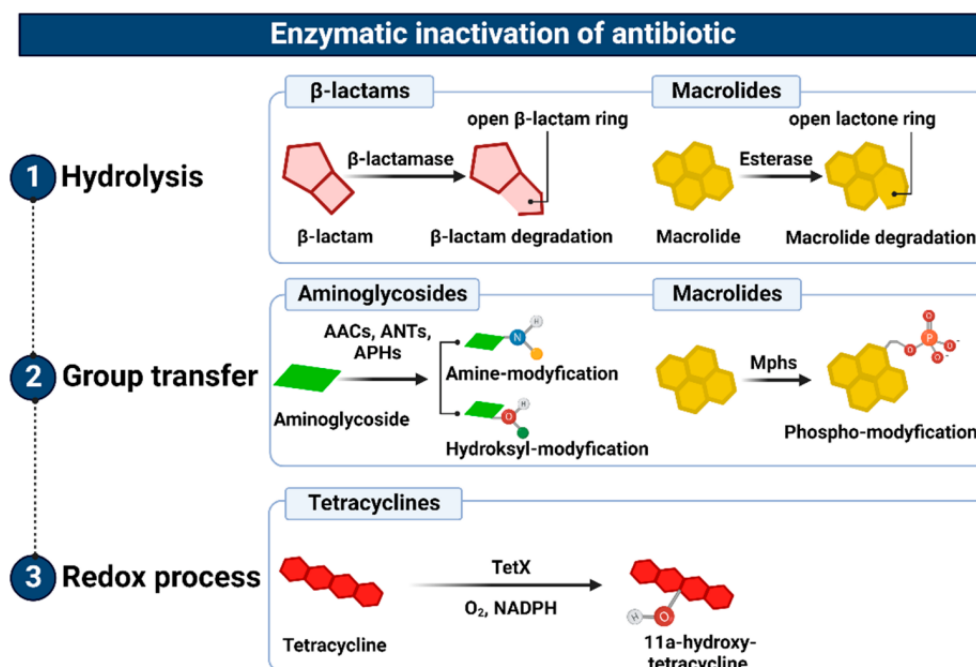
**Figure 10.** Modification de la cible bactérienne des antimicrobiens

a) une bactérie susceptible à cet antimicrobien puisque celui-ci se lie à sa cible et exerce un effet inhibiteur sur la bactérie, b) une bactérie résistante à cet antimicrobien par une mutation dans le site actif de l'enzyme cible, c) une bactérie résistante à cet antimicrobien par la protection du site actif de l'enzyme qui prévient l'attachement de l'antimicrobien à la cible. Figure reproduite avec la permission de Springer Nature provenant de (3).

En plus des mutations, le site actif peut être protégé de l'antimicrobien par différents mécanismes agissant comme protecteur direct de la protéine ciblée par l'antimicrobien (Figure 10). Il peut s'agir d'une modification du site d'attachement par l'ajout d'un groupement méthyle par une méthylase ou une méthyltransférase, un changement de charge de ce site ou la synthèse d'une nouvelle protéine liant directement le site actif de celui-ci (3). Un exemple serait la présence du gène *qnr* codant pour un PRP (pentapeptide repeat proteins) qui lie et protège la topoisomérase pour limiter l'action des fluoroquinolones (3).

### 1.2.3.3. Inactivation enzymatique

La production de molécules affectant directement l'antimicrobien est l'un des mécanismes de résistance les plus fréquemment retrouvés chez les bactéries. Il a été responsable des premiers cas de résistances bactériennes observés suite à l'utilisation des pénicillines dans les années 1940 (25). L'inactivation peut se produire suite à l'hydrolyse, l'ajout d'un groupement chimique ou par un processus d'oxydoréduction (rare) (Figure 11). L'hydrolyse est le plus fréquemment observée avec une quantité sans cesse grandissante de plusieurs milliers de molécules dégradant divers antimicrobiens. La classe d'antimicrobien la plus souvent affectée est les  $\beta$ -lactamines (44). La classification des  $\beta$ -lactamases sera expliquée en détail dans la section 1.2.3.5 sur la particularité des céphalosporines de 3<sup>e</sup> génération. L'ajout d'un groupement chimique par des enzymes comme l'acétyltransférase, la phosphotransférase et de nucléotidyltransférase est surtout décrit pour les aminoglycosides (3). Cette modification entraîne une augmentation de l'encombrement stérique de l'antimicrobien et inhibe l'interaction de celui-ci avec sa cible (Figure 11).



**Figure 11.** Inactivation enzymatique des antimicrobiens

Inactivation enzymatique des antimicrobiens par hydrolyse, transfert d'un groupement chimique ou par un processus d'oxydoréduction. AAC, Aminoglycoside Acétyltransférase; ANT Aminoglycoside Nucléotidyltransférase; APH, Aminoglycoside phosphotransférase. Image provenant de (11).

#### 1.2.3.4. Réversibilité de la résistance

L'acquisition de gène de résistance n'est pas sans conséquence pour la bactérie. Cet ajout de matériel génétique doit être transmis de la cellule mère à la cellule fille et augmente le temps nécessaire à la multiplication cellulaire. Dans un milieu sans antimicrobien, la sélection naturelle favorise la bactérie naïve sans bagage génétique excédentaire. En théorie, il devrait y avoir une diminution importante de bactéries résistantes qui ont un coût d'adaptation (fitness cost) plus élevé si l'on arrête d'utiliser un certain antimicrobien (45-47). Malheureusement, ce n'est pas ce qui a été observé dans une revue de 2010 (48). Les auteurs ont tenté d'expliquer cette observation par plusieurs possibilités. L'activité des gènes de résistance peut être favorisée dans un milieu particulier par de l'épistasie (défini comme : une interaction entre les gènes, de telle sorte que l'effet d'un gène est modifié par un ou plusieurs autres gènes), une régulation ou des conditions environnementales qui favorisent la souche résistante. Il peut également avoir des mutations sans effet délétère sur le coût d'adaptation. Finalement, certains types de résistances sont associés à un avantage au niveau de la sélection naturelle. Ces hypothèses pourraient expliquer pourquoi l'arrêt de l'usage d'un certain antimicrobien n'est pas corrélé avec une diminution de résistance à court terme. La réversibilité de la résistance dépend du patient, de la souche bactérienne ainsi que du mécanisme de résistance en cause (48).

#### 1.2.3.5. Particularité : Céphalosporine de 3<sup>e</sup> génération

De nombreux mécanismes menant à de la RAM pour les antimicrobiens sont décrits pour la classe des  $\beta$ -lactamines comme une modification de la cible, une diminution de la perméabilité ou une augmentation de l'efflux. Cependant, le principal et le plus important, particulièrement pour les bactéries à Gram négatif et surtout les *Enterobacteriaceae*, demeure la production de  $\beta$ -lactamases ; une enzyme qui ouvre l'anneau  $\beta$ -lactamines et inactive l'antimicrobien (Figure 2) (1). Il existe actuellement plus de 1000 gènes codants pour des  $\beta$ -lactamases. Ceux-ci sont regroupés en différentes familles selon une nomenclature complexe, très variée et parfois peu fonctionnelle. Certaines enzymes ont été nommées en référence à la ville d'origine, la fonction

de l'enzyme, le plasmide, le patient d'origine, l'antimicrobien principalement affecté, etc. La signification complète de ces noms est décrite dans une revue de littérature (49), mais dépasse le but de cette thèse et ne sera pas abordée ici. Il y a eu une augmentation fulgurante du nombre de  $\beta$ -lactamases découvert au cours des dernières années (44).

Classiquement, les  $\beta$ -lactamases sont classés selon la méthode d'Ambler. Cette classification créée en 1980 par Ambler (50), est basée sur la séquence de nucléotides et d'acide aminés. Il existe actuellement 4 groupes : A, B, C et D. Les groupes A, C et D sont des enzymes avec une sérine au niveau du site actif alors que le groupe B possède un ion bivalent pour être fonctionnel (51). Le groupe A comprend des pénicillinases et des  $\beta$ -lactamases à spectre étendu (BLSE). Le groupe B inclut toutes les métallo- $\beta$ -lactamases qui ne sont pas affectés par les inhibiteurs de  $\beta$ -lactamases. Le groupe C inclut les céphalosporinases ou AmpC. Le groupe D inclut les OXA  $\beta$ -lactamases (1, 44, 51). Il existe une deuxième classification plus récente de Bush-Jacoby basée sur la fonction (52) et qui comporte 3 membres. Les deux types de classification sont similaires puisque la séquence d'acides aminés est fortement liée à la fonction. Ainsi il est possible d'établir une corrélation entre les deux classifications. Le groupe 1 (C) inclut les céphalosporinases qui ne sont pas inhibées par l'acide clavulanique ou le tazobactam. Le groupe 2 (A et D) inclut les BLSE ainsi que les carbapénémases. Le groupe 3 (B) regroupe les métallo- $\beta$ -lactamases qui ne sont pas inhibés par l'acide clavulanique ou le tazobactam. Il s'agit d'une règle générale, mais il y a quelques exceptions à ces règles qui sont bien définies dans une revue de littérature de 2011 (44).

En plus des deux classifications ci-haut, les  $\beta$ -lactamases sont également divisés en catégories selon le spectre d'action. Cette catégorisation est plus fréquemment utilisée au niveau clinique pour déterminer si un isolat pathogène peut être traité avec un certain antimicrobien. Les enzymes inactivant les céphalosporines sont regroupés en 3 catégories. Les BLSE sont des enzymes hydrolysant les pénicillines, les céphalosporines (incluant celles de 3<sup>e</sup> et 4<sup>e</sup> génération) ainsi que les monobactames (aztréonam), par contre, ceux-ci n'affectent pas les céphamycines (céfoxitine) ni les carbapénèmes et sont inhibés par les inhibiteurs de  $\beta$ -lactamases (acide clavulanique et tazobactam). Les céphalosporinases de type AmpC affectent

les pénicillines, les céphalosporines (surtout de 3<sup>e</sup> génération, mais rarement les 4<sup>e</sup> génération), les céphamycines (céfoxitine) ainsi que les monobactames. Ceux-ci sont généralement non affectés par les inhibiteurs de  $\beta$ -lactamases (surtout l'acide clavulanique). Finalement, la dernière classe, les carbapénèmes, hydrolysent les pénicillines, les céphalosporines, les monobactames et les carbapénèmes (53).

Les BLSE sont une des inquiétudes majeures pour la RAM chez les bactéries à Gram négatif depuis maintenant plusieurs années puisque les gènes codants pour ce type de résistance sont retrouvés fréquemment sur des plasmides chez les *Enterobacteriaceae* (54). Les BLSE sont présents dans de nombreuses familles d'enzyme comme les TEM, SHV, CTX-M, GES, PER et VEB (55). Actuellement, le BLSE le plus prévalent est le CTX-M suivi de SHV et TEM (44, 53, 55).

Contrairement à son nom, les céphalosporinases de type AmpC n'inhibe pas uniquement l'antimicrobien ampicilline. Cette nomenclature remonte en 1965 où des chercheurs suédois analysaient des gènes nommés *ampA*, *ampB* et *ampC* retrouvés chez *E. coli* résistant à l'ampicilline (56, 57). La nomenclature des gènes *amp* a été modifiée dans les années subséquentes puisque celle-ci n'était pas exacte, mais la désignation de *ampC* a persisté à travers le temps. Aujourd'hui, AmpC ne signifie plus un gène, mais une classe de  $\beta$ -lactamase (58). De nombreuses bactéries à Gram négatif produisent une enzyme de type AmpC de façon constitutive en très faible quantité (*E. coli*, *Shigella* spp.) ou inductible en plus grande quantité (*Enterobacter* spp., *Citrobacter freundii*, *Morganella morganii*, *Pseudomonas aeruginosa*). Une amplification dans le promoteur ou une mutation qui déstabilise le répresseur du gène codant pour l'enzyme de type AmpC peut entraîner de la résistance. Ce type de résistance peut également être acquis par des plasmides contenant des gènes codant pour des enzymes de type AmpC. L'enzyme la plus fréquente et la plus disséminée est celle de type CMY-2. Avec la distribution clonale et le transfert horizontal de gène, ce type de résistance est maintenant observé partout à travers le monde (53, 58).

La résistance de type carbapénémase est la plus inquiétante puisqu'elle confère de la résistance à toutes les  $\beta$ -lactamines et celle-ci est facilement transférable par des gènes situés

sur des plasmides (53). Depuis 2011, les bactéries obtenues de nombreuses espèces animales (volaille, porc, bovin, poisson, fruit de mer, animaux domestiques et sauvages) ont démontré des gènes de résistance associés à de la résistance aux carbapénèmes (59). Cependant, les bactéries résistantes aux carbapénèmes sont rares chez les bovins et ceux décrits jusqu'à présent sont surtout retrouvés pour *E. coli* et *Acinetobacter baumannii* associé à des OXA ou des NDM (59).

#### 1.2.3.6. Particularité : Fluoroquinolones

Les mécanismes de résistance sont très vastes et incluent la modification et la protection de la cible, l'inactivation enzymatique, la diminution de la perméabilité ainsi que l'augmentation de l'efflux. Ces mécanismes ne contribuent pas équitablement à la résistance observée, la modification de la cible entraîne une résistance importante (12) alors que l'inactivation enzymatique entraîne une résistance légère qui n'est pas significative cliniquement (60). En général, plus il y a de mécanismes présents chez une bactérie, plus la résistance observée est élevée (61). Les mécanismes de résistance sont semblables d'une fluoroquinolone à l'autre, ce qui entraîne une résistance croisée importante (1, 13).

La modification de la cible (résistance chromosomique) peut entraîner un haut niveau de résistance sans nuire à l'activité enzymatique des topoisomérases de type II (ADN gyrase et topoisomérase IV) qui sont les cibles des fluoroquinolones (Figure 5). Toutes les sous-unités de l'ADN gyrase (*GyrA* et *GyrB*) et de la topoisomérase IV (*ParC* et *ParE*) peuvent avoir des mutations pour diminuer l'affinité des fluoroquinolones, mais les mutations dans *GyrA* ou *ParC* sont les plus fréquentes et elles sont associées à une plus grande résistance. Le site principal de mutation nommé le QRDR (Quinolone Resistant-Determining Region) est situé dans le site actif de l'enzyme. Celui-ci est situé entre alanine 67 et glutamine 106 pour *GyrA* et acide aspartique 426 et lysine 447 pour *GyrB*. Étant donnée la forte homologie entre l'ADN gyrase et la topoisomérase IV, ces sites se retrouvent entre l'acide aminé 64 et 103 pour *ParC* et 420 et 441 pour *ParE* (13). Pour *E. coli*, il doit généralement y avoir au moins deux mutations pour avoir un niveau de résistance plus élevé (13). Les mutations les plus fréquemment observées



chez *E. coli* pour un niveau important de résistance sont retrouvées au niveau de *GyrA* pour les codons 83 (mutation de sérine en leucine) et 87 (mutation d'acide aspartique en asparagine). Dans le cas de *parC*, les mutations les plus fréquentes chez *E. coli* sont au niveau des codons 80 (mutation de sérine en isoleucine) et 84 (mutation de l'acide glutamique en glycine, lysine ou valine) (13, 62, 63). Une observation importante à noter par rapport à certaines de ces mutations est qu'elles peuvent être associées à un avantage lors de la multiplication bactérienne en absence de l'antimicrobien. La population mutante résistante se maintient même lors du retrait de la sélection par un antimicrobien (64).

Un gène codant pour une protéine protectrice de la cible a été découvert en 1998 sur un plasmide d'une souche clinique de *Klebsiella pneumoniae* (65). Ce gène nommé *qnr* (quinolone resistance) code pour un pentapeptide protégeant l'ADN gyrase et la topoisomérase IV (12). Cette protection entraîne un faible niveau de résistance, mais serait un processus important de sélection qui pourrait entraîner un niveau de résistance beaucoup plus élevé à la suite de l'addition des mécanismes de résistance. Actuellement, les 3 types de *qnr* les plus importants sont A, B et S. Les *qnr* A et S contiennent 218 acides aminés alors que le *qnr* B contient 214 acides aminés (66). De plus, la séquence codante pour ce gène est située près d'un intégron de classe 1 sur un plasmide (1). Habituellement, les plasmides transportant les gènes *qnr* sont également porteurs de gènes codant pour une BLSE comme *bla<sub>CTX-M-9</sub>* ou *bla<sub>SHV-7</sub>* ou un gène de type AmpC tels que *bla<sub>fox-5</sub>* (14). Une prévalence importante a été décrite pour des *Enterobacteriaceae* résistants aux céphalosporines de 3<sup>e</sup> génération porteurs du gène *qnr* (67). Même si la résistance apportée par ce mécanisme est minime, il est l'un des premiers pas vers une résistance plus importante pour les fluoroquinolones et il est transférable par plasmide.

Puisque cette classe d'antimicrobiens est synthétique sans aucun analogue naturel, il était considéré comme très peu probable que l'inactivation enzymatique soit un mécanisme de résistance. Cependant, une étude de 2006 a démontré qu'une enzyme inactivant les aminoglycosides (*aac(6')-1 b-cr*) pouvait avoir un impact sur la résistance envers les fluoroquinolones (60). Cette enzyme entraîne un faible niveau de résistance chez *E. coli* pour certaines fluoroquinolones uniquement. Le gène *aac(6')-1 b-cr* code pour une enzyme

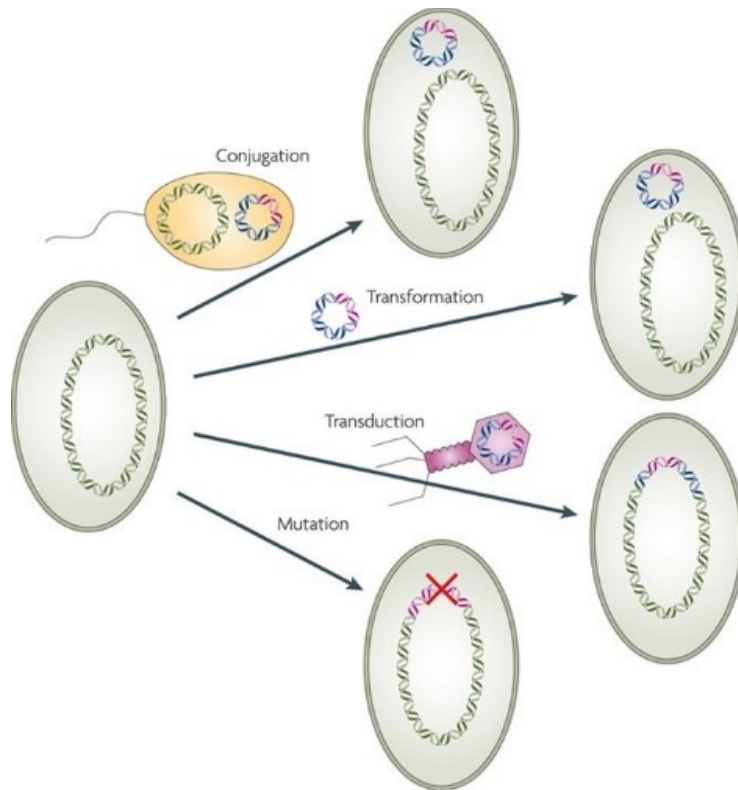
dégradant le ciprofloxacine et le norfloxacine par une N-acétylation sur l'anneau pipérazine. L'enrofloxacin possède un anneau pipérazine déjà acétylé (Figure 4) et serait protégé de cette enzyme (60). Ce gène est transmis par un plasmide, mais n'aurait pas de lien avec celui contenant le gène *qnr* (68). De plus, ce gène est présent chez des bactéries isolées dans plusieurs états américains, mais ne serait pas lié à des souches plus résistantes au ciprofloxacine (68). L'implication clinique de ce gène de résistance resterait donc à démontrer.

Des processus non spécifiques de résistances aux fluoroquinolones sont également décrits comme mécanisme de résistance pour cette classe d'antimicrobien. Une diminution de la concentration intracellulaire par une diminution de la perméabilité et une augmentation de l'efflux sont rapportées chez certaines bactéries. Des mutations dans certaines porines (OmpC et OmpF) chez *E. coli* entraînent un niveau de résistance faible en limitant l'entrée de plusieurs antimicrobiens incluant les fluoroquinolones (14, 69). Il y aurait également l'implication d'une porine OmpX qui serait exprimée dans un environnement stressant et son expression inhiberait les autres porines présentes sur la membrane externe des bactéries à Gram négatif. Un deuxième type de protéine (pompe à efflux) est responsable du transport actif permettant de déplacer les molécules nuisibles pour la cellule bactérienne à l'extérieur de celle-ci. Certaines de ces pompes sont impliquées dans l'expulsion des antimicrobiens et entraînent donc de la résistance. Chez *E. coli*, la pompe à efflux AcrAB-TolC peut être responsable de multirésistance, incluant les fluoroquinolones. Cette pompe est constituée de deux parties importantes : la partie AcrAB et TolC. AcrAB est située dans la membrane interne alors que TolC est situé sur la membrane externe de la bactérie (70). Cette pompe est normalement présente, mais une modification de plusieurs régulateurs (*AcrR*, *Mar*, *Sox*) permet la surexpression de celle-ci et entraîne ainsi de la résistance (42, 62, 71). Par contre, les pompes à efflux entraînent habituellement un faible niveau de résistance envers les fluoroquinolones (12).

Enfin, il est important de mentionner ici que l'utilisation des fluoroquinolones est pratiquement inexistante dans les troupeaux bovins laitiers canadiens (19) et québécois (15) par rapport aux autres classes d'antimicrobiens. Cependant, une utilisation minimale n'est pas nécessairement corrélée avec une absence de résistance observée. Par exemple, il a été noté que l'apparition de résistance dans le fumier peut survenir rapidement après le traitement de veaux malades, même après l'administration d'une seule dose de fluoroquinolones (72). Pour la posologie et la voie d'administration homologuées chez le bovin (dose de 7,5 mg/kg d'enrofloxacin administrée une seule fois sous-cutanée), les concentrations maximales dans le colon étaient de 0,86 µg/mL d'enrofloxacin et de 0,13 µg/mL de ciprofloxacine (son métabolite principal). Ces doses sont bactéricides pour les souches sensibles de *Salmonella enterica* (73). Ces concentrations maximales sont probablement sous-estimées puisque la dose homologuée va jusqu'à 12,5mg/kg pour les bovins au Canada. Bref, l'administration d'enrofloxacin (même unique) selon les directives de l'étiquette entraîne des concentrations suffisantes qui pourraient favoriser la sélection de bactéries résistantes dans le microbiome intestinal.

#### 1.2.4. Transmission de la résistance aux antimicrobiens

La transmission de gènes de RAM entre bactéries s'effectue par deux mécanismes principaux de transfert : vertical et horizontal. Le transfert vertical est une transmission d'un mécanisme de résistance entre la cellule mère aux cellules filles lors de la multiplication cellulaire (48). Le transfert horizontal implique des bactéries différentes et l'acquisition d'une nouvelle propriété qui était absente de l'une d'elles (nouvelle protéine transcrite). Le transfert de matériel génétique entre bactéries se produit de 3 façons : la conjugaison (via un plasmide), la transformation (via du matériel génétique libre) et la transduction (via un bactériophage) (Figure 12) (48, 74). Dans la plupart des cas, les éléments génétiques mobiles sont responsables de l'amplification, du maintien et de la distribution des gènes de résistances dans une population bactérienne. Le plus connu de ces éléments est le plasmide qui est de l'ADN extrachromosomique qui n'est pas essentiel à la survie bactérienne, mais qui procure des avantages dans certains environnements néfastes (1). Cependant, il existe d'autres éléments génétiques mobiles comme des séquences d'insertion et des transposons qui sont de petites molécules d'ADN capables de se déplacer aléatoirement. Il existe d'autres éléments comme les intégrons qui utilisent des sites spécifiques pour se déplacer entre plusieurs de ces sites et insérer des cassettes de gènes de résistance. Il peut y avoir de nombreux éléments génétiques mobiles au sein d'une bactérie et celles-ci peuvent échanger le matériel avec d'autres bactéries facilitant l'acquisition et la distribution de la RAM (74).



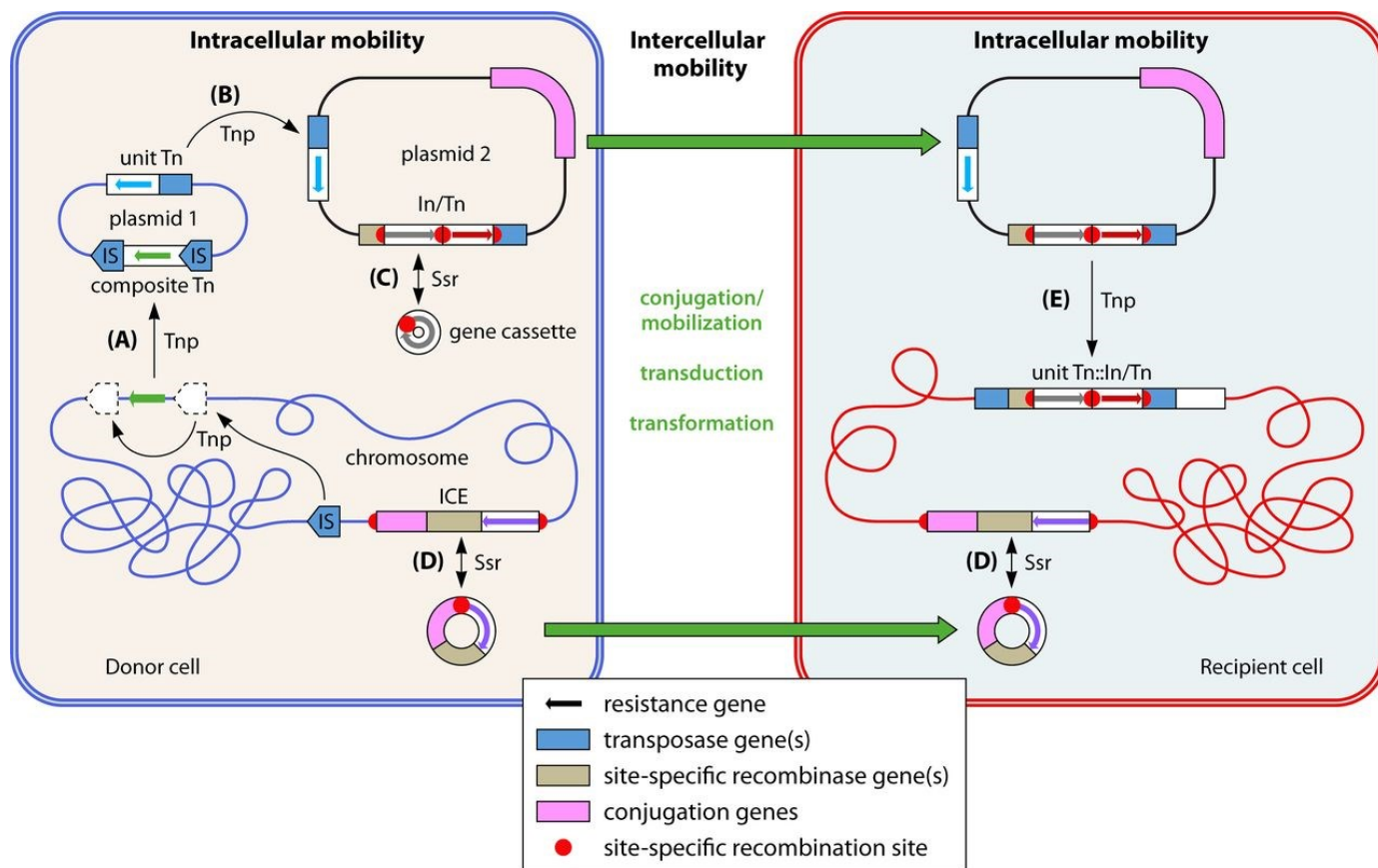
Nature Reviews | Microbiology

**Figure 12.** Transmission de la résistance aux antimicrobiens entre bactéries

Le transfert horizontal de gène de résistance s’effectue par : conjugaison entre une cellule donneuse et une cellule receveuse par un pili de conjugaison et un transfert de plasmide, transformation en acquérant du matériel génétique libre (ADN libre ou plasmide) d’une cellule morte ou transduction impliquant le transfert du matériel génétique par un bactériophage. Le transfert peut également être vertical entre la cellule mère et la cellule fille lors d’un transfert d’une mutation. Figure reproduite avec la permission de Springer Nature provenant de (48).

Le plasmide est un véhicule de transport qui peut accueillir plusieurs autres petits éléments génétiques mobiles et différents gènes de résistance aux antimicrobiens ou des gènes de virulence. En plus de pouvoir transmettre ce matériel génétique aux cellules filles lors de la division cellulaire, ce véhicule peut se déplacer vers d’autres bactéries pour transmettre les éléments qu’il contient (Figure 13). La taille des plasmides est variable entre quelques kilobases à plusieurs mégabases (75). Classiquement, un plasmide contient une origine de réplication (*ori*), mais utilise la machinerie de l’hôte pour faire sa réplication. Une cellule bactérienne contient un certain nombre de copies d’un plasmide. Classiquement, les

plasmides sont classifiés en groupe d'incompatibilité (Inc group). Les plasmides d'un même groupe ont une origine de réplication très similaire et ne peuvent pas coexister chez une bactérie puisqu'il est difficile de les distinguer et la bactérie ne peut pas garder un nombre de copies adéquats de ces plasmides (74). En plus de l'origine de réplication et des gènes qu'il contient, le plasmide conjugatif contient une machinerie complexe qui permet de faire un transfert horizontal de plasmide entre les bactéries. La taille d'un tel plasmide est beaucoup plus importante (74).



**Figure 13.** Éléments génétiques mobiles présents chez les bactéries

Les éléments génétiques présentés chez une bactérie donneuse (avec un contour bleu) vers une bactérie réceptrice (contour rouge). A) une transposase (Tnp) transfère un transposon (Tn) composite du chromosome vers le plasmide 1, B) transfert d'un transposon unitaire entre deux plasmides suivi d'une conjugaison du plasmide 2 vers la bactérie réceptrice, C) intégration d'une cassette dans un complexe intégron/transposon (In/Tn) du plasmide 2 par une recombinaise spécifique (Ssr), D) transfert d'éléments intégratifs constitutifs (ICE) chromosomaux entre bactéries, et E) intégration du matériel génétique transféré dans le chromosome bactérien. Image reproduite avec permission de American Society for Microbiology provenant de (74). L'autorisation de reproduction a été transmise par le Copyright Clearance Center, Inc.

Les séquences d'insertion (IS) sont de très petits éléments génétiques ne contenant qu'un (ou deux) gène transposase (*tnp*) entouré de séquences inversées répétées (IR). La seule fonction de ces séquences est de se déplacer (transposer) dans différents sites du génome bactérien. La transposition peut être conservative (couper-coller) ou répllicative (copier-coller) (74). Normalement, une séquence d'insertion ne contient pas d'autres gènes, mais si deux séquences d'insertion se retrouvent de part et d'autre d'un gène de résistance, cet ensemble (IS-gène de résistance-IS) est nommé transposon (Tn) composite et ce gène de résistance peut alors être déplacé (Figure 13). Un transposon unitaire est très semblable à une séquence d'insertion. Il contient un gène transposase (*tnp*), un gène passager (qui peut être un gène de résistance) et des séquences inversées répétées qui encadrent ces deux gènes. Le gène passager peut alors être déplacé par transposition (Figure 13). Il peut être difficile de distinguer adéquatement un transposon composite d'un transposon unitaire (74).

Une cassette génétique est un petit élément génétique mobile contenant un (ou deux) gène avec un site de recombinaison (*attC*). Ces cassettes peuvent être retrouvées sous forme circulaire (Figure 13), mais sont habituellement insérées dans un intégron. L'intégron (In) possède un gène de recombinase spécifique (*intI*), un site de recombinaison (*attI*) et un promoteur (*Pc*). Ainsi la recombinase spécifique catalyse la combinaison des sites de recombinaison de la cassette et de l'intégron (Figure 13). Le promoteur peut alors favoriser l'expression du gène de la cassette. Il existe plusieurs classes d'intégrons catégorisées selon la séquence de la recombinase (74).

Finalement, les éléments intégratifs constitutifs (ICE : integrated conjugative elements) sont capables de se transmettre entre bactéries par conjugaison et ils sont intégrés directement dans le chromosome bactérien (Figure 13). Ceux-ci sont constitués d'un gène ayant une fonction d'intégration et d'excision (semblable à un phage), un gène de conjugaison (semblable à un plasmide), un module de régulation et un ou plusieurs gènes accessoires (gènes de résistance) (74, 76).

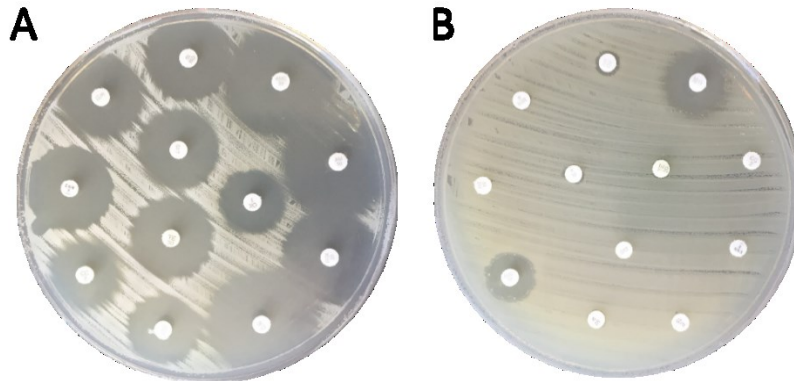
### 1.2.5. Méthodes pour tester la résistance aux antimicrobiens

Pour détecter la RAM chez une bactérie en laboratoire, il existe de nombreuses méthodes phénotypiques qui reposent sur l'interaction entre la bactérie et l'antimicrobien d'intérêt. De façon générale, la bactérie est mise en contact avec plusieurs concentrations d'un antimicrobien et la concentration minimale qui empêche la croissance de la bactérie est déterminée. Il existe deux méthodes principales : la diffusion et la dilution (1).

La méthode de diffusion comprend la diffusion en disque et la méthode de gradient. La méthode de diffusion en disque est la méthode la moins dispendieuse et la plus facilement réalisable dans un laboratoire de diagnostic. Un tapis bactérien d'une concentration standard est étendu uniformément sur une gélose. Par la suite, des disques de différents antimicrobiens avec des concentrations fixes sont appliqués sur la gélose. L'antimicrobien contenu dans un disque diffusera dans le milieu de culture de façon inversement proportionnel par rapport au centre du disque (plus un point est éloigné du disque, moins la concentration d'antimicrobien dans la gélose est élevée). Après un temps d'incubation, la distance entre le centre du disque et la croissance bactérienne est mesurée (Figure 14). Cette distance doit être interprétée et donne un résultat catégorique (sensible, intermédiaire ou résistante). La technique est standardisée et décrite dans un guide spécifique (77). Pour la méthode de gradient, il s'agit du même principe que la diffusion en disque, mais une bandelette contenant une concentration croissante d'antimicrobien est déposée sur la gélose. Il s'agit d'une mesure quantitative (concentration minimale inhibitrice : CMI).

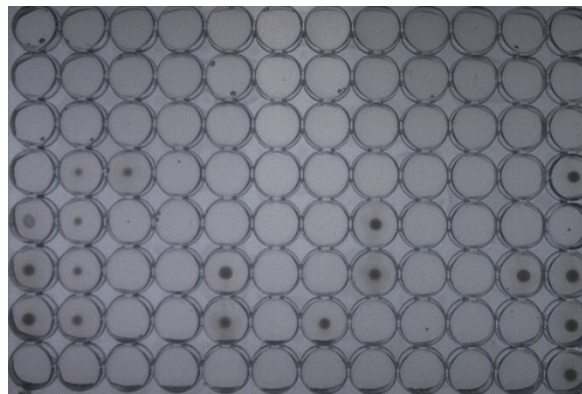
La méthode de dilution comprend la dilution en gélose, la macrodilution en bouillon et la microdilution en bouillon. Les milieux (solide ou liquide) sont préparés avec des concentrations doublées d'un certain antimicrobien. Les différents milieux sontensemencés avec une concentration standardisée d'une suspension bactérienne. Après incubation, la croissance bactérienne est visualisée pour déterminer la plus faible concentration capable d'inhiber la croissance de cette bactérie pour un antimicrobien précis. Il s'agit d'une mesure quantitative (CMI).





**Figure 14.** Méthode de diffusion en disque pour détecter la résistance de deux bactéries  
 La bactérie A a un profil sensible à tous les antimicrobiens testés puisqu'il y a une forte inhibition de la croissance pour une faible concentration d'antimicrobiens (le cercle d'inhibition de la croissance bactérienne est large autour des disques d'antimicrobiens). La bactérie B a un profil résistant puisqu'il n'y a pas ou peu de zone d'inhibition de croissance à un haut niveau de concentration.

La technique de microdilution en bouillon est souvent utilisée pour sa simplicité puisqu'il existe des plaques de 96 puits disponibles commercialement qui contiennent plusieurs concentrations de plusieurs antimicrobiens (Figure 15). Les coûts d'une plaque commerciale sont élevés, mais il n'est pas nécessaire de préparer et d'entreposer les plaques avant l'utilisation. De plus, les plaques sont automatisées et il est possible d'établir relativement facilement le profil de résistance phénotypique d'une bactérie pour plusieurs antimicrobiens avec cette technique.



**Figure 15.** Méthode de microdilution en bouillon pour détecter la résistance d'une bactérie  
 Microplaque commerciale de 96 puits contenant plusieurs antimicrobiens à plusieurs concentrations différentes. La croissance bactérienne correspond à un point dans l'un des puits. Les puits sans croissance sont des concentrations d'antimicrobiens ayant inhibé la croissance bactérienne.

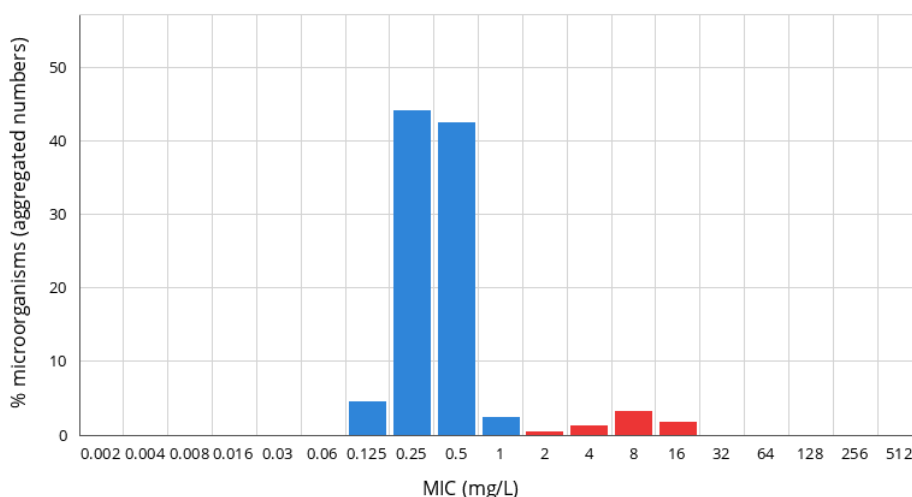
Les méthodes les plus souvent utilisées dans les laboratoires de recherche et de diagnostic sont la diffusion en disque, la microdilution en bouillon.

#### 1.2.5.1. Seuils d'interprétation

Les méthodes phénotypiques de détection de la RAM donnent une mesure (distance ou concentration minimale inhibitrice). Cependant, cette mesure ne permet pas, à elle seule, de déterminer si la bactérie est résistante. Il existe deux principales lignes directrices pour faire ces interprétations, celle du Clinical and Laboratory Standard Institutes (CLSI) et celle de l'European committee on antimicrobial susceptibility testing (EUCAST). En plus de décrire les techniques pour réaliser les antibiogrammes par la méthode de diffusion en gélose ou de dilution en bouillon, ces lignes directrices fournissent une charte d'interprétation clinique pour différentes bactéries envers plusieurs antimicrobiens. Il s'agit de seuils cliniques estimant la réponse au traitement antimicrobien d'un patient lors d'une infection bactérienne. Ce seuil est classiquement divisé en trois soit sensible, intermédiaire ou résistant. La sensibilité correspond à une efficacité clinique probable alors que la résistance correspond à une inefficacité clinique probable. Le seuil intermédiaire correspond à une zone grise entre la sensibilité et la résistance (77). Des études pharmacodynamiques et pharmacocinétiques pour chacun des antimicrobiens sont nécessaires pour réaliser ces seuils pour l'espèce animale et le site anatomique d'intérêt. Selon une posologie déterminée, la concentration d'un antimicrobien dans l'organe affecté est estimée et c'est cette concentration qui est utilisée pour déterminer le seuil efficace pour éliminer ou limiter la croissance de la bactérie problématique. Malheureusement, il existe de nombreuses limites pour ces seuils, particulièrement en médecine vétérinaire. Il y a plusieurs cas de figure où il manque de l'information dans l'un des aspects de la combinaison espèce animale/site/bactérie/antimicrobien et un seuil précis ne peut pas être établi. Dans ces cas, il s'agit d'une extrapolation à partir d'informations disponibles. Une autre limite est la prédiction d'un comportement *in vivo* à partir d'une observation *in vitro* qui ne tient pas compte de tous les aspects physiologiques de l'animal. Bref, les seuils cliniques sont disponibles et sont actuellement la meilleure option pour prédire

l'efficacité clinique d'un antimicrobien pour une certaine infection bactérienne, mais ils ont de nombreuses limites.

Un deuxième seuil d'interprétation est également utilisé pour définir la RAM pour les bactéries. Le seuil épidémiologique (epidemiological cut-off values ou ECOFF en anglais) distingue deux populations bactériennes (ou distinction entre deux courbes normales) soit la population sauvage et la population résistante (Figure 16). Il existe de nombreux seuils épidémiologiques pour de nombreuses combinaisons antimicrobien/microorganisme. Ces données sont disponibles sur le site de l'EUCAST (<https://mic.eucast.org/search/>). Ce seuil a son utilité au niveau épidémiologique afin de déterminer si la bactérie appartient à la population sauvage ou résistante. Cependant, celui-ci ne tient pas en compte l'aspect clinique (concentration possible d'un antimicrobien à son site d'action chez un patient).



**Figure 16.** Exemple d'un seuil épidémiologique pour *E. coli* envers le ceftiofur  
Exemple de graphique tiré du site web de l'EUCAST (<https://mic.eucast.org/search/>) démontrant la population sauvage (en bleu) de *E. coli* pour le ceftiofur et la population résistante (en rouge). Le seuil de 1mg/L est donc le seuil épidémiologique pour départager les deux populations de *E. coli*.

#### 1.2.5.2. Séquençage du génome entier

En plus des méthodes phénotypiques, il existe des méthodes génotypiques qui détectent les gènes associés à la RAM. Ils peuvent être détectés par PCR ou plus récemment par le séquençage du génome entier. Cette dernière méthode compare le génome de la bactérie à des bases de données publiques contenant des gènes de RAM (CARD (78), ARGannot (79), Resfinder (80)). Cette technique est complémentaire aux techniques classiques de détection de la RAM et il y a une bonne corrélation entre le phénotype et le génotype observé (81). L'avantage principal de cette technique est qu'elle ne se limite pas à la détection de gènes de résistance. Il est possible de détecter la présence d'éléments génétiques mobiles (82, 83), de facteurs de virulence (84) en plus de pouvoir comparer les génomes bactériens entre eux afin de déterminer si celles-ci sont clonales. Pour déterminer cette proximité, il est possible de faire une analyse de type cgMLST (core genome Multilocus sequence typing) (85) qui consiste à regarder un nombre fixe de gènes et de comparer les allèles de ces gènes entre eux. Il est également possible de faire une analyse de type SNP (single nucleotide polymorphism) qui consiste à comparer (après un nettoyage de toutes les séquences) chaque séquence bactérienne entre elles et de déterminer le nombre de nucléotides de différence (86). Malheureusement, la technique de séquençage du génome entier a quelques désavantages comme des discordances entre les gènes de résistance qui ne sont pas corrélés à de la résistance phénotypique. Inversement, une résistance phénotypique peut ne pas être expliquée par des gènes de résistances puisque ceux-ci doivent être connus et répertoriés pour pouvoir être détectés. De plus, bien que les coûts de séquençage du génome entier aient largement diminué au cours des dernières années, ceux-ci sont encore importants et ne sont pas accessibles à tous selon une perspective de santé globale. Bref, le séquençage du génome entier est très utile pour détecter la RAM et présente de nombreux avantages, mais il reste un complément à la méthode phénotypique classique.

### **1.3. Surveillance de la résistance aux antimicrobiens**

Les deux sections précédentes ont décrit les antimicrobiens, les mécanismes de résistance ainsi que les méthodes pour détecter ces résistances. Il y a un accent important sur les antimicrobiens de catégorie I homologués chez les bovins au Canada soit les céphalosporines de 3<sup>e</sup> génération et les fluoroquinolones. La présente section décrira le problème actuel de la RAM particulièrement pour les bovins laitiers. La section inclut une description des outils de surveillance, de la prévalence rapportée ainsi que certains facteurs de risque associés à l'excrétion de bactéries résistantes chez les bovins laitiers.

#### **1.3.1. Généralité**

La RAM est considérée comme un problème de santé publique mondial par l'OMS (87). À travers le monde, elle a des impacts majeurs pour les humains et les animaux associés aux échecs thérapeutiques. Pour combattre la RAM, l'OMS a établi un plan d'action global contenant 5 objectifs stratégiques afin de suivre et limiter l'augmentation de l'antibiorésistance (29). Ce même type de mesure a également été proposée dans un autre rapport (30). L'un de ces objectifs est de renforcer les connaissances et les bases factuelles par la surveillance et la recherche. La surveillance de la RAM est nécessaire au niveau mondial et de nombreux pays industrialisés ont mis en place des programmes nationaux au cours des 20 dernières années.

#### **1.3.2. Surveillance nationale pour les bovins laitiers**

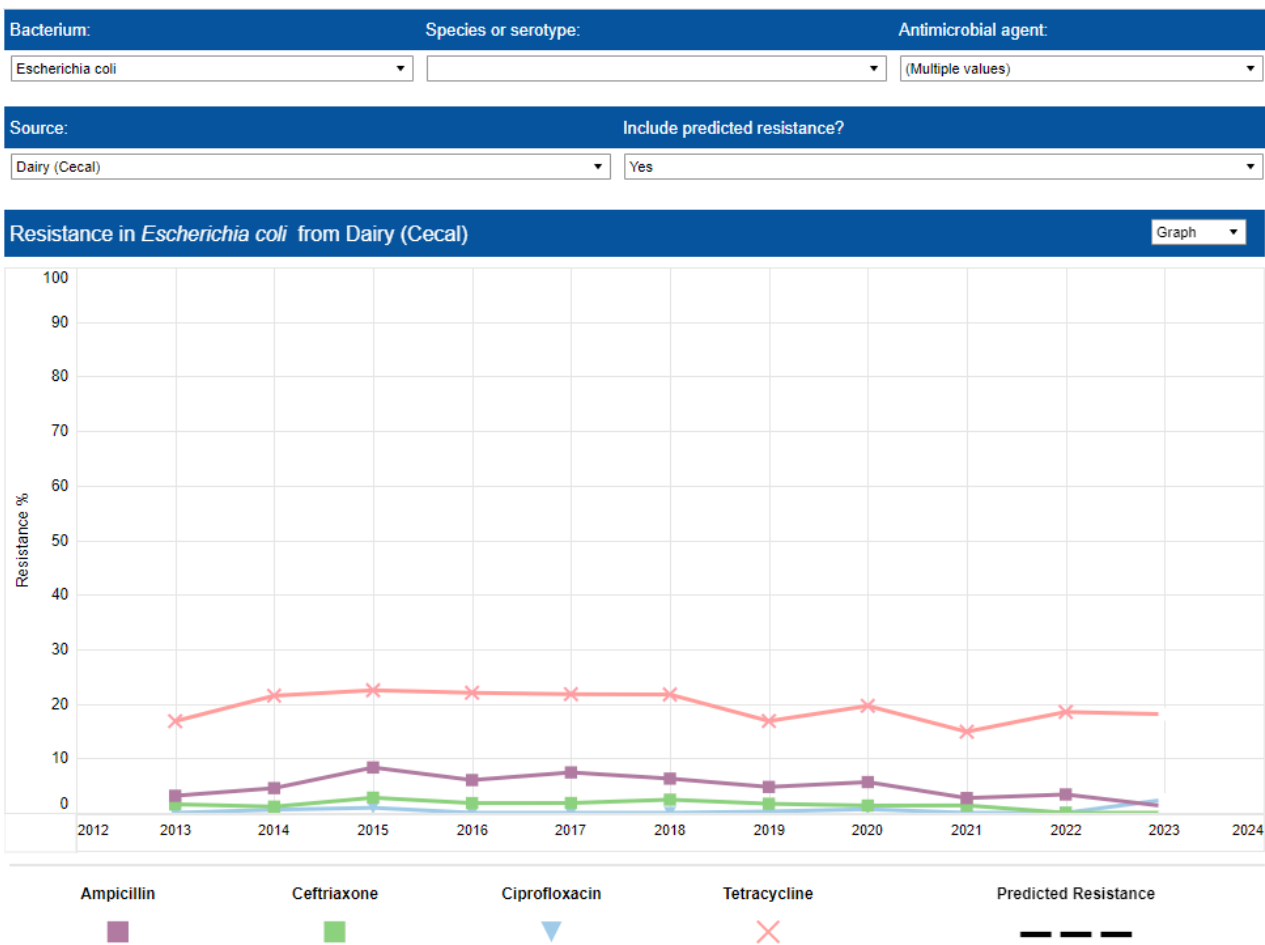
Les programmes nationaux de surveillances de la RAM publient annuellement des données pour de nombreuses bactéries isolées chez les humains et les animaux. Ces programmes ont été créés au Canada en 2002 (PICRA : Programme intégré Canadien de la Surveillance de la RAM (88)) et aux États-Unis en 1996 (NARMS : National Antimicrobial Resistance Monitoring System (37)). En Europe, il existe de nombreux programmes de surveillance spécifiques à chaque pays. Depuis 2013, l'Union européenne publie un rapport combiné de tous les pays membres (EUSR on AMR : European Union Summary Report on Antimicrobial Resistance (89)). Il existe d'autres programmes de surveillance, mais cette section se limitera aux trois

mentionnés plus haut. Ces programmes suivent la RAM dans la population humaine, la population animale et les aliments. Les bactéries ciblées sont des agents zoonotiques (*Salmonella* spp., *Campylobacter* spp.) ainsi que des bactéries commensales (*E. coli*) indicatrices de la RAM. Cependant, de nombreuses différences méthodologiques compliquent les comparaisons entre les données. Il y a une variation pour les antimicrobiens testés (antimicrobiens humains ou vétérinaires, homologation nord-américaine ou européenne), les animaux prélevés (bovin, bovins laitier, bovin de moins d'un an), les seuils utilisés (seuil clinique ou seuil épidémiologique), certaines techniques de sélection (utilisation d'un milieu pour détecter les *E. coli* producteurs de BLSE/AmpC) et la méthode de détection de la résistance (microdilution en bouillon ou séquençage du génome entier). Malheureusement, la pandémie mondiale de COVID-19 a également eu des impacts importants sur ces programmes dans les dernières années. Le PICRA mentionne une diminution de la collecte de données, du nombre d'isolats et des changements dans les régions échantillonnées (88). Le programme américain fut également affecté et mentionnait que les ressources utilisées en laboratoire ont été détournées pour lutter contre la pandémie (90). Bref, il est difficile de faire une comparaison entre les différents programmes de surveillances qui ont été fortement ébranlés par la pandémie de COVID-19. Les points saillants des différents programmes pour les bovins laitiers seront présentés dans les prochains paragraphes, mais sans les comparer.

Le plus récent rapport complet du PICRA est pour l'année 2019 (88). En plus du retard causé par la pandémie de COVID-19, le PICRA est en migration dans sa présentation des données annuelle. Il travaille vers un affichage interactif des données. Dans son dernier rapport, il n'y a pas de données spécifiques pour le secteur des bovins laitiers. Cependant, il est mentionné que suite à une collaboration avec le Canadian Dairy Network for Antimicrobial Stewardship and Resistance, de nouvelles données sur l'utilisation des antimicrobiens et de la RAM seront récoltées à la ferme afin de suivre l'évolution dans le temps pour le secteur des bovins laitiers. Normalement, cette implantation aurait commencé à partir de 2019. Malheureusement, il n'y a aucune donnée officielle concernant la RAM présentée par le PICRA jusqu'à maintenant pour le secteur des bovins laitiers. Par le passé, seules les données de bovins de boucherie ou de la

viande au détail étaient présentées dans les rapports et ne sont possiblement pas représentatives de la situation pour les bovins laitiers au Canada.

Le programme américain du NARMS présente des données interactives (Figure 17), commence à utiliser le séquençage du génome entier dans la surveillance en plus de distinguer les échantillons fécaux de bovins de boucherie des bovins laitiers depuis 2013. Les données interactives sont disponibles à l'adresse : <https://www.fda.gov/animal-veterinary/national-antimicrobial-resistance-monitoring-system/narms-now-integrated-data>. L'avantage principal de ce type de présentation est qu'il est disponible en temps réel et qu'il ne requiert pas la lecture de long rapport PDF, parfois exhaustif. Même si l'année de surveillance 2023 n'est pas terminée, les données sont déjà disponibles puisque celles-ci sont saisies au fur et à mesure dans le système. Pour les échantillons fécaux de bovins laitiers en 2023, la résistance de *E. coli* la plus élevée était pour la tétracycline (18%) suivie de la streptomycine (13%) (37). La résistance était nulle (0%) pour la ceftriaxone (céphalosporine de 3<sup>e</sup> génération) et faible (2%) pour le ciprofloxacine (fluoroquinolone). La résistance pour ces deux antimicrobiens de très hautes importances en santé humaine est toujours demeurée sous les 3% depuis le début de la surveillance pour ce secteur il y a 10 ans. Il n'y a pas de changement important au niveau temporel dans la prévalence de la RAM pour tous les antimicrobiens testés pour *E. coli*. Pour *Campylobacter*, les résistances les plus fréquentes étaient envers la tétracycline (66%) et le ciprofloxacine (32%). Pour *Salmonella*, la résistance observée était faible, peu importe l'antimicrobien évalué. La résistance la plus élevée était pour la tétracycline (6%). Le nombre d'isolats résistant à trois classes ou plus d'antimicrobiens a diminué d'environ 10% dans les années 2013-2015 à moins de 5% dans les trois dernières années. Ce seuil de résistance pour trois classes ou plus d'antimicrobiens est défini comme de la multirésistance (91). Ces bactéries multirésistantes peuvent être associées à une thérapie antimicrobienne inadéquate pour un patient. Le terme multirésistance est largement répandu dans la littérature et est particulièrement important pour la santé publique et l'épidémiologie (91).



**Figure 17.** Exemple de graphique interactif obtenu à partir du NARMS

Le graphique provient du programme américain de surveillance de la résistance aux antimicrobiens (NARMS). En haut de la figure sont les données qui peuvent être sélectionnées par l'utilisateur sur l'interface web (<https://www.fda.gov/animal-veterinary/national-antimicrobial-resistance-monitoring-system/narms-now-integrated-data>). Le graphique en bas est construit automatiquement selon la sélection choisie plus haut. Image provenant de (37).

Au niveau européen, le dernier rapport publié en 2023 correspond à des données obtenues en 2019 (89). Le secteur bovin, qui ne présente pas nécessairement que le secteur laitier, est représenté par un échantillonnage de bovins de moins d'un an. En plus de cette différence par rapport aux programmes nord-américains, les antimicrobiens testés ainsi que les seuils utilisés sont différents. La résistance la plus élevée pour les *E. coli* indicateurs était envers la tétracycline (38%) et la sulfaméthoxazole (30%). Pour les antimicrobiens de très haute importance en santé humaine, la résistance était faible (1%) pour le céfotaxime et la



ceftazidime (deux céphalosporines de 3<sup>e</sup> génération), nulle (0%) pour le méropénème (carbapénème) et moyenne (10%) pour la ciprofloxacine (fluoroquinolone). Ce programme réunit des données de 12 pays et il y a une variation importante entre ceux-ci. Par exemple, 94% des isolats étaient sensibles à tous les antimicrobiens testés pour la Norvège alors que 15 % l'étaient pour l'Italie. Un avantage important du programme européen par rapport aux programmes nord-américains est la recherche spécifique de *E. coli* producteur de BLSE/AmpC et de carbapénémases par un protocole spécifique. Ce type de recherche permet de détecter les *E. coli* résistants qui sont particulièrement inquiétants pour la santé publique. Pour les bovins de moins d'un an, les données de 2019 pour 9 pays montrent que 46% des matières fécales étaient positives pour le protocole sélectif de *E. coli* présomptif producteur de BLSE/AmpC. Il y avait également une très grande variation selon le pays. Le Danemark rapporte un faible nombre d'échantillons positifs (8%) alors que ce nombre est très élevé (100%) en Italie. Suite à la caractérisation des isolats, la très grande majorité (93%) possédait un profil ESBL comparativement à un profil AmpC (10%) (la somme est supérieure à 100%, car certains isolats avaient un profil ESBL et AmpC). Heureusement, il n'y avait aucune carbapénémase détectée dans aucun des pays surveillés dans ce rapport.

En résumé, la situation de la RAM est inconnue chez les bovins laitiers du Canada puisque le programme de surveillance ne couvre pas encore ce type d'élevage. La résistance observée chez les bovins laitiers américains est faible pour les antimicrobiens de très haute importance en santé humaine. Par contre, il n'y a pas de protocole sélectif pour la détection d'un type de résistance particulièrement inquiétante pour la santé publique, comme c'est le cas au niveau européen par la recherche spécifique de *E. coli* producteur de BLSE/AmpC. Ce type d'ajout serait intéressant à étudier au niveau nord-américain.

### 1.3.3. Situation chez les bovins laitiers au Québec

En plus du programme fédéral de surveillance, il existe un programme provincial au Québec coordonné par le Ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation du Québec (MAPAQ). Contrairement au programme fédéral, il s'agit d'un programme de surveillance passive qui se rapporte à une population animale malade possiblement traitée avec des

antimicrobiens et qui n'est donc pas représentative de la population générale (92). Tout comme les programmes fédéraux, la pandémie de COVID-19 a fortement affecté les données fournies dans ce rapport. Au cours de la dernière année, l'équipe du programme québécois d'antibiosurveillance vétérinaire travaillait à présenter le prochain rapport avec des données interactives disponible sur une interface web (j'étais personnellement impliqué dans cette équipe entre juillet 2022 et juin 2023). Celui-ci est maintenant disponible depuis novembre 2023 à l'adresse <https://www.quebec.ca/agriculture-environnement-et-ressources-naturelles/sante-animale/usage-antibiotiques/surveillance> dans l'onglet du rapport interactif. Les dernières données officiellement publiées dans ce rapport sont issues de l'année 2022 (93). Les données proviennent des laboratoires du MAPAQ en collaboration avec la faculté de médecine vétérinaire (FMV) de l'Université de Montréal ainsi que de l'Agence de la santé publique du Canada. Les laboratoires du MAPAQ ainsi que de la FMV sont des laboratoires de diagnostic vétérinaire recevant des échantillons d'animaux malades d'élevages québécois. Les résultats sont présentés pour le secteur bovin qui inclut majoritairement les bovins laitiers et les veaux lourds (veaux de lait et veaux de grain). Ce rapport interactif permet maintenant de distinguer les résultats de ces deux sous-secteurs. Pour les bovins laitiers (bovins laitiers adultes et bovins laitiers de remplacement), les isolats testés varient entre 16 à 35 selon la bactérie testée. Il faut être prudent avec l'interprétation des résultats puisqu'il n'est généralement pas recommandé de rapporter des données lorsque le nombre d'isolat est inférieur à 30. Les antimicrobiens testés sont ceux utilisés par les médecins vétérinaires praticiens afin d'orienter le traitement dans les fermes. Ces molécules vétérinaires sont parfois différentes des molécules humaines. Pour des isolats de *E. coli* pathogènes, la résistance la plus élevée était envers la tétracycline (56%), le sulfisoxazole (53%), le triméthoprime/sulfa. (44%) et l'ampicilline (50%). Pour les antimicrobiens de très haute importance en médecine humaine, la résistance était faible (9%) pour le ceftiofur (céphalosporine de 3<sup>e</sup> génération) et faible (3%) pour l'enrofloxacin (fluoroquinolone). Pour *Salmonella* spp., le nombre d'isolats surveillé est faible ( $n=16$ ). La résistance la plus importante était envers le sulfisoxazole (56%), la tétracycline (44%), l'ampicilline (37%) et le triméthoprime/sulfa. (37%). Pour les antimicrobiens de très haute importance en médecine humaine, la résistance était moyenne

(19%) pour le ceftiofur et nul (0%) pour l'enrofloxacin. De façon générale, la RAM pour les bactéries pathogènes respiratoires (*Histophilus somni*, *Mannheimia haemolytica* et *Pasteurella multocida*) était moindre. La RAM observée dans le rapport provincial est, de façon générale, plus importante que ce qui est observé dans le rapport fédéral. Cette observation est attendue puisque la source des bactéries suivies est différente entre les deux rapports.

Ce rapport provincial permet également de suivre la RAM pour les sérotypes de *Salmonella* spp. isolés chez les bovins. *Salmonella enterica* spp *enterica* sérotype Dublin (*Salmonella* Dublin) est particulièrement problématique pour l'industrie laitière. Puisque des infections ont été rapportées chez plusieurs espèces animales, ce sérotype n'est pas spécifique d'hôte, mais il est considéré comme adapté pour les bovins (31). Ce sérotype cause principalement une maladie chez les bovins, mais il est possible d'avoir un faible nombre d'infections chez d'autres espèces animales. La maladie est fréquemment systémique (31). La dissémination entre les troupeaux peut être fréquente et problématique si les mesures de biosécurité sont déficientes. Dans ces cas, cela peut causer une morbidité et une mortalité importante dans les troupeaux (94). Selon le dernier rapport provincial, la grande majorité (96%) des souches de *Salmonella* Dublin isolées entre 2014 et 2022 (n=197) étaient résistantes à au moins trois classes d'antimicrobiens. La résistance la plus importante était envers le sulfisoxazole (100%), la tétracycline (100%), le florfenicol (98%) et l'ampicilline (92%). Pour les antimicrobiens de très haute importance en médecine humaine, la résistance était de 88% pour le ceftiofur et de 31% pour l'enrofloxacin. Ces hauts niveaux de résistances pour *Salmonella* Dublin sont également décrits aux États-Unis (95), mais il existe peu d'information sur l'impact de cette RAM dans les troupeaux.

Ce programme provincial de surveillance a également une limite, soit l'absence de données de RAM dans l'environnement. La RAM est un problème global qui touche les humains, les animaux, mais également l'environnement (96). Ce dernier aspect est généralement négligé dans les programmes de surveillance, même si les fumiers des animaux de production constituent un risque important de propagation de microorganismes résistants dans l'environnement (97). Il y a un certain risque d'affecter l'homme puisque le fumier est

fréquemment utilisé pour fertiliser les champs. Lorsque le fumier des animaux est entreposé dans la fosse à fumier, la RAM des bactéries peut être influencée par les conditions environnementales, telles que les multiples cycles de congélation-décongélation (98). Malheureusement, il y a très peu de données dans la littérature actuelle concernant l'environnement des fermes laitières en relation avec la RAM.

Bref, bien que ce programme provincial de surveillance de la RAM permette d'avoir des données intéressantes au niveau du Québec, celles-ci ne sont pas représentatives de la situation réelle dans les fermes laitières du Québec. La RAM est actuellement inconnue sur les fermes laitières du Québec ainsi que dans l'environnement de celles-ci. De plus, la RAM associée à une bactérie pathogène adaptée à l'hôte bovin (*Salmonella* Dublin) est importante et demande davantage d'investigation.

#### 1.3.4. Facteurs de risque de la résistance aux antimicrobiens chez les bovins laitiers

Il est généralement accepté que la surutilisation des antimicrobiens est la cause principale du développement de la RAM chez les bactéries pathogènes (87). Malheureusement, l'apparition de résistance en médecine vétérinaire peut éventuellement se transmettre à l'homme par contacts directs avec les animaux, par l'environnement et par la chaîne alimentaire, comme le démontrent plusieurs cas de contagion qui ont déjà été rapportés (99, 100). Selon un rapport de 2016, une diminution de l'utilisation des antimicrobiens au niveau de l'agriculture aurait des impacts positifs selon une grande majorité (114 pour et 15 contre) de papiers scientifiques publiés (30). L'utilisation des antimicrobiens pour traiter les animaux de production a un impact sur la résistance observée chez l'humain, mais étant donné la complexité de la situation, il est impossible de quantifier cet impact (101). Un arrêt de l'utilisation des antimicrobiens en agriculture est impossible puisqu'il y aurait des problèmes importants au niveau de la quantité et de la qualité de la nourriture, des maladies zoonotiques ainsi que des problèmes de santé et de bien-être animal (102, 103). La diminution s'avère donc être une solution et une utilisation judicieuse des antimicrobiens chez les animaux de productions est essentielle pour limiter l'impact de l'antibiorésistance (101). L'utilisation des antimicrobiens est un facteur de risque plutôt large qui englobe toutes les espèces d'animaux de production,

incluant les bovins laitiers. Malheureusement, les études portant sur le lien précis entre l'utilisation des antimicrobiens et la RAM dans les fermes de bovins laitiers sont rares pour l'instant.

Certaines observations viennent nuancer le lien entre l'utilisation des antimicrobiens et la présence de RAM chez les bovins. Si nous appliquons à la lettre le principe qu'il y a un lien direct entre utilisation et la présence de RAM, un animal plus âgé (qui aurait reçu de multiples traitements antimicrobiens) aurait une plus grande proportion de bactéries résistantes par rapport à un animal nouveau-né (qui n'a jamais été exposé à des antimicrobiens) dans ses matières fécales. Étonnamment, c'est l'inverse de ce qui est observé, le jeune âge est un facteur de risque extrêmement important pour les bovins. Ce phénomène est bien décrit pour les bovins laitiers. Les veaux portent un niveau élevé de *E. coli* résistant dans leurs matières fécales par rapport aux animaux adultes (104). Plusieurs publications ont rapporté une augmentation du risque d'excrétion de bactéries résistantes pour les veaux en comparaison des animaux plus âgés sur les fermes laitières (104-108). D'après une revue de littérature, l'excrétion maximale de bactérie résistante serait autour de 2 semaines chez les veaux qui ne sont pas nourris avec du lait contenant des antimicrobiens (104). Il y a également certaines études (qui ne sont pas uniformes) qui montrent que cette excrétion serait influencée par un lait de remplacement supplémenté en antimicrobien ou par une utilisation du lait contenant des résidus médicamenteux pour l'alimentation des veaux (104, 107, 109). Par contre, l'excrétion fécale de bactéries résistantes n'augmenterait pas lorsque les veaux étaient nourris avec du lait de vache ayant reçu un traitement antimicrobien au tarissement (107, 110). La cause exacte d'une telle excrétion demeure inconnue. Par contre, une des hypothèses est que les veaux ont un système digestif immature en termes de diversité microbienne et que les *E. coli* résistants sont capables d'y compétitionner efficacement à cause d'un possible lien entre les gènes de résistance et certains gènes conférant un avantage sélectif dans les intestins néonataux. Au fur et à mesure que le microbiote intestinal se diversifie, les *E. coli* résistants perdent leurs avantages compétitifs et sont graduellement remplacés par d'autres bactéries dans le tractus digestif (111-114). En conséquence, les veaux sont colonisés rapidement après

la naissance par des *E. coli* multirésistants (115) et le jeune âge constitue un important facteur de risque pour l'excrétion fécale de *E. coli* résistant aux antimicrobiens.

Bref, le lien entre utilisation et présence de RAM est généralement accepté, mais la situation est bien plus complexe que cette simple association. Chez les bovins, l'âge est un facteur de risque très important. Malheureusement, il n'y a pas d'autres facteurs de risque aussi bien décrit qui pourrait entraîner une augmentation de l'excrétion de bactéries résistances chez les bovins laitiers.

## **Chapitre 2 – Hypothèses et Objectifs**

Comme stipulé dans le titre de cette thèse, l'antibiorésistance sur les fermes de bovins laitiers québécois est explorée selon 3 thèmes principaux soit la prévalence, la description (des gènes de résistance et de la transmission) et les facteurs de risque associés à cette RAM. Chacun de ces 3 thèmes est exploré dans un article scientifique basé sur une hypothèse spécifique associée à des objectifs. La RAM est étudiée pour les antimicrobiens homologués chez les bovins au Canada en plus d'inclure certains antimicrobiens d'importance au niveau de la santé publique. Il y a un accent important pour les antimicrobiens de catégorie I par Santé Canada soit les céphalosporines de 3<sup>e</sup> génération et les fluoroquinolones.

Hypothèse 1 : La prévalence de la RAM chez les *E. coli* fécaux est faible sur les fermes de bovins laitiers québécois et la RAM pour les antimicrobiens de catégorie I est très faible. Cependant, la RAM des *E. coli* provenant des veaux est plus importante que celles provenant des vaches en lactation ou de la fosse à fumier.

Les 2 objectifs spécifiques de cette hypothèse sont :

- a) Déterminer la prévalence de la RAM dans le fumier des veaux pré-sevrage, des vaches en lactation et de la fosse à fumier en utilisant la bactérie *E. coli*.
- b) Déterminer la prévalence de *E. coli* producteur de BLSE/AmpC (associé à de la résistance pour les céphalosporines de 3<sup>e</sup> génération) avec un protocole spécifique dans ces mêmes échantillons fécaux.



Hypothèse 2 : Des gènes de résistance expliquent la résistance phénotypique observée pour les *E. coli* fécaux. Ces gènes sont proches les uns des autres en plus d'être à proximité des éléments génétiques mobiles dans le génome bactérien. De plus, il y a une transmission clonale de ces bactéries résistantes entre les fermes.

Les 3 objectifs spécifiques de cette hypothèse sont :

- a) Déterminer le profil complet de gènes de résistance pour les *E. coli* les plus résistants (résistance multiple ou résistance à une céphalosporine de 3e génération ou à une fluoroquinolone).
- b) Déterminer la proximité entre ces gènes de résistance et entre des éléments génétiques mobiles.
- c) Déterminer s'il y a une transmission clonale de *E. coli* résistant entre les fermes.

Hypothèse 3 : La quantité d'antimicrobien utilisé sur la ferme, certains facteurs associés à la gestion de la ferme et la présence de *Salmonella* Dublin influencent positivement la RAM retrouvée chez les *E. coli* fécaux des animaux sur les fermes laitières.

L'objectif spécifique de cette hypothèse est :

- a) Décrire, avec des analyses univariées classiques et des analyses multivariées utilisant l'intelligence artificielle, les facteurs de risque associés à la RAM dans les fermes québécoises de bovins laitiers. Les facteurs de risque étudiés sont les pratiques de gestion de la ferme (rapportées par les producteurs dans un questionnaire), l'utilisation des antimicrobiens (obtenue par les factures des médecins vétérinaires) et la présence de *Salmonella* Dublin (obtenue par un test sérologique).

**Chapitre 3 – Prévalence de la résistance aux antimicrobiens  
(article 1)**

# Prevalence of antimicrobial resistance and characteristics of *Escherichia coli* isolates from fecal and manure pit samples on dairy farms in the province of Québec, Canada

Jonathan Massé<sup>1,2,3\*</sup>, Hélène Lardé<sup>1,3</sup>, John M. Fairbrother<sup>2,3</sup>, Jean-Philippe Roy<sup>1,4</sup>, David Francoz<sup>1,4</sup>, Simon Dufour<sup>1,3</sup>, and Marie Archambault<sup>1,2,3</sup>

Affiliations:

<sup>1</sup> Regroupement FRQNT Op+lait, Saint-Hyacinthe, QC, Canada

<sup>2</sup> Groupe de Recherche sur les maladies infectieuses en production animale (GREMIP), Saint-Hyacinthe, QC, Canada

<sup>3</sup> Department of Pathology and Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, Université de Montréal, Saint-Hyacinthe, QC, Canada

<sup>4</sup> Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Université de Montréal, Saint-Hyacinthe, QC, Canada

\*Correspondance: Jonathan Massé, jonathan.masse.1@umontreal.ca

Mots-clés: antimicrobial resistance, *Escherichia coli*, ESBL/AmpC, dairy cattle, calf, fecal, manure pit

Article publié dans la revue *Frontiers in Veterinary Science* en mai 2021

(<https://doi.org/10.3389/fvets.2021.654125>)

Contribution de Jonathan Massé à cet article :

JM a participé au recrutement des fermes, à la coordination et à la collection des échantillons. JM a également préparé les protocoles de laboratoires en plus de faire la majorité des expérimentations. JM a fait l'analyse et l'interprétation des données en plus d'écrire la première version, fait la correction et révisé la version publiée de l'article.

### 3.1. Abstract

Antimicrobial resistance (AMR) is an important burden for public health and veterinary medicine. For Québec (Canada) dairy farms, the prevalence of AMR is mostly described using passive surveillance, which may be misleading. In addition, the presence of extended spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL)/AmpC producing *Escherichia coli* is unknown. This observational cross-sectional study used random dairy farms ( $n = 101$ ) to investigate AMR and extended spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL)/AmpC producing *Escherichia coli*. Twenty antimicrobials were tested on *E. coli* isolates ( $n = 593$ ) recovered from fecal samples ( $n = 599$ ) from calves, cows, and the manure pit. Isolates were mostly susceptible (3% AMR or less) to the highest priority critically important antimicrobials in humans. The highest levels of AMR were to tetracycline (26%), sulfisoxazole (23%) and streptomycin (19%). The resistance genes responsible for these resistances were, respectively: *tet(A)*, *tet(B)*, *sul1*, *sul2*, *sul3*, *aph(3'')-Ib (strA)*, *aph(6)-Id (strB)*, *aadA1*, *aadA2*, and *aadA5*. ESBL analysis revealed two predominant phenotypes: AmpC (51%) and ESBL (46%) where *bla<sub>CMY-2</sub>* and *bla<sub>CTX-M</sub>* (*bla<sub>CTX-M-1</sub>*, *bla<sub>CTX-M-15</sub>*, and *bla<sub>CTX-M-55</sub>*) were the genes responsible for these phenotypes, respectively. During this study, 85% of farms had at least one ESBL/AmpC producing *E. coli*. Isolates from calves were more frequently resistant than those from cows or manure pits. Although prevalence of AMR was low for critically important antimicrobials, there was a high prevalence of ESBL/AmpC-producing *E. coli* on Quebec dairy farms, particularly in calves. Those data will help determine a baseline for AMR to evaluate impact of initiatives aimed at reducing AMR.

## 3.2. Introduction

Antimicrobial resistance (AMR) is an important public health concern (87, 116). Indeed, around the world, AMR has major financial and health implications for humans, animals and the environment. According to an OIE report, this burden will dramatically increase the number of human deaths in the future (30). A multitude of national programs now ensures surveillance of AMR data for several bacterial species in humans and animals and publishes their reports annually (e.g.: Canada (CIPARS), USA (NARMS), Denmark (DANMAP)). However, some surveillance programs are incomplete as data originated from slaughterhouses or diagnostic laboratories and may not accurately reflect the real on farm conditions. The present AMR situation in dairy farms is currently unknown in Canada, including in the province of Québec.

To investigate AMR in healthy animals, commensal bacteria, such as *Escherichia coli*, is globally used as an indicator to estimate AMR in livestock (117). In addition, in dairy animals, the age of the animal has been reported as an important determinant of AMR carriage. Calves can carry higher levels of AMR in fecal *E. coli* isolates compared to older animals (104). Furthermore, feces from animals is an important hazard for spread of resistant organisms in the environment (97) and eventually to humans, as manure is used to fertilize crops. The composition of the population of *E. coli* isolates found in feces may be affected by the animal's living conditions such as geographic region or purpose (dairy or beef) (107, 118) and by the antimicrobial treatments it has received (107, 119). However, when manure is commingled in the manure pit, the AMR profiles of the indicator *E. coli* may be further influenced by environmental conditions such as multiple freeze-thaw cycles (98). Consequently, it would be useful to test the manure pit to investigate this possibility.

Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL)/AmpC-producing *Enterobacteriaceae* are a growing public health concern in veterinary medicine (120). The World Health Organization has recently published a global priority pathogens list to focus attention on the most significantly resistant pathogens. ESBL-producing *Enterobacteriaceae* are included within the critical category of this list (121). ESBL/AmpC *Enterobacteriaceae* are resistant to penicillin, second-

and third-generation cephalosporins, and monobactams (122). ESBL are associated with resistance to fourth-generation cephalosporins, although  $\beta$ -lactamase inhibitors usually neutralize their activity. AmpC are associated with susceptibility to fourth-generation cephalosporins, but with resistance to cephamycins and  $\beta$ -lactamase inhibitors (122). Despite their public health importance, fecal carriage of ESBL/AmpC is not well described in dairy animals in Canada.

The objective of this paper was, therefore, to investigate the prevalence of AMR and of ESBL/AmpC in *E. coli* isolated from fecal samples in calves, cows, and from the manure pits on Québec dairy farms.

### **3.3. Materials and methods**

#### Selection of herds and sample collection

The current study was an observational cross-sectional study on commercial dairy farms. The research protocol was approved prior to initiating the research by the Animal Use Ethics Committee of the Université de Montréal (Protocol 16-Rech-1859). The complete protocol describing sample size calculation, exclusion criteria, recruitment of participants, and method used to avoid selection bias is available elsewhere (15). Briefly, dairy farms from a random list of dairies in three regions of Québec province were solicited for participation by telephone between January and March 2017. Participation was on a voluntary basis. Basic demographic information was obtained from producers refusing to participate to quantify any selection bias. Given that some producers may decide to leave the study during the study period, we aimed at recruiting 102 farms (*vs.* our sample size estimate of 100 farms). We use a stratified random sampling to achieve a proportion of herds similar to the source population: 45 (45%) herds in the Montérégie region, 35 (34%) herds in the Centre-du-Québec region and 22 (21%) herds in the Estrie region.

Following recruitment, two sampling visits were made, firstly between April and June 2017 and secondly between October and November 2017. On each visit, three composite fecal samples were collected from: five randomly chosen pre-weaned calves; five randomly chosen lactating

cows; and two convenient locations in the manure pit. The total number of calves and lactating cows was recorded upon arrival and a random number generator was used to select five animals in each group for sample collection. If fewer than five pre-weaned calves were present on the farm, all available pre-weaned calves were sampled. Fecal samples were collected directly from the rectum of each individual animal. If the manure pit was inaccessible, the last indoor point before the manure pit or the conveyer was used. For each of these three composite samples, approximately 25 g of composite feces or manure was placed in a 50 mL sterile tube and stored immediately on ice at the farm. Samples were processed in the laboratory within less than 24 hours. A preservative medium (peptone water with 30% glycerol) was added to feces at a 1:1 volume-to-weight ratio; samples were then homogenized and frozen at -70°C.

#### Bacterial isolation

One gram of thawed composite fecal samples was mixed in 9 mL of phosphate buffer saline. A volume as determined by previous standardization in our laboratory, (1uL for calves, 10uL for cows and 100 uL for manure pits) was spread on MacConkey agar (Oxoid, Canada) then incubated overnight at 37°C. One lactose positive colony was subcultured on Columbia agar with 5% sheep blood (Oxoid, Canada), and then incubated overnight at 37°C. The identification of isolates as *E. coli* was confirmed by MALDI-TOF MS using a Microflex LT instrument and the reference spectra database from Bruker containing 7311 spectra (Bruker Daltonics, Germany).

#### Antimicrobial Susceptibility Testing

The minimum inhibitory concentrations (MIC) for 20 antimicrobials (Table 5) representing 11 classes of antimicrobials were determined with the broth microdilution method using commercially available panels (Sensititre CMV4AGNF and BOPO6F) (Thermo Fisher scientific, Canada) following manufacturer recommendations in accordance with CLSI. Isolates were defined as susceptible, intermediate, or resistant according to CLSI M100 (77) (*Enterobacteriaceae*: amoxicillin/clavulanate, azithromycin, ampicillin, cefoxitin, ceftriaxone,

chloramphenicol, ciprofloxacin, gentamicin, meropenem, nalidixic acid, sulfisoxazole, tetracycline and trimethoprim/sulfamethoxazole), CLSI VET08 (123) (ceftiofur, danofloxacin, enrofloxacin and spectinomycin), or CIPARS (124) (streptomycin) clinical breakpoints. A MIC breakpoint was not available for neomycin, thus the epidemiological cut-off value from European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) was used (MIC  $\geq 16 \mu\text{g mL}^{-1}$  was defined as resistant). There was no valid florfenicol clinical breakpoint for *Enterobacteriaceae* and the tested concentrations ( $0.25 - 4 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) did not include the European epidemiological cut-off of  $16 \mu\text{g mL}^{-1}$ , therefore no interpretation was attempted. For subsequent analyses, intermediate and resistant isolates were grouped together and labelled as resistant. Multidrug resistance (MDR) was defined as acquired resistance to at least one agent in three or more antimicrobial classes (91). *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 were used as reference strains for batch controls. *Escherichia coli* ATCC 25922 was used as a daily control.

#### Isolation of presumptive ESBL/AmpC-producing *E. coli* and phenotypic confirmation

Fecal samples were processed according to the laboratory protocol of the European Union Reference Laboratory on Antimicrobial Resistance which allow the isolation of ESBL-, AmpC- and carbapenemase-producing *E. coli* from fecal samples after a discussion with this laboratory. The protocol is available online at <https://www.eurl-ar.eu/protocols.aspx>. Briefly, 1 g of feces or manure was added to 9 mL of Buffered Peptone Water, then incubated at  $37^\circ\text{C}$  for 20h. One loop ( $10 \mu\text{l}$ ) was streaked onto a MacConkey agar plate containing  $1 \text{ mg mL}^{-1}$  of cefotaxim, then incubated at  $44^\circ\text{C}$  for 20h. Lactose positive colonies were subcultured on Columbia agar with 5% sheep blood, and then incubated overnight at  $37^\circ\text{C}$ . Identification of *E. coli* was confirmed by MALDI-TOF MS. Samples with at least one *E. coli* colony isolated with this technique were labelled as presumptive ESBL/AmpC *E. coli*. Isolate 2005-60-10-96-1 (MIC cefotaxim:  $2 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) and isolate OXA-30 (MIC cefotaxim:  $0.5 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) were used as positive and negative controls, respectively. Secondly, ESBL production was confirmed according to the Clinical Laboratory Standard Institute (CLSI) protocol disk diffusion tests for ESBL in *E. coli*



because this technique is the gold standard assay of the CLSI (123). In addition, ceftiofur and meropenem disks were added to investigate AmpC  $\beta$ -lactamase and meropenemase production. The phenotype assignments (definitions shown in Figure 18) were defined according to EUCAST (125) and CLSI cut-offs (123). *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 and *E. coli* ATCC 25922 were used as positive and negative controls, respectively.

### Antimicrobial Genotyping

Whole genome sequencing (WGS) was used on a subset of isolates ( $n=16$ ) to determine the genetic basis of the observed AMR. Isolates resistant to nine or more antimicrobials classes (aminoglycosides and aminocyclitols were considered two different classes for this selection) ( $n=8$ ) were selected. Furthermore, isolates identified as harboring an ESBL ( $n=4$ ) or an AmpC ( $n=4$ ) phenotype were randomly selected. Briefly, genomic DNA was extracted using QIAamp DNA Mini Kit for DNA following manufacturer's guidelines (Qiagen, Hilden, Germany). We performed WGS on the Illumina (San Diego, CA) MiSeq platform with  $2 \times 300$  paired-end runs after library preparation with the Illumina Nex-tera XT DNA Library preparation kit, according to the manufacturer's instructions. Galaxy (<https://usegalaxy.org/>) (126) platform was used for in-silico analysis, assembled genomes were obtained using SPADES software (Galaxy Version 3.12.0+galaxy1) (127) and assembly quality was evaluated with Quast (Galaxy Version 5.0.2+galaxy1) (128). An assembly was rejected if the number of contigs was  $> 410$ , if the N50 was  $< 40000$  or if the number of contigs were between 300 and 400 and the N50  $< 50000$ . To search AMR genes and point mutations, ResFinder 4.0 (80) and PointFinder (129) bioinformatics tools were used from the Center of Genomic Epidemiology (CGE) platform (<http://www.genomicepidemiology.org/>).

### Statistical Analyses

For all statistical analyses, the unit of analysis was the sample obtained from a given source (calves, cows, or manure pit), time (autumn or spring visit), and herd. These samples were represented by one *E. coli* isolate.

### Effect of Sample Origin on Prevalence of Resistant Isolates

We investigated whether probability of resistance to a given antimicrobial differed between isolates obtained from pre-weaned calves, cows, or the manure pit. To achieve this, results from up to two *E. coli* isolates (one of the autumn and one of the spring visit) were available for each sample type (calves, cows, manure pits) and for each herd. For this analysis, we used a logistic regression model with susceptibility vs. resistance to a given antimicrobial as outcome variable, sample type as sole fixed predictor, and estimated using robust variance to account for clustering of isolates by herd (SAS, PROC GENMOD. Cary, NC, US). Whenever this model could not converge, a Fisher exact test was used, thus ignoring clustering of observations. Tukey-Kramer adjustment was used to adjust for multiple comparisons. An alpha of 0.05 was chosen to define statistically significant results.

### Effect of Sample Origin and Season on Number of Antimicrobials to which an Isolate was resistant

A generalized linear mixed model (SAS, PROC GLIMMIX, Cary, NC, US) was used to investigate whether the origin of the samples (calves, cows, or manure pit) or the season (autumn or spring) could influence the number of antimicrobials to which an isolate was resistant. In this model, a Poisson distribution with a log link was used. The outcome was the number of antimicrobial classes to which an isolate was defined as resistant (0, 1, 2, 3, ...). The predictor was either the origin of the samples (calves, cows, or manure pits) or the season (autumn or spring) and a random herd intercept was included to account for clustering of isolates by herd. A Tukey-Kramer test was applied to adjust for multiple comparisons and an alpha of 0.05 was used.

### Recovery of Presumptive ESBL/AmpC-producing *E. coli*

A generalized linear mixed model with a logit link was used to investigate probability of recovery of an ESBL/AmpC isolate. In the first model, the outcome was recovery or not of an ESBL/AmpC isolate in a given sample, and we accounted for clustering of observations by visit and herd by including random visit and random herd intercepts, respectively. In this first

model, however, we did not include any fixed predictors (i.e., a null model). The variance estimates obtained from this model were used to partition the outcome's variance using the simulation method described previously (130). This allowed for reporting the proportion of the risk of observing an ESBL/AmpC isolate that was due to sample', visit', or herd's characteristics. This model was then used to estimate the effect of sample source and of season on probability of recovery of an ESBL/AmpC isolate, simply by including these predictors in the model one at a time.

Finally, we investigated whether the recovery of an ESBL/AmpC isolate was associated with the number of antimicrobial resistances observed in this isolate. The Poisson generalized mixed model described in the preceding section was used with recovery of an ESBL/AmpC isolate (yes or no) as sole fixed predictor and number of resistances as outcome. A Tukey-Kramer test was applied for all analyses to adjust for multiple comparisons and an alpha of 0.05 was used.

### **3.4. Results**

#### Sample collection

We recruited 102 dairy farms. Only one farm left the study early after the first sampling visit and was excluded from our analyses. Four and three farms had no pre-weaned calves present on site at the first and second visits, respectively. On the first visit, we sampled 325 pre-weaned calves (average: 29 days old, range: 1 to 150), and 505 lactating cows (average : 2.6 lactations, range: 1 to 9). On the second visit, we sampled 395 pre-weaned calves (average : 27 days old, range: 1 to 100) and 505 lactating cows (average : 2.7 lactations, range: 1 - 10). Manure pits were emptied approximately 7 and 3 months before the first and second visits, respectively. In Québec province, manure pits are generally emptied at the beginning of autumn (October) and spring (May). Hence, the majority of manure pits were full on the first visit (spring) and nearly empty on the second visit (autumn). Among the 599 fecal composite samples obtained, we recovered 593 *E. coli* isolates as six samples from manure pits did not yield any lactose positive colonies.

## Antimicrobial Resistance Prevalence, Phenotypes and Predominant AMR genes

All isolates were susceptible to meropenem and ciprofloxacin (Table 5), which are of critical importance in human medicine (131). Most isolates (70%; 414/593) were susceptible to all antimicrobials tested (Table 6). A low level of AMR ( $\leq 3\%$ ) was observed to highest priority critically important antimicrobials (ceftriaxone, ceftiofur, danofloxacin, enrofloxacin, ciprofloxacin, nalidixic acid, and azithromycin). The highest levels of resistance were to tetracycline (26%), sulfisoxazole (23%), and streptomycin (19%). These highest levels of resistance were also observed at the farm level (Figure 19). The most prevalent resistance patterns were: tetracycline alone (4%), tetracycline-streptomycin-sulfisoxazole (3%), and chloramphenicol-tetracycline-streptomycin-sulfisoxazole (2%) (Table 6). Twenty-two isolates were resistant to six or more antimicrobial classes and were observed in 19 different patterns (Table 6). The resistance genes responsible for the highest levels of AMR towards tetracycline, sulfisoxazole, and streptomycin were, respectively: *tet(A)*, *tet(B)*, *sul1*, *sul2*, *sul3*, *aph(3'')-Ib (strA)*, *aph(6)-Id (strB)*, *aadA1*, *aadA2*, and *aadA5* (Table 7). The sequences have been submitted to NCBI and the bioproject ID is PRJNA716674.

## Prevalence Distribution of Resistant Isolates

The proportion of resistant isolates from calves exceeded 30% for several antimicrobials whereas it never reached 15% for any of the isolates from cows or manure pits (Figure 20). This difference between calves' isolates and those from other origin was statistically significant ( $p < 0.05$ ) for 13 of the tested antimicrobials (amoxicillin/clavulanate, azithromycin, ampicillin, cefoxitin, ceftiofur, ceftriaxone, chloramphenicol, neomycin, spectinomycin, streptomycin, sulfisoxazole, tetracycline and trimethoprim/sulfamethoxazole). There were no significant differences in proportion of resistant isolates between cow and manure pit isolates for all antimicrobials tested.

## Multidrug Resistance

The majority of isolates from cows (84%) and manure pits (84%) were susceptible to all antimicrobials tested (Figure 21). Prevalence of MDR *E. coli* was low for cows (8%) and manure

pits (8%). However, approximately half (51%) of the *E. coli* isolates from calves were MDR with 8% being resistant to seven or more antimicrobial classes. One *E. coli* isolate from a calf was resistant to 9 classes of antimicrobials out of 11 tested and was considered extensively drug-resistant (91). It was only susceptible to quinolones and carbapenems. Sample types (calves, cows, manure pit) were significantly associated with number of antimicrobial classes for which resistance was observed ( $p < 0.01$ ). Isolates from calves were resistant to 6.1 (95% CI 4.7-8.0) and 6.2 (95% CI 4.7–8.1) times more antimicrobial classes than isolates from cows and manure pits, respectively. Prevalence of MDR *E. coli* was high at the farm level (82%). There was no statistical difference in the number of resistances between isolates obtained during the autumn and spring sampling seasons.

#### ESBL/AmpC Phenotypes and Genotypes

Most ESBL/AmpC-producing *E. coli* were isolated from calf samples (Table 8). Overall, 85% (86/101) of farms were positive for ESBL/AmpC-producing *E. coli* in at least one sample during the study. The probability of retrieving a positive ESBL/AmpC phenotype within a sample was mainly influenced by the visit (47%), then the herd (33%), and, finally, by sample characteristics, such as its origin (20%), as determined by variance partitioning of the null model. Odds of retrieving an ESBL/AmpC-producing *E. coli* from calves were 16.9 (95% CI 7.5-38.1) and 10.1 (95% CI 4.8- 21.2) times greater compared to cows and manure pits samples, respectively. Also, the recovery percentage of ESBL/AmpC-producing *E. coli* was statistically higher during the autumn season than in spring (1.9 times higher odds; 95% CI 1.3-2.8). There was no difference between the ESBL and AmpC phenotypes for each sampling season and origin of the sample (Figure 22). Commensal *E. coli* from samples that were positive for ESBL/AmpC had 3.0 (95% CI 2.5-3.5) times greater odds of carrying AMR than those that were negative for ESBL/AmpC. ESBL confirmation revealed four phenotypes: AmpC, ESBL, ESBL/AmpC, and other, in proportions of 51%, 46%, 2%, and 1%; respectively. In total, 4 ESBL and 4 AmpC-producing *E. coli* isolates were sequenced using WGS to identify the genes responsible for this resistance. The *bla*<sub>CTX-M</sub> gene was identified for the ESBL phenotype with the variants *bla*<sub>CTX-M-1</sub> ( $n=1$ ), *bla*<sub>CTX-M-15</sub> ( $n=1$ ), and *bla*<sub>CTX-M-55</sub> ( $n=2$ ) (Figure 23). The resistance

gene *bla*<sub>CMY-2</sub> and a mutation in the promoter *ampC* (-42 C->T) known to cause increase in *ampC* expression (132) were both identified with regard to the AmpC phenotype (Figure 23).

### 3.5. Discussion

The overall prevalence of *E. coli* AMR in this study was lower than in a report of the Canadian Integrated Program for Antimicrobial Resistance Surveillance (CIPARS) where 58% of isolates from beef cattle in slaughterhouses were susceptible to all antimicrobials tested (124). The most common resistances observed in CIPARS were toward tetracycline (36%), followed by sulfonamides (18%) and streptomycin (18%). In this latter report, prevalences were twice as high as those reported in our study for lactating cows and could mostly be explained by difference in source population (dairy cattle versus beef cattle). Dairy farms located in Pennsylvania, USA, also observed a higher level of resistance toward tetracycline (93%), sulfonamide (56%) and streptomycin (53%) for fecal *E. coli* (108). However, it is difficult to compare prevalences because these authors used a preliminary screening step with antimicrobial-based selective medium before testing their *E. coli*. Interestingly, *E. coli* isolated from clinical mastitis in Canadian dairy farms (133) harboured similar AMR patterns and prevalence to those of cow fecal isolates in our study. The only difference was for the  $\beta$ -lactam antimicrobials that demonstrated higher levels of resistance in this latter study compared to those observed in our study. The majority of antimicrobial treatments (7 out of 8) approved for intramammary gland usage in Canada contain  $\beta$ -lactams and this likely explains the difference between results. Interestingly, we previously reported (15) that predominant antibiotic use was associated with penicillins, aminoglycosides, and polymyxins. This is partly related to the most observed resistance phenotypes in this study for streptomycin (an aminoglycoside). However, the highest level of resistance we observed toward tetracycline and sulfonamides were not associated with a high utilisation of these antimicrobials. This could be partly explained because the antibiotics used most often on Quebec farms are intramammary (15). In addition, some mobile genetic elements present in *E. coli* were shown to allow the maintenance of resistance without the selection pressure by the antibiotic. This

has been reported for sulfonamides genes, such as *sul1* gene which is normally found linked to other resistance genes in class 1 integrons, whereas *sul2* is usually located on small nonconjugative plasmids (43) or large transmissible multiresistance plasmids (134). Further analyses are required to demonstrate a clear correlation between antimicrobial usage and antimicrobial resistance. As for AMR genes, similar results were obtained by Tyson et al. (81) who reported a high prevalence for *strA/strB*, *sul2* and *tet(A)* for cattle in the USA.

We found that the prevalence of AMR is highly dependent on origin of samples (cow, calf, or manure pit); the *E. coli* from dairy calves in our study carried proportionally higher levels of AMR. This is consistent with the current literature. Many reports have indicated an association between pre-weaned calves and increased risk of fecal shedding of resistant bacteria, compared to older animals on dairy farms (104-108). According to a review, the maximal prevalence of AMR carriage was around 2 weeks of age in calves not fed with any antimicrobial-containing milk replacer (104). Evidence, although reported as less consistent, of an impact of antimicrobial treatment via milk replacer feeding and feeding unsalable or waste milk on the presence of AMR bacteria was reported (104, 107, 109). However, fecal shedding of resistant bacteria did not increase when calves were fed colostrum from cows that received treatment at drying off (107, 110). The design of the current study could not investigate all the risk factors previously reported for pre-weaned calves. The exact cause of the increased shedding of resistant bacteria in calves is currently unknown. However, the commonly reported hypothesis is that calves have an underdeveloped gut in terms of bacterial diversity and resistant *E. coli* is able to compete successfully due to a possible linkage between resistance genes and genes conferring selective advantage in neonatal intestines. As the bacterial microbiota diversifies and increases in numbers, resistant *E. coli* loses its competitive advantage and is slowly removed from the gastrointestinal tract (111-114). In consequence, calves are colonized rapidly after birth by MDR *E. coli* (115), which is consistent with our results. Although calves pose a minimal risk to public health, they could be included in surveillance programs as a sentinel for AMR in dairy farms. However, the relatedness between resistant *E. coli* in calves, cows and the manure pit is still unclear.

Manure pits on dairy farms where animals are confined are used to store large amounts of raw feces mixed with used bedding materials and waste water. Raw feces originates mainly from cows and the contribution of calves is considered minor. This explains the likeness between AMR results from cows and manure pits in our study. Even if there were fewer bacteria (difference in volume dilution for cows and manure pits), the proportions of AMR in *E. coli* from manure pits were not different from those found in adult cows. According to some studies, commercial spreading of dairy feces can disseminate AMR genes into the environment (135-137). Also, some authors reported that manure can be a reservoir of antimicrobial compounds, and via its application could increase the selection of resistant bacterial populations in soil (97). The possible dissemination to the environment and, subsequently, to other animals or humans of ESBL/AmpC producing *E. coli* present in the manure pit, as observed in the present study, is a public health concern. The main preoccupation is with ESBLs, which are frequently encoded by a resistance gene *bla<sub>CTX-M</sub>* (138). These genes are associated with mobile genetic elements (139, 140) and it was reported that some *bla<sub>CTX-M</sub>* recovered from *E. coli* isolated from food-producing animals were on plasmids and associated with other resistance genes (141). AMR environmental dissemination and persistence conveyed by livestock waste has recently been reviewed (142). Manure treatments such as thermophilic composting, biological treatments, and anaerobic digestion have been shown to reduce the number of antimicrobial-resistant bacteria (142).

Prevalence of ESBL/AmpC producing *E. coli* is variable between countries. A surveillance program from the European Union in 2015 reported that 43.6% (variation between 9 countries : 1.3% - 68.9%) of samples tested from calves under one year of age were carriers of ESBL/AmpC (125). In our study, the prevalence of ESBL/AmpC producing *E. coli* was 63% for calves, indicating a high level of colonization in young animals. This concurs with results from Belgium, France, Germany, Portugal, and Spain (125). In Canada, the frequency of fecal carriage of *E. coli* with reduced susceptibility to third-generation cephalosporins was 81.2% in Holstein dairy calves in New Brunswick, Canada (143). The difference in province of origin could explain the difference of prevalence noted in this study. The variation observed between



different geographic locations could be due to a regional use of cephalosporins, which select for ESBL/AmpC producing *E. coli*. However, this correlation is not unanimous in the literature; some authors have reported an association between regular use of ceftiofur on the farm and fecal recovery of *E. coli* with reduced susceptibility to extended-spectrum cephalosporins (143). Furthermore, reduced use of 3<sup>rd</sup> and 4<sup>th</sup> generation cephalosporins was associated with a decrease in prevalence of ESBL/AmpC producing *E. coli* on Dutch dairy farms (114). On the other hand, some authors could not find a link between ceftiofur use on farms and probability of recovering ESBL/AmpC producing *E. coli* (144). In addition, use of ceftiofur for the treatment of respiratory diseases in dairy calves was statistically associated with decreased recovery of *E. coli* with reduced susceptibility to extended-spectrum cephalosporins (143).

We showed that dairy calves carried more ESBL/AmpC producing *E. coli* than their adult counterparts or the manure pit. This is consistent with a study in Holland where dairy calves demonstrated a much higher prevalence of ESBL/AmpC producing *E. coli* than cows (114). As explained above, dairy calves have an increased risk of fecal shedding of resistant bacteria including ESBL/AmpC producing *E. coli*.

Among the ESBL/AmpC producing *E. coli*, the predominant phenotype in Europe is ESBL for calves under one year of age (125). In North America, the predominant phenotype for dairies is unclear as there are few prevalence studies. However, some studies have reported that *bla*<sub>CMY</sub> (associated with AmpC phenotypes) was predominant in dairy farms when compared to *bla*<sub>CTX-M</sub> (associated with ESBL phenotypes) (108, 144). In our study, there was no difference between the prevalence of ESBL or AmpC phenotypes (51% and 46% respectively). A specific geographic situation could explain why we found more ESBL producing *E. coli* compared to previous studies in North America in dairy cattle. However, a larger geographical study would be essential to confirm this difference. A temporal variation in the proportion of ESBL and AmpC could also explain the variation noted. Resistance genes associated with these phenotypes are dynamic over time. Over a decade ago, *bla*<sub>CMY-2</sub> was prevalent and there were no reports of *bla*<sub>CTX-M</sub> in animals in Canada (145). The first report of *bla*<sub>CTX-M</sub> in animals in North America was in dairy cattle in Ohio in 2010 (146). Subsequently, numerous reports have

indicated the presence of *bla*<sub>CTX-M</sub> in animals. There is a public health concern for transmission of these resistance genes associated with MDR plasmids between bacteria from humans, animals, and the environment.

We found that ESBL/AmpC producing *E. coli* were recovered more frequently in the autumn season. This difference is not caused by outdoor temperature because there is no difference for the manure pit samples between the two seasons. Seasonal variation in excretion of ESBL/AmpC is poorly described in veterinary medicine. A study in a human population reported that carriage of ESBL *E. coli* and *Klebsiella pneumoniae* was highest in the months at the end of summer/beginning of autumn (August/September) (147). Another study reported higher levels of excretion of ESBL between July and September, although this was inversely correlated with use of antimicrobials (148). However, some factors that could explain this variation in prevalence, such as outdoor activity, different feed preparation methods, and increased movement, are not applicable for dairies in Québec (149). Nevertheless, even if animals did not have access to the outside for the majority of farms, buildings were often opened to allow better aeration during the summer. Consequently, many animal species such as birds had access to the interior of the buildings. It has been shown that migratory birds may carry ESBL *E. coli* (150). We could hypothesize that the opening of buildings during the summer allows wild animals potentially carrying ESBL/AmpC-producing *E. coli* to be in contact directly or indirectly with farm animals. In the context of our results and of manure application in Canada, it is tempting to speculate that spring manure application might be a better strategy in terms of reducing AMR spread associated with ESBL/AmpC resistance.

We observed a statistical association between presence of ESBL/AmpC-producing *E. coli* as recovered by the selective protocol and MDR in commensal *E. coli* from the same sample. This observation could be associated with farm characteristics. Risk factors such as use of antimicrobials are farm dependant and could lead to a selection of resistant bacteria in the enteric gut of animals. This selection leads to a larger number of resistant bacteria, but also the presence of ESBL/AmpC-producing *E. coli*. This observation warrants further investigation.

In this cross-sectional study, the random selection of herds allowed an accurate estimate of the target population (the province of Québec). However, studies that require enrollment of participants are inherently prone to selection bias (151). Indeed, it is possible that producers who have experienced medical problems in their herd requiring antimicrobial treatment may be more prone to decline participation in this project because they would be uncomfortable to be identified as heavy users of antimicrobials. Nevertheless, Lardé et al. (15) demonstrated that the herds that accepted or refused to participate in the current study were not different in terms of herd size, amount of owned milk quota, and average daily production.

In conclusion, our results suggest that AMR in dairy farms from Québec province, Canada, is low for highest priority critically important antimicrobials for humans. As previously described, pre-weaned calves carried higher levels of AMR in commensal fecal *E. coli* than cows and manure pit systems on dairy farms. Also, there is a high prevalence of ESBL/AmpC-producing *E. coli* on farms, particularly in calves. Presence of ESBL *E. coli* in manure pits, although low, nevertheless suggests a possible contamination of the environment and raises public health concern.

### **3.6. Funding**

This work was funded by a grant from the Agri-Food Innov'Action Program resulting from the Cultivons l'Avenir 2 agreement between the Ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation du Québec and Agriculture and Agri-Food Canada (Project IA 116596 to MA, collaborators SD, DF and JPR). It was also partly supported by a grant from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (RGPIN-191461 to MA). Fonds de recherche du Québec – Nature et technologies (#258243) funded a doctoral fellowship for JM. The leading author (JM) also received scholarships from the CREATE in milk quality program and from the Regroupement FRQ-NT Fonds de recherche du Québec – Nature et technologies Op+lait.

### **3.7.Acknowledgments**

We thank Claudia Duquette, Maria Puerto Parada, Fabrice Coulombe, Frédérick Gallant and Avila Croisetière for their technical assistance for this project. We also thank Ghyslaine Vanier for help with the Sensititer system and the whole genome sequencing. Finally, we would like to thank all participating dairy farmers for their unconditional help and their involvement in this project.

### **3.8. Contribution to the Field**

Antimicrobial resistance (AMR) is a major public health concern. One of the recent strategies to control AMR is to strengthen knowledge of passive surveillance programs through active surveillance studies. Indeed, most of the surveillance programs do not accurately reflect the real on farm situations because their data originate from slaughterhouses or diagnostic laboratories. This is the case for Québec, Canada, dairy farms. Via this study, we were able to describe the accurate on farm level of AMR, which was low for critically important antimicrobials. We also identified a high prevalence of extended spectrum  $\beta$ -lactamase /AmpC-producing *Escherichia coli*, particularly in calves. These phenotypes are of major public health concern because they are associated with increased AMR and mobile genetic elements. These data will help determine a baseline for AMR to evaluate impact of initiatives aimed at reducing AMR in our province.

### 3.9. Tables

**Table 5.** Minimum inhibitory concentration for medically important antimicrobials, according to the WHO, of 593 *Escherichia coli* isolated from calf or cow feces or manure pit of 101 dairy farms in Québec, Canada

Importance for human medicine <sup>†</sup>	Antimicrobial Class	Antimicrobial Agent	MIC ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ )*																% resistant	
			0.015	0.03	0.06	0.12	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	512		
Critically important – Highest priority	Cephalosporin 3 <sup>rd</sup> generation	Ceftiofur					38.4	57.8	0.5	0.8	0.7	0.5	1.2							2.4
		Ceftriaxone					96.3	0.5	0.2	0.7		1.0	0.5			0.8				3.0
	Quinolone	Ciprofloxacin	97.3	1.3	0.3	0.2	0.8													0
		Danofloxacin				99.0	0.3	0.5	0.2											0.7
		Enrofloxacin				99.0	0.5	0.3	0.2											0.5
		Nalidixic acid							5.4	74.4	19.1	0.3	0.2			0.7				0.7
Macrolide	Azithromycin						0.2	1.2	19.6	68.6	7.6	0.5	1.3	1.0				2.3		
Critically important – High priority	Aminoglycoside	Gentamicin					2.0	70.0	25.8	0.7			0.2	1.3					1.5	
		Neomycin										91.1	0.5	0.2	1.3	6.9			8.4	
		Streptomycin									0.3	43.0	33.4	1.3	2.5	5.7	13.7		19.4	
	Carbapenem	Meropenem			99.7	0.3													0	
	Amino/ $\beta$ -lac inh <sup>‡</sup>	Amox.-CLA <sup>‡</sup>							2.4	17.4	63.1	14.2	0.5	2.0	0.5				3.0	
Highly important	Aminopenicillin	Ampicillin						5.6	42.7	36.3	1.7				13.8				13.8	
	Cephamycin	Cefoxitin							0.2	6.2	68.6	21.8	1.0	0.8	1.3				3.2	
		Folate pathway antagonist	Sulfisoxazole TMP-sulfa. <sup>§</sup>											43.5	31.5	2.4		22.6	22.6	
	Phenicol	Chloramphenicol				81.5	5.4	0.7		0.2			12.3						12.3	
		Florfenicol <sup>¶</sup>							0.2	5.9	68.5	16.7	8.8						NA	
Tetracycline	Tetracycline									74.4	0.7	0.5	1.9	22.6				25.6		
Important	Aminocyclitol	Spectinomycin										4.4	75.9	9.4	2.0	8.3			10.3	

\*Numbers indicate percentages of isolates. White areas are concentrations of antimicrobials tested by the broth microdilution method. Percentages in gray areas have a MIC superior to the concentration range tested. Percentages in the first white area starting from left have MIC inferior or equal to the corresponding concentration. Dashed and plain lines represent threshold used to define intermediate and resistant clinical breakpoints, respectively. Intermediate and resistant isolates were grouped together and labelled as resistant for the last column of the table. ; <sup>†</sup> Importance of antimicrobials according to World Health Organization (131). <sup>‡</sup> Penicillin +  $\beta$ -lactamase inhibitor : Amoxicillin/clavulanic acid combination; <sup>§</sup>Trimethoprim-sulfamethoxazole combination; <sup>¶</sup>Florfenicol has no valid clinical breakpoints for *Enterobacteriaceae* and the concentration of 0.25 to 4  $\mu\text{g mL}^{-1}$  did not include the European epidemiological breakpoint of 16  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , thus no interpretation could be given.

**Table 6.** Antimicrobial resistance patterns of 593 Escherichia coli isolated from calf or cow feces or manure pit of 101 dairy farms in Québec Canada.

Antimicrobial pattern	Number of isolates(%)
Pan-Susceptible	414 (69.8)
TET	24 (4.0)
SPT	4 (0.7)
FOX	3 (0.5)
CHL	2 (0.3)
STR	1 (0.2)
FIS	1 (0.2)
AMP	1 (0.2)
FIS, SXT	1 (0.2)
GEN, SPT	1 (0.2)
FIS, TET	4 (0.7)
AMP, TET	2 (0.3)
AMP, STR	1 (0.2)
FOX, CHL	1 (0.2)
AZM, FIS	1 (0.2)
AMP, FIS	1 (0.2)
AMP, TIO, CRO	1 (0.2)
STR, FIS, TET <sup>MDR</sup>	16 (2.7)
NEO, FIS, TET <sup>MDR</sup>	1 (0.2)
AMP, SPT, TET <sup>MDR</sup>	1 (0.2)
AMP, GEN, TET <sup>MDR</sup>	1 (0.2)
AMP, CHL, FIS <sup>MDR</sup>	1 (0.2)
AMP, FIS, TET <sup>MDR</sup>	1 (0.2)
AMC, AMP, FOX <sup>MDR</sup>	1 (0.2)
SPT, STR, FIS, TET <sup>MDR</sup>	3 (0.5)
SPT, FIS, TET, SXT <sup>MDR</sup>	2 (0.3)
NEO, STR, FIS, TET <sup>MDR</sup>	2 (0.3)
AMP, STR, FIS, SXT <sup>MDR</sup>	2 (0.3)
AMP, SPT, FIS, SXT <sup>MDR</sup>	1 (0.2)
AMP, NEO, STR, FIS <sup>MDR</sup>	1 (0.2)
AMP, TIO, CRO, TET <sup>MDR</sup>	1 (0.2)
CHL, STR, FIS, TET <sup>MDR</sup>	11 (1.9)
AMP, CHL, FIS, TET <sup>MDR</sup>	1 (0.2)
NEO, STR, FIS, TET, SXT <sup>MDR</sup>	1 (0.2)
AMP, GEN, STR, FIS, SXT <sup>MDR</sup>	1 (0.2)
AMP, STR, FIS, TET, SXT <sup>MDR</sup>	6 (1.0)
CHL, NEO, STR, FIS, TET <sup>MDR</sup>	3 (0.5)
AMP, SPT, STR, FIS, TET <sup>MDR</sup>	2 (0.3)
AMP, NEO, STR, FIS, TET <sup>MDR</sup>	2 (0.3)
AMP, SPT, FIS, TET, SXT <sup>MDR</sup>	1 (0.2)
CHL, STR, FIS, TET, SXT <sup>MDR</sup>	1 (0.2)
AMP, NEO, SPT, FIS, TET <sup>MDR</sup>	1 (0.2)
AMP, CHL, STR, FIS, TET <sup>MDR</sup>	3 (0.5)
AMP, CHL, SPT, FIS, TET <sup>MDR</sup>	1 (0.2)
NEO, SPT, STR, FIS, TET, SXT <sup>MDR</sup>	4 (0.7)



CHL, SPT, STR, FIS, TET, SXT <sup>MDR</sup>	4 (0.7)
AMP, NEO, STR, FIS, TET, SXT <sup>MDR</sup>	3 (0.5)
AMP, SPT, STR, FIS, TET, SXT <sup>MDR</sup>	1 (0.2)
AMP, CHL, STR, FIS, TET, SXT <sup>MDR</sup>	1 (0.2)
AMP, NEO, SPT, STR, FIS, TET, SXT <sup>MDR</sup>	2 (0.3)
AMP, TIO, CRO, SPT, STR, FIS, SXT <sup>MDR</sup>	1 (0.2)
AMP, CHL, SPT, STR, FIS, TET, SXT <sup>MDR</sup>	4 (0.7)
AMP, CHL, NEO, STR, FIS, TET, SXT <sup>MDR</sup>	4 (0.7)
AMP, AZM, SPT, STR, FIS, TET, SXT <sup>MDR</sup>	2 (0.3)
AMC, AMP, GEN, NEO, STR, FIS, TET <sup>MDR</sup>	1 (0.2)
CHL, DAN, NAL, SPT, STR, FIS, TET <sup>MDR</sup>	1 (0.2)
AMP, NAL, NEO, STR, FIS, TET, SXT <sup>MDR</sup>	1 (0.2)
AZM, CHL, SPT, STR, FIS, TET, SXT <sup>MDR</sup>	1 (0.2)
AZM, CHL, NEO, STR, FIS, TET, SXT <sup>MDR</sup>	1 (0.2)
AMP, CHL, GEN, SPT, STR, FIS, TET <sup>MDR</sup>	1 (0.2)
AMC, AMP, CHL, NEO, SPT, FIS, TET <sup>MDR</sup> *	1 (0.2)
DAN, ENR, NEO, SPT, STR, FIS, TET, SXT <sup>MDR</sup>	1 (0.2)
AMP, CHL, NEO, SPT, STR, FIS, TET, SXT <sup>MDR</sup>	4 (0.7)
AZM, CHL, NEO, SPT, STR, FIS, TET, SXT <sup>MDR</sup>	2 (0.3)
AMP, AZM, NEO, SPT, STR, FIS, TET, SXT <sup>MDR</sup>	1 (0.2)
AMP, AZM, CHL, NEO, STR, FIS, TET, SXT <sup>MDR</sup> *	2 (0.3)
AMP, AZM, CHL, NEO, SPT, FIS, TET, SXT <sup>MDR</sup> *	1 (0.2)
AMC, AMP, FOX, GEN, NEO, SPT, FIS, TET, SXT <sup>MDR</sup> *	1 (0.2)
AMP, AZM, TIO, CRO, SPT, STR, FIS, TET, SXT <sup>MDR</sup> *	1 (0.2)
AMC, AMP, FOX, TIO, CRO, NEO, STR, FIS, TET <sup>MDR</sup> *	1 (0.2)
AMC, AMP, FOX, TIO, CRO, SPT, STR, FIS, TET, SXT <sup>MDR</sup> *	1 (0.2)
AMC, AMP, FOX, TIO, CRO, NEO, STR, FIS, TET, SXT <sup>MDR</sup> *	1 (0.2)
AMC, AMP, FOX, CRO, CHL, SPT, STR, FIS, TET, SXT <sup>MDR</sup> *	2 (0.3)
AMC, AMP, FOX, CRO, CHL, NEO, STR, FIS, TET, SXT <sup>MDR</sup> *	1 (0.2)
AMC, AMP, FOX, TIO, CRO, CHL, STR, FIS, TET, SXT <sup>MDR</sup> *	1 (0.2)
AMP, AZM, TIO, CRO, GEN, NEO, SPT, STR, FIS, TET, SXT <sup>MDR</sup> *	1 (0.2)
AMC, AMP, CHL, DAN, ENR, NAL, SPT, STR, FIS, TET, SXT <sup>MDR</sup> *	1 (0.2)
AMP, FOX, TIO, CRO, CHL, NEO, SPT, STR, FIS, TET, SXT <sup>MDR</sup> *	1 (0.2)
AMC, AMP, FOX, TIO, CRO, CHL, SPT, STR, FIS, TET, SXT <sup>MDR</sup> *	1 (0.2)
AMC, AMP, FOX, CRO, CHL, NEO, SPT, STR, FIS, TET, SXT <sup>MDR</sup> *	1 (0.2)
AMC, AMP, FOX, TIO, CRO, CHL, NEO, STR, FIS, TET, SXT <sup>MDR</sup> *	1 (0.2)
AMC, AMP, FOX, TIO, CRO, CHL, NEO, SPT, STR, FIS, TET, SXT <sup>MDR</sup> *	1 (0.2)
AMC, AMP, CHL, DAN, ENR, GEN, NAL, NEO, SPT, STR, FIS, TET, SXT <sup>MDR</sup> *	1 (0.2)
AMC, AMP, AZM, FOX, TIO, CRO, CHL, GEN, NEO, SPT, STR, FIS, TET, SXT <sup>MDR</sup> *	1 (0.2)

<sup>MDR</sup> Multidrug resistance was defined by resistance to three or more antimicrobial classes.

\* Pattern resistant to six or more antimicrobial classes

AMC amoxicillin-clavulanic acid; AMP ampicillin; AZM azithromycin; CHL chloramphenicol; CRO ceftriaxone; DAN danofloxacin; ENR enrofloxacin; FIS sulfisoxazole; FOX cefoxitin; GEN gentamicin; NAL nalidixic acid; NEO neomycin; SPT spectinomycin; STR streptomycin; SXT trimethoprim-sulfamethoxazole; TET tetracycline; TIO ceftiofur.

**Table 7.** Phenotypic resistance and presence of associated antimicrobial resistance genes for the most multidrug resistant *Escherichia coli* (n=8) isolated from calf of 101 dairy farms in Québec, Canada.

Antimicrobial		Isolate							
Class	Agent	10040013	10420013	10500013	10600013	10780027	10830027	10940027	10990027
Aminocyclitol	SPT	aadA1	aadA1,aadA2	aadA1,aadA2	aadA1	aadA2	aadA2	aadA1	aadA5
	GEN					aac(3)-IId			aac(3)-IId
Aminoglycoside	NEO				aph(3')-Ia	aph(3')-Ia	aph(3')-Ia		aph(3')-Ia
	STR	aadA1 strA/strB	aadA1,aadA2	aadA1,aadA2 strA/strB	aadA1 strA/strB	aadA2 strA/strB	aadA2 strA/strB	aadA1 strA/strB	aadA5 strA/strB
Aminopenicillin	AMP	bla <sub>CMY-2</sub> , bla <sub>TEM-</sub>	bla <sub>CARB-2</sub>	ampC*	bla <sub>CMY-2</sub>	bla <sub>CMY-2</sub> bla <sub>TEM-</sub>	ampC*	ampC*	bla <sub>TEM-1B</sub>
Amino/β-lac inh <sup>‡</sup>	AMC	bla <sub>CMY-2</sub>		ampC*	bla <sub>CMY-2</sub>	bla <sub>CMY-2</sub>	ampC*	ampC*	
Cepharmycin	FOX	bla <sub>CMY-2</sub>		ampC*	bla <sub>CMY-2</sub>	bla <sub>CMY-2</sub>	ampC*	ampC*	
Cephalosporin	TIO	bla <sub>CMY-2</sub>		ampC*	bla <sub>CMY-2</sub>	bla <sub>CMY-2</sub>	ampC*	ampC*	
	CRO	bla <sub>CMY-2</sub>		ampC*	bla <sub>CMY-2</sub>	bla <sub>CMY-2</sub>	ampC*	ampC*	
Folate pathway antagonist	FIS	sul2	sul3	sul1, sul2	sul2	sul, sul2	sul, sul2	sul2	sul, sul2
	SXT	dfrA1	dfrA16	dfrA23	dfrA1	dfrA12	dfrA23	dfrA1	dfrA17
Macrolide	AZM					mph(A)			
Phenicol	CHL	floR	cmlA1	floR	floR	floR	floR	floR	floR
Quinolone	DAN		gyrA <sup>†</sup>						gyrA <sup>†</sup>
	ENR		gyrA <sup>†</sup>						gyrA <sup>†</sup>
	NAL		gyrA <sup>†</sup>						gyrA <sup>†</sup>
Tetracycline	TET	tet(B)	tet(A)	tet(A)	tet(B)	tet(A), tet(B)	tet(A), tet(B)	tet(A)	tet(A)

Phenotypic resistance is represented by dark and light gray cells for intermediate and resistant isolates, respectively. White cells are for susceptible isolates. Resistance genes indicated in cells denote their presence for a particular isolate.

\* Promoter mutation in *ampC* -42 C → T, † Mutation in *gyrA* S83L, ‡ Penicillin + β-lactamase inhibitor

AMC amoxicillin-clavulanic acid; AMP ampicillin; AZM azithromycin; CHL chloramphenicol; CRO ceftiofur; DAN danofloxacin; ENR enrofloxacin; FIS sulfisoxazole; FOX cefoxitin; GEN gentamicin; NAL nalidixic acid; NEO neomycin; SPT spectinomycin; STR streptomycin; SXT trimethoprim-sulfamethoxazole; TET tetracycline; TIO ceftiofur.

**Table 8.** Number of positive samples with a presumptive ESBL/AmpC *Escherichia coli*

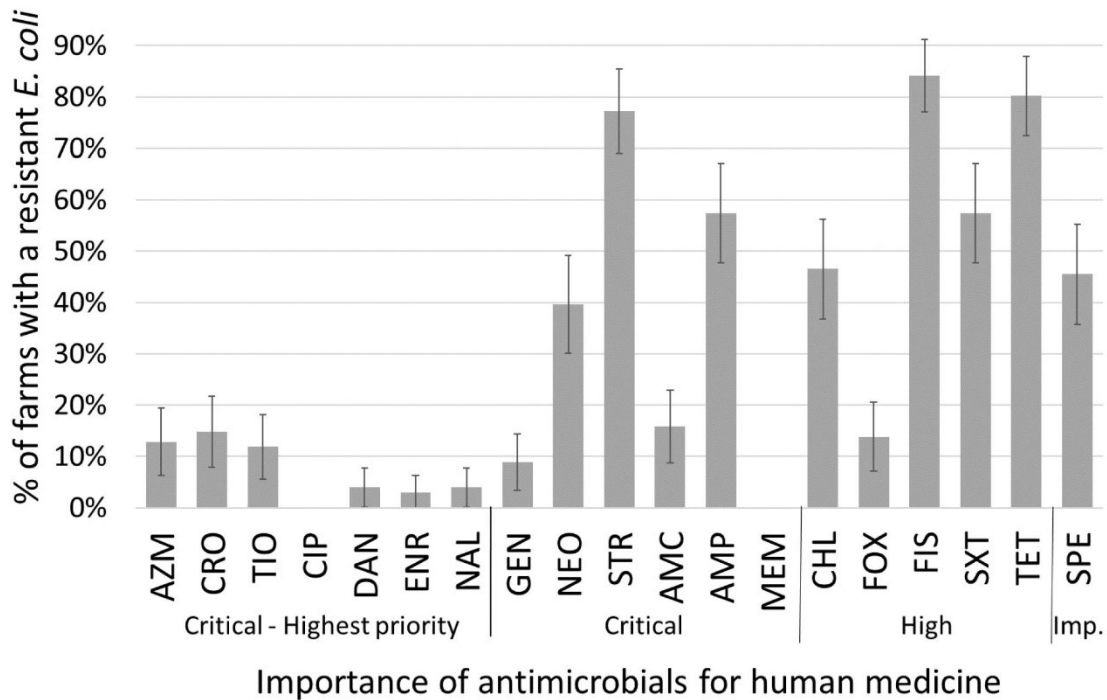
Sample types	Season		Total Number (%)
	Spring (n= 299) Number	Autumn (n= 300) Number	
Calves (n= 195)	53	70	123 (63) <sup>a</sup>
Cows (n= 202)	11	28	39 (19) <sup>b</sup>
Manure Pits (n= 202)	24	28	52 (26) <sup>b</sup>
Total Number (%)	88 (29) <sup>a</sup>	126 (42) <sup>b</sup>	214 (36)

Values with different superscripts within a row (for season) or within a column (for source) were statistically different using a generalized linear mixed model with Tukey-Kramer adjustment for multiple comparisons.

### 3.10. Figures

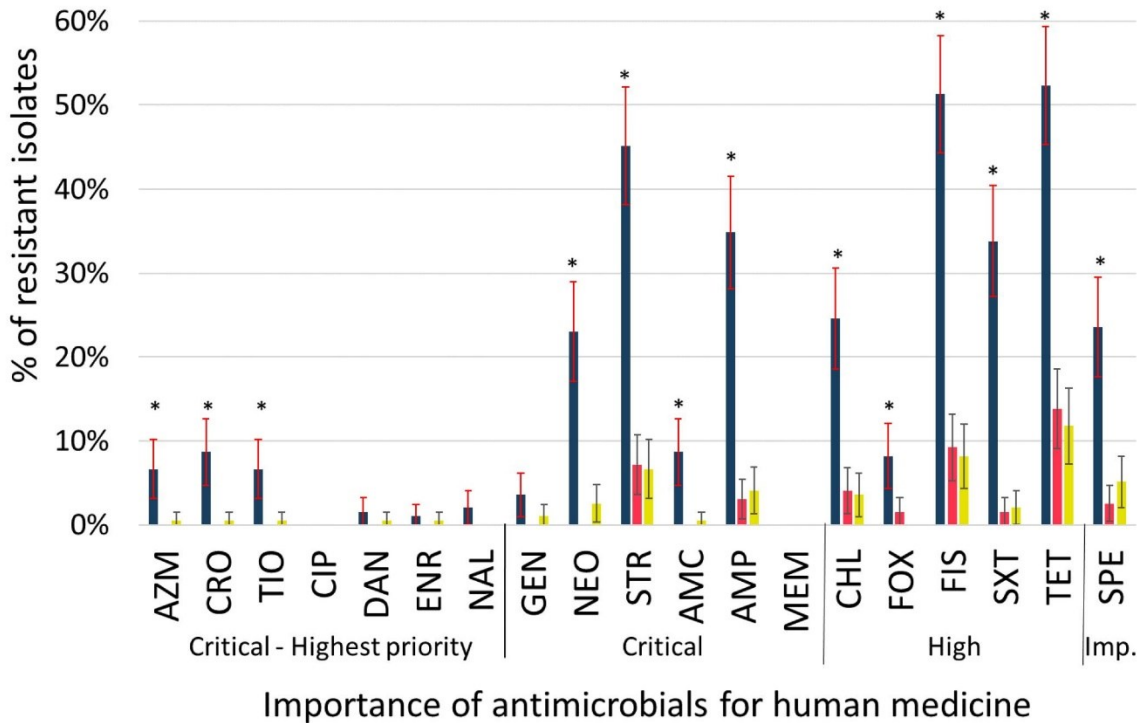
<p style="text-align: center;"><b>ESBL</b></p> <ul style="list-style-type: none"><li>- CTX ≤ 27 mm or CAZ ≤ 22 mm AND</li><li>- MEM ≥ 25 mm AND</li><li>- FOX ≥ 19 mm AND</li><li>- CTX/CLA ≥ 5 mm vs CTX and/or CAZ/CLA ≥ 5 mm vs CAZ</li></ul>	<p style="text-align: center;"><b>AmpC</b></p> <ul style="list-style-type: none"><li>- CTX ≤ 27 mm or CAZ ≤ 22 mm AND</li><li>- MEM ≥ 25 mm AND</li><li>- FOX ≤ 18 mm AND</li><li>- CTX/CLA ≤ 4 mm vs CTX and/or CAZ/CLA ≤ 4 mm vs CAZ</li></ul>
<p style="text-align: center;"><b>ESBL/AmpC</b></p> <ul style="list-style-type: none"><li>- CTX ≤ 27 mm or CAZ ≤ 22 mm AND</li><li>- MEM ≥ 25 mm AND</li><li>- FOX ≤ 18 mm AND</li><li>- CTX/CLA ≥ 5 mm vs CTX and/or CAZ/CLA ≥ 5 mm vs CAZ</li></ul>	<p style="text-align: center;"><b>Other</b></p> <ul style="list-style-type: none"><li>- CTX ≤ 27 mm or CAZ ≤ 22 mm AND</li><li>- MEM ≥ 25 mm AND</li><li>- FOX ≥ 19 mm AND</li><li>- CTX/CLA ≤ 4 mm vs CTX and/or CAZ/CLA ≤ 4 mm vs CAZ</li></ul>

**Figure 18.** ESBL/AmpC phenotypes by disk diffusion method derived from MIC by the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing definition. CTX, CAZ, CTX/CLA, and CAZ/CLA are zone diameters from CLSI VET08 table 7A. FOX and MEM are zone diameters from EUCAST guidelines for detection of resistance mechanisms and specific resistances of clinical and/or epidemiological importance. CAZ ceftazidime (30 µg); CLA clavulanate (10 µg); CTX cefotaxime (30 µg); FOX cefoxitin (30 µg); MEM meropenem (10 µg)



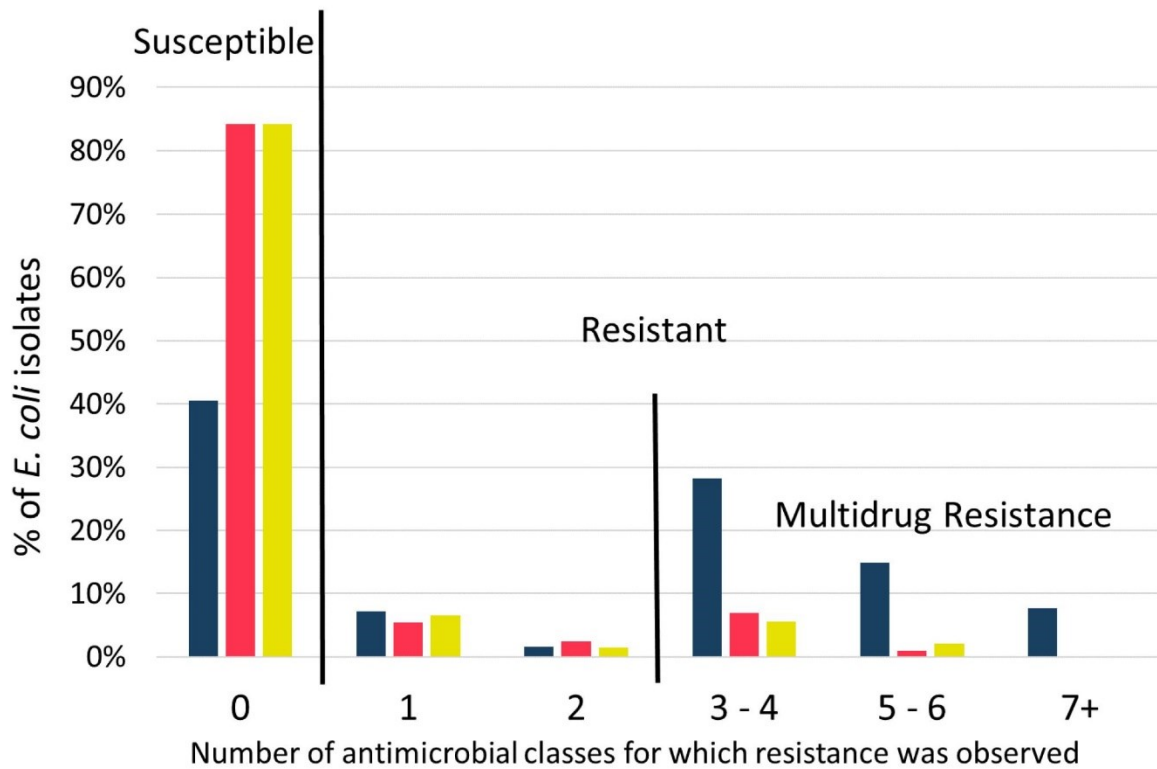
**Figure 19.** Proportion of farms with a least one resistant (intermediate and resistant combined) *Escherichia coli* from any sample or any season from 101 dairy farms from Québec, Canada.

On each farm, between 4 and 6 *E. coli* were tested for each antimicrobial. Importance of antimicrobial for human medicine according to World Health Organization (131). AMC amoxicillin-clavulanic acid; AMP ampicillin; AZM azithromycin; CHL chloramphenicol; CIP ciprofloxacin; CRO ceftriaxone; DAN danofloxacin; ENR enrofloxacin; FIS sulfisoxazole; FOX ceftiofur; GEN gentamicin; MEM meropenem; NAL nalidixic acid; NEO neomycin; SPT spectinomycin; STR streptomycin; SXT trimethoprim-sulfamethoxazole; TET tetracycline; TIO ceftiofur.



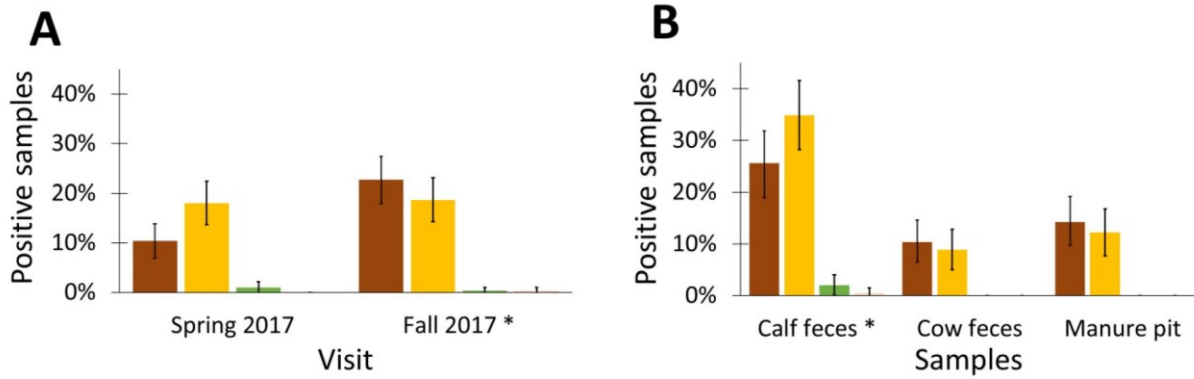
**Figure 20.** Proportion of resistant (intermediate and resistant combined) *Escherichia coli* isolated from calves (■; n=195), cows (■; n=202), and manure pits (■; n=196) from 101 dairy farms from Québec, Canada.

Error bars represent 95% confidence intervals. Importance of antimicrobial for human medicine according to World Health Organization (131). \*Statistically different ( $p < 0,05$ ) probabilities of resistance between isolates obtained from calves, cows, or manure pit and estimated using either a logistic regression model with robust variance to account for clustering by farm (AMP, CHL, FIS, SPT, STR, SXT, TET), or a Fisher exact test (AMC, AZM, CRO, DAN, ENR, FOX, GEN, NAL, NEO, TIO). AMC amoxicillin-clavulanic acid; AMP ampicillin; AZM azithromycin; CHL chloramphenicol; CIP ciprofloxacin; CRO ceftriaxone; DAN danofloxacin; ENR enrofloxacin; FIS sulfisoxazole; FOX ceftiofur; GEN gentamicin; MEM meropenem; NAL nalidixic acid; NEO neomycin; SPT spectinomycin; STR streptomycin; SXT trimethoprim-sulfamethoxazole; TET tetracycline; TIO ceftiofur.



**Figure 21.** Distribution of susceptible and resistant profiles for *Escherichia coli* isolated from calves (■;  $n=195$ ), cows (■;  $n=202$ ), and manure pits (■;  $n=196$ ) from 101 dairy farms from Québec Province, Canada.

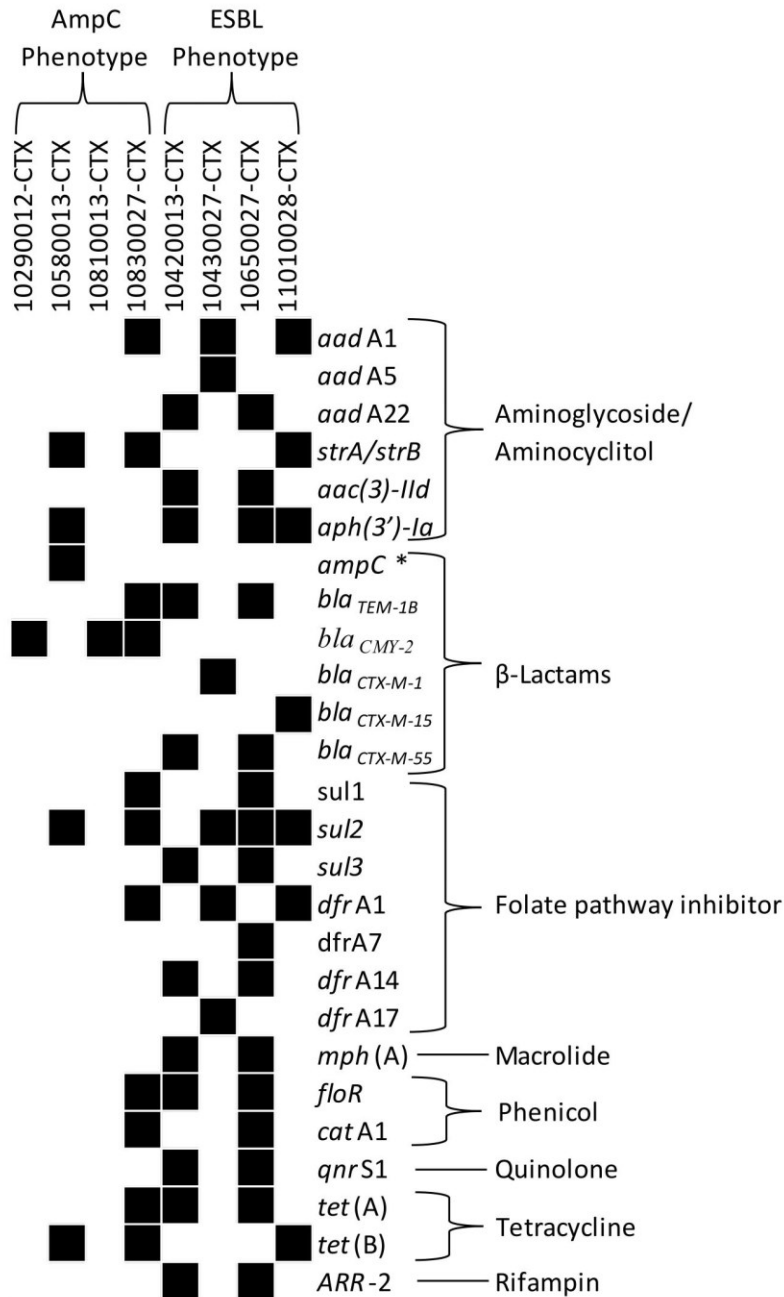
Columns above zero were susceptible to all antimicrobials tested. Columns above a number  $> 0$  were resistant to that corresponding number of antimicrobial classes. Multidrug resistance was defined by resistance to three or more antimicrobial classes. Globally, distribution of isolates from calves were statistically different from isolates of cows and manure pits ( $p < 0,05$ ; Poisson regression with Tukey-Kramer correction for multiple comparison).



**Figure 22.** Distribution of phenotype ESBL (■), AmpC (■), ESBL+AmpC (■), or other (■) in *Escherichia coli* isolated from calves, cows and manure pits from 101 dairy farms from Québec Province, Canada.

(A) Distribution of phenotypes by sampling seasons. (B) Distribution of phenotypes by origin of sampling. \*  $p < 0,05$  Poisson distribution with Tukey-Kramer correction for multiple comparison.





**Figure 23.** Antimicrobial resistance gene profiles of randomly selected ESBL ( $n=4$ ) or AmpC ( $n=4$ ) producing *Escherichia coli* isolated from calf or cow feces or manure pit of 101 dairy farms in Québec, Canada.

Isolates were recovered using a selective protocol. Whole genome sequencing of selected isolates was processed on Resfinder and PointFinder in the Center for Genomic Epidemiology (CGE) to determine the presence of antimicrobial resistance genes. Black blocks indicate the presence of the corresponding gene. Antimicrobial classes associated with resistance genes are listed in the column to the right of the gene names. \* Promoter mutation in *ampC* -42 C -> T

## **Chapitre 4 – Description génétique de la résistance aux antimicrobiens (article 2)**

# Description of Antimicrobial-Resistant *Escherichia coli* and Their Dissemination Mechanisms on Dairy Farms

Jonathan Massé <sup>1,2,3</sup>, Ghyslaine Vanier <sup>2,4</sup>, John M. Fairbrother <sup>2,3,4</sup>, Maud de Lagarde <sup>1,2,3</sup>, Julie Arsenault <sup>3</sup>, David Francoz <sup>1,5</sup>, Simon Dufour <sup>1,3</sup> and Marie Archambault <sup>1,2,3,\*</sup>

Affiliations:

<sup>1</sup> Regroupement FRQNT Op+lait, Saint-Hyacinthe, QC J2S 2M2, Canada

<sup>2</sup> Groupe de Recherche sur les Maladies Infectieuses en Production Animale (GREMIP), Saint-Hyacinthe, QC J2S 2M2, Canada;

<sup>3</sup> Department of Pathology and Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, Université de Montréal, Saint-Hyacinthe, QC J2S 2M2, Canada;

<sup>4</sup> WOA Reference Laboratory for *Escherichia coli*, Faculty of Veterinary Medicine, Université de Montréal, Saint-Hyacinthe, QC J2S 2M2, Canada

<sup>5</sup> Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Université de Montréal, Saint-Hyacinthe, QC J2S 2M2, Canada

\*Correspondence: marie.archambault@umontreal.ca

Mots-clés: antimicrobial resistance; whole genome sequencing; dairy cattle; fluoroquinolone; third-generation cephalosporin; multidrug resistance; horizontal transfer; plasmid; clone; mobile genetic element

Article publié dans la revue Veterinary Sciences en mars 2023  
(<https://doi.org/10.3390/vetsci10040242>)

Contribution de Jonathan Massé à cet article :

JM a préparé les protocoles de laboratoire en plus de faire la majorité des expérimentations. JM a fait l'analyse et l'interprétation des données bioinformatiques en plus d'écrire la première version, faire la correction et réviser la version publiée de l'article.

## 4.1. Abstract

Despite its importance in veterinary medicine, there is little information about antimicrobial resistance (AMR) and its transmission in dairy cattle. The aim of this work is to compare AMR phenotypes and genotypes in resistant *Escherichia coli* and to determine how the resistance genes spread among the *E. coli* population on dairy farms in Québec, Canada. From an existing culture collection of *E. coli* isolated from dairy manure, a convenient selection of the most resistant isolates (a high level of multidrug resistance or resistance to broad-spectrum  $\beta$ -lactams or fluoroquinolones) was analyzed ( $n = 118$ ). An AMR phenotype profile was obtained for each isolate. Whole genome sequencing was used to determine the presence of resistance genes, point mutations, and mobile genetic elements. In addition, a subset of isolates from 86 farms was taken to investigate the phylogenetic relationship and geographic distribution of the isolates. The average agreement between AMR phenotypes and genotypes was 95%. A third-generation cephalosporin resistance gene (*bla*<sub>CTX-M-15</sub>), a resistance gene conferring reduced susceptibility to fluoroquinolones (*qnrS1*), and an insertion sequence (ISKpn19) were detected in the vicinity of each other on the genome. These genes were harbored in one triplet of clonal isolates from three farms located > 100 km apart. Our study reveals the dissemination of resistant *E. coli* clones between dairy farms. Furthermore, these clones are resistant to broad-spectrum  $\beta$ -lactam and fluoroquinolone antimicrobials.

## 4.2. Introduction

The World Health Organization (WHO) has proclaimed antimicrobial resistance (AMR) to be one of the greatest current threats to global health (87). It is generally accepted that AMR is directly associated with the use of antimicrobials (87). AMR bacteria pose serious problems associated with treatment failures or the transmission of resistance. Among these, extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL)-producing *Escherichia coli* are resistant to most third- and fourth-generation cephalosporins, which are classified as the highest priority critically important antimicrobials by the WHO (131). Increasing detection of ESBL-producing *E. coli* strains in livestock has been noted (141, 152-154), making them of particular concern because of the potential for the transfer of resistance to humans, especially those with direct exposure to food-producing animals (155). Furthermore, clonal transmission of bacteria resistant to third-generation cephalosporins has been described in farm animals such as pigs (156) and chickens (157). In addition, fluoroquinolones are an important class of broad-spectrum antimicrobials against many Gram-negative aerobes and are also classified as the highest priority critically important antimicrobials by the WHO. The prevalence of *E. coli* with reduced susceptibility toward fluoroquinolones remains low for livestock in North America (37, 88). However, quinolone-resistant *E. coli* are particularly problematic for human medicine (158) and clonal dissemination has been described (159). Monitoring AMR in bacteria relies on classic phenotypic tests described in standardized reference guides such as CLSI (77) or EUCAST (53). In the last few years, whole genome sequencing (WGS) of bacteria has enriched the classic phenotypic techniques. A strong correlation between phenotypic and genotypic AMR has been reported for bacteria of human (160, 161) and animal origin (81).

Our group has recently described antimicrobial usage on 101 dairy farms in Québec, Canada (15). The AMR in *E. coli* from fecal samples was also investigated for these same farms (162). The highest observed prevalence of AMR was towards tetracycline, sulfisoxazole, and streptomycin (162). Preliminary WGS results in a limited number of isolates demonstrated the resistance genes associated with these resistance phenotypes (162). However, the full

potential of WGS was not exploited in this previous study. In addition to demonstrating the presence of resistance genes, WGS using short reads can, to a certain extent, evaluate the proximity of resistance genes (81) and the proximity of these genes to mobile genetic elements (83). Furthermore, WGS can establish phylogenetic relatedness (163) and demonstrate clonal dissemination of resistant bacteria (164). The present study characterizes the AMR in greater depth using a larger pool of multidrug-resistant, broad-spectrum  $\beta$ -lactam, or fluoroquinolone-resistant *E. coli* from dairy cattle manure. This will enhance our knowledge of bacterial resistance in dairy cattle.

The three hypotheses driving this study are: (1) multidrug-resistant or broad-spectrum  $\beta$ -lactam or fluoroquinolone-resistant *E. coli* isolated from dairy cattle manure possess resistance genes that encode phenotypic resistance; (2) these resistance genes are located in close proximity and in the vicinity of mobile genetic elements in the bacterial genome; and 3) there is clonal transmission of these resistant bacteria between dairy farms. The main aim of this work is to elucidate the genetic component of the resistance to broad-spectrum  $\beta$ -lactams and fluoroquinolones and to determine how these genes are spread in the *E. coli* population on dairy farms.

### **4.3. Materials and Methods**

#### Culture Collection and Selection of Isolates

Isolates from this study originate from an observational cross-sectional study on 101 commercial dairy farms (Québec, Canada) which was previously described (162). Selection of herds, fecal sample collection, and bacterial isolation are available elsewhere (162). The culture collection included: 593 randomly selected indicator *E. coli* and 214 ESBL/AmpC-producing *E. coli* obtained with a selective protocol. The first two hypotheses (the presence of resistance genes and mobile genetic elements) were tested with a convenient selection of the most resistant isolates regrouped in collection A. The third hypothesis (clonal dissemination between farms) was tested with a standardized random selection of isolates regrouped in collection B. Collection A comprised 118 isolates selected as follows: (1) twenty-seven isolates

from the indicator *E. coli* subset based on at least one of the three following criteria: resistant to seven or more antimicrobial classes (aminoglycosides and aminocyclitols were considered two different classes for this selection), resistant to ceftriaxone (MIC  $\geq 2$   $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) or a high MIC to ciprofloxacin (MIC  $\geq 0.064$   $\mu\text{g}/\text{mL}$ ); (2) five isolates selected for an atypical phenotype from the ESBL/AmpC-producing *E. coli* subset: four isolates with an ESBL/AmpC phenotype and one isolate with the phenotype “other”, and (3) eighty-six isolates from collection B which comprised eighty-six isolates that were selected randomly (ALEA function in Excel), one per positive farm, from the ESBL/AmpC-producing *E. coli* subset. Fifteen farms did not demonstrate any ESBL/AmpC-producing *E. coli* and were excluded from further analyses.

#### Antimicrobial Resistance Phenotypes

The antimicrobial resistance phenotypes were previously described for isolates selected in the indicator *E. coli* subset ( $n = 27$ ) (162). The same protocol was used for the remaining 91 isolates selected in the ESBL/AmpC-producing *E. coli* subset. Briefly, the minimum inhibitory concentrations (MICs) for 20 antimicrobials were tested. As previously described (162), the isolates were defined as susceptible, intermediate, or resistant according to CLSI M100 (77) (human *Enterobacterales*), CLSI VET01S (165) (bovine respiratory pathogens), or CIPARS (88) breakpoints. The epidemiological cut-off value from the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) was used for neomycin (MIC  $\geq 16$   $\mu\text{g}/\text{mL}$  was defined as resistant). There was no valid florfenicol breakpoint for *Enterobacterales* and the tested concentrations (0.25–8  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) did not include the European epidemiological cut-off of 16  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; therefore, no interpretation was attempted for this latter antimicrobial. For subsequent analyses, intermediate and resistant isolates were grouped together and labelled as resistant. For sensitivity and specificity, the phenotypic resistance defined by breakpoints was considered as the “gold standard” method. In addition to breakpoints described above, isolates were also classified by EUCAST epidemiological cut-off values. All values used for definition of AMR phenotypes are shown in the Supplementary Table S1. *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, and

*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 were used as reference strains for batch controls. *Escherichia coli* ATCC 25922 was used as a daily control.

### Whole Genome Sequencing

The QIAamp DNA Mini Kit for DNA was used to extract genomic DNA according to the manufacturer's guidelines (Qiagen, Hilden, Germany). The Illumina Nextera XT DNA Library Preparation Kit was used, according to the manufacturer's instructions. Whole genome sequencing was performed on the Illumina (San Diego, CA, USA) MiSeq platform with 2 × 300 paired-end runs. The assembled genomes were obtained using SPAdES software. An assembly was rejected if the number of contigs was > 400, if the N50 was < 40,000, or if the number of contigs was between 300 and 400 and the N50 < 50,000. The quality of the genome assembly is presented in Supplementary Table S1. The sequences were submitted to NCBI and the bioproject ID is PRJNA716674.

For collection A, the Center of Genomic Epidemiology (CGE) platform (<http://www.genomicepidemiology.org/>, accessed on 25 January 2023) was used for all the analyses. Resistance genes, point mutations, and replicons were searched using ResFinder 4.1 (80), PointFinder (129), and PlasmidFinder (82), respectively. An ID threshold ≥ 95% and the minimum length ≥ 85% were used for ResFinder. An ID threshold ≥ 95% and the minimum length ≥ 95% were used for PlasmidFinder. Mobile genetic elements and their association with antimicrobial resistance genes were searched using MGE finder (83). Plasmid ST was searched using pMLST (82). For some isolates, the resistance gene *bla<sub>CMY</sub>* was truncated in the FASTA files; in these cases, FASTQ files were used instead.

For collection B, supplemental phylogenetic analyses were carried out. Phylogroups were determined with in silico PCR using the Clermont Typing platform (<http://clermontyping.iame-research.center/>, accessed on 7 December 2022) (166). FASTA files were used to determine MLST (167), O and H serotypes (168), and the *fimH* gene (169). The default parameters were used for each application. For some isolates, the O serotyping was problematic (truncated O genes, missing O genes, or multiple O genes). The O17/O44/O77 problem was resolved according to Joensen et al. (168); if the *wzy* variant is O17/O44 and the *wzx* variant is O17/O77,



O17 is the expressed O antigen. For O9/O9a, SeroTypeFinder cannot distinguish these variants (168) and it was reported as O9/O9a. Other problems were investigated with a standard agglutination method (170) for six O serogroups (O8, O9, O46, O92, O101, and O108) to evaluate the somatic phenotype. FASTQ files were used to determine cgMLST (85). CSIphylogeny (86) on the CGE platform was used to perform multiple alignments with the default parameters with FASTA files. The genome of *E. coli* strain K-12 MG1655 (GenBank acc. num. NC\_000913) was used as the reference genome. The SNP phylogenetic tree was annotated with the relevant metadata using iTOL (<http://itol.embl.de>, accessed on 12 January 2023) (171).

#### Clonal Lineages and Clones

Only isolates from collection B were considered in the definition of clonal lineages and clones. Isolates with the same phylogroup, serotype, *fimH*, and sequence type (ST) were considered to belong to the same clonal lineage as previously described (164). The difference in SNPs between each pair of isolates was considered for definition of a clone.

In the list containing numbers of SNP differences between each pair of isolates (Supplementary Table S2), there were a number of SNPs that doubled by a gap in the 12 to 25 SNPs' differences range values. Therefore, for the setting presented in this study, two isolates separated by 12 SNPs or fewer were considered as clones. The geographical distribution of farms for clonal lineages and clones was mapped in ArcGIS (version 10.8.1). Jittering was used on farm locations to protect their confidentiality, with each farm point being randomly moved within a 5 km radius around their original location.

## 4.4. Results

### Phenotypic Resistance and the Related AMR Genes or AMR-Associated Mutations

The first hypothesis was that multidrug- or broad-spectrum  $\beta$ -lactam- or fluoroquinolone-resistant *E. coli* isolated from dairy cattle manure possess resistance genes that encode phenotypic resistance. A convenient selection of the most resistant isolates was grouped in collection A to test this hypothesis.

### Description of AMR Phenotypes

The most frequent resistance observed according to the breakpoints was to ampicillin (98%), ceftriaxone (90%), sulfisoxazole (88%), ceftiofur (84%), and tetracycline (80%). No resistance was observed towards meropenem. The least frequently observed resistance was to quinolones (ciprofloxacin 15%, danofloxacin 23%, enrofloxacin 22%, and nalidixic acid 6%), azithromycin (17%), and gentamicin (20%) (Table 9).

### Description of AMR Genotypes

The predominant AMR genes were *sul2* (72%), *strA/strB* (65%), *tet(A)* (53%), and *aph(3')-1a* (47%) (Table 10). Resistance to  $\beta$ -lactams (ampicillin, amoxicillin–clavulanic acid, ceftiofur, and ceftriaxone) was explained by the presence of nine resistance genes or mutations in low proportions varying between 1 and 43% (Table 10). Of all isolates, 42% carried variants of the *bla*<sub>CTX-M</sub> gene, 41% carried variants of the *bla*<sub>CMY-2</sub> gene, 12% carried a resistance-associated mutation in the *ampC* promoter (-42C > T), and 7% had none of the genes or mutations mentioned above (Table 10). The most frequently observed *bla*<sub>CTX-M</sub> variant in our study was *bla*<sub>CTX-M-55</sub> (15%), followed by *bla*<sub>CTX-M-15</sub> (12%) and *bla*<sub>CTX-M-1</sub> (9%) (Table 10). Three isolates with the *bla*<sub>CMY-2</sub> gene demonstrated a truncated gene between two contigs in the FASTA files (data not shown). For the quinolone class of antimicrobials, *qnrS1* was the most frequently observed resistance gene (19%). Mutations in *gyrA*, *parC*, or *parE*, associated with decreased susceptibility to fluoroquinolones, were rarely observed (<5%) (Table 10).

### Comparison between AMR Phenotypes and Genotypes

The average agreement between the observed AMR phenotypes (defined by the breakpoints in Table 9) and genotypes (defined by the presence of resistance genes or mutations for a specific antimicrobial according to Table 10) was found to be 95%. The average sensitivity (isolates with a resistance gene in the population of isolates with phenotypic resistance) was excellent (97%) and varied between 85% and 100% depending on the antimicrobial tested

(Table 11). On a few occasions ( $n = 34$ ), no resistance gene could explain the phenotypic resistance observed. Most of these discrepancies were for  $\beta$ -lactam resistance (82%) (Table 11). It was observed that most of these isolates had intermediate susceptibility results to  $\beta$ -lactam (Table 12). The average specificity (isolates with an absence of a resistance gene in the population of isolates with phenotypic susceptibility) was slightly lower (93%) and also varied according to the antimicrobial tested (52% to 100%). The lowest specificity was observed for streptomycin (52%) and spectinomycin (77%). All phenotype-susceptible genotype-resistance mismatches for these antimicrobials were due to the presence of the resistant genes *aadA1*, *aadA5*, or *strA + strB* (Table 12). The majority (57%) of the 76 mismatches with phenotype-susceptible genotype-resistance were associated with quinolones. For these antimicrobials, isolates with a resistance gene or resistance-associated mutation showed a small increase in MICs that did not reach clinical breakpoints (Table 12).

We also used the epidemiological cut-off values (Supplementary Table S3) from EUCAST to compare the specificity and sensitivity results obtained. In this way, we wanted to verify whether the use of EUCAST epidemiological cut-off values could improve the lower specificity observed with the breakpoints. Regardless of the values used, there was almost no difference in sensitivity, specificity, or the overall agreement (Supplementary Table S3). In an attempt to optimize the overall agreement, we manually tried to find the best fitting MIC values for the presence of the resistance genes for each isolate. The best fitting MIC values (Supplementary Table S3) were associated with a sensitivity of 99%, a specificity of 97%, and an overall agreement of 98%.

#### Comparison between MIC and the Presence of AMR Genes or AMR-Associated Mutations

For the third-generation cephalosporins (ceftiofur and ceftriaxone), the presence of two resistance genes (*bla<sub>CMY-2</sub>* including *bla<sub>CMY-44</sub>* (*bla<sub>CMY-2</sub>*-like) and *bla<sub>CTX-M</sub>* variants) and a mutation in the *ampC* promoter were associated with phenotypic resistance. There was a slight increase in MIC when a mutation in the *ampC* promoter was observed. However, these MICs were not high enough to reach clinical breakpoints for most isolates (Figure 24). For cephalosporins, the

presence of the *bla*<sub>CMY-2</sub> resistance gene was associated with a moderate increase in the MIC whereas the presence of all *bla*<sub>CTX-M</sub> variants was associated with a large increase in the MIC (Figure 24). Epidemiological cut-offs from EUCAST were found to be more accurate than clinical breakpoints in detecting the gene or mutation associated with resistance to third-generation cephalosporins. For fluoroquinolones, multiple resistance-associated mutations in the *gyrA* (p.D87N, p.S83A, p.S83L, and p.S83V), *parC* (p.A56T and p.S80I), and *parE* (p.I355T and p.S458A) genes were observed, as well as the resistance genes *qnrB19* and *qnrS1*. For three fluoroquinolone-resistant isolates, a combination of multiple resistance genes or resistance-associated mutations was associated with the highest MIC for this class of antimicrobials (Figure 24), indicating a process of accumulation of these genetic modifications associated with a gradual rise in AMR. A high increase in MIC to nalidixic acid was observed when resistance-associated mutations in the *gyrA* gene (p.S83L and p.S83V) were present. However, these mutations only led to a moderate increase in MIC towards fluoroquinolones. It was observed that a mutation in only *parE* (p.I355T) was not associated with an increase in the MIC towards quinolones (Figure 24). The actual clinical breakpoints and EUCAST epidemiological cut-off values were too high to accurately predict any one or a few genes or mutations associated with the resistance to fluoroquinolones.

#### Mobile Genetic Elements and Proximity of AMR Genes

The second hypothesis was that resistance genes are located close to each other and in the vicinity of mobile genetic elements on the genome. In our study, it is noteworthy that some genes were frequently observed in the same contig at a fixed distance in bp from each other and close to mobile genetic elements (plasmid replicons and insertion sequences) (Figure 25). In this respect, the proximity of the gene *suI2* located at exactly 61 bp from the genes *aph(6)-1d/aph(3'')-1b (strA/strB)* was observed in 30 isolates. The longest fixed distance was observed between the gene *bla*<sub>CMY-2</sub> and a block of five resistance genes located at a distance of exactly 28,341 bp (Figure 25). This proximity was noted in six isolates. An additional observation was that a third-generation cephalosporin resistance gene (*bla*<sub>CTX-M-15</sub>), a resistance gene conferring

reduced susceptibility to fluoroquinolones (*qnrS1*), and an insertion sequence (ISKpn19) were in the vicinity of each other. This observation was noted for half of the isolates harboring the *bla<sub>CTX-M-15</sub>* gene (7/14). Taking into consideration all the isolates analyzed ( $n = 118$ ), a total of 365 plasmid replicons were found. Of these isolates, only one did not contain any plasmid replicons. For several isolates, some plasmid replicons were located on the same contigs carrying genes for resistance to antimicrobials (Figure 25). In six isolates, the plasmid replicon IncI1 was located near the resistance gene *bla<sub>CTX-M-1</sub>* conferring resistance to third-generation cephalosporins and the plasmid sequence type of these isolates was the same (pST3). The IncI1 plasmid replicon was also found on the same contig as the *bla<sub>CMY-2</sub>* and ISEc9 genes in three isolates and their pST was identical (pST12). A total of 18 isolates harbored the IncA/C2 (pST3) plasmid replicon but none were on the same contigs as an AMR gene.

#### Clonal Dissemination between Farms

The third hypothesis of clonal dissemination between farms was tested using a standardized random selection of 86 isolates (representing 86 farms) regrouped in collection B.

#### Identification of Clonal Lineages, Clones, and Their Associated Characteristics

The reference genome size of *E. coli* K12 is 4,641,652 bp and a total of 3,406,861 bp (73.4%) were identified in all of the analyzed genomes ( $n = 86$ ). A total of 148,561 SNPs were used to construct a phylogenetic tree (Figure 26). A total of 14 clonal lineages (I-XIV) were identified. Clonal lineage I (Phylogroup A, ST10, O101:H9, *fimH54*), consisting of seven isolates, was observed on well-dispersed farms in our sample area (Figure 27). The second most widespread clonal lineage, lineage IX (Phylogroup C, ST88, O8:H17, *fimH39*), consisting of five isolates, was also observed to be well dispersed in the sampling area but more commonly located in the southern half of the map (Figure 27). For these two clonal lineages, different AMR genes were observed in each isolate (data not shown). A total of 10 pairs or triplets of isolates with the same cgMLST were found. All of them had no more than 71 SNPs of difference. Isolates with the same cgMLST had the same ST, serotype, and *fimH*, but were not necessarily clones. Based

on our definition of a clone, the maximum number of different SNPs between clonal isolates was set at 12. Three pairs and one triplet of isolates were found to be clones for a total of nine isolates. Interestingly, clone C was observed on two different farms 158 km apart and clone D was observed on three different farms up to 142 km apart (Figure 27). In addition, the two farms on which clone A was detected were geographically close to each other (25 km apart), as well as the two farms on which clone B was detected (6 km apart; Figure 27). Isolates from clones B and D carried the *bla*<sub>CTX-M-15</sub> gene as well as the *qnrS1* gene, conferring resistance to third-generation cephalosporins and decreased susceptibility to fluoroquinolones, respectively. These two genes were close to each other and in the vicinity of the insertion sequence ISKpn19 (Figure 25).

#### Phylogroup and $\beta$ -Lactam Resistance

In our study, it was noted that some phylogroups were associated with specific mechanisms of resistance to  $\beta$ -lactams, in particular to third-generation cephalosporins. Indeed, for phylogroups E and F, only variants of the *bla*<sub>CTX-M</sub> gene were found. In phylogroup D, all isolates possessed the *bla*<sub>CMY-2</sub> gene. Regarding the mutation in the *ampC* promoter n. 42C->T, it was only found in phylogroup C (Figure 26).

## 4.5. Discussion

The main aim of this work was to elucidate the genetic components of the resistance to broad-spectrum  $\beta$ -lactams and fluoroquinolones and to determine how these genes spread among the *E. coli* population in dairy farms. In order to achieve this, three hypotheses were tested.

The first hypothesis regarding the agreement between phenotypic and genotypic AMR was validated in this study and was consistent with what has been previously described for *E. coli* despite the different bioinformatics tools used in the various studies (81, 172). The lowest level of sensitivity was towards cefoxitin, and this does not appear to have been described previously. In contrast, a sensitivity of 100% was reported (81) for this antimicrobial, although intermediate isolates were included in the susceptible category. On the other hand, in our study, an intermediate isolate was considered resistant to this antimicrobial. If we consider

intermediate isolates as susceptible to ceftiofur the sensitivity increases from 85% to 97%. For third-generation cephalosporins, the problem with sensitivity was found to be associated with the mutation in the *ampC* n.-42C>T promoter. This mutation in *ampC* has previously been associated with a slight increase in the MIC for some third-generation cephalosporins (cefotaxime and ceftazidime) and a strong increase in the MIC for other cephalosporins (ceftazidime and ceftiofur) (173). In our study, this mutation was associated with a slight increase in the MIC for the third-generation cephalosporins tested (ceftiofur and ceftriaxone) and was not described as being “genotypic resistance” according to ResFinder (80). If the mutation in the *ampC* n.-42C>T promoter is considered as genotypic resistance, the sensitivity increases to 100% at the cost of a strong decrease in specificity to 42% and 67% for ceftiofur and ceftriaxone, respectively.

The lowest specificity was observed towards streptomycin. Such genotypically resistant but phenotypically susceptible isolates have also been described previously (81). The breakpoint seemed to be responsible for this discordance. There is no CLSI breakpoint for this antimicrobial and the CIPARS(88)-NARMS(37) breakpoint ( $R > 32$  ug/mL) and the epidemiological cut-off value ( $R > 16$  ug/mL) seemed to be too high to adequately distinguish the genotype–phenotype agreement for this antimicrobial. In one study, a cut-off value for streptomycin of  $\leq 8$  ug/mL for susceptibility ( $R > 8$  ug/mL) was proposed for *E. coli* (174). In our study, this value was also the best fitting value for the agreement between the phenotype and the genotype for this antimicrobial. If we used this value for streptomycin, its specificity increased from 52% to 93% and its sensitivity remained at 100%.

Genes and mutations associated with fluoroquinolone resistance also demonstrated low specificity. This was expected because the presence of a single mutation (*gyrA* or *parC*) or resistance gene (*qnr*) was used for the definition of a resistant isolate in our study. It is well known that, for fluoroquinolones, an accumulation of mutations and resistance genes is required to increase the MIC to reach clinical breakpoints (14). In our study, an accumulation of four resistance genes and/or mutations were observed in the isolates ( $n = 3$ ) associated with

the highest MICs to fluoroquinolones. The epidemiological cut-off values yielded better specificity for this class of antimicrobials. A lower breakpoint for fluoroquinolones could be used to determine a better agreement between phenotypic and genotypic resistance when a single mutation or resistance gene is identified. It was observed that most of our isolates harbored a single mutation and were associated with only a slight increase in MIC toward fluoroquinolones. These isolates are not detected by most surveillance programs (37, 88) because the clinical breakpoint is used and several mutations or genes are needed to reach this breakpoint. Lower thresholds would therefore be necessary to identify and monitor this type of genotypic resistance to fluoroquinolones.

One limitation of the present study was the definition of phenotypic AMR described by breakpoints. This method of comparison between breakpoints (phenotypic AMR) and resistance genes (genotypic AMR) has been used in numerous studies (81, 160, 161). In the present study, the phenotypic AMR was considered as the “gold standard” but this assumption is not exactly true. The breakpoints used are mainly extrapolated from human or cattle respiratory pathogens. This is not necessarily representative of *Enterobacteriales* from the gastrointestinal tract of cattle. However, there is no clear method to predict the clinical outcome when administering a specific antimicrobial for bacteria in a specific animal. Phenotypic techniques are tools to predict clinical outcomes but are not perfect. Sequencing techniques could add a plus value to breakpoints currently used for bacteria in veterinary medicine.

The second hypothesis concerning the proximity between resistance genes and mobile genetic elements was also validated in a number of isolates, for some resistance genes and mobile genetic elements. The close proximity between the AMR genes *bla<sub>CMY-2</sub>*, *sul2*, *strA/strB*, *floR*, and *tet(A)* observed in a few of our isolates ( $n = 6$ ) has previously been reported in pig farms from the province of Québec (156). This latter study also demonstrated, using transformants, that the IncA/C plasmid was associated with phenotypic resistance to  $\beta$ -lactams (*bla<sub>CMY-2</sub>*), sulfisoxazole, streptomycin, chloramphenicol, and tetracycline (156). However, it was not



possible for us to associate the IncA/C plasmid replicon with these resistance genes. This observation highlights the limitation of our study associated with the short-read sequencing technique we used, which does not allow the full description of the plasmids. Indeed, the prediction of large plasmids containing repeated sequences is difficult with short-read sequencing (175). It has previously been reported that the precision of PlasmidFinder is very high (1.0), but the recall (defined as the percentage of the reference plasmid(s) covered by the prediction) was very low (0.36) (175). In other words, PlasmidFinder does not detect many plasmids, but false positives are uncommon. In our study, we found multiple plasmid replicons and some of them were on a same contig and close to some AMR genes suggesting that these genes were most likely found on a plasmid. For example, the plasmid replicon IncI1 was located near the resistance gene *bla*<sub>CTX-M-1</sub>. It was also observed that *bla*<sub>CTX-M</sub> variants were in the vicinity of other important AMR genes, such as *qnr*, a gene responsible for an increased MIC towards fluoroquinolones. The *bla*<sub>CTX-M-15</sub> gene was found on the same contig and at exactly 4641 pb from the *qnrS* gene. The number of genes near each other was probably underestimated due to the sequencing method using short-read sequences. Repeated sequences are, indeed, difficult to reconstruct with short-read sequences.

The mutation in *ampC* promoter n. 42C->T was only found in isolates of the phylogroup C. Because mutations are vertically transferred, this was expected in closely related isolates. In contrast, the resistance gene *bla*<sub>CMY-2</sub> was found in many different phylogroups. This gene is commonly found on plasmids (176, 177) which are transferred horizontally. In our study, *bla*<sub>CMY-2</sub> was frequently associated with the same plasmid replicon. However, many plasmid STs were found, suggesting that several different plasmids can harbor *bla*<sub>CMY-2</sub> in our *E. coli* population. The genes *bla*<sub>CMY-2</sub> and *bla*<sub>CTX-M</sub> are associated with resistance to third-generation cephalosporins, which are key antimicrobials of very high importance used to treat humans and animals (9). In our study, we found a high proportion of these two resistance genes. However, it is difficult to compare our results with those of other studies because a selective protocol was used to collect a proportion of our isolates. In 2007, only *bla*<sub>CMY-2</sub> was reported in animals from Canada and there were no reports of *bla*<sub>CTX-M</sub> at that time (145). The first report

of *bla*<sub>CTX-M</sub> in animals in North America (dairy cattle in Ohio) was published in 2010 (146). Subsequently, many reports have indicated the presence of *bla*<sub>CTX-M</sub> in animals and animal products (141, 152-154).

The most common *bla*<sub>CTX-M</sub> variant found in this study was *bla*<sub>CTX-M-55</sub>. This is consistent with a large study on *bla*<sub>CTX-M</sub> variants in Canada in which the variant *bla*<sub>CTX-M-55</sub> was found in several animal species (140). Furthermore, *bla*<sub>CTX-M-55</sub> was the most commonly found variant in beef cattle in Canada (140). Our results seem to indicate that this situation is also true for dairy cattle in Québec. We also observed close proximity, for some isolates, between the resistance genes *bla*<sub>CTX-M-1</sub> or *bla*<sub>CMY-2</sub> and plasmid IncI1 pST3 or pST12, respectively. This observation was previously reported in pathogenic *E. coli* in pigs in the province of Québec where the resistance genes *bla*<sub>CTX-M</sub> and *bla*<sub>CMY-2</sub> were found on isolates with plasmids IncI1, IncF1B, and IncF1C (154). A European study on raw chicken meat also reported the presence of these types of *E. coli* (*bla*<sub>CTX-M-1</sub> on plasmid IncI1-ly pST3 and *bla*<sub>CMY-2</sub> on plasmid IncI1-ly pST12) (178). These resistance genes are of concern for public health as they could potentially spread to other bacteria, including human and veterinary pathogens (179). Indeed, it has been suggested that *bla*<sub>CMY-2</sub> could be transmitted between animals and humans via IncI1 and IncK plasmids (180).

Prior to 2019, third-generation cephalosporins, such as ceftiofur, were used frequently on Québec dairy farms, whereas fluoroquinolones were used only sporadically (15). The resistance to fluoroquinolones could possibly persist in the *E. coli* population via the co-selection process between the *bla*<sub>CTX-M-15</sub> and *qnrS* genes and be mobile due to the proximity of ISkpn19. The proximity of these two genes has been previously observed in *Salmonella* (181). Close proximity between *qnrS1*, *bla*<sub>CTX-M-15</sub>, *tet(A)*, and *sul2* was also observed in our study, suggesting that the use of tetracyclines or sulfonamides could select for resistance to fluoroquinolones and third-generation cephalosporins. In February 2019, a new regulation was put in place in the province of Québec to better manage the use in production animals of antimicrobials of very high importance in human medicine according to Health Canada (9). Following this regulation, it was observed that use of category I antimicrobials, such as

fluoroquinolones and third-generation cephalosporins, had drastically dropped in dairy cattle (24). However, no reduction in resistance to these antimicrobials was observed in the same population sampled two years after the implementation (182). Considering the phenomenon of co-selection, a reduction in resistance to these antimicrobials could be slow and potentially unlikely, given its possible maintenance through the use of other antimicrobials.

The third hypothesis regarding a clonal transmission of those resistant bacteria between dairy farms was also confirmed. It could be argued that our definition of clones was arbitrary. However, there is not a clear definition of a clone in the literature in regard to the difference of SNPs between isolates. This number varies according to bioinformatics tools used and from one study to another. We used FASTA files for the phylogenetic analyses and there was no SNP pruning with this method (86); therefore, the number of SNPs was overestimated. It is also difficult to compare between studies; using a previously described formula (164), we found that a 10 SNP difference could be used for clonal definition. In other studies, a difference of 10 SNPs (183) or 17-25 SNPs (184) was used to define clonality. However, these numbers were not suitable for this study but gave us an order of magnitude. We considered 12 SNPs in our clonal definition to be conservative. Some clones were found on farms that were geographically far apart from each other, suggesting a dispersal of resistant clones between dairy farms. It is tempting to speculate that the transport of live animals between farms could have spread these clones. However, some farms in our study did not report purchasing or transporting live animals. Transmission by indirect contact would also be possible. It has also been shown that migratory birds can be carriers of *E. coli* *bla*<sub>CTX-M</sub> (150). This is consistent with the results of our study, which shows that two of our isolates are ST117 (*fimH97* and H4), a sequence type associated with poultry (185). Another study also suggested clonal spread via free-range birds (186). It has previously been described that calves carry more resistant *E. coli* than adult dairy cows (162). This age difference could help explain, in part, the spread of clonal resistant bacteria. The exact explanation for this dissemination of clones resistant to broad-spectrum  $\beta$ -lactam and fluoroquinolone antimicrobials remains uncertain. More studies are

warranted to understand the dissemination mechanism and the appropriate fighting strategies to tackle this phenomenon.

#### **4.6. Conclusions**

In conclusion, this study characterized a population of *E. coli* associated with a high level of multidrug resistance to antimicrobials or resistance to broad-spectrum  $\beta$ -lactams or fluoroquinolones from dairy cattle manure. This study found a strong agreement between AMR phenotypes and genotypes. This work also found that an important proportion of AMR genes could be disseminated vertically and possibly horizontally and that co-selection could explain the persistence of certain resistance profiles. Clones were found on farms geographically far apart from each other and were resistant to both broad-spectrum  $\beta$ -lactam and fluoroquinolone antimicrobials. More studies are warranted to understand the dissemination mechanism, including long-read sequencing to clarify the structure of mobile genetic elements, the appropriate fighting strategies, and the impact of this phenomenon with time.

#### **4.7. Simple Summary**

There is little information about antimicrobial resistance and the transmission of this resistance in dairy cattle. The aim of this work is to use cutting-edge technology (whole genome sequencing) to characterize antimicrobial resistance of bacteria (*Escherichia coli*) retrieved from the manure of dairy cattle and to determine how this resistance spreads among the *E. coli* population on dairy farms in Québec, Canada. We detect some resistance genes for antimicrobials considered to be of high priority and critical importance to human medicine. Some of these genes are situated close to each other as well as in the vicinity of some elements for transfer between bacteria. This suggests that bacteria can share these critical antimicrobial resistance genes on dairy farms. Furthermore, the same bacterium was found on farms located up to more than 100 km apart, suggesting transmission across dairy farms. An understanding of this dissemination mechanism will allow for the elaboration of fighting strategies against these resistant bacteria.

## 4.8. Supplementary Materials

The following supporting information can be downloaded at:

<https://www.mdpi.com/article/10.3390/vetsci10040242/s1>. Table S1: Whole genome sequencing quality assembly of the *E. coli* isolates ( $n = 118$ ); Table S2: Difference of SNPs between each pair of *E. coli* isolates ( $n = 118$ ); Table S3: Correlation between phenotypic and genotypic resistance for various minimal inhibitory concentration values.

## 4.9. Funding

This research was funded by a grant from the Agri-Food Innov'Action Program resulting from the Cultivons l'Avenir 2 agreement between the Ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation du Québec and Agriculture and Agri-Food Canada (Project IA 116596 to MA, collaborators SD and DF). A grant from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (RGPIN-191461 to MA) partly supported this work. The leading author (JM) received doctoral scholarships from Fonds de recherche du Québec–Nature et technologies (#258243), the CREATE in milk quality program, and the Regroupement FRQ-NT Fonds de recherche du Québec–Nature et technologies Op+lait.

## 4.10. Data Availability Statement

The sequences are publicly available from the NCBI and through the bioproject ID PRJNA716674.

## 4.11. Tables

**Table 9.** Minimum inhibitory concentration for a selection of the most resistant *Escherichia coli* ( $n = 118$ ) isolated from manure from 101 dairy farms in Québec, Canada.

Antimicrobial Class	Antimicrobial Agent	MIC ( $\mu\text{g/mL}$ )														Non-Susceptible (%)			
		0.015	0.03	0.06	0.12	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128		256	512	
Aminoglycoside/ aminocyclitol	Gentamicin				2.5	54.2	22.0	0.8			0.8	19.5							20.3
	Neomycin								50.0	0.8	4.2	9.3	35.6						49.2
	Spectinomycin									2.5	28.0	6.8	10.2	52.5					62.7
	Streptomycin								6.8	5.1	5.9	3.4	6.8	72.0					78.8
$\beta$ -lactam	Amoxicillin/clavu.							1.7	1.7	40.7	3.4	50.0	2.5						55.9
	Ampicillin							1.7					98.3						98.3
	Cefoxitin							4.2	23.7	11.0	9.3	20.3	31.4						61.0
	Ceftiofur				1.7	4.2	0.8	9.3	5.1	17.8	61.0								83.9
	Ceftriaxone				6.8		3.4	5.9		14.4	20.3	7.6	11.9	29.7					89.8
	Meropenem		100.0																0.0
Folate pathway antagonist	Sulfisoxazole										8.5	2.5	0.8				88.1	88.1	
	Trimethoprim/sulfa.				16.1	5.1	1.7	0.8	0.8		75.4							75.4	
Macrolide	Azithromycin						0.8	12.7	51.7	12.7	5.1	12.7	4.2					16.9	
Phenicol	Chloramphenicol								16.9	33.1	1.7		48.3					50.0	
	Florfenicol <sup>a</sup>							3.4	33.9	17.8	44.9							NA	
Quinolone	Ciprofloxacin	66.9	3.4	4.2	1.7	8.5	7.6	5.1		2.5								15.3	
	Danofloxacin				74.6	2.5	5.9	8.5	8.5										22.9
	Enrofloxacin				74.6	3.4	5.1	9.3	5.1	2.5									22.0
	Nalidixic acid							9.3	50.0	16.9	8.5	9.3		5.9					5.9
Tetracycline	Tetracycline									20.3			2.5	77.1				79.7	

The numbers represent the percentage of isolates in each MIC category by the antimicrobial agent. White areas represent the concentrations of antimicrobials tested by the broth microdilution method. Percentages in grey areas have an MIC superior to the concentration range tested. Percentages in the first white area starting from the left have an MIC inferior or equal to the corresponding concentration. Dashed and plain lines represent thresholds used to define intermediate and resistant breakpoints. Non-susceptible % is the addition of intermediate and resistant isolates. Yellow areas represent the lowest concentration for non-wild-type isolates according to the European epidemiological cut-off values from EUCAST; <sup>a</sup> Florfenicol has no valid clinical breakpoints.

**Table 10.** Proportion positive for AMR genes or AMR-associated mutations with their related phenotypic resistance among a selection of the most resistant *Escherichia coli* (n = 118) isolated from manure from 101 dairy farms in Québec, Canada.

AMR Gene or Mutation	Proportion (%)	AMR Phenotype <sup>a</sup>	Antimicrobial Class
<i>aac(3)-IIa</i>	2	GEN	
<i>aac(3)-IIId</i>	17	GEN	
<i>aac(3)-Via</i>	2	GEN	
<i>aadA(1,2,5,12,22,24)</i>	27,25,11,1,13,1 <sup>b</sup>	STR, SPT	Aminoglycosides /Aminocyclitols
<i>aph(3')-Ia</i>	47	NEO	
<i>aph(3'')-Ib (strA)</i>	65	STR	
<i>aph(6)-Id (strB)</i>	65	STR	
<i>ampC</i> promoter n.-42C>T	12	AMC, AMP, FOX	
<i>bla<sub>CARB-2</sub></i>	1	AMP	
<i>bla<sub>CMY-2</sub></i>	39	AMC, AMP, FOX, TIO <sup>c</sup> , CRO <sup>d</sup>	
<i>bla<sub>CMY-44</sub> (bla<sub>CMY-2</sub> like)</i>	2	AMC, AMP, FOX, TIO <sup>c</sup> , CRO <sup>d</sup>	
<i>bla<sub>CTX-M-(1,15,27,55,65,124)</sub></i>	9,12,2,15,1,3 <sup>b</sup>	AMP, TIO <sup>c</sup> , CRO	β-lactams
<i>bla<sub>OXA-1</sub></i>	1	AMC, AMP	
<i>bla<sub>OXA-10</sub></i>	1	AMP	
<i>bla<sub>TEM-1A</sub></i>	2	AMP	
<i>bla<sub>TEM-1B</sub></i>	43	AMP	
<i>dfrA(1,5,7,8,12,14,16,17,23)</i>	16,8,4,1,19,20,1,11,5 <sup>b</sup>	SXT	Folate pathway antagonist
<i>sul(1,2,3)</i>	38,72,18 <sup>b</sup>	FIS	
<i>mph(A)</i>	21	AZM	Macrolide
<i>catA1</i>	9	CHL	
<i>cmIA1</i>	4	CHL	Phenicol
<i>floR</i>	43	CHL, FFC	
<i>gyrA</i> (p.D87N, p.S83A, p.S83L, p.S83V)	3,3,5,1 <sup>b</sup>	CIP, DAN <sup>c</sup> , ENR <sup>c</sup> , NAL	
<i>parC</i> (p.A56T, p.S80I)	2,3 <sup>b</sup>	CIP, DAN <sup>c</sup> , ENR <sup>c</sup> , NAL	
<i>parE</i> (p.I355T, p.S458A)	1,1 <sup>b</sup>	CIP, DAN <sup>c</sup> , ENR <sup>c</sup> , NAL	Quinolone
<i>qnrB19</i>	1	CIP, DAN <sup>c</sup> , ENR <sup>c</sup>	
<i>qnrS1</i>	19	CIP, DAN <sup>c</sup> , ENR <sup>c</sup>	
<i>ARR-2</i>	13	Not tested	Rifampin
<i>tet(A)</i>	53	TET	
<i>tet(B)</i>	36	TET	Tetracycline

<sup>a</sup> Antimicrobial resistance phenotype according to ResFinder (80) associated with each gene or mutation; <sup>b</sup> multiple proportions in a row are associated with each variant of the corresponding AMR gene or mutation in a respective order; <sup>c</sup> TIO, DAN, and ENR are not listed in the antimicrobial list of ResFinder; therefore, CRO was assigned for TIO and CIP was assigned for DAN and ENR; <sup>d</sup> CRO is not reported to be resistant when a *bla<sub>CMY</sub>* is found but it was considered resistant according to Tyson et al. (2017) (81); AMC, amoxicillin–clavulanic acid; AMP, ampicillin; AZM, azithromycin, CHL, chloramphenicol; CIP, ciprofloxacin; CRO, ceftriaxone; DAN, danofloxacin; ENR, enrofloxacin; FFC, florfenicol; FIS, sulfisoxazole; FOX, ceftiofur; GEN, gentamicin; MEM, meropenem; NAL, nalidixic acid; NEO, neomycin; SPT, spectinomycin; STR, streptomycin; SXT, trimethoprim–sulfamethoxazole; TET, tetracycline; TIO, ceftiofur.

**Table 11.** Agreement (number of isolates) observed between antimicrobial resistance phenotypes and genotypes for a selection of the most resistant *Escherichia coli* ( $n = 118$ ) isolated from manure at 101 dairy farms in Québec, Canada.

Antimicrobial	Phenotype : Susceptible		Phenotype : Resistant		Sensitivity (%)	Specificity (%)
	Genotype Resistant	Genotype Susceptible	Genotype Resistant	Genotype Susceptible		
Gentamicin	0	94	24	0	100	100
Neomycin	0	60	56	2	97	100
Spectinomycin	10	34	74	0	100	77
Streptomycin	12	13	93	0	100	52
Amoxicillin/clavu.	0	52	62	4	94	100
Ampicillin	0	2	116	0	100	100
Cefoxitin	0	46	61	11	85	100
Ceftiofur	0	19	96	3	97	100
Ceftriaxone	0	12	96	10	91	100
Meropenem	0	118	0	0	NA	100
Sulfisoxazole	0	14	104	0	100	100
Trimethoprim/sulfa.	4	25	89	0	100	86
Azithromycin	6	92	19	1	95	94
Chloramphenicol	1	58	57	2	97	98
Nalidixic acid	6	105	7	0	100	95
Ciprofloxacin	18	82	18	0	100	82
Danofloxacin	9	82	27	0	100	90
Enrofloxacin	10	82	26	0	100	89
Tetracycline	0	24	93	1	99	100

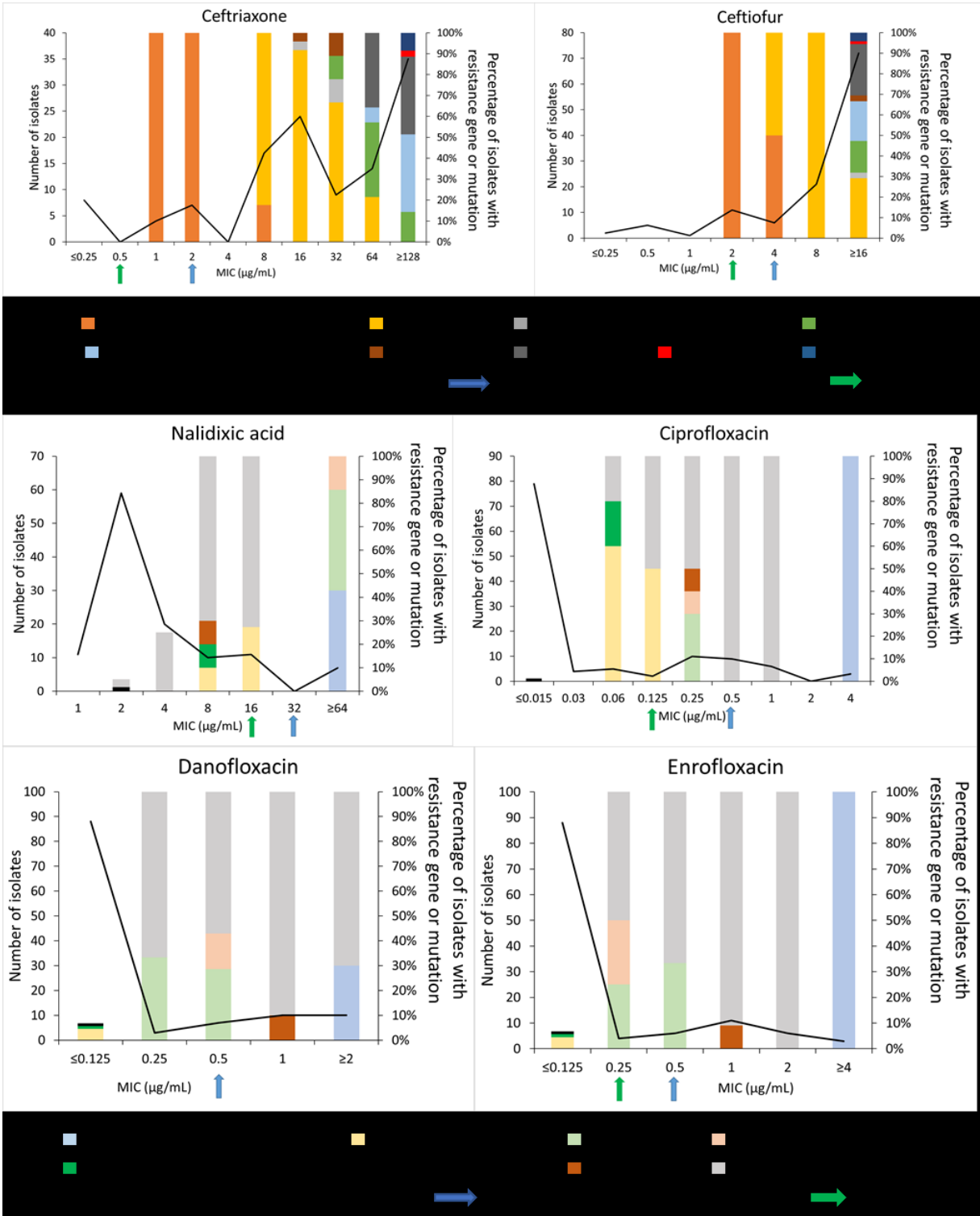


**Table 12.** List of discordance observed between antimicrobial resistance phenotypes and genotypes.

Antimicrobial(s)	Pheno.	Geno.	Gene(s)	nb	Explanation
NEO	R	S		2	Unknown
AMC	R	S		4	Unknown, only four isolates with intermediate susceptibility
FOX	R	S		11	Unknown, most have intermediate susceptibility
CRO, TIO	R	S	<i>ampC</i> <sup>a</sup> (-42 C->T)	10	Gene not reported to be associated with a phenotypic resistance to CRO or TIO
AZM	R	S		1	Unknown
CHL	R	S		2	Unknown, only two isolates with intermediate susceptibility
TET	R	S		1	Unknown
SPT	S	R	<i>aadA1</i> or <i>aadA5</i>	10	Increase in MIC but not enough to reach clinical breakpoint
STR	S	R	<i>aadA(1,5)</i> or <i>strA/strB12</i>	12	Increase in MIC but not enough to reach clinical breakpoint
SXT	S	R	<i>dfrA</i>	4	Increase in MIC but not enough to reach clinical breakpoint
AZM	S	R	<i>mph(A)</i>	6	Increase in MIC but not enough to reach clinical breakpoint
CHL	S	R	<i>catA1</i>	1	Unknown, lowest coverage among <i>catA1</i> (possible non-functional gene)
NAL, CIP, DAN, ENR	S	R	<i>qnr</i> , <i>gyrA</i> <sup>a</sup> , <i>parC</i> <sup>a</sup> or <i>parE</i> <sup>a</sup>	18	Increase in MIC but not enough to reach clinical breakpoint or silent mutation

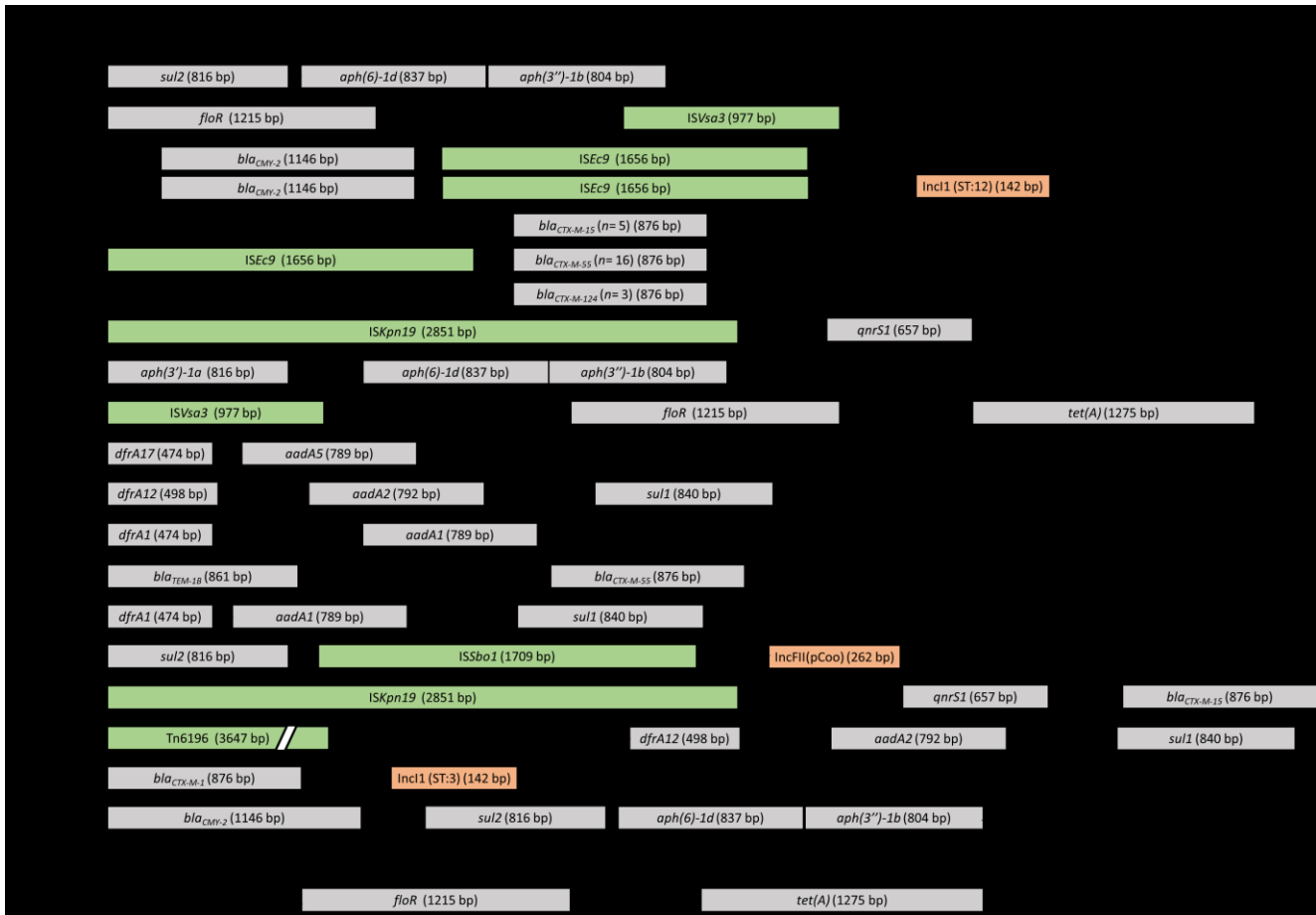
<sup>a</sup> Mutations in these genes are associated with antimicrobial resistance, AMC, amoxicillin–clavulanic acid; AZM, azithromycin, CHL, chloramphenicol; CIP, ciprofloxacin; CRO, ceftriaxone; DAN, danofloxacin; ENR, enrofloxacin; FOX, ceftiofur; NAL, nalidixic acid; NEO, neomycin; SPT, spectinomycin; STR, streptomycin; SXT, trimethoprim–sulfamethoxazole; TET, tetracycline; TIO, ceftiofur.

## 4.12. Figures



**Figure 24.** Correlation between an increase in the minimum inhibition concentration (MIC) and the presence of an antimicrobial resistance gene or resistance-associated mutation for third-generation cephalosporins and (fluoro)quinolones for a selection of the most resistant *Escherichia coli* ( $n = 118$ ) isolated from manure at 101 dairy farms in Québec, Canada.

\* Three isolates harboured multiple mutation points with or without an antimicrobial resistance gene: isolate 10090027-CTX (*gyrA* p.D87N, *gyrA* p.S83L, *parC* p.S80I, and *parC* p.A56T), isolate 10640027-CTX (*gyrA* p.D87N, *gyrA* p.S83L, *parC* p.S80I, and *parE* p.S458A), and isolate 10740013-CTX (*gyrA* p.D87N, *gyrA* p.S83L, *parC* p.S80I, and *qnrS1*).

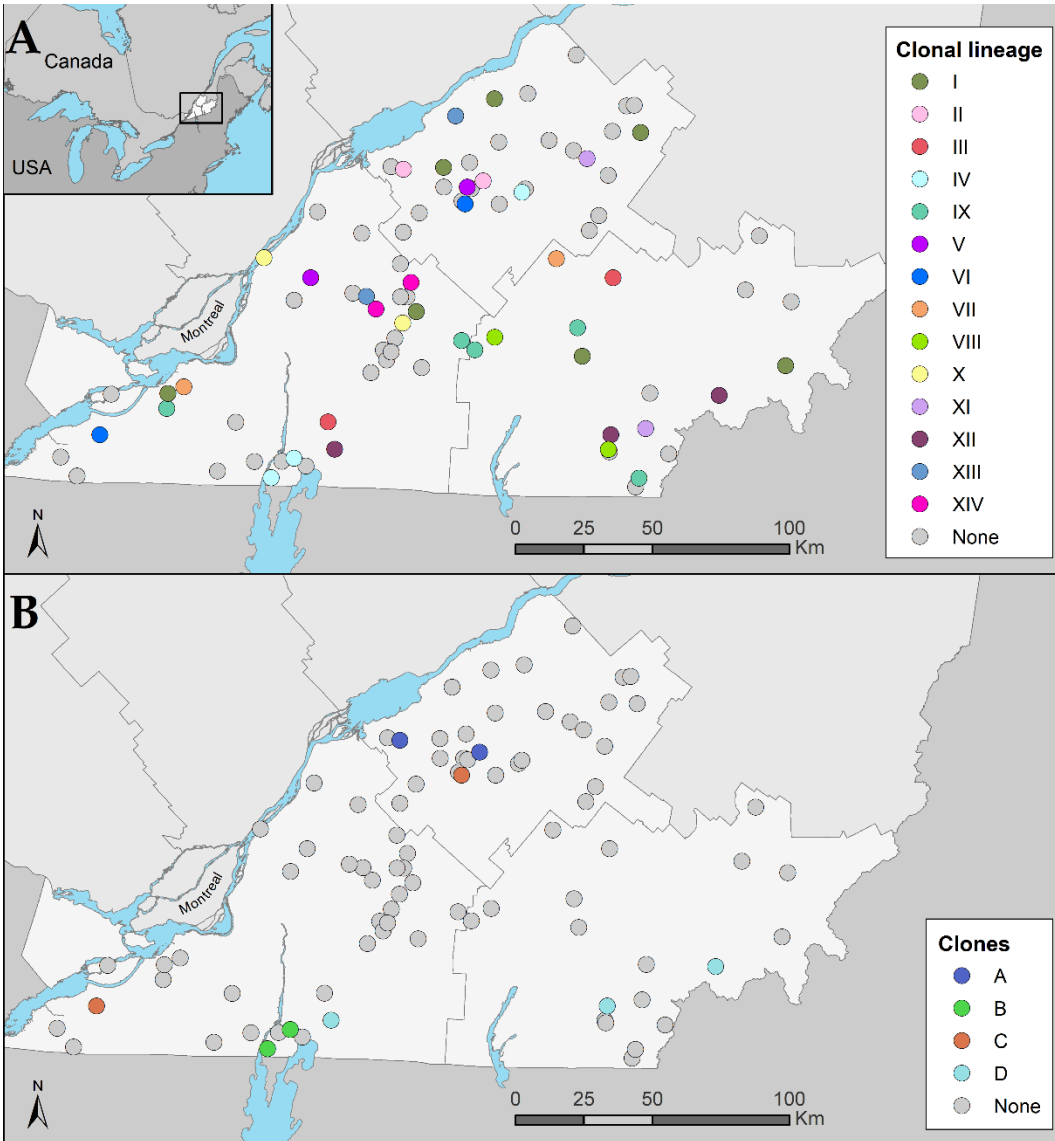


**Figure 25.** Fixed contiguous resistance genes and mobile genetic elements found with ResFinder, PointFinder, PlasmidFinder, and MGE finder from the Center for Genomic Epidemiology platform for a selection of the most resistant *Escherichia coli* ( $n = 118$ ) isolated from manure from 101 dairy farms in Québec, Canada. Only isolates of which six or more harbour the resistance gene and mobile genetic element are represented in the figure.



**Figure 26.** Phylogenetic tree created by CSIPhylogeny from the Center for Genomic Epidemiology by *E. coli* ( $n = 86$ ).

Single nucleotide polymorphisms (SNPs) were analysed and modified with the Itol online platform. Each branch with a bootstrap value  $<1$  was deleted. The letters and their corresponding colour to the left are the Clermont phylogroup mash group created by the clermontyping online platform. Isolate ID: the first four digits of the isolate ID number are the farm identification (example: 10890013 = farm #89) and the last four digits are the sample type and the sample period (0012 = cow spring 2017, 0013 = calf spring 2017, 0014 = manure pit spring 2017, 0026 = cow fall 2017, 0027 = calf fall 2017, and 0028 = manure pit fall 2017). The definition of clonal isolates was 12 or fewer SNP differences from each other. A clonal lineage comprises isolates with the same sequence type (ST), serogroup, phylogroup, and *fimH* gene.



**Figure 27.** Geographical distribution of isolates according to the definition of: (A) Clonal lineage: isolates with the same sequence type (ST), serogroup, phylogroup, and fimH gene. (B) Clone: isolates with 12 or fewer SNP differences from each other. Jittering was used for the farm location to preserve their confidentiality. The light grey zone represents the three administrative regions of the study area: Montérégie, Centre-du-Québec, and Estrie. The medium grey zone represents the other administrative regions of Quebec. A Lambert conformal conic projection (NAD 1983) was used for mapping.

**Chapitre 5 – Facteurs de risque de la résistance aux  
antimicrobiens (article 3)**



# Conventional and unsupervised artificial intelligence analyses identified risk factors for antimicrobial resistance on dairy farms in the province of Québec, Canada

Jonathan Massé,<sup>1-2</sup> Hélène Lardé,<sup>3</sup> Marie Archambault,<sup>1-2</sup> David Francoz,<sup>2,4</sup> Jean-Philippe Roy,<sup>2,4</sup> Pablo Valdes Donoso,<sup>4</sup> and Simon Dufour,<sup>1-2\*</sup>

Affiliations:

<sup>1</sup>Department of Pathology and Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, Université de Montréal, Saint-Hyacinthe, Québec, J2S 2M2, Canada.

<sup>2</sup>Regroupement FRQNT Op+lait, Saint-Hyacinthe, Québec, J2S 2M2, Canada.

<sup>3</sup>Department of Clinical Sciences, Ross University School of Veterinary Medicine, Basseterre, Saint Kitts and Nevis.

<sup>4</sup>Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Université de Montréal, Saint-Hyacinthe, Québec, J2S 2M2, Canada

\* Correspondance: Simon Dufour; [simon.dufour@umontreal.ca](mailto:simon.dufour@umontreal.ca)

Jonathan Massé<sup>1,2,3\*</sup>, Hélène Lardé<sup>1,3</sup>, John M. Fairbrother<sup>2,3</sup>, Jean-Philippe Roy<sup>1,4</sup>, David Francoz<sup>1,4</sup>, Simon Dufour<sup>1,3</sup>, and Marie Archambault<sup>1,2,3</sup>

Mots-clés: Dairy Cattle, Calf, Antimicrobial usage, ESBL/AmpC, Factor analysis of mixed data, Hierarchical clustering

Article en préparation pour soumission dans la revue Journal of Dairy Science.

Contribution de Jonathan Massé à cet article :

JM a recueilli les échantillons (lait et sang des animaux) pour le test sérologique pour *Salmonella* Dublin en plus de préparer les demandes d'analyse et de synthétiser les résultats. JM a analysé les données du questionnaire. JM a fait les analyses univariées en plus de faire l'analyse et l'interprétation des données pour l'écriture de l'article. JM a écrit la première version de l'article et fait les corrections suite aux commentaires des co-auteurs.

## 5.1. Abstract

Antimicrobial resistance (AMR) is one of the greatest threats to global health worldwide and is threatening not only humans, but also animal production systems, including dairy farms. The objective of this paper was to describe risk factors associated with AMR on dairy farms in Québec, Canada. This observational cross-sectional study included 101 commercial dairy farms and took place between spring 2017 and spring 2018 for a one-year period. We explored risk factors such as farm practices and producer's knowledge (measured using a questionnaire), antimicrobial use (quantified using veterinary invoices), and the presence of *Salmonella* Dublin (tested by serology). We evaluated AMR with fecal *Escherichia coli* retrieved from pre-weaned calves and lactating cows using the following outcomes: the presence of extended-spectrum- $\beta$ -lactamase/AmpC resistance and the number of resistances to antimicrobial classes. We used logistic regression models to evaluate the association between each risk factor and the two outcomes for the two types of samples (pre-weaned calves and lactating cows). Furthermore, we explored the relationships between these risk factors to describe farms utilizing data dimensionality reduction with unsupervised algorithms. Outputs of these analyses were used as regressors for AMR in regression models. While the results for univariate analyses were ambiguous, the unsupervised analysis naturally categorized the sample of farms according to their health/treatment status (dimension 1, explaining 12.9% of the variance) and herd size (dimension 2, explaining 7.8%). Dimension 1 was statistically associated with the presence of extended-spectrum- $\beta$ -lactamase/AmpC resistance in lactating cows and in pre-weaned calves, and with the number of resistances in pre-weaned calves. This study highlights the complexity of analyzing risk factors associated with AMR. Our results suggest that improving herd health status will help improving AMR in dairy farms. However, prospective studies are needed to confirm this observation.

## 5.2. Introduction

Antimicrobial resistance (AMR) is one of the greatest threats to global health worldwide (87). This phenomenon impacts human and animal health, especially in settings such as

dairy production. Even if AMR is a natural adaptation of bacteria, antimicrobial overuse and misuse is considered as the main driver for AMR selection (87). One of the important resistance mechanisms in *Enterobacteriaceae*, such as *Escherichia coli*, is the production of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases (ESBL)/AmpC, which are of great public health concern in veterinary medicine (120). *Enterobacteriaceae* producing ESBL/AmpC are resistant to many  $\beta$ -lactams, including third-generation cephalosporins (122). This class of antimicrobials is one of highest priority and critically important classes for human medicine, according to WHO (131) and requires careful utilization in veterinary medicine. A third-generation cephalosporin (ceftiofur) is approved for dairy cattle in Canada and could potentially impose a selection pressure for ESBL/AmpC producing *Enterobacteriaceae*.

Antimicrobial use (AMU) and its association with AMR in dairy cattle has been studied (187, 188). However, the risk of AMR development is a complex phenomenon that cannot be entirely explained by the quantity and types of antimicrobials used on a farm. Multiple factors are involved, with potentially antagonistic and synergistic relationships between them. For instance, studies using questionnaires have reported that the frequency of veterinary visits to farms (189) and educational intervention with producers could reduce AMU (190). However, studies reporting a comprehensive description of risk factors for AMR in dairy farms are scarce.

*Salmonella enterica* spp *enterica* serovar Dublin (*Salmonella* Dublin) can be challenging in dairy farms. Although this serotype is not host-specific, it is considered host adapted to bovine. Its dissemination between and within herds can be important if biosecurity measures are deficient and cause significant morbidity and mortality in dairy herds (94). Furthermore, *Salmonella* Dublin are also frequently multidrug resistant (95). Since 2011, *Salmonella* Dublin have become more common in Quebec's dairy farms (191) and we could hypothesize that the presence of this infection on a farm could possibly contribute to an increase risk of AMR for other bacterial species found on that farm by transfer of genetic elements.

Dairy calves are sometimes neglected in AMR surveillance programs (37, 88). However, dairy calves are associated with high AMR excretion in their feces (104) and could serve as a reservoir for AMR bacteria. While Zhang et al. (2022) described a positive association between AMU and AMR in dairy calves (192), few studies like Adler et al. 2017, have combined animals of multiple ages (calves and adult cows) in risk factors analyses for AMR in dairy farms (193).

Our group previously reported AMU (21) and AMR (162) in Quebec's dairy herds using a selection of 101 dairy farms from Québec, Canada. However, we have not yet described the associations between AMU and AMR. Therefore, the objective of this manuscript was to describe AMU-associated risk factors for AMR in dairy farms from Québec, Canada. We explored whether AMR was associated with farm's practices and producer's knowledge, incidence and treatment of main health problems (as reported by producers in a questionnaire), AMU (quantified using veterinarian invoices), and the *Salmonella* Dublin herd status (tested by a serological method). We assessed the AMR outcomes using the resistance profile and ESBL/AmpC production of *E. coli* retrieved from fecal samples of pre-weaned calves and of lactating cows for each farm.

### 5.3. Materials and Methods

#### Selection of farms

This observational cross-sectional study included 101 commercial dairy farms in Québec, Canada. We conducted this study for a one-year period, between spring 2017 and spring 2018. The selection of farms, recruitment of participants, sample size calculation, and exclusion criteria were previously described (15). Briefly, we used a random list of dairies in three regions (Montérégie, Centre-du-Québec, and Estrie) of Québec province to solicit dairy farmers by telephone between January and March 2017. Participation was on a voluntary basis. We used a stratified random sampling to achieve a proportion of herds similar to proportion in the source population (knowing the number of herds in each region of Québec). This study was approved by the Health Research Ethics Committee of the Université de Montréal (project number 16-166-CERES-D) and by the Animal Use Ethics Committee of the Université de Montréal (project number 16-Rech-1859).

#### Questionnaire

The questionnaire (available in French in Supplemental files) comprised 45 questions and was divided in three sections (general demographic data, AMU practices on the farm, and producers' perceptions and knowledge about AMU). In a pilot stage for questionnaire development, ten dairy producers were interviewed to ensure clarity of questions. Those producers were excluded from the current study. Participating producers from each farm ( $n=101$ ) answered the questionnaire during a farm visit conducted by two members of the research team (HL or JM). To keep the questionnaire standardized between farms, investigators read the questions as written. A visual sheet depicting all antimicrobial products labeled for cattle in Canada was available to help producers identify the products they were using for their animals. Each questionnaire was recorded in a database in a Microsoft Access form. Following data cleaning and transformation, a total of 40 final variables, which are presented in Table 9, were analyzed as risk factors.

## Antimicrobial use

We used veterinary invoices to quantify AMU at the farm-level during the study period. This quantification method to estimate farm-level usage of antimicrobials was previously validated and showed an almost-perfect agreement when compared to the reference method (“Garbage can audit”) (21). Veterinary invoices data were previously published (21) and were used for this study. For AMU, four variables were analyzed as risk factors at the farm level: total yearly usage rate of antimicrobials, injectable yearly usage rate of antimicrobials, total yearly usage rate of ceftiofur, and injectable yearly usage rate of ceftiofur. The unit of measure for these risk factors was the Canadian defined course doses (DCD<sub>bovCA</sub>, hereafter abbreviated as DCD) (17).

## *Salmonella* Dublin

There were two sampling visits for each farm. The first visit was between April and June 2017 and the second visit was between October and November 2017. On a voluntary basis, each farm was offered to be tested for *Salmonella* Dublin at each of the two sampling visits. We used a serology test, an indirect ELISA (PrioCheck® *Salmonella* Ab bovine Dublin, Prionics, The Netherlands), for the detection of *Salmonella* antibodies against *S. Dublin* in cattle. The antibodies detected were the polysaccharide LPS O-antigens 1,9 and 12. The sampling method recommended by the testing laboratory (the Ministère de l’Agriculture, des Pêcheries et de l’Alimentation du Québec laboratory) included a milk sample from the bulk tank and up to 10 blood samples from animals between 4 months and 1 year with emphasis on the youngest animals. All samples were shipped on ice to the testing laboratory for processing within 24 hours. For samples taken on Fridays, all bloods were centrifuged and serums were frozen at -20°C with milk samples until processing by the laboratory the following weekday. As recommended by the manufacturer, percent positivity of  $\geq 35\%$  for blood or milk sample was considered positive. The variable analyzed as a risk factor was the farm status for *S. Dublin*, categorized as positive (bulk milk sample positive or at least one blood sample positive), negative (all samples negative), or unknown (for herd declining *S. Dublin* testing).

## Antimicrobial resistance

For each of the two sampling visits, we measured AMR from fecal samples. In a previous study, we described the sampling protocol, bacteriological analyses, and antimicrobial phenotyping testing (162). Briefly, fecal samples were pooled from up to five pre-weaned calves and from five lactating cows for both sampling visits. Each herd in this study was represented by a total of four pooled fecal samples (pre-weaned calves - spring, pre-weaned calves - autumn, lactating cows - spring, and lactating cows - autumn). One *E. coli* was randomly selected from each fecal sample. These *E. coli* were tested for 20 antimicrobials, representing 11 classes of antimicrobials as previously described (162). Briefly, the minimum inhibitory concentrations (MIC) were determined with the broth microdilution method using commercially available panels (Sensititre CMV4AGNF and BOPO6F) (Thermo Fisher scientific, Canada) following manufacturer recommendations, and in accordance with the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Isolates were defined as susceptible or non-susceptible (intermediate or resistant) according to clinical breakpoints from the CLSI (77), the Canadian Integrated Program for Antimicrobial Resistance Surveillance (CIPARS) (124) or the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) (194) values. Furthermore, fecal samples were subjected to a selective protocol with a third-generation cephalosporin previously described (162). Briefly, 1 g of feces was added to 9 mL of Buffered Peptone Water, then incubated at 37 °C for 20h. One loop (10 µl) was streaked onto a MacConkey agar plate containing 1 mg/mL of cefotaxim, then incubated at 44 °C for 20 hours. Lactose positive colonies were subcultured on Columbia agar with 5% sheep blood for *E. coli* identification with MALDI-ToF. A fecal sample was considered to have ESBL/AmpC producing *E. coli* if an *E. coli* was retrieved from this selective technique.

For this study, two fecal samples (from both sampling visits) were used to represent each animal age group (lactating cows and pre-weaned calves) within each herd. The outcomes of the study were the maximum number of resistances to antimicrobial classes found on *E. coli* retrieved from faecal samples from a given origin (i.e., one value per farm for samples from lactating cows and one value for samples from pre-weaned calves) and the

presence of selected resistance to cefotaxim (CTX), which represent ESBL/AmpC producing *E. coli* (again one value per farm for samples from lactating cows and one value for samples from pre-weaned calves).

#### Statistical analyses

Independent variables (Questionnaire, AMU, and *Salmonella* Dublin;  $n=45$ ) were mainly quantitative ( $n=26$ ), some were dichotomous ( $n=15$ ), or categorical ( $n=4$ ). The dependent variable CTX was dichotomous (i.e., presence or absence), while the number of resistances was a discrete quantitative variable (i.e., 0, 1, 2, ..., 9). For CTX in lactating cows and pre-weaned calves, univariate generalized linear regression models using a logit link were used to assess its association with each risk factor. Thus, the exponent of the coefficient was interpreted as the odds ratio of the outcome for every one unit increase of the predictor (if continuous) or for the presence of the predictor as compared to a reference category (for categorical variables). Linearity of the relationship of quantitative variables and the outcome was assessed with the addition of a set of second-degree polynomial terms. When statistically significant, these polynomial terms were then retained to describe the predictor-outcome non-linear relationship. For dichotomous or categorical independent variables, the fisher exact test was used whenever convergence of the logistic model was not possible. For the number of resistances in lactating cows and pre-weaned calves, a univariate generalized linear model assuming a Poisson distribution and a log-linear link function was used to evaluate the association between each individual risk factor and the outcome. Again, linearity of quantitative variables was assessed with the addition of a set of second-degree polynomial terms. For all analyses,  $p<0.05$  was considered significant. Statistical analyses were made using IBM SPSS Statistics (version 28).

Unsupervised artificial intelligence methods were then used to conduct a multivariate analysis, to explore how the different risk factors could be used all together at once to describe the farms. To reduce data dimensionally, we first performed a factor analysis of mixed data (FAMD) on the potential risk factors to summarize the relationships between



all the continuous and categorical variables (excluding the four outcome variables, i.e.: presence of ESBL/AmpC *E. coli* in feces from calves or cows; number of resistances to antimicrobial classes in feces from calves or cows). This unsupervised approach was used to characterize each farm according to specific dimensions of the factorial analyses. Then hierarchical clustering based on the FAMD (HCFAMD) was used to create clusters of farms that were more similar based on their whole profile of predictors (based on the FAMD analysis) and to assign values to each farm representing its position in the first three dimensions. These latter variables (i.e., cluster identification of a given farm and the farm's coordinates on the first three dimensions) were then evaluated as predictors in regression models (one with cluster as the sole predictor and one with the three farm's coordinates as predictors) to describe their association with each of the four AMR outcomes. Whenever the cluster variable was statistically associated with a given outcome, then each category of cluster was compared to one another using a Tukey-Kramer test to adjust for multiple comparison. These analyses were performed using R (Version 2023.06.0+421). The complete R code used for analyses as well as complete data are provided as Supplemental Files at <https://doi.org/10.5683/SP3/T8JRW0>.

## 5.4. Results

### Description of risk factors

All the producers (n=101) completed the questionnaire. There were four missing answers to the question: “What percentage reduction in antimicrobial can be achieved without impacting the health of herds in the province of Québec?” and one missing answer to the question: “When you start an antimicrobial treatment, do you follow indication on the bottle or ask the veterinarian for any question?” The farms with missing answers to a given question were excluded from the univariate analyses for that risk factor. Descriptive statistics for each of the 40 risk factors measured using the questionnaire are presented in Table 13. Farms AMU variables estimated using veterinary invoices were extracted from previous work (21) and are also presented in Table 13. For *Salmonella* Dublin

serological test, a total of 77% of farms agreed to be tested at least once and 14% were considered as positive (Table 13).

#### Description of outcomes - AMR

Among all the dairy farms sampled ( $n=101$ ), six did not have any pre-weaned calf at one or both sampling periods. Those six farms were excluded from subsequent analyses exploring impact of risk factors on the two calves' outcomes. The difference in AMR outcomes between cows and calves' samples was noteworthy. The average (range) number of resistances in *E. coli* was 0.8 (0 to 5) for cows and 3.7 (0 to 9) for calves (Table 13). The prevalence of CTX (i.e., finding at least one fecal sample with an ESBL/AmpC producing *E. coli* using the cefotaxime-based selective technique) was 76% for calves and 35% for cows (Table 13).

#### Univariate analyses of risk factors for AMR

A total of 32 risk factors were statistically significantly ( $p<0.05$ ) associated with a least one of the four outcomes (Table 14). The number of resistances of *E. coli* retrieved from cows was the outcome with the highest number of statistically significant risk factors ( $n=25$ ) associated to it. Among those, ten risk factors had a non-linear relationship with the AMR outcome. These latter relationships are illustrated in Figure 28. We observed a non-linear relationship for an additional seven risk factors for the three remaining outcomes (Figures 29 and 30). Interestingly, some risk factors were significantly associated with multiple AMR outcomes. For example, the presence of antimicrobials in the diet of pre-weaned calves was a significant risk factor for CTX in cows, and number of resistances of *E. coli* from cows and calves. On the other hand, some risk factors showed opposite associations (e.g., preventive than causative) from one AMR outcome to another. For example, an open herd was a risk factor for CTX in cows, but was a protective factor for number of resistances of *E. coli* from cows and calves (Table 14).

#### Multivariate analyses of risk factors for AMR

For multivariate analyses, only farms without any missing answer from the questionnaire were included ( $n=96$ ).

#### Grouping variables by dimension

According to the FAMD, the first five dimensions explained 36.2% of the variation between farms. Contribution of the most important variables to the first five dimensions are represented in Figure 31. Dimension 1 explained 12.9% of the variance and the most important variables in that dimension represented mainly the concept "animal health status" (Figure 31). Dimension 2 (7.8% of the variance) represented mainly the concept "herd size". Dimension 3 (5.7% of the variance) was dominated by variables that are related to AMU and dimension 4 (5.3% of the variance) seemed to represent the "dry cow therapy" concept. For the fifth dimension (4.6% of the variance), it was difficult, when inspecting the most important variables, to attach a label representing a specific concept (Figure 31).

#### Clustering farms based on their profile of predictors

The HCFAMD identified three clusters of farms based on their profile of predictors (Figure 32). Cluster 1 ( $n=76$  farms) represented the largest group, which we could label the "healthy herds, low ceftiofur users". Producers in cluster 1 had lower rates of disease and lower rates of treatment of animals without veterinary consultation. They also used less ceftiofur (self-reported DCT, self-reported injectable ceftiofur, AMU injectable ceftiofur, and AMU total ceftiofur usage) (Supplemental Files).

The farms from cluster 2 ( $n=9$  farms) could be labelled the "high ceftiofur users". When compared to the whole dataset, producers of cluster 2 used more ceftiofur regardless of the route of administration, as estimated using the veterinary sales data (111 DCD/100 cow-year vs. 39 DCD/100 cow-year) and they also self-reported a very high usage of ceftiofur for DCT (39 treatments/100 animals-year vs. 5 treatments/100 animals-year). They were more likely to use ceftiofur at dry-off (89% used ceftiofur for DCT vs. 10% in the whole dataset). In fact, 80% of producers using ceftiofur at dry-off belonged to cluster 2 (Supplemental Files).

The farms from Cluster 3 ( $n=11$  farms) could be labelled as “farms with poor animal health that treat frequently with antimicrobials”. For producers in cluster 3, the rates of disease and treatments of animals without veterinary consultation, were at least twice the mean of all producers. According to the veterinary sales data, they used more injectable ceftiofur when compared to the whole dataset (27 DCD/100 cow-year vs. 11 DCD/100 cow-year). They also used more injectable antimicrobials in general (132 DCD/100 cow-year vs. 78 DCD/100 cow-year). They seemed to be treating more often (93%) without a veterinary advice than what was observed in the whole dataset (82%). Furthermore, they estimated that AMU could only be reduced by 13% in the province of Québec while it was estimated at 23% for the whole dataset (Supplemental Files).

Clusters and farm's coordinates in the three FAMD dimensions as predictors for AMR

Cluster membership was a significant predictor for odds of CTX in cows. In cluster 1, only 28% (21/76) of herds were CTX-positive, while 67% (6/9) and 64% (7/11) of herds in cluster 2 and cluster 3, respectively, were CTX-positive (Figure 33). After adjustment for multiple comparisons, however, we could not identify significant pairwise differences. Clusters were not a significant predictor of the number of resistances in *E. coli* from cows. Regarding calves' samples, clusters were, again, a significant predictor for the odds of CTX. In cluster 1, 76% (53/70) of herds were CTX-positive, while 89% (8/9) and 100% (11/11) of herds in cluster 2 and cluster 3, respectively, were CTX-positive (Figure 33). After adjustment for multiple comparisons, again, we could not highlight pairwise differences between clusters. Clusters membership was not a significant predictor of number of resistances in *E. coli* from calves.

The coordinate of the farm in the first dimension (concept of animal health status) was a significant predictor for odds of CTX in calves, odds of CTX in cows and the number of resistances in calves. The first three dimensions were significant predictors of the number of resistances in *E. coli* from cows.

## **5.5. Discussion**

The objective of this paper was to describe risk factors for AMR in dairy farms from Québec, Canada. In this study, we presented univariate analyses between four AMR outcomes and potential risk factors such as disease and treatment rates, farm practices, AMU, and *S. Dublin* seropositivity. Noteworthy, antimicrobial used in the diet of pre-weaned calves was a statistically significant risk factor for three of the four AMR outcomes. Some studies also reported a higher prevalence of resistant bacteria in fecal samples from calves fed with antimicrobials supplemented diet compared to non-supplemented diet (195, 196). However, our data suggested that the impact of this

practice was not limited to calves since the AMR outcomes from lactating cows were also impacted by this practice. The exact implication of this observation was unclear due to limitations of univariate analyses which produce unadjusted estimates. For instance, producers adopting this practice may also adopt a set of other practices that, together, would affect the herd's AMR profile. This matter is a common limitation of any "conventional" analysis such as univariate analyses when studying a complex phenomenon such as AMR on dairy farms. Therefore, even if univariate analyses were presented in this study, drawing conclusions from those analyses should be interpreted with caution. These latter analyses were conducted and presented mainly for appraising strength and direction of the association between each individual putative risk factor and each of the four AMR outcomes. On the other hand, the multivariate analyses used in our study can more readily consider the interplay of the different factors in a holistic way. Therefore, we will focus our discussion mainly on those results, which in our opinion, provide a better description of risk factors for AMR on dairy farms.

Cluster membership was a significant predictor of odds of CTX. We observed that farmers in cluster 2 were high users of ceftiofur for DCT but this situation has likely changed since the beginning of this project. Since February 25<sup>th</sup> 2019, Québec adopted a new legislation restricting in food animals the usage of antimicrobial of very high importance in human medicine (including third-generation cephalosporins such as ceftiofur) (197). Data collection for this study was conducted before this legislation and farms with high usage rate of ceftiofur in the province of Québec are now possibly quite uncommon. Indeed, an important decrease in utilization of very high importance antimicrobials for human medicine has been noted since this 2019 (24). Although cluster 3 regrouping farms with poor animal health status represented a small proportion of farms, they could be important contributors to the AMR problem according to the most important variables of the first dimension identified using the FAMD. Measures should possibly be directed towards this group of farms to decrease their incidence rates of disease and, therefore, possibly reduce the presence of AMR on these farms.

Variables related to diseases and treatment incidence rates (dimension 1) were associated with presence of ESBL/AmpC producing *E. coli* in fecal samples from lactating cows and calves. Those variables could be associated with less than optimal biosecurity measures. It was previously reported that poor hygiene (infrequent cleaning of calf feeding equipment) was a risk factor for excretion of ESBL producing *E. coli* (198). This previous study also reported that utilization of third and fourth generation cephalosporins was a risk factor for the presence of ESBL *E. coli*. Another study reported a relation between the excretion of ESBL/AmpC producing *E. coli* and general AMU on dairy farms (119). However, in our study, the third dimension, which included the general AMU concept, was not significantly associated with presence of ESBL/AmpC producing *E. coli* in fecal samples.

The association of variables linked to animal health status (first dimension), herd size (second dimension) and AMU (third dimension) to the outcome number of resistances in *E. coli* from cows observed in this study may be explained by an increased AMU to control infectious disease in larger herds. Herd size was previously described as an important risk factor for antimicrobial treatment incidence in conventional herds (199). Our group also reported that herd size was positively associated with total AMU rate (15). However, associations with AMR were not reported in those two studies. Another study on cattle farms (including dairy and beef) reported herd size to be a risk factor for AMR in respiratory pathogens (200). However, this correlation between herd size and AMR is not widespread in livestock production. A study in integrated pork production reported that herd size was not associated with either AMU or AMR (201).

Contrary to our initial hypothesis, *S. Dublin* herd status (based on seroprevalence measures) was not among the most important variable of the first three dimensions in the multivariate analysis. This was not associated with any of the four AMR outcomes. A major limitation lied in the low accuracy of the test to detect the disease. The diagnostic strategy used (parallel interpretation of an ELISA test combining bulk milk and serum of up to ten young animals) has a low sensitivity (45%) and specificity (85%) (202). Therefore, in a population with a low *S. Dublin* prevalence, as observed in Québec's herds in 2019

(approximate at 7%), this approach would lead to a positive predictive value of 18% (i.e., positive herd would require complementary tests to confirm status) (202). The potential for cross-reactions with other serotypes is also reported in the test's brochure. Noteworthy, after discussion with public health authorities, one of the positive farms had a *Salmonella* Typhimurium outbreak confirmed by culture and this farm had the highest serology result in milk for *S. Dublin*. Furthermore, none of the farm reported any clinical signs suggesting an outbreak of *S. Dublin*. These limitations likely impaired our ability to observe an association between the *S. Dublin* herd status and its AMR profile.

This cross-sectional study had some limitations. Investigators completed questionnaires with producers and even if they read questions as written, they could exert pressure on producers toward the "correct" answer, but not on the practices currently in place on the farm. Furthermore, the majority of questions targeted events that occurred "during the last year" and a recall bias was likely possible. Establishing the presence of ESBL/AmpC producing *E. coli* from calves was also a challenge. The number of calves available to constitute the calves' samples was not uniform; across all samples the number of calves was zero (3%), one (11%), two (13%), three (12%), four (19%), or five (41%). This could possibly influence the selective protocol used to establish presence of ESBL/AmpC producing *E. coli*. A larger farm with a higher number of pre-weaned calves would possibly have a higher chance to be found positive for the selective protocol, as compared to a small farm with only one calf. However, based on this hypothesis, we could have observed a spurious positive effect of herd size on the odds of retrieving ESBL/AmpC producing *E. coli* in calves. On the contrary, the second dimension (concerning herd size) was not a significant risk factor for any of the AMR outcomes for calves, suggesting a minor impact in this population of herds.

Another important limitation of this study was the timeline between the AMU measurement, the questionnaire administration, and the AMR measures. The temporality of the relationship between predictors and outcomes was difficult to assess and the experimental design did not allow to assess the causal relationship between data. Antimicrobial use and questionnaire responses were collected over a single year, while



AMR were collected at two points during the year. Antimicrobial resistance is a dynamic long-term process that cannot be summarized in a single year's practice at the farm. Furthermore, another aspect that could add to the complexity was the possible transmission of resistant bacteria between farm. A study described the distribution of phylogenetically related resistant *E. coli* strains in different geographic locations (beef cattle farms) (163). A possible transmission of resistant *E. coli* between farms is therefore possible. We previously demonstrated a clonal transmission of resistant bacteria between dairy farms (203). This transmission of resistant bacteria could be a part of the AMR puzzle on dairy farms of Québec.

## **5.6. Conclusions**

In conclusion, this study characterized risk factors associated with multiple AMR outcomes in dairy farms in the province of Québec, Canada. Using unsupervised artificial intelligence analysis, we demonstrated that poor diseases control and high treatments rates, as well as large herd size were significant risk factors for the presence of AMR on farms. Some antimicrobial treatments was also associated with AMR on farms. Targeted measures could be directed toward a better control of diseases to prevent AMR on dairy farms. The AMR on farms is complex and further prospective studies, with particular emphasis on biosecurity measures, are needed to confirm the observations from our study.

## **5.7. Interpretive summary**

Antimicrobial resistance is a concern for animal and public health. This study reported risk factors associated with antimicrobial resistance in 101 commercial dairy farms. Risk factors were associated with the size of the farm, animal disease and treatment rate and the use of certain antimicrobials. Despite the complexity of those risk factors, improvement of animal health and antimicrobial stewardship could help diminish this important phenomenon in dairy farms. However, prospective studies are needed to confirm this observation.

## **5.8. Supplementary materials**

The questionnaire (available in French), the complete R code used for analyses, completed data are provided as Supplemental Files at <https://doi.org/10.5683/SP3/T8JRWO>

## **5.9. Acknowledgments**

This research was supported by a grant from the Agri-Food Innov'Action Program resulting from the Cultivons l'Avenir 2 agreement between the Ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation du Québec and Agriculture and Agri-Food Canada (Project IA 116596 to MA, collaborators SD and DF). A grant from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (RGPIN-191461 to MA) partly supported this work. The leading author (JM) received doctoral scholarships from Fonds de recherche du Québec–Nature et technologies (#258243), the CREATE in milk quality program, and the Regroupement FRQ-NT Fonds de recherche du Québec–Nature et technologies Op+lait. We thank Laurence Desjardins and Sandra Botelho for their technical assistance in the transcription of questionnaires. Finally, we would like to thank all participating dairy farmers for their unconditional help and their involvement in this project.

## 5.10. Tables

**Table 13.** Description of variables included as risk factors for antimicrobial resistance (AMR) on 101 dairy farms in Québec, Canada.

Variables	Descriptive statistics						
	Missing data	% Yes	Mean	Median	Standard deviation	Min.	Max.
<b>Questionnaire</b>							
<i>Farm description and practices</i>							
Quota (kg of fat/day)	0		70	65	30	19	174
Number of animals	0		115	107	46	39	260
Number of employees	0		3.5	3	1.3	1	8
Number of preventive veterinary visits per year	0		16	13	8	0	52
Number of curative veterinary visits per year	0		11	10	9	0	48
Number of animals purchased/100 animals-year	0		2.6	0	5.1	0	26
Number of animals transported/100 animals-year	0		1.2	0	3.3	0	23
Was the herd closed during the last year?	0	55					
Are there any chickens present on the farm?	0	5					
Are pre-weaned calves kept in group?	0	43					
Do pre-weaned calves have outside access?	0	14					
Do pre-weaned calves receive antimicrobials in their diet?	0	8					
Are pre-weaned calves fed with milk containing antimicrobial residues?	0						
No		36					
Unclear <sup>1</sup>		26					
Yes		38					
Are weaned animals fed with medicated feed	0	75					
Percentage of cows treated with antimicrobials at dry-off	0		86	100	31	0	100
Do you use penicillin/novobiocin at dry-off?	0	42					
Do you use cephalosporin at dry-off?	0	33					
Do you use cloxacillin at dry-off?	0	28					
Do you use ceftiofur at dry-off?	0	10					
Do you use any other drying-off antimicrobial?	0	5					
Are teat sealants used on farms at dry-off?	0						
Never		65					
Sometimes		14					
Always		21					
<i>Herd health and antimicrobial practices</i>							
Percentage of animals treated without vet. consult	0		82	85	18	3	100
Number of sick calves/100 animals-year	0		15	12	13	0	67
Number of sick calves treated without veterinary consult /100 animals-year	0		14	11	12	0	63
Number of sick lactating cows/100 animals-year	0		35	31	19	9	114
Number of sick lactating cows treated without vet. consult /100 animals-year	0		29	23	19	0	114
Number of sick animals/100 animals-year	0		53	45	29	11	150
Number of sick animals treated without veterinary consult /100 animals-year	0		44	38	28	3	143

Do you always follow duration of vet. prescription?	0	80				
When you start an antimicrobial, do you follow indication on the bottle or ask the veterinarian for any question?	1	61				
Number of treatments/100 animals-year						
Ceftiofur – injection	0		8.6	6.2	9.1	0 56
Ceftiofur - intramammary - lactating cow	0		3.6	2.5	4.4	0 23
Ceftiofur - intramammary - dry-cow	0		4.5	0	12.1	0 50
Enrofloxacin - injection	0		0.2	0	0.7	0 3.5

### *Producer description and opinions*

Age (in y) of the responding producer	0		44	45	11	20 65
Do you have a good knowledge of categorization of antimicrobials?	0	13				
What percentage reduction in antimicrobials you think could be achieved without impacting the health of herd?						
On your farm	0		14	10	15	0 50
In the province of Québec	4		23	20	17	0 90
Do you know the phenomenon of AMR?	0					
No		10				
A little		43				
Moderately		34				
Very well		14				
Do a future ban on the use of ATM of category 1 could have a negative impact on your farm?	0	58				

### Farms antimicrobial usage by veterinary invoices

Antimicrobial usage rate in DCD <sup>2</sup> /100 cow-year						
Total	0		520	417	367	6 1829
Systemic injection	0		76	57	69	0 360
Ceftiofur - total	0		38	27	46	0 321
Ceftiofur - systemic injection	0		11	6	15	0 108

### *Salmonella* Dublin

Farm had a positive <i>Salmonella</i> Dublin result	0					
No		63				
Yes		14				
Unknown (not tested)		23				

### Outcomes

Calves - Presence of ESBL/AmpC producing <i>E. coli</i> (CTX)	6	76				
Calves - Maximum number of resistances in indicator <i>E. coli</i>	6		3.7	4	2.4	0 9
Cows - Presence of ESBL/AmpC producing <i>E. coli</i> (CTX)	0	35				
Cows - Maximum number of resistances in indicator <i>E. coli</i>	0		0.8	0	1.3	0 5

ATM: Antimicrobial

<sup>1</sup>Questionnaire contained two different questions regarding food of pre-weaned calves with antimicrobial residues. If answers were different between the two questions, this variable was categorized as unclear.

<sup>2</sup> Canadian defined course doses for cattle (DCD) (17)

**Table 14.** Results of univariate logistic (for presence of ESBL/AmpC producing *Escherichia coli* (CTX)) and Poisson regression (for number of resistances in indicator *E. coli*) models describing the unconditional associations between various potential risk factors and four antimicrobial resistance outcomes using data obtained from up to 101 dairy herds in Québec, Canada.

Risk factors	Outcome <sup>1</sup>			
	Cows		Calves	
	CTX OR (95% CI)	Number of resistance IR (95% CI)	CTX OR (95% CI)	Number of resistance IR (95% CI)
<b>Questionnaire</b>				
<i>Farm description and practices</i>				
Quota (for a 30 kg of fat/day increase)	1.0 (0.7 - 1.5)	1.7 (1.4 - 2.0)*	1.4 (0.8 - 2.5)	1.1 (1.0 - 1.2)
Number of animals (for a 50-animal increase)	1.0 (0.6 - 1.6)	1.6 (1.3 - 2.0)*	1.6 (0.8 - 3.2)	Not reported* <sup>2</sup>
Number of employees (for one employee increase)	1.1 (0.8 - 1.5)	Not reported* <sup>2</sup>	1.2 (0.8 - 1.8)	Not reported* <sup>2</sup>
Number of preventive veterinary visits per year (for five visits increase)	1.2 (0.9 - 1.5)	1.2 (1.1 - 1.4)*	1.2 (0.9 - 1.6)	1.0 (1.0 - 1.1)
Number of curative veterinary visits per year (for five visits increase)	1.1 (0.8 - 1.3)	1.0 (0.8 - 1.7)	1.3 (0.9 - 2.0)	1.0 (1.0 - 1.1)
Number of animals purchased /100 animals-year (for one animal increase)	1.1 (1.0 - 1.1)	Not reported* <sup>2</sup>	0.9 (0.8 - 1.0)	Not reported* <sup>2</sup>
Number of animals transported /100 animals-year (for one animal increase)	1.0 (0.8 - 1.1)	Not reported* <sup>2</sup>	1.0 (0.9 - 1.1)	1.0 (1.0 - 1.1)
Was the herd closed during the last year (referent is no)?	3.5 (1.4 - 8.5)*	0.5 (0.3 - 0.8)*	0.7 (0.3 - 2.1)	0.8 (0.6 - 1.0)*
Are pre-weaned calves kept in group?	0.9 (0.4 - 2.0)	1.7 (1.1 - 2.6)*	1.2 (0.4 - 3.5)	0.8 (0.7 - 1.0)
Do pre-weaned calves have access to the outside?	1.5 (0.5 - 4.7)	1.5 (0.9 - 2.7)	0.5 (0.1 - 1.7)	1.2 (0.9 - 1.6)
Do pre-weaned calves have antimicrobials in their diet?	6.6 (1.3 - 35)*	2.0 (1.0 - 3.7)*	Model error <sup>3</sup>	1.4 (1.0 - 2.0)*
Are weaned animals fed with medicated feed (referent is no)?	0.7 (0.3 - 1.9)	3.2 (1.5 - 7.1)*	0.9 (0.3 - 3.2)	1.2 (0.9 - 1.5)
Do you use penicillin/novobiocin at dry-off?	0.3 (0.1 - 0.9)*	0.9 (0.6 - 1.5)	0.5 (0.2 - 1.4)	1.0 (0.8 - 1.2)
Do you use ceftiofur at dry-off?	5.3 (1.3 - 22)*	0.8 (0.3 - 1.8)	0.9 (0.2 - 4.8)	1.2 (0.9 - 1.6)
Are teat sealants use on farms at dry-off?				
Never	Referent	Referent	Referent	Referent

Sometimes	0.9 (0.3 - 3.3)	0.3 (0.1 - 0.8)*	0.4 (0.1 - 1.7)	1.3 (0.9 - 1.7)
Always	2.5 (0.9 - 6.9)	0.4 (0.2 - 0.9)*	0.8 (0.2 - 2.8)	1.3 (1.0 - 1.7)*
<i>Herd health and antimicrobial practices</i>				
Percentage of animals treated without vet. consult (for a 10% increase)	0.4 (0.2 - 1.0)*	0.6 (0.4 - 1.0)	1.0 (0.4 - 3.0)	0.9 (0.7 - 1.1)
Number of sick calves/100 animals-year (for ten animals increase)	1.7 (1.2 - 2.5)*	Not reported* <sup>2</sup>	1.8 (1.0 - 3.3)	1.0 (0.9 - 1.1)
Number of sick calves treated without veterinary consult /100 animals-year (for ten animals increase)	1.8 (1.2 - 2.7)*	Not reported* <sup>2</sup>	2.2 (1.1 - 4.4)*	1.1 (1.0 - 1.2)
Number of sick lactating cow/100 animals-year (for ten animals increase)	Not reported* <sup>2</sup>	1.0 (0.9 - 1.1)	1.6 (1.0 - 2.5)	1.0 (1.0 - 1.1)
Number of sick lactating cow treated without veterinary consult /100 animals-year (for ten animals increase)	Not reported* <sup>2</sup>	1.0 (0.9 - 1.1)	1.7 (1.0 - 2.8)*	1.0 (1.0 - 1.1)
Number of sick animals/100 animals-year (for ten animals increase)	1.4 (1.1 - 1.6)*	Not reported* <sup>2</sup>	1.4 (1.0 - 1.9)*	1.0 (1.0 - 1.1)
Number of sick animals treated without veterinary consult /100 animals-year (for ten animals increase)	1.3 (1.1 - 1.6)*	Not reported* <sup>2</sup>	1.6 (1.1 - 2.3)*	1.0 (1.0 - 1.1)*
Do you always follow duration of veterinary prescription?	1.3 (0.5 - 3.8)	0.3 (0.2 - 0.5)*	0.9 (0.2 - 3.5)	1.4 (1.0 - 1.9)*
When you start an antimicrobial, do you follow indication on the bottle or ask the veterinarian for any question?	0.4 (0.2 - 1.0)*	0.6 (0.4 - 1.0)	1.0 (0.4 - 3.0)	0.9 (0.7 - 1.1)
Number of treatments/100 animals-year (for one treatment increase)				
Ceftiofur - injection	1.0 (1.0 - 1.1)	Not reported* <sup>2</sup>	1.1 (1.0 - 1.3)*	1.0 (1.0 - 1.0)*
Ceftiofur - intramammary - lactating cow	1.1 (1.0 - 1.2)	0.9 (0.8 - 1.0)*	1.0 (0.9 - 1.1)	1.0 (1.0 - 1.0)*
Ceftiofur - intramammary - dry-cow	1.0 (1.0 - 1.1)	Not reported* <sup>2</sup>	1.0 (1.0 - 1.0)	1.0 (1.0 - 1.0)
<i>Producer description and opinions</i>				
Age of the responding producer (for ten-year increase)	1.3 (0.9 - 1.9)	0.8 (0.7 - 1.0)*	1.2 (0.7 - 1.8)	1.0 (0.9 - 1.1)
What percentage of antimicrobials could be reduced on your farm without impacting the health of your herd? (for 5% increase)	0.9 (0.7 - 1.0)	1.0 (0.9 - 1.0)	1.0 (0.8 - 1.2)	Not reported* <sup>2</sup>
Farm antimicrobial usage estimated by vet. invoices				
Real antimicrobial usage rate in DCD <sup>6</sup> /100 cow-year				
Total (for 200 DCD/100 cow-year increase)	1.2 (1.0 - 1.5)	0.9 (0.7 - 1.0)*	1.1 (0.8 - 1.5)	1.0 (1.0 - 1.1)
Systemic injection (for 25 DCD/100 cow-year increase)	1.2 (1.0 - 1.4)*	0.9 (0.8 - 1.0)*	1.0 (0.8 - 1.2)	1.0 (1.0 - 1.1)
Ceftiofur - total (for 15 DCD/100 cow-year increase)	1.2 (1.0 - 1.4)	0.8 (0.7 - 0.9)*	Not reported* <sup>2</sup>	1.0 (1.0 - 1.1)

Ceftiofur - systemic injection (for 5 DCD/100 cow-year increase)	1.2 (1.0 - 1.4)	Not reported* <sup>2</sup>	1.1 (0.9 - 1.4)	1.0 (1.0 - 1.1)*
--	-----------------	----------------------------	-----------------	------------------

*Salmonella* Dublin

Did the farm agree to test for <i>Salmonella</i> Dublin?	0.6 (0.2 - 1.6)	0.7 (0.4 - 1.1)	0.6 (0.2 - 2.3)	0.9 (0.7 - 1.2)
--	-----------------	-----------------	-----------------	-----------------

Was the farm considered positive?

No	Referent	Referent	Referent	Referent
Yes	1.8 (0.5 - 5.8)	2.4 (1.3 - 4.2)*	0.9 (0.2 - 3.9)	1.1 (0.8 - 1.5)
Unknown (not tested)	1.8 (0.7 - 4.9)	1.8 (1.1 - 3.1)*	1.6 (0.4 - 6.4)	1.1 (0.8 - 1.4)

OR: Odds ratio; IR: Incidence ratio

\* The risk factor was statistically significant (p<0.05) for the corresponding outcome

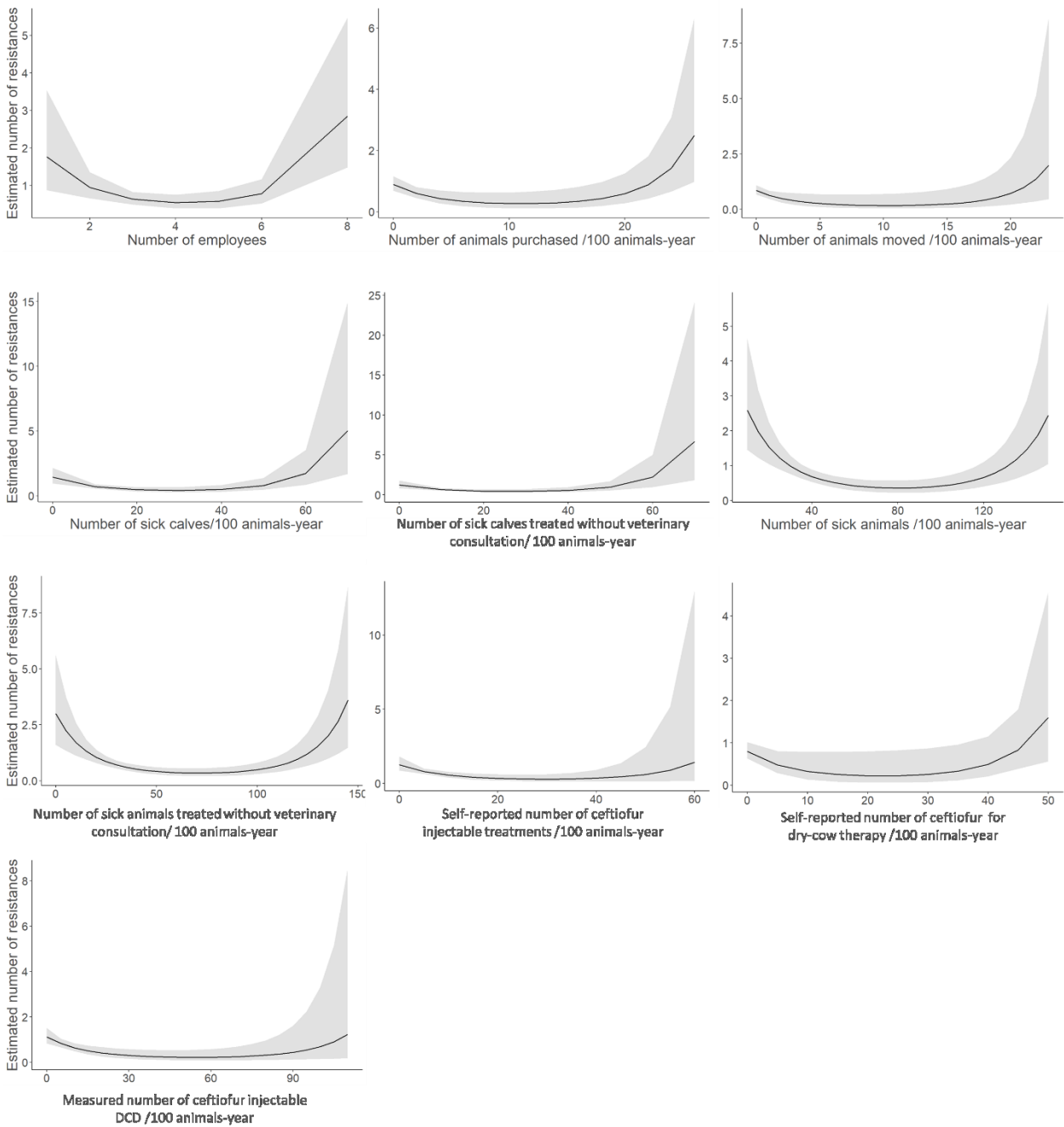
<sup>1</sup>Four outcomes were tested for each predictor: CTX (Cefotaxim), *Escherichia coli* recovered in a selective medium with a third-generation cephalosporin in at least one *E. coli* from two fecal samples from lactating cows or pre-weaned calves; Number of resistances, the highest number of class resistance among *E. coli* from two fecal samples from lactating cows or pre-weaned calves.

<sup>2</sup>A set of second-degree polynomial terms was significant for those predictors and the relationship with the outcome was, therefore, non-linear. Therefore, the OR or the IR are not presented in this table and the relationship are instead illustrated in Figures 28 to 30.

<sup>3</sup>The solution could not be found with a logistic regression and a Fisher's exact test was used instead. This latter test was not statistically significant.

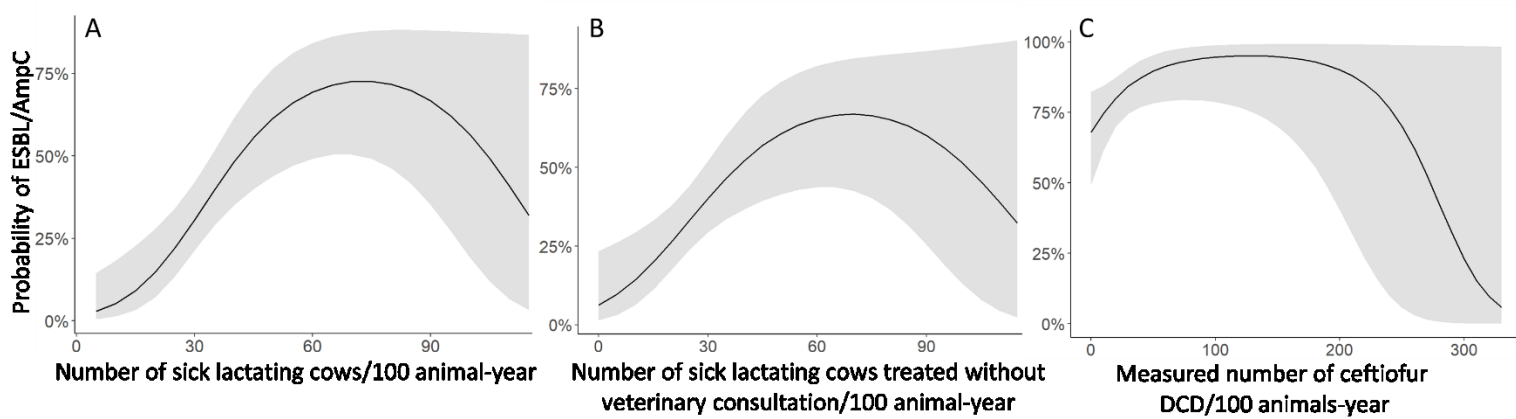
<sup>4</sup>Canadian defined course doses for cattle (DCD) (17)

## 5.11. Figures

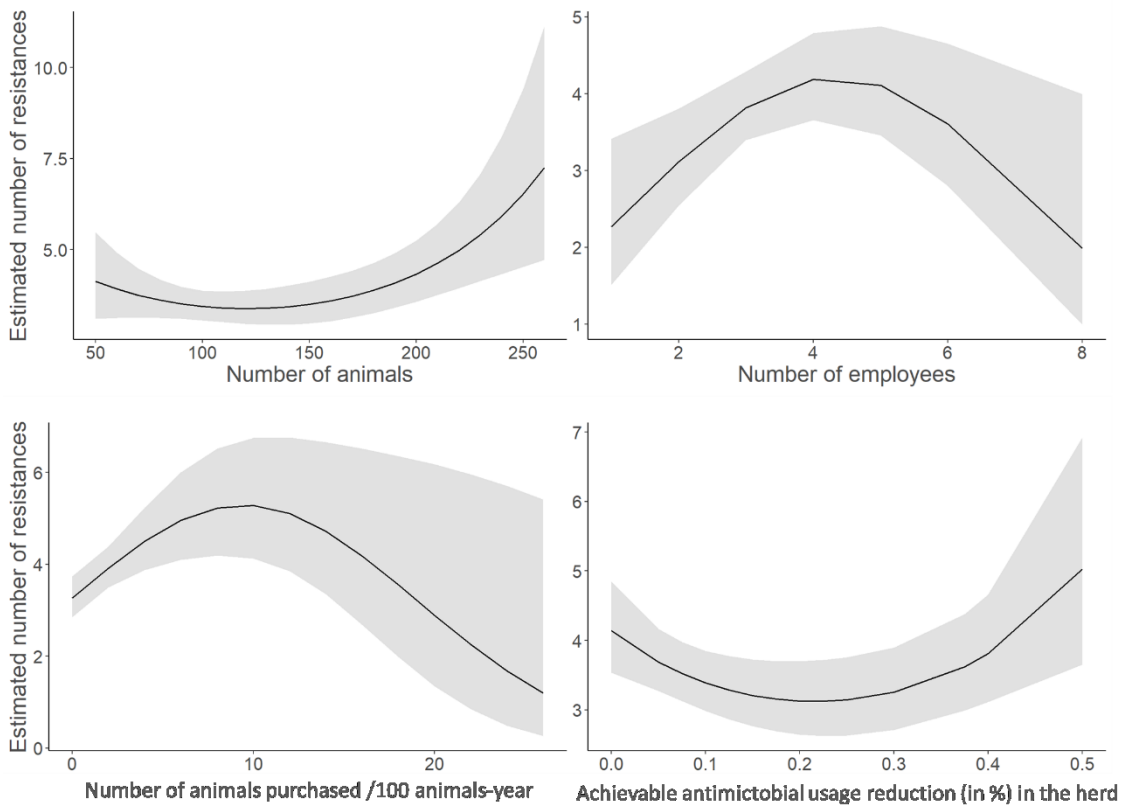


**Figure 28.** Estimated relationships between the estimated number of resistances in sentinel *Escherichia coli* from fecal samples of lactating cow and multiple risk factors. Estimates were obtained from a Poisson regression model using data from 101 dairy herds in Québec, Canada. DCD: Canadian defined course doses for cattle (17)





**Figure 29.** Estimated relationships between the probability of the presence of ESBL/AmpC producing *Escherichia coli* in fecal samples from (A and B: cow and C: calf) and risk factors. Estimates were obtained from a logistic regression model using data from up to 101 dairy herds in Québec, Canada. DCD: Canadian defined course doses for cattle (17)



**Figure 30.** Estimated relationships between the estimated number of resistances in sentinel *Escherichia coli* from pre-weaned calves' fecal samples and risk factors. Estimates were obtained from a Poisson regression model using data from up to 101 dairy herds in Québec, Canada.



Estim. Achiev.ATM.reduc.farm: Percentage reduction in antimicrobials achievable without impacting the health of herd in your farm;

Restr.ATM.impacts: Do restriction of category I ATM could have a negative impact on your farm;

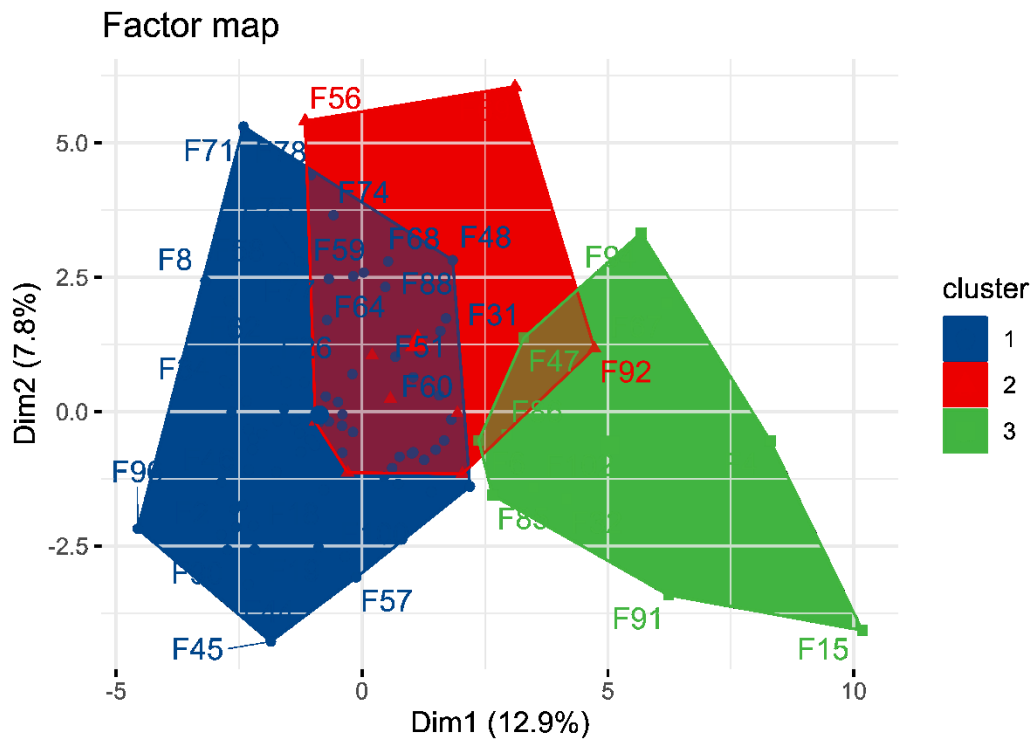
AMR. Knowledge: Knowledge of the AMR phenomenon;

Weaned anim. Medic. Diet: Are weaned animals fed with medicated feed;

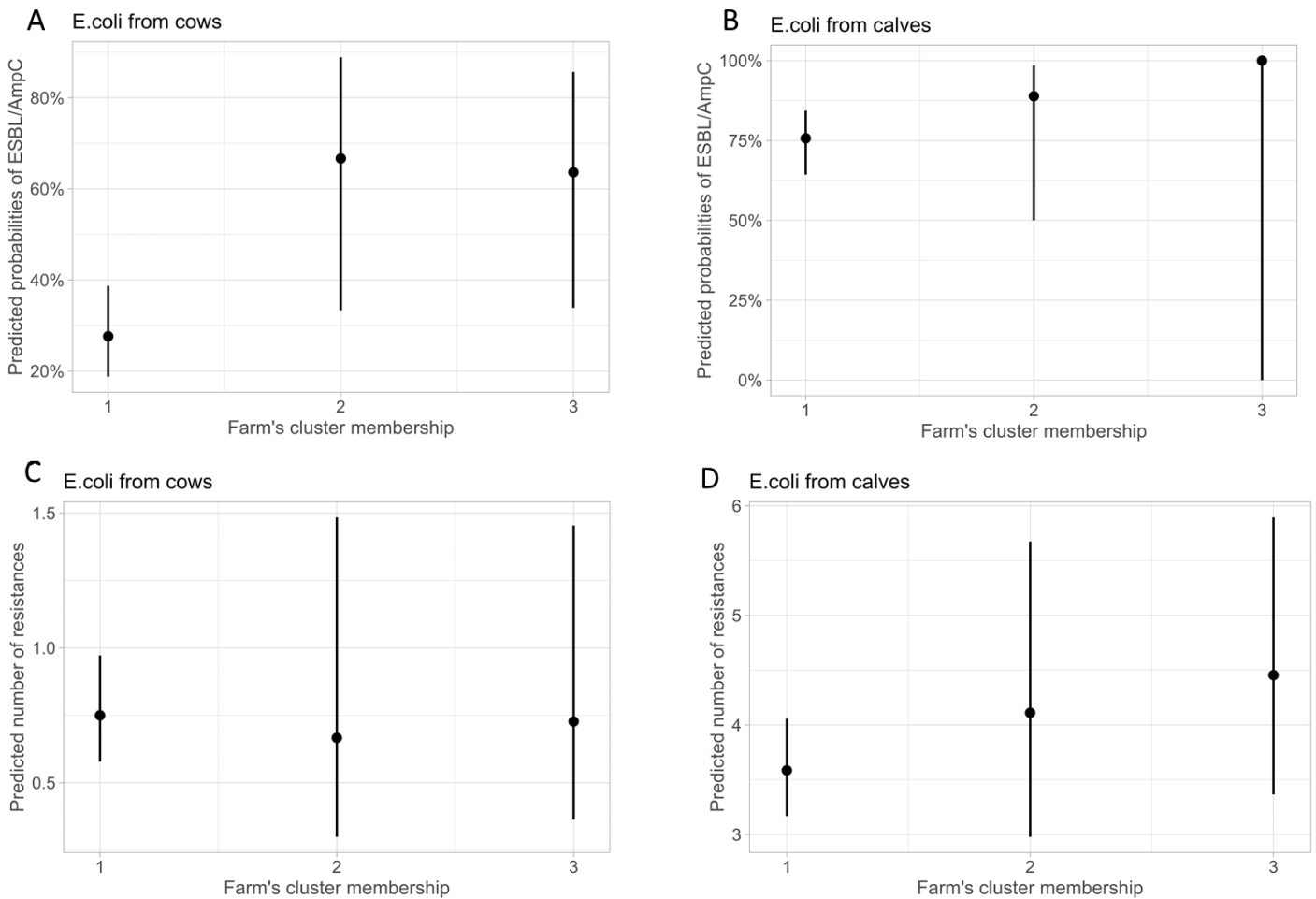
Follow.label.WO.vet.prescr: When you start an antimicrobial, do you follow indication on the bottle;

Treat.presc.duration: Do you always follow duration of veterinary prescription;

ATM class knowledge: Knowledge of categorization of antimicrobials.



**Figure 32.** Clusters of farms according to the first two dimensions of the Factor analysis of mixed data from 96 dairy herds in Québec, Canada. Dimension 1 represented mainly the concept " animal health status ". Dimension 2 represented mainly the concept "herd size".



**Figure 33.** Predicted probabilities for the presence of ESBL/AmpC producing *Escherichia coli* (*E. coli*) in fecal samples from cows (A) and calves (B) and predicted number of resistances in *E. coli* in fecal samples from cows (C) and calves (D) as function of cluster membership in up to 96 dairy herds in Québec, Canada.

Clusters membership was determined using hierarchical clustering based on factor analysis of mixed data. Cluster 1 was mainly composed of farms with healthy animals, low diseases and treatments incidence rates and low usage of ceftiofur, cluster 2 was composed on farms that were relatively high ceftiofur users, and farm from cluster 3 were farms with higher incidence of diseases and high antimicrobial treatment rates.

## **Chapitre 6 – Discussion**

La RAM est un problème de santé publique mondial avec des répercussions importantes en médecine vétérinaire et humaine. Pour lutter contre celle-ci, il est important d'avoir des organismes de surveillance fiables et viables afin de suivre l'évolution de cette problématique chez les humains, les animaux et dans l'environnement. L'objectif de cette thèse était de contribuer à combler une lacune dans les systèmes de surveillance canadien et québécois qui ne présentaient pas la situation de la RAM sur les fermes de bovins laitiers au Québec. En plus de déterminer la prévalence de la RAM, cette thèse a caractérisé celle-ci au niveau génétique en plus de décrire certains facteurs de risque associés à cette problématique. Cependant, certains points de discussion ou certaines limites importantes n'ont pas été abordés jusqu'à maintenant, en plus des perspectives futures que cette thèse soulève.

## 6.1. Discussion générale des résultats présentés

D'après la littérature et les résultats présentés dans cette thèse, les veaux pré-sevrage sont les bovins les plus grands excréteurs de *E. coli* résistant aux antimicrobiens. Cette situation ne serait pas unique aux bovins laitiers. D'après un examen de la portée (scoping review) pour toutes les espèces animales (204), une diminution de la RAM pour les bactéries fécales était notée avec l'augmentation de l'âge des animaux pour la majorité des études sur les bovins de boucherie, les porcs, en plus des bovins laitiers. Cette observation était indépendante de la région géographique. Cependant, les résultats n'étaient pas uniformes pour la volaille. Pour le chien, seulement deux études étaient disponibles et les conclusions étaient contradictoires. La situation demeure donc inconnue pour cette espèce animale. Du côté humain, certaines études mentionnent que les enfants en bas âge seraient porteurs de plus de bactéries résistantes aux antimicrobiens par rapport à d'autres groupes d'âge. Par exemple, une étude (205) a noté que les enfants de 6 semaines avaient significativement plus de *E. coli* fécaux résistants à l'ampicilline, au triméthoprim-sulfamide, à la céphalotine et à l'acide nalidixique par rapport aux enfants de 6 à 17 ans. Cette observation est d'autant plus étonnante que les plus jeunes enfants ont reçu un nombre bien moins élevé de traitements antimicrobiens. Une seconde étude sur des patients au Royaume-Uni (206) a noté une différence concernant la résistance des bactéries isolées selon l'âge pour l'amoxicilline, l'amoxicilline-acide



clavulanique, la ciprofloxacine et les bactéries productrices de BLSE. La prévalence élevée en bas âge diminue à l'âge adulte pour ensuite augmenter lorsque le patient devient très âgé. Une troisième étude portant sur le résistome (207) a établi que les enfants de 6 semaines avaient un peu plus de 4 fois le taux des marqueurs des gènes de RAM par rapport aux enfants d'un an. Malheureusement, il ne semble pas y avoir de revue de littérature sur le sujet et il est difficile d'établir un portrait de la situation dans son ensemble chez l'humain. Bref, la diminution de l'excrétion de bactéries résistantes avec l'âge est observée chez les bovins, les porcs et possiblement chez les humains. Malheureusement, il n'est pas possible d'avoir une explication claire et précise sur la cause d'un tel phénomène.

Les résultats concernant la présence de *E. coli* producteur de BLSE/AmpC présenté dans les trois articles de cette thèse sont basés sur un protocole sélectif européen utilisant la céfotaxime (céphalosporine de 3<sup>e</sup> génération). Cependant, il existe d'autres protocoles dans la littérature comme celui qui utilise la ceftriaxone (208). La décision de prendre le protocole européen plutôt qu'un autre est basée sur la facilité d'accès à ce protocole, la clarté de celui-ci, les souches contrôles facilement accessibles, ainsi qu'une standardisation par le laboratoire de référence européen pour la RAM. Ce protocole est déjà mis en place dans plusieurs organismes de surveillance européens et il est ainsi facile de comparer les données entre elles. Cependant, les auteurs du protocole européen (209) mentionnent certaines limites de celui-ci comme la possibilité de ne pas détecter les producteurs d'OXA-48 et OXA-48-like responsables de résistance aux carbapénèmes. Le document de référence décrit un protocole supplémentaire qui doit être complété afin de détecter ces enzymes. Ce protocole supplémentaire n'a pas été réalisé dans le cadre de cette thèse, mais il n'est pas considéré comme important puisqu'aucune résistance envers le méropénème (carbapénème) n'a été détectée au niveau phénotypique (*cf.* article 1) ou génotypique (*cf.* article 2). De plus, ce type de résistance (carbapénémase) n'a pas été détecté dans aucun des pays rapportant des données sur la RAM pour les bovins en Europe (89).

Un protocole sélectif a été utilisé pour détecter la présence de *E. coli* résistant aux céphalosporines de 3<sup>e</sup> génération, mais aucun protocole sélectif n'a été réalisé pour les

fluoroquinolones, qui sont également une classe d'antimicrobien de très haute importance en médecine humaine selon Santé Canada. Est-ce que l'ajout d'un tel protocole aurait été pertinent dans le projet actuel? Je pense que non; le développement de la résistance pour les fluoroquinolones est un processus qui s'effectue par étape (cf. 1.2.3.6 – Particularité pour les fluoroquinolones) et plusieurs mutations et mécanismes de résistance sont nécessaires afin d'obtenir un haut niveau de résistance (cf. Figure 28 de l'article 2). Ainsi, il serait difficile d'établir une concentration précise de l'antimicrobien dans les milieux sélectifs pour déterminer le type de résistance qui doit être détecté. De plus, ce type de résistance peut se développer rapidement en laboratoire. Il a été possible d'observer des souches de *Salmonella* développant une diminution de la susceptibilité envers plusieurs fluoroquinolones après quelques jours lorsque la bactérie était en contact avec de faibles concentrations de fluoroquinolones (210). Il serait donc possible de créer une résistance *de novo* qui n'était pas dans l'échantillon au départ et qui serait associée à un artéfact de laboratoire. Contrairement au protocole sélectif pour les céphalosporines, il n'existe pas de protocole uniforme disponible au niveau international. De plus, la résistance aux fluoroquinolones était peu fréquente dans les échantillons prélevés pour ce projet (cf. Article 1) et la quantité utilisée de fluoroquinolones chez les bovins laitiers au Québec durant cette période était marginale (15). Bref, il y a de nombreux arguments qui soutiennent la pertinence de ne pas utiliser un milieu sélectif pour détecter une résistance envers les fluoroquinolones.

La co-sélection est définie comme une proximité physique entre des gènes de résistance qui, à la suite d'une sélection de l'un de ceux-ci, entraîne la persistance de tous les gènes de résistances présents dans le groupe (1). Il a été rapporté que l'utilisation d'antimicrobiens en médecine vétérinaire, comme la tétracycline ou les sulfamides, peut entraîner la persistance de la résistance pour des antimicrobiens critiques en médecine humaine pourvu que les gènes soient situés sur le même élément génétique (211). Cette situation hypothétique a été observée pour les troupeaux de bovins laitiers de cette étude. Des gènes codant pour une résistance à la tétracycline (*tet(A)*) et aux sulfamides (*su2*) étaient situés à proximité d'un gène codant pour une résistance aux céphalosporines de 3<sup>e</sup> génération (*bla<sub>CMY-2</sub>*) (cf. article 2). Ainsi,

il serait possible que l'utilisation d'antimicrobiens de catégorie III (tétracycline, sulfamides) sélectionne et maintienne de la résistance pour les antimicrobiens de catégorie I (ceftiofur) dans la population bactérienne des bovins laitiers. Cependant, les données obtenues concernant l'utilisation des antimicrobiens pour les troupeaux du projet démontrent que la plupart des antimicrobiens utilisés dans les fermes étaient utilisés par voie intra-mammaire (lactation ou tarissement) (15). La co-sélection décrite plus haut est peu probable dans ce cas puisqu'il n'existe pas de traitement de tétracycline ou de sulfamide avec une homologation pour une injection intra-mammaire chez les bovins. Seules des  $\beta$ -lactamines sont homologuées pour une utilisation par cette voie d'administration (cf. 1.1.5.1 - Antimicrobiens homologués). Dans ce dernier cas, la résistance croisée, qui correspond à un mécanisme conférant de la résistance envers toute une classe d'antimicrobiens, pourrait être responsable du maintien de certains gènes associés à de la résistance envers les céphalosporines de 3<sup>e</sup> génération. Par exemple, l'utilisation de la céphapirine (céphalosporine de 1<sup>re</sup> génération), disponible dans un produit intra-mammaire, pourrait sélectionner un gène (*bla<sub>CMY-2</sub>* ou *bla<sub>CTX-M</sub>*) conférant de la résistance pour le ceftiofur chez les bactéries. Malheureusement, l'exemple des produits intra-mammaires n'est pas parfait puisque l'impact précis de cette voie d'administration sur la sélection de bactéries dans le microbiome intestinal est incertain chez la vache adulte. Les produits antimicrobiens injectables sont moins fréquemment utilisés chez les bovins laitiers (15), mais leurs impacts sur le microbiome intestinal seraient plus importants. En résumé, la co-sélection et la résistance croisée sont des phénomènes inquiétants pour le maintien de la RAM dans la population bactérienne intestinale. L'impact réel est malheureusement difficile à prévoir au niveau des troupeaux, mais ces phénomènes suggèrent que la diminution de l'utilisation des antimicrobiens de catégorie I uniquement n'est peut-être pas suffisante pour diminuer la résistance envers les antimicrobiens de catégorie I. Il faut encourager une diminution globale et une meilleure utilisation des antimicrobiens dans les élevages pour tenter de limiter la RAM dans son ensemble.

La polymyxine B, qui est un antimicrobien de très haute importance en médecine humaine selon Santé Canada, n'a pas été abordée dans aucun des articles présentés dans cette thèse.

Bien que cet antimicrobien ne soit plus disponible commercialement pour traiter les bovins laitiers au Canada, celui-ci était disponible au moment où le projet a débuté en 2018. Il était largement utilisé dans les troupeaux de bovins laitiers québécois tel que mesuré par Hélène Lardé et collaborateurs (15). Il était le 5<sup>e</sup> antimicrobien le plus utilisé parmi toutes les classes d'antimicrobiens et était le premier parmi les antimicrobiens de catégorie I de Santé Canada. Cet antimicrobien était homologué en formulation intra-mammaire pour le traitement de mammite clinique. Cette formulation est administrée localement dans la glande affectée et est considérée avoir peu ou pas de diffusion systémique. Une injection de polymyxine B dans un quartier sain ou dans un quartier affecté par une inflammation chronique n'entraîne pas une distribution systémique de l'antimicrobien (212). Par contre, une inflammation aiguë (causé par une injection d'endotoxine dans le quartier) entraîne une distribution systémique d'une partie de l'antimicrobien (212). Il est donc possible qu'il y ait un impact sur le microbiome intestinal des animaux traités lors d'une mammite clinique sévère par de la polymyxine B par la voie intra-mammaire. Il serait donc possible qu'il y ait une excrétion fécale de *E. coli* résistant à la polymyxine B. Il n'a malheureusement pas été possible de tester cet antimicrobien à l'aide des plaques commerciales utilisées puisque celles-ci ne le contenaient pas. La méthode pour tester cet antimicrobien est laborieuse en laboratoire (213) et il existe uniquement un seuil clinique humain pour les *Enterobacterales* qui permet de départager une souche intermédiaire ( $\leq 2\mu\text{g/ml}$ ) d'une souche résistance ( $>2\mu\text{g/ml}$ ) pour la polymyxine B. Ce seuil est également utilisé pour une molécule semblable à cette dernière soit la polymyxine E (colistine) (77). Toutes les souches sont considérées comme intermédiaires par défaut puisque les données cliniques, pharmacodynamique et pharmacocinétique démontrent que ces deux antimicrobiens ont une efficacité clinique limitée lorsqu'ils sont utilisés seuls. Il est recommandé de combiner le traitement avec un autre antimicrobien. De plus, il n'y a pas de seuil épidémiologique disponible pour ces deux antimicrobiens. Dans le cadre des travaux de cette thèse, tous les résultats intermédiaires sont inclus avec les résultats résistants et il y aurait eu une aberrance dans l'analyse puisque tous les isolats seraient résistants par défaut. Par contre, pour avoir une idée générale des CMI, la polymyxine B et E ont été testés avec des plaques faites maisons pour ce projet de façon exploratoire. Afin de limiter le nombre d'isolats

à tester, seule une portion des isolats provenant de veaux (isolats avec un patron de résistance plus important) ont été testés. Les résultats n'ont pas été présentés dans cette thèse jusqu'à maintenant, mais la distribution des CMI était semblable à une population sauvage (une seule courbe normale) (Annexe 2). De plus, parmi les isolats séquencés du second article, aucun de ceux-ci ne possédait de gène de résistance conférant de la résistance à la polymyxine. Ces gènes recherchés incluent le gène transférable par plasmide (*mcr*) codant pour une phosphoéthanolamine transférase qui modifie le lipide A du LPS des bactéries à Gram négatif pour le rendre plus cationique (213). Bref, il est théoriquement possible d'avoir une excrétion fécale de *E. coli* résistant à la polymyxine B à la suite d'une utilisation intra-mammaire de cet antimicrobien. Cependant, d'après les résultats obtenus au niveau des CMI testées et des gènes de résistances recherchés, cet aspect est considéré comme négligeable.

## 6.2. Limites du projet

La bactérie *E. coli* est reconnue comme un agent pathogène important autant chez les animaux que les humains. Cette pathogénicité est apportée par un nombre important de gènes de virulence. Même si les données étaient disponibles (données de séquençage du génome entier), la recherche de gène de virulence n'a pas été explorée dans le cadre de cette thèse. Cet aspect n'était pas dans les objectifs définis pour celle-ci ni dans les objectifs de l'article de séquençage correspondant (*cf.* article 2). Cependant, il s'agit d'une limite pour cet ouvrage puisque cela pourrait aider à comprendre pourquoi des souches clonales résistantes ont été observées à travers les fermes du projet. Peut-être qu'un gène de virulence pourrait favoriser la distribution d'une souche résistante à plusieurs antimicrobiens. Il a déjà été observé qu'un clone à haut risque possédait des gènes de virulence et des gènes de résistances chez les porcs au Québec (164). Bref, il aurait été intéressant d'étudier la présence de gènes de virulence, mais cet aspect sort du cadre de cette thèse.

L'utilisation de *E. coli* comme bactérie indicatrice de la RAM peut être considérée comme une limite. Même si le choix de cette bactérie est pertinent et logique, elle ne représente pas le système digestif dans son ensemble. Bien qu'il soit impossible d'avoir un portrait global de la

situation, le séquençage du génome entier des matières fécales dans son ensemble permettrait d'avoir une meilleure idée de la RAM de toutes les bactéries dans un échantillon (concept appelé résistome). Au début du projet, cette perspective n'était pas encore bien décrite et, à ce jour, il existe encore des limites concernant son application. Il s'agit d'une description de matériel génétique sans information supplémentaire concernant la viabilité des microorganismes. Si un gène de résistance est identifié par cette technique, il n'est pas possible de l'associer à un microorganisme vivant, ni de s'assurer que celui-ci est réellement exprimé (par de la résistance phénotypique). Bref, l'utilisation de *E. coli* comme bactérie indicatrice de résistance présentée dans cette thèse n'est pas parfaite, mais toutes les techniques ont leurs propres limites pour quantifier la RAM.

Le choix des seuils est également une limite de cette thèse. Les seuils cliniques ont été utilisés comme référence pour les trois articles de cette étude qui est plutôt de type épidémiologique. Dans ce cas, pourquoi avoir choisi des seuils cliniques plutôt que des seuils épidémiologiques? La principale raison est purement pour des fins de comparaison; les études et les organismes de surveillance nord-américains prennent les seuils cliniques du CLSI comme référence dans la grande majorité des publications. De plus, les résultats présentés sont facilement utilisables par les utilisateurs (ex. : producteurs, médecins vétérinaires) qui ont normalement des résultats avec des seuils cliniques. Au niveau théorique, il aurait été préférable d'utiliser les seuils épidémiologiques pour les travaux de cette thèse. Bien qu'il y ait une différence importante entre les définitions des deux seuils, celle-ci n'est pas majeure au niveau des données obtenues. Pour l'article 1, il n'y avait pas de différence importante entre le pourcentage de prévalence lorsque l'on utilise un seuil plutôt qu'un autre (résultats non présentés). Au niveau de l'article 2, la différence observée pour la RAM ne dépasse pas 10% si l'on compare les deux seuils, mais il n'y avait pratiquement pas de différence pour la sensibilité, la spécificité et pour l'accord général entre le phénotype et les gènes de résistances lorsque l'on compare les deux seuils (cf. article 2). Bref, il aurait peut-être été préférable de présenter les données avec un seuil épidémiologique dans le cadre de cette thèse, mais l'impact est considéré comme faible puisqu'il n'y avait pas une grande différence entre les

deux seuils. Par conséquent, l'impact sur l'analyse des facteurs de risque de l'article 3 est considéré comme mineur. Il est également important de garder en tête que les seuils sont une approximation générale de la réalité pour départager s'il y a résistance ou non chez une bactérie. La situation est parfois bien plus complexe au niveau de l'interaction entre la bactérie, l'antimicrobien et l'hôte.

La mise en commun (pool) des échantillons fécaux des animaux limite l'interprétation par rapport au prélèvement d'un animal individuel. Au départ, il était prévu d'isoler 5 *E. coli* par pool pour un total de 3 000 isolats. Par contrainte budgétaire, un seul *E. coli* a finalement été isolé de chacun de ces pools pour être caractérisé pour un total d'environ 600 isolats. Il aurait été plus simple de prélever un seul animal de façon aléatoire et d'isoler un seul *E. coli* indicateur de cet échantillon. Il aurait été possible d'associer des données spécifiques (âge exact, nombre de traitements antimicrobiens reçu, nombre de lactations, etc.) à cette bactérie et de faire une analyse spécifique selon les caractéristiques de l'individu.

Par contre, il y a un avantage pour l'analyse par pool en regard du protocole sélectif pour la recherche de *E. coli* producteur de BLSE/AmpC. Selon les résultats de cette thèse, il y avait une différence significative (test de chi-carré,  $p < 0,05$ ) pour les résultats du protocole sélectif si l'échantillon de fumier des veaux contenait un seul animal ou plus d'un animal dans le pool (un veau : 14 négatifs et 8 positifs; pool de 2 à 5 veaux : 58 négatifs et 115 positifs). Par contre, il est difficile d'interpréter les résultats du protocole sélectif selon le nombre précis de veaux dans le pool (Annexe 3). Certaines fermes ( $n = 6$ ) n'avaient aucun veau lors de l'une ou des deux visites d'échantillonnage. Parmi celles-ci, 4 (67%) étaient positives pour le protocole sélectif au niveau du troupeau alors que l'ensemble des fermes était de 85%. Malheureusement, il est difficile de comparer ces pourcentages à cause du faible nombre de fermes dans le premier groupe. Celui-ci était constitué des petites exploitations (3 de ces fermes possédaient les plus petits troupeaux du projet). En théorie, une petite ferme serait un possible facteur protecteur pour la présence de *E. coli* producteur de BLSE/AmpC dans les fèces des veaux pré-sevrage. Cependant, selon l'article 3, la taille du troupeau n'est pas un facteur de risque pour la RAM observée chez les veaux pour les *E. coli* producteur de BLSE/AmpC. Cette

observation au niveau du pool des veaux entraîne une certaine limite pour les conclusions de l'article 1 concernant le pourcentage des fermes avec la présence d'au moins un *E. coli* producteur de BLSE/AmpC. Nous avons rapporté que 85% des fermes étaient positives pour ce protocole sélectif. Bien que ce chiffre soit très élevé, il s'agit vraisemblablement d'une sous-estimation puisque parmi les fermes considérées négatives (n=15), certaines fermes (n=6) avaient 0 ou 1 veau dans l'un des pools lors de l'échantillonnage.

Une autre limite est l'échantillonnage de la fosse à fumier qui était très variable selon la ferme. Lors de la collecte, certaines fosses étaient liquides, gelées, vides, pleines, non accessibles, etc. Ce manque de standardisation pour cet échantillon pourrait avoir un impact important sur les données obtenues. Par contre, cet échantillon était utilisé pour avoir une approximation de la portion environnementale de la RAM à la ferme et celle-ci est fortement influencée par les conditions météorologiques. Il s'agit donc d'une limite mineure puisque cet échantillon est représentatif de ce que les bactéries fécales subissent avant leur épandage dans l'environnement.

Pour l'article 3, il y avait une limite particulière concernant le lien entre le type d'utilisation d'un antimicrobien (durée du traitement, voie d'administration) et la RAM qui n'a pas été établie. Seuls les taux d'utilisation globaux d'antimicrobien ainsi que l'utilisation du ceftiofur ont été incluses comme facteurs de risque de la RAM. Les données obtenues à la ferme concernant la RAM représentent l'ensemble des animaux sur la ferme et il est impossible d'établir un lien précis entre un traitement particulier et la RAM pour un animal en particulier. Des études antérieures ont noté que certains traitements peuvent avoir un effet sur le microbiome intestinal. Par exemple, l'injection intra-mammaire de pirlimycine avait un effet sur le microbiome intestinal des génisses en début de lactation (214). Ce changement était rétabli peu de temps après l'arrêt de l'antimicrobien. Le temps de traitement aurait également un impact, puisque le changement observé dans le microbiome intestinal demeurait en place plus longtemps lorsque le traitement était allongé (214). Malheureusement, cette dernière étude n'incluait pas la portion concernant la RAM. En résumé, l'utilisation précise des antimicrobiens en lien avec la présence de RAM au niveau intestinal est intéressante, mais n'a



pas été établie dans le cadre de cette thèse. Ce type de recherche sort du contexte des présents travaux puisque l'objectif était limité au niveau de la ferme et non de l'animal individuel.

### 6.3. Perspectives futures

Premièrement, la nouvelle réglementation de 2019 encadrant l'utilisation des antimicrobiens de catégorie I chez les animaux de production ajoute un aspect des plus intéressants puisqu'il sera possible de faire un suivi de l'évolution de la RAM suite à cette réglementation pour le secteur des bovins laitiers au Québec. Il a d'ailleurs déjà été démontré que, suite à cette réglementation, il y a eu une diminution importante de la vente des antimicrobiens de catégorie I, et ce, sans augmentation de l'utilisation des autres antimicrobiens (24). Une étude sur la prévalence de la RAM a également démontré une diminution significative de *E. coli* multirésistants au niveau de la ferme entre les résultats présentés dans cette thèse et un échantillonnage après la réglementation (182). Cette dernière étude n'a pas démontré de différence pour la RAM des *E. coli* au niveau de l'échantillonnage spécifique (veaux, vaches et fosses à fumier) ou avec la procédure sélective pour les *E. coli* producteurs de BLSE/AmpC. En résumé, bien que la quantité d'antimicrobiens de catégorie I ait diminué, la situation pour la RAM a peu changé. Cependant, le délai est très court entre les deux périodes (environ 4 ans) et il sera intéressant de suivre cette situation à plus long terme. Il faut être prudent par rapport aux attentes d'une diminution importante de la RAM à la suite d'un retrait ou une diminution de l'utilisation de certains antimicrobiens. Au Canada, une situation bien particulière a marqué les esprits au début des années 2000 concernant l'utilisation du ceftiofur chez les poulets et la RAM associée pour des *Salmonella*. Une forte corrélation a été observée entre des *Salmonella* Heidelberg résistants au ceftiofur retrouvés sur de la viande de poulets et des *Salmonella* Heidelberg isolés à partir d'infections humaines au Canada. À la suite de cette observation, l'industrie avicole a décidé de faire un retrait volontaire de l'utilisation du ceftiofur qui était administré *in ovo* pour prévenir les infections opportunistes chez les poulets. Quelques années plus tard, une diminution importante de la résistance envers le ceftiofur était observée chez des souches de *Salmonella* aviaires et humaines (215). Cette corrélation temporelle apparente

de cause à effet n'est pas une règle générale ou un gage de réussite à tout coup. Cette thèse a démontré la complexité de la situation concernant la RAM dans les troupeaux de bovins laitiers québécois. Les veaux pré-sevrage sont fortement excréteurs de bactéries résistantes alors qu'ils ne sont pas exposés à beaucoup d'antimicrobiens, la co-sélection entre certains gènes de résistances, la présence de clones résistants retrouvés dans plusieurs fermes et la santé du troupeau, rapporté comme facteur de risque pour la présence de RAM à la ferme, démontre qu'il s'agit d'une situation complexe. L'encadrement de l'utilisation des antimicrobiens de catégorie I chez les animaux de production est un pas dans la bonne direction, mais un suivi à plus long terme sur les fermes est nécessaire pour suivre l'évolution complexe de la RAM. De plus, il serait également pertinent d'inclure une recherche spécifique pour les *E. coli* producteurs de BLSE/AmpC dans les programmes de surveillance.

Deuxièmement, cette thèse a démontré le transfert clonal de souches résistantes entre des fermes situées sur une longue distance l'une de l'autre. Des investigations supplémentaires seraient nécessaires pour savoir comment ces clones ont été transférés entre les fermes. Il s'agit d'un défi complexe et plusieurs hypothèses ont été soulevées dans la discussion spécifique de l'article 2 (oiseaux migrateurs, transports d'animaux, personnes se déplaçant entre les fermes). En déterminant des facteurs de risque associés à cette dissémination, il serait possible de limiter la propagation de cette résistance entre les troupeaux de bovins laitiers au Québec. De plus, selon les facteurs mis en cause, il serait possible d'appliquer ces mesures préventives à d'autres secteurs de production ou pour d'autres provinces ou pays.

Troisièmement, en support de la littérature déjà publiée, il a été démontré que les veaux pré-sevrage sont fortement excréteurs de *E. coli* résistants aux antimicrobiens. Les organismes de surveillances actives concentrent leurs efforts d'échantillonnage à l'abattoir ainsi que dans plusieurs fermes sentinelles pour plusieurs types de production. Il serait peut-être pertinent d'inclure les jeunes animaux dans ces méthodes d'échantillonnage. Au niveau du programme de surveillance canadien (PICRA), les résistances observées étaient proches de 0% pour de nombreux antimicrobiens chez les bovins à l'abattoir et il est statistiquement difficile de quantifier l'impact de certaines mesures lorsque la prévalence de RAM est très faible. En

incluant des bactéries provenant des veaux, ce seuil serait plus élevé et il serait plus facile de valider si certaines mesures ont des impacts dans le temps sur la RAM chez les bovins (laitier et boucherie). Cependant, l'impact de ces jeunes animaux sur la quantité totale de bactéries résistantes à la ferme est incertain. Même si les veaux pré-sevrage excrètent une quantité beaucoup plus importante de *E. coli* résistants par rapport aux animaux adultes, la contamination de l'environnement de la ferme est faible puisque qu'il y a peu de ce type d'animaux sur les fermes et que la quantité de fumier excrétée est moindre par rapport aux animaux adultes. D'ailleurs, les résultats présentés dans l'article 1 sur la prévalence de la RAM démontrent que le profil de résistance des *E. coli* dans la fosse (représentant l'environnement ou la contamination de l'environnement) est semblable au profil retrouvé chez les vaches en lactation. D'un autre côté, contrairement aux animaux adultes, les jeunes veaux sont plus susceptibles à des infections bactériennes systémiques (septicémie, omphalite, arthrite, diarrhée) qui peuvent être causées par des *E. coli* pathogènes ou opportunistes. D'après les observations de cette thèse, il est possible que l'une de ces infections soit causée par un *E. coli* résistant à plusieurs antimicrobiens. D'ailleurs, il arrive à l'occasion qu'un *E. coli* responsable de septicémie chez les jeunes veaux soit résistant à de nombreux antimicrobiens (93). Ainsi, il serait pertinent d'étudier davantage ce phénomène pour aider à limiter les impacts d'une telle excrétion chez les jeunes animaux. Il serait intéressant de compléter les observations chez d'autres espèces animales peu étudiées jusqu'à maintenant pour mieux comprendre ce phénomène.

Quatrièmement, les travaux de cette thèse ont décrit certains facteurs de risque associés à la RAM sur les fermes laitières du Québec. Certains de ces facteurs de risque étaient intrinsèques à la ferme comme la taille du troupeau alors que d'autres pouvaient être modifiés par des actions concrètes comme l'amélioration de la santé du troupeau (diminution de l'incidence des maladies). Il serait intéressant de faire des études prospectives afin de valider l'impact réel d'une amélioration de la santé du troupeau sur la présence de *E. coli* résistant isolé chez les animaux retrouvés sur les fermes laitières. De plus, les mesures de biosécurité semblent avoir un impact sur la présence de la RAM (impact sur l'incidence des maladies, transfert clonale de

bactéries résistantes entre les fermes, gestion des matières fécales des veaux). Il s'agit d'une observation indirecte, mais il serait intéressant d'explorer cette relation entre les mesures de biosécurité à la ferme et la présence de RAM des bactéries provenant des animaux.

## **Chapitre 7 – Conclusion**

En conclusion, les travaux présentés dans le cadre de cette thèse ont contribué à combler un manque de connaissances concernant la RAM sur les fermes laitières du Québec. Il s'agit d'un phénomène complexe qui ne se limite pas simplement à un lien direct avec l'utilisation des antimicrobiens. En effet, il a été démontré que plusieurs éléments jouent un rôle important par rapport à cette RAM. La forte excrétion de *E. coli* résistants chez les veaux pré-sevrage, la co-sélection entre certains gènes de résistances, la présence de clones résistants retrouvés dans plusieurs fermes et la santé du troupeau rapporté comme facteur de risque sont des éléments à prendre en considération concernant la présence de RAM sur les fermes de bovins laitiers.

Ces travaux serviront de bases pour suivre l'évolution temporelle de la RAM dans les fermes de bovins laitiers du Québec. De plus, des études prospectives pourraient être réalisées afin de confirmer les impacts des observations notées dans cette thèse. L'ensemble de ces informations seront déterminantes en vue d'établir des mesures concrètes pour tenter de limiter cette importante problématique.

# Bibliographie

1. Giguère S, Prescott JF, Dowling PM. Antimicrobial therapy in veterinary medicine. Ames, Iowa: Wiley-Blackwell; 2013. Available from: <http://dx.doi.org/10.1002/9781118675014>.
2. Davies J, Davies D. Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2010;74(3):417-33.
3. Blair JM, Webber MA, Baylay AJ, Ogbolu DO, Piddock LJ. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nat Rev Microbiol.* 2015;13(1):42-51.
4. D'Costa VM, King CE, Kalan L, Morar M, Sung WW, Schwarz C, et al. Antibiotic resistance is ancient. *Nature.* 2011;477(7365):457-61.
5. Davies J. Where have All the Antibiotics Gone? *Can J Infect Dis Med Microbiol.* 2006;17(5):287-90.
6. FAO O, OMS. Rapport de la réunion mixte d'experts FAO/OMS/OIE sure les agents antimicrobiens d'importance critique. Rome2010.
7. Organisation Mondiale de la Santé (OMS). Antimicrobiens d'importance critique pour la médecine humaine, 6e révision. Genève, Suisse2019.
8. (OMSA) OMDISA. Liste OIE des agents antimicrobiens importants en médecine vétérinaire. Paris2021.
9. Health Canada. Categorization of Antimicrobial Drugs Based on Importance in Human Medicine: Health Canada; 2009 [Available from: <https://www.canada.ca/en/health-canada/services/drugs-health-products/veterinary-drugs/antimicrobial-resistance/categorization-antimicrobial-drugs-based-importance-human-medicine.html>].
10. Canada S. Base de données sur les produits pharmaceutiques 2017 [Available from: <https://produits-sante.canada.ca/dpd-bdpp/index-fra.jsp>].
11. Baran A, Kwiatkowska A, Potocki L. Antibiotics and Bacterial Resistance-A Short Story of an Endless Arms Race. *Int J Mol Sci.* 2023;24(6).
12. Correia S, Poeta P, Hebraud M, Capelo JL, Igrejas G. Mechanisms of quinolone action and resistance: where do we stand? *J Med Microbiol.* 2017;66(5):551-9.
13. Hopkins KL, Davies RH, Threlfall EJ. Mechanisms of quinolone resistance in *Escherichia coli* and *Salmonella*: recent developments. *Int J Antimicrob Agents.* 2005;25(5):358-73.
14. Jacoby GA. Mechanisms of resistance to quinolones. *Clin Infect Dis.* 2005;41 Suppl 2:S120-6.
15. Lardé H, Dufour S, Archambault M, Massé J, Roy JP, Francoz D. An observational cohort study on antimicrobial usage on dairy farms in Quebec, Canada. *J Dairy Sci.* 2021;104(2):1864-80.
16. Gouvernement du Canada. PICRA-RVMVA : Ventes d'antimicrobiens vétérinaires au Canada: Agence de la Santé publique du Canada; 2022 [Available from: <https://sante-infobase.canada.ca/ventes-antimicrobiens-veterinaires/>].
17. Lardé H, Dufour S, Archambault M, Léger D, Loest D, Roy JP, et al. Assignment of Canadian Defined Daily Doses and Canadian Defined Course Doses for Quantification of Antimicrobial Usage in Cattle. *Frontiers in Veterinary Science.* 2020;7:10.
18. Government of Canada. Canadian Integrated Program for Antimicrobial Resistance Surveillance (CIPARS) 2020: Executive summary and key findings. Guelph, Ontario, Canada: Public Health Agency of Canada; 2022.
19. Saini V, McClure JT, Leger D, Dufour S, Sheldon AG, Scholl DT, et al. Antimicrobial use on Canadian dairy farms. *J Dairy Sci.* 2012;95(3):1209-21.

20. Lardé H. Comparaison de méthodes de quantification afin de proposer un système de surveillance de l'utilisation des agents antimicrobiens dans les fermes bovines laitières du Québec: Université de Montréal; 2021.
21. Lardé H, Francoz D, Roy JP, Massé J, Archambault M, Paradis M, et al. Comparison of Quantification Methods to Estimate Farm-Level Usage of Antimicrobials Other than in Medicated Feed in Dairy Farms from Québec, Canada. *Microorganisms*. 2021;9(5).
22. Lardé H, Francoz D, Roy JP, Archambault M, Massé J, Paradis M, et al. Comparison of Quantification Methods to Estimate Farm-Level Usage of Antimicrobials in Medicated Feed in Dairy Farms from Québec, Canada. *Microorganisms*. 2021;9(9).
23. Gouvernement du Québec. P-42, r. - Règlement sur l'administration de certains médicaments Québec: Publications Québec, Légis Québec source officielle; 2022 [Available from: <https://www.legisquebec.gouv.qc.ca/fr/document/rc/P-42,%20r.%201%20/>].
24. Millar N, Aenishaenslin C, Lardé H, Roy JP, Fourichon C, Francoz D, et al. Evidence of a decrease in sales of antimicrobials of very high importance for humans in dairy herds after a new regulation restricting their use in Quebec, Canada. *Zoonoses and public health*. 2022;69(4):370-81.
25. Abraham EP, Chain E. An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. 1940. *Rev Infect Dis*. 1988;10(4):677-8.
26. Bhullar K, Waglechner N, Pawlowski A, Koteva K, Banks ED, Johnston MD, et al. Antibiotic resistance is prevalent in an isolated cave microbiome. *PLoS One*. 2012;7(4):e34953.
27. Hernandez J, Stedt J, Bonnedahl J, Molin Y, Drobni M, Calisto-Ulloa N, et al. Human-associated extended-spectrum beta-lactamase in the Antarctic. *Appl Environ Microbiol*. 2012;78(6):2056-8.
28. D'Costa VM, McGrann KM, Hughes DW, Wright GD. Sampling the antibiotic resistome. *Science*. 2006;311(5759):374-7.
29. OMS. Résistance aux antibiotiques - Aide-mémoire 2016 [updated Octobre. Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/antibiotic-resistance/fr/>].
30. O'Neill J. Tackling Drug-Resistant infections globally : Final Report and Recommendations. 2016.
31. Markey B. LF, Archambault M., Cullinane A., Maguire D. *Clinical Veterinary Microbiology*. Elsevier; 2013. p. 239 - 74.
32. Organisation Mondiale de la Santé (OMS). Directives de qualité pour l'eau de boisson : 4e éd. intégrant le premier additif. Genève 2017.
33. Anjum MF, Schmitt H, Börjesson S, Berendonk TU. The potential of using *E. coli* as an indicator for the surveillance of antimicrobial resistance (AMR) in the environment. *Curr Opin Microbiol*. 2021;64:152-8.
34. Laboratoire de référence pour *Escherichia coli*. Les *E. coli* pathogènes 2004 [Available from: <http://www.ecl-lab.ca/fr/ecoli/index.asp>].
35. Blake DP, Hillman K, Fenlon DR, Low JC. Transfer of antibiotic resistance between commensal and pathogenic members of the Enterobacteriaceae under ileal conditions. *J Appl Microbiol*. 2003;95(3):428-36.
36. Canada. Rapport annuel 2014 du Programme intégré canadien de surveillance de la résistance aux antimicrobiens (PICRA). In: Canada Adlspd, editor. Canada, Guelph (Ontario) 2016.
37. Food and Drug Administration (FDA). National Antimicrobial Resistance monitoring surveillance, NARMS now : integrated data. In: U.S. Department of Health and Human Services, editor. Rockville, MD 2024.
38. Boireau C, Jarrige N, Cazeau G, Jouy E, Haenni M, Philippon C, et al. Représentativité et couverture du Résapath, le réseau d'épidémiologie de l'antibiorésistance des bactéries pathogènes animales. *Bulletin épidémiologique*. 2018(82):1-4.



39. Aspevall O, Dohnhammar U, Nilsson O, Pringle M. Swedres-Svarm 2018. Consumption of Antibiotics and Occurrence of Antibiotic Resistance in Sweden. Public Health Agency of Sweden and National Veterinary Institute. 2019.
40. Rice LB. Progress and challenges in implementing the research on ESKAPE pathogens. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2010;31 Suppl 1:S7-10.
41. Grossman TH. Tetracycline Antibiotics and Resistance. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2016;6(4):a025387.
42. Alekshun MN, Levy SB. Regulation of chromosomally mediated multiple antibiotic resistance: the mar regulon. *Antimicrob Agents Chemother*. 1997;41(10):2067-75.
43. Sköld O. Sulfonamide resistance: mechanisms and trends. *Drug Resist Updat*. 2000;3(3):155-60.
44. Bush K, Fisher JF. Epidemiological expansion, structural studies, and clinical challenges of new beta-lactamases from gram-negative bacteria. *Annu Rev Microbiol*. 2011;65:455-78.
45. Andersson DI, Levin BR. The biological cost of antibiotic resistance. *Curr Opin Microbiol*. 1999;2(5):489-93.
46. Levin BR. Models for the spread of resistant pathogens. *Neth J Med*. 2002;60(7 Suppl):58-64; discussion -6.
47. Levin BR, Lipsitch M, Perrot V, Schrag S, Antia R, Simonsen L, et al. The population genetics of antibiotic resistance. *Clin Infect Dis*. 1997;24 Suppl 1:S9-16.
48. Andersson DI, Hughes D. Antibiotic resistance and its cost: is it possible to reverse resistance? *Nat Rev Microbiol*. 2010;8(4):260-71.
49. Jacoby GA. Beta-lactamase nomenclature. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006;50(4):1123-9.
50. Ambler RP. The structure of beta-lactamases. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 1980;289(1036):321-31.
51. Hall BG, Barlow M. Revised Ambler classification of {beta}-lactamases. *J Antimicrob Chemother*. 2005;55(6):1050-1.
52. Bush K, Jacoby GA. Updated functional classification of beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010;54(3):969-76.
53. EUCAST. EUCAST guidelines for detection of resistance mechanisms and specific resistances of clinical and/or epidemiological importance. 2017.
54. Paterson DL, Bonomo RA. Extended-spectrum beta-lactamases: a clinical update. *Clin Microbiol Rev*. 2005;18(4):657-86.
55. Dallenne C, Da Costa A, Decre D, Favier C, Arlet G. Development of a set of multiplex PCR assays for the detection of genes encoding important beta-lactamases in Enterobacteriaceae. *J Antimicrob Chemother*. 2010;65(3):490-5.
56. Eriksson-Grennberg KG. Resistance of Escherichia coli to penicillins. II. An improved mapping of the ampA gene. *Genet Res*. 1968;12(2):147-56.
57. Eriksson-Grennberg KG, Boman HG, Jansson JA, Thorén S. Resistance of Escherichia coli to Penicillins I. Genetic Study of Some Ampicillin-Resistant Mutants. *J Bacteriol*. 1965;90(1):54-62.
58. Jacoby GA. AmpC beta-lactamases. *Clin Microbiol Rev*. 2009;22(1):161-82, Table of Contents.
59. Ramírez-Castillo FY, Guerrero-Barrera AL, Avelar-González FJ. An overview of carbapenem-resistant organisms from food-producing animals, seafood, aquaculture, companion animals, and wildlife. *Frontiers in Veterinary Science*. 2023;10.
60. Robicsek A, Strahilevitz J, Jacoby GA, Macielag M, Abbanat D, Park CH, et al. Fluoroquinolone-modifying enzyme: a new adaptation of a common aminoglycoside acetyltransferase. *Nat Med*. 2006;12(1):83-8.

61. Komp Lindgren P, Karlsson A, Hughes D. Mutation rate and evolution of fluoroquinolone resistance in *Escherichia coli* isolates from patients with urinary tract infections. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003;47(10):3222-32.
62. Wang H, Dzink-Fox JL, Chen M, Levy SB. Genetic characterization of highly fluoroquinolone-resistant clinical *Escherichia coli* strains from China: role of *acrR* mutations. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001;45(5):1515-21.
63. Ramirez Castillo FY, Avelar Gonzalez FJ, Garneau P, Marquez Diaz F, Guerrero Barrera AL, Harel J. Presence of multi-drug resistant pathogenic *Escherichia coli* in the San Pedro River located in the State of Aguascalientes, Mexico. *Front Microbiol.* 2013;4:147.
64. Marcusson LL, Fridmodt-Moller N, Hughes D. Interplay in the selection of fluoroquinolone resistance and bacterial fitness. *PLoS Pathog.* 2009;5(8):e1000541.
65. Martinez-Martinez L, Pascual A, Jacoby GA. Quinolone resistance from a transferable plasmid. *Lancet.* 1998;351(9105):797-9.
66. Jacoby G, Cattoir V, Hooper D, Martinez-Martinez L, Nordmann P, Pascual A, et al. *qnr* Gene nomenclature. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008;52(7):2297-9.
67. Robicsek A, Strahilevitz J, Sahm DF, Jacoby GA, Hooper DC. *qnr* prevalence in ceftazidime-resistant Enterobacteriaceae isolates from the United States. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006;50(8):2872-4.
68. Park CH, Robicsek A, Jacoby GA, Sahm D, Hooper DC. Prevalence in the United States of *aac(6)-Ib-cr* encoding a ciprofloxacin-modifying enzyme. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006;50(11):3953-5.
69. Fernandez L, Hancock RE. Adaptive and mutational resistance: role of porins and efflux pumps in drug resistance. *Clin Microbiol Rev.* 2012;25(4):661-81.
70. Du D, Wang Z, James NR, Voss JE, Klimont E, Ohene-Agyei T, et al. Structure of the AcrAB-TolC multidrug efflux pump. *Nature.* 2014;509(7501):512-5.
71. Zayed AA, Essam TM, Hashem AG, El-Tayeb OM. 'Supermutators' found amongst highly levofloxacin-resistant *E. coli* isolates: a rapid protocol for the detection of mutation sites. *Emerging microbes & infections.* 2015;4(1):e4.
72. Pereira RV, Siler JD, Ng JC, Davis MA, Grohn YT, Warnick LD. Effect of on-farm use of antimicrobial drugs on resistance in fecal *Escherichia coli* of preweaned dairy calves. *J Dairy Sci.* 2014;97(12):7644-54.
73. Foster DM, Jacob ME, Warren CD, Papich MG. Pharmacokinetics of enrofloxacin and ceftiofur in plasma, interstitial fluid, and gastrointestinal tract of calves after subcutaneous injection, and bactericidal impacts on representative enteric bacteria. *J Vet Pharmacol Ther.* 2016;39(1):62-71.
74. Partridge SR, Kwong SM, Firth N, Jensen SO. Mobile Genetic Elements Associated with Antimicrobial Resistance. *Clin Microbiol Rev.* 2018;31(4):10.1128/cmr.00088-17.
75. Shintani M, Sanchez ZK, Kimbara K. Genomics of microbial plasmids: classification and identification based on replication and transfer systems and host taxonomy. *Front Microbiol.* 2015;6.
76. Delavat F, Miyazaki R, Carraro N, Pradervand N, van der Meer JR. The hidden life of integrative and conjugative elements. *FEMS Microbiol Rev.* 2017;41(4):512-37.
77. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 31st ed. CLSI supplement M100: Clinical and Laboratory Standards Institute ,USA, 2021; 2021.
78. McArthur AG, Waglechner N, Nizam F, Yan A, Azad MA, Baylay AJ, et al. The comprehensive antibiotic resistance database. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013;57(7):3348-57.
79. Gupta SK, Padmanabhan BR, Diene SM, Lopez-Rojas R, Kempf M, Landraud L, et al. ARG-ANNOT, a new bioinformatic tool to discover antibiotic resistance genes in bacterial genomes. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014;58(1):212-20.

80. Bortolaia V, Kaas RS, Ruppe E, Roberts MC, Schwarz S, Cattoir V, et al. ResFinder 4.0 for predictions of phenotypes from genotypes. *J Antimicrob Chemother.* 2020;75(12):3491-500.
81. Tyson GH, McDermott PF, Li C, Chen Y, Tadesse DA, Mukherjee S, et al. WGS accurately predicts antimicrobial resistance in *Escherichia coli*. *J Antimicrob Chemother.* 2015;70(10):2763-9.
82. Carattoli A, Zankari E, García-Fernández A, Voldby Larsen M, Lund O, Villa L, et al. In silico detection and typing of plasmids using PlasmidFinder and plasmid multilocus sequence typing. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014;58(7):3895-903.
83. Johansson MHK, Bortolaia V, Tansirichaiya S, Aarestrup FM, Roberts AP, Petersen TN. Detection of mobile genetic elements associated with antibiotic resistance in *Salmonella enterica* using a newly developed web tool: MobileElementFinder. *J Antimicrob Chemother.* 2021;76(1):101-9.
84. Liu B, Zheng D, Zhou S, Chen L, Yang J. VFDB 2022: a general classification scheme for bacterial virulence factors. *Nucleic Acids Res.* 2022;50(D1):D912-d7.
85. Zhou Z, Alikhan NF, Mohamed K, Fan Y, Achtman M. The Enterobase user's guide, with case studies on *Salmonella* transmissions, *Yersinia pestis* phylogeny, and *Escherichia* core genomic diversity. *Genome Res.* 2020;30(1):138-52.
86. Kaas RS, Leekitcharoenphon P, Aarestrup FM, Lund O. Solving the problem of comparing whole bacterial genomes across different sequencing platforms. *PLoS One.* 2014;9(8):e104984.
87. World Health Organization (WHO). Antimicrobial Resistance - Fact sheets. WHO (World Health Organization); 2023.
88. Government of Canada. Canadian Integrated Program for Antimicrobial Resistance Surveillance (CIPARS) Annual Report. In: Public Health Agency of Canada, editor. Guelph, Ontario, Canada2022.
89. EFSA. The European Union Summary Report on Antimicrobial Resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2020/2021. EFSA journal European Food Safety Authority. 2023;21(3):e07867.
90. Centers for Disease Control and Prevention. COVID-19: U.S. Impact on Antimicrobial Resistance, Special Report 2022. In: Promotion; NCfEaZIDDoHQ, editor. 2022.
91. Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG, et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect.* 2012;18(3):268-81.
92. Gouvernement du Québec. Usage des antibiotiques chez les animaux 2023 [Available from: <https://www.quebec.ca/agriculture-environnement-et-ressources-naturelles/sante-animale/usage-antibiotiques/surveillance>].
93. Ministère de l'agriculture des pêcheries et de l'alimentation du Québec (MAPAQ). Résultat interactif - Surveillance de l'antibiorésistance - Rapport 2022. In: animale Dgdledls, editor. Québec2022.
94. Nielsen LR. Review of pathogenesis and diagnostic methods of immediate relevance for epidemiology and control of *Salmonella* Dublin in cattle. *Vet Microbiol.* 2013;162(1):1-9.
95. Srednik ME, Lantz K, Hicks JA, Morningstar-Shaw BR, Mackie TA, Schlater LK. Antimicrobial resistance and genomic characterization of *Salmonella* Dublin isolates in cattle from the United States. *PLoS One.* 2021;16(9):e0249617.
96. Velazquez-Meza ME, Galarde-López M, Carrillo-Quiróz B, Alpuche-Aranda CM. Antimicrobial resistance: One Health approach. *Veterinary world.* 2022;15(3):743-9.
97. Heuer H, Schmitt H, Smalla K. Antibiotic resistance gene spread due to manure application on agricultural fields. *Curr Opin Microbiol.* 2011;14(3):236-43.
98. Gunnarsdóttir R, Müller K, Jensen PE, Jenssen PD, Villumsen A. Effect of Long-Term Freezing and Freeze–Thaw Cycles on Indigenous and Inoculated Microorganisms in Dewatered Blackwater. *Environ Sci Technol.* 2012;46(22):12408-16.

99. Fey PD, Safraneck TJ, Rupp ME, Dunne EF, Ribot E, Iwen PC, et al. Ceftriaxone-resistant salmonella infection acquired by a child from cattle. *N Engl J Med.* 2000;342(17):1242-9.
100. Davis GS, Waits K, Nordstrom L, Weaver B, Aziz M, Gauld L, et al. Intermingled *Klebsiella pneumoniae* Populations Between Retail Meats and Human Urinary Tract Infections. *Clin Infect Dis.* 2015;61(6):892-9.
101. Hoelzer K, Wong N, Thomas J, Talkington K, Jungman E, Coukell A. Antimicrobial drug use in food-producing animals and associated human health risks: what, and how strong, is the evidence? *BMC Vet Res.* 2017;13(1):211.
102. Hao H, Cheng G, Iqbal Z, Ai X, Hussain HI, Huang L, et al. Benefits and risks of antimicrobial use in food-producing animals. *Front Microbiol.* 2014;5:288.
103. Oliver SP, Murinda SE, Jayarao BM. Impact of antibiotic use in adult dairy cows on antimicrobial resistance of veterinary and human pathogens: a comprehensive review. *Foodborne Pathog Dis.* 2011;8(3):337-55.
104. Springer HR, Denagamage TN, Fenton GD, Haley BJ, Van Kessel JAS, Hovingh EP. Antimicrobial Resistance in Fecal *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* from Dairy Calves: A Systematic Review. *Foodborne Pathog Dis.* 2019;16(1):23-34.
105. Berge AC, Atwill ER, Sisco WM. Animal and farm influences on the dynamics of antibiotic resistance in faecal *Escherichia coli* in young dairy calves. *Prev Vet Med.* 2005;69(1-2):25-38.
106. Hoyle DV, Knight HI, Shaw DJ, Hillman K, Pearce MC, Low JC, et al. Acquisition and epidemiology of antibiotic-resistant *Escherichia coli* in a cohort of newborn calves. *J Antimicrob Chemother.* 2004;53(5):867-71.
107. Duse A, Waller KP, Emanuelson U, Unnerstad HE, Persson Y, Bengtsson B. Risk factors for antimicrobial resistance in fecal *Escherichia coli* from preweaned dairy calves. *J Dairy Sci.* 2015;98(1):500-16.
108. Cao H, Pradhan AK, Karns JS, Hovingh E, Wolfgang DR, Vinyard BT, et al. Age-Associated Distribution of Antimicrobial-Resistant *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* Isolated from Dairy Herds in Pennsylvania, 2013-2015. *Foodborne Pathog Dis.* 2019;16(1):60-7.
109. Aust V, Knappstein K, Kunz HJ, Kaspar H, Wallmann J, Kaske M. Feeding untreated and pasteurized waste milk and bulk milk to calves: effects on calf performance, health status and antibiotic resistance of faecal bacteria. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl).* 2013;97(6):1091-103.
110. Hazards EPoB. Scientific opinion on the risk for the development of Antimicrobial Resistance (AMR) due to feeding of calves with milk containing residues of antibiotics. *EFSA Journal*; 2017. p. 101 pp.
111. Khachatryan AR, Hancock DD, Besser TE, Call DR. Role of calf-adapted *Escherichia coli* in maintenance of antimicrobial drug resistance in dairy calves. *Appl Environ Microbiol.* 2004;70(2):752-7.
112. Khachatryan AR, Besser TE, Hancock DD, Call DR. Use of a nonmedicated dietary supplement correlates with increased prevalence of streptomycin-sulfa-tetracycline-resistant *Escherichia coli* on a dairy farm. *Appl Environ Microbiol.* 2006;72(7):4583-8.
113. Edrington TS. Age and diet effects on fecal populations and antibiotic resistance of a multi-drug resistant *Escherichia coli* in dairy calves. *Agriculture, food and analytical bacteriology.* 2012;v. 2(no. 3):pp. 162-74-2012 v.2 no.3.
114. Heuvelink AE, Gonggrijp MA, Buter RGJ, Ter Bogt-Kappert CC, van Schaik G, Velthuis AGJ, et al. Prevalence of extended-spectrum and AmpC  $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* in Dutch dairy herds. *Vet Microbiol.* 2019;232:58-64.

115. Donaldson SC, Straley BA, Hegde NV, Sawant AA, DebRoy C, Jayarao BM. Molecular epidemiology of ceftiofur-resistant *Escherichia coli* isolates from dairy calves. *Appl Environ Microbiol*. 2006;72(6):3940-8.
116. OIE. Antimicrobial Resistance - Fact sheets: OIE (World Organization for Animal Health); 2015 [Available from: <https://www.oie.int/app/uploads/2021/03/antibio-en.pdf>].
117. Catry B, Laevens H, Devriese LA, Opsomer G, De Kruif A. Antimicrobial resistance in livestock. *J Vet Pharmacol Ther*. 2003;26(2):81-93.
118. Berge AC, Hancock DD, Sisco WM, Besser TE. Geographic, farm, and animal factors associated with multiple antimicrobial resistance in fecal *Escherichia coli* isolates from cattle in the western United States. *J Am Vet Med Assoc*. 2010;236(12):1338-44.
119. Hordijk J, Fischer EAJ, van Werven T, Sietsma S, Van Gompel L, Timmerman AJ, et al. Dynamics of faecal shedding of ESBL- or AmpC-producing *Escherichia coli* on dairy farms. *J Antimicrob Chemother*. 2019;74(6):1531-8.
120. Madec JY, Haenni M, Nordmann P, Poirel L. Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase/AmpC- and carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in animals: a threat for humans? *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 2017;23(11):826-33.
121. World Health Organization (WHO). WHO priority pathogens list for R&D of new antibiotics 2017 [Available from: <https://www.who.int/news-room/detail/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>].
122. Liebana E, Carattoli A, Coque TM, Hasman H, Magiorakos AP, Mevius D, et al. Public health risks of enterobacterial isolates producing extended-spectrum beta-lactamases or AmpC beta-lactamases in food and food-producing animals: an EU perspective of epidemiology, analytical methods, risk factors, and control options. *Clin Infect Dis*. 2013;56(7):1030-7.
123. CLSI. Performance Standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals. 4th ed. CLSI supplement VET08: Wayne, PA : Clinical and Laboratory Standards Institute; 2018.
124. Government of Canada. Canadian Integrated Program for Antimicrobial Resistance Surveillance (CIPARS) 2016 Annual Report. Guelph, Ontario, Canada: Public Health Agency of Canada; 2018.
125. EFSA, ECDC. The european union summary report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2015. Parma, Italy: EFSA journal; 2017.
126. Afgan E, Baker D, van den Beek M, Blankenberg D, Bouvier D, Čech M, et al. The Galaxy platform for accessible, reproducible and collaborative biomedical analyses: 2016 update. *Nucleic Acids Res*. 2016;44(W1):W3-w10.
127. Bankevich A, Nurk S, Antipov D, Gurevich AA, Dvorkin M, Kulikov AS, et al. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *J Comput Biol*. 2012;19(5):455-77.
128. Mikheenko A, Prjibelski A, Saveliev V, Antipov D, Gurevich A. Versatile genome assembly evaluation with QUAST-LG. *Bioinformatics*. 2018;34(13):i142-i50.
129. Zankari E, Allesøe R, Joensen KG, Cavaco LM, Lund O, Aarestrup FM. PointFinder: a novel web tool for WGS-based detection of antimicrobial resistance associated with chromosomal point mutations in bacterial pathogens. *J Antimicrob Chemother*. 2017;72(10):2764-8.
130. Goldstein H, Browne W, Rasbash J. Partitioning Variation in Multilevel Models. *Understanding Statistics*. 2002;1(4):223-31.
131. World Health Organization (WHO). Critically important antimicrobials for human medicine, 6th revision. . Geneva: World Health Organization; 2019.

132. Caroff N, Espaze E, Gautreau D, Richet H, Reynaud A. Analysis of the effects of -42 and -32 ampC promoter mutations in clinical isolates of *Escherichia coli* hyperproducing ampC. *J Antimicrob Chemother.* 2000;45(6):783-8.
133. Saini V, McClure JT, Leger D, Keefe GP, Scholl DT, Morck DW, et al. Antimicrobial resistance profiles of common mastitis pathogens on Canadian dairy farms. *J Dairy Sci.* 2012;95(8):4319-32.
134. Enne VI, Bennett PM, Livermore DM, Hall LM. Enhancement of host fitness by the sul2-coding plasmid p9123 in the absence of selective pressure. *J Antimicrob Chemother.* 2004;53(6):958-63.
135. Marti R, Tien YC, Murray R, Scott A, Sabourin L, Topp E. Safely coupling livestock and crop production systems: how rapidly do antibiotic resistance genes dissipate in soil following a commercial application of swine or dairy manure? *Appl Environ Microbiol.* 2014;80(10):3258-65.
136. Wichmann F, Udikovic-Kolic N, Andrew S, Handelsman J. Diverse antibiotic resistance genes in dairy cow manure. *mBio.* 2014;5(2):e01017.
137. Kyselkova M, Jirout J, Vrchatova N, Schmitt H, Elhottova D. Spread of tetracycline resistance genes at a conventional dairy farm. *Front Microbiol.* 2015;6:536.
138. D'Andrea MM, Arena F, Pallecchi L, Rossolini GM. CTX-M-type  $\beta$ -lactamases: a successful story of antibiotic resistance. *Int J Med Microbiol.* 2013;303(6-7):305-17.
139. Rossolini GM, D'Andrea MM, Mugnaioli C. The spread of CTX-M-type extended-spectrum beta-lactamases. *Clin Microbiol Infect.* 2008;14 Suppl 1:33-41.
140. Cormier A, Zhang PLC, Chalmers G, Weese JS, Deckert A, Mulvey M, et al. Diversity of CTX-M-positive *Escherichia coli* recovered from animals in Canada. *Vet Microbiol.* 2019;231:71-5.
141. Tadesse DA, Li C, Mukherjee S, Hsu CH, Bodeis Jones S, Gaines SA, et al. Whole-Genome Sequence Analysis of CTX-M Containing *Escherichia coli* Isolates from Retail Meats and Cattle in the United States. *Microbial drug resistance (Larchmont, NY).* 2018;24(7):939-48.
142. Checcucci A, Trevisi P, Luise D, Modesto M, Blasioli S, Braschi I, et al. Exploring the Animal Waste Resistome: The Spread of Antimicrobial Resistance Genes Through the Use of Livestock Manure. *Front Microbiol.* 2020;11:1416.
143. Awosile B, McClure J, Sanchez J, Rodriguez-Lecompte JC, Keefe G, Heider LC. Salmonella enterica and extended-spectrum cephalosporin-resistant *Escherichia coli* recovered from Holstein dairy calves from 8 farms in New Brunswick, Canada. *J Dairy Sci.* 2018;101(4):3271-84.
144. Mollenkopf DF, Weeman MF, Daniels JB, Abley MJ, Mathews JL, Gebreyes WA, et al. Variable within- and between-herd diversity of CTX-M cephalosporinase-bearing *Escherichia coli* isolates from dairy cattle. *Appl Environ Microbiol.* 2012;78(13):4552-60.
145. Li XZ, Mehrotra M, Ghimire S, Adewoye L. beta-Lactam resistance and beta-lactamases in bacteria of animal origin. *Vet Microbiol.* 2007;121(3-4):197-214.
146. Wittum TE, Mollenkopf DF, Daniels JB, Parkinson AE, Mathews JL, Fry PR, et al. CTX-M-type extended-spectrum  $\beta$ -lactamases present in *Escherichia coli* from the feces of cattle in Ohio, United States. *Foodborne Pathog Dis.* 2010;7(12):1575-9.
147. Wielders CCH, Van Duijkeren E, Van Den Bunt G, Meijs AP, Dierikx CM, Bonten MJM, et al. Seasonality in carriage of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in the general population: a pooled analysis of nationwide cross-sectional studies. *Epidemiol Infect.* 2020;148:e68.
148. Mesa RJ, Blanc V, Blanch AR, Cortés P, González JJ, Lavilla S, et al. Extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae in different environments (humans, food, animal farms and sewage). *J Antimicrob Chemother.* 2006;58(1):211-5.
149. Meijs AP, Gijsbers EF, Hengeveld PD, Veenman C, van Roon AM, van Hoek AHAM, et al. Do vegetarians less frequently carry ESBL/pAmpC-producing *Escherichia coli*/*Klebsiella pneumoniae* compared with non-vegetarians? *The Journal of antimicrobial chemotherapy.* 2020;75(3):550-8.

150. Bonnedahl J, Stedt J, Waldenström J, Svensson L, Drobni M, Olsen B. Comparison of Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase (ESBL) CTX-M Genotypes in Franklin Gulls from Canada and Chile. *PLoS One*. 2015;10(10):e0141315.
151. Morton LM, Cahill J, Hartge P. Reporting participation in epidemiologic studies: a survey of practice. *Am J Epidemiol*. 2006;163(3):197-203.
152. Awosile B, Eisnor J, Saab ME, Heider L, McClure JT. Occurrence of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase and AmpC-producing *Escherichia coli* in retail meat products from the Maritime Provinces, Canada. *Can J Microbiol*. 2021;67(7):537-47.
153. Afema JA, Ahmed S, Besser TE, Jones LP, Sisco WM, Davis MA. Molecular Epidemiology of Dairy Cattle-Associated *Escherichia coli* Carrying bla(CTX-M) Genes in Washington State. *Appl Environ Microbiol*. 2018;84(6).
154. Jahanbakhsh S, Smith MG, Kohan-Ghadr HR, Letellier A, Abraham S, Trott DJ, et al. Dynamics of extended-spectrum cephalosporin resistance in pathogenic *Escherichia coli* isolated from diseased pigs in Quebec, Canada. *Int J Antimicrob Agents*. 2016;48(2):194-202.
155. Tang KL, Caffrey NP, Nóbrega DB, Cork SC, Ronksley PE, Barkema HW, et al. Restricting the use of antibiotics in food-producing animals and its associations with antibiotic resistance in food-producing animals and human beings: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet Planetary health*. 2017;1(8):e316-e27.
156. Jahanbakhsh S, Letellier A, Fairbrother JM. Circulating of CMY-2  $\beta$ -lactamase gene in weaned pigs and their environment in a commercial farm and the effect of feed supplementation with a clay mineral. *J Appl Microbiol*. 2016;121(1):136-48.
157. Vounba P, Arsenault J, Bada-Alambédji R, Fairbrother JM. Pathogenic potential and the role of clones and plasmids in beta-lactamase-producing *E. coli* from chicken faeces in Vietnam. *BMC Vet Res*. 2019;15(1):106.
158. Zhu DM, Li QH, Shen Y, Zhang Q. Risk factors for quinolone-resistant *Escherichia coli* infection: a systematic review and meta-analysis. *Antimicrobial resistance and infection control*. 2020;9(1):11.
159. Fuzi M, Rodriguez Baño J, Toth A. Global Evolution of Pathogenic Bacteria With Extensive Use of Fluoroquinolone Agents. *Front Microbiol*. 2020;11:271.
160. Golden AR, Karlowsky JA, Walkty A, Baxter MR, Denisuik AJ, McCracken M, et al. Comparison of phenotypic antimicrobial susceptibility testing results and WGS-derived genotypic resistance profiles for a cohort of ESBL-producing *Escherichia coli* collected from Canadian hospitals: CANWARD 2007-18. *J Antimicrob Chemother*. 2021;76(11):2825-32.
161. Day MR, Doumith M, Do Nascimento V, Nair S, Ashton PM, Jenkins C, et al. Comparison of phenotypic and WGS-derived antimicrobial resistance profiles of *Salmonella enterica* serovars Typhi and Paratyphi. *J Antimicrob Chemother*. 2018;73(2):365-72.
162. Massé J, Lardé H, Fairbrother JM, Roy J-P, Francoz D, Dufour S, et al. Prevalence of Antimicrobial Resistance and Characteristics of *Escherichia coli* Isolates From Fecal and Manure Pit Samples on Dairy Farms in the Province of Québec, Canada. *Frontiers in Veterinary Science*. 2021;8(438).
163. Teng L, Lee S, Ginn A, Markland SM, Mir RA, DiLorenzo N, et al. Genomic Comparison Reveals Natural Occurrence of Clinically Relevant Multidrug-Resistant Extended-Spectrum-beta-Lactamase-Producing *Escherichia coli* Strains. *Appl Environ Microbiol*. 2019;85(13).
164. de Lagarde M, Vanier G, Arsenault J, Fairbrother JMM. High Risk Clone: A Proposal of Criteria Adapted to the One Health Context with Application to Enterotoxigenic *Escherichia coli* in the Pig Population. *Antibiotics (Basel, Switzerland)*. 2021;10(3).
165. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance Standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals. 5th ed. CLSI supplement VET01S: Clinical and Laboratory Standards Institute, USA, 2020; 2020.

166. Beghain J, Bridier-Nahmias A, Le Nagard H, Denamur E, Clermont O. ClermonTyping: an easy-to-use and accurate in silico method for *Escherichia* genus strain phylotyping. *Microbial genomics*. 2018;4(7).
167. Larsen MV, Cosentino S, Rasmussen S, Friis C, Hasman H, Marvig RL, et al. Multilocus sequence typing of total-genome-sequenced bacteria. *J Clin Microbiol*. 2012;50(4):1355-61.
168. Joensen KG, Tetzschner AM, Iguchi A, Aarestrup FM, Scheutz F. Rapid and Easy In Silico Serotyping of *Escherichia coli* Isolates by Use of Whole-Genome Sequencing Data. *J Clin Microbiol*. 2015;53(8):2410-26.
169. Roer L, Tchesnokova V, Allesøe R, Muradova M, Chattopadhyay S, Ahrenfeldt J, et al. Development of a Web Tool for *Escherichia coli* Subtyping Based on fimH Alleles. *J Clin Microbiol*. 2017;55(8):2538-43.
170. Edwards PR, Ewing WH. Identification of *Enterobacteriaceae*: Minneapolis: Burgess Publishing Company.; 1972. 362 p.
171. Letunic I, Bork P. Interactive Tree Of Life (iTOL) v4: recent updates and new developments. *Nucleic Acids Res*. 2019;47(W1):W256-w9.
172. Stubberfield E, AbuOun M, Sayers E, O'Connor HM, Card RM, Anjum MF. Use of whole genome sequencing of commensal *Escherichia coli* in pigs for antimicrobial resistance surveillance, United Kingdom, 2018. *Euro Surveill*. 2019;24(50).
173. Mammeri H, Nazic H, Naas T, Poirel L, Léotard S, Nordmann P. AmpC beta-lactamase in an *Escherichia coli* clinical isolate confers resistance to expanded-spectrum cephalosporins. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004;48(10):4050-3.
174. Garcia-Migura L, Sunde M, Karlslose S, Veldman K, Schroeter A, Guerra B, et al. Establishing streptomycin epidemiological cut-off values for *Salmonella* and *Escherichia coli*. *Microbial drug resistance (Larchmont, NY)*. 2012;18(1):88-93.
175. Arredondo-Alonso S, Willems RJ, van Schaik W, Schürch AC. On the (im)possibility of reconstructing plasmids from whole-genome short-read sequencing data. *Microbial genomics*. 2017;3(10):e000128.
176. Call DR, Singer RS, Meng D, Broschat SL, Orfe LH, Anderson JM, et al. blaCMY-2-positive IncA/C plasmids from *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* are a distinct component of a larger lineage of plasmids. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010;54(2):590-6.
177. Meunier D, Jouy E, Lazizzera C, Doublet B, Kobisch M, Cloeckert A, et al. Plasmid-borne florfenicol and ceftiofur resistance encoded by the floR and blaCMY-2 genes in *Escherichia coli* isolates from diseased cattle in France. *J Med Microbiol*. 2010;59(Pt 4):467-71.
178. Kurittu P, Khakipour B, Aarnio M, Nykäsenoja S, Brouwer M, Myllyniemi AL, et al. Plasmid-Borne and Chromosomal ESBL/AmpC Genes in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in Global Food Products. *Front Microbiol*. 2021;12:592291.
179. Lalak A, Wasyl D, Zając M, Skarżyńska M, Hoszowski A, Samcik I, et al. Mechanisms of cephalosporin resistance in indicator *Escherichia coli* isolated from food animals. *Vet Microbiol*. 2016;194:69-73.
180. Pietsch M, Irrgang A, Roschanski N, Brenner Michael G, Hamprecht A, Rieber H, et al. Whole genome analyses of CMY-2-producing *Escherichia coli* isolates from humans, animals and food in Germany. *BMC Genomics*. 2018;19(1):601.
181. Li L, Olsen RH, Xiao J, Meng H, Peng S, Shi L. Genetic context of bla (CTX-M-55) and qnrS1 genes in a foodborne *Salmonella enterica* serotype Saintpaul isolate from China. *Front Microbiol*. 2022;13:899062.
182. de Lagarde M, Fairbrother JM, Archambault M, Dufour S, Francoz D, Massé J, et al. Impact of a Regulation Restricting Critical Antimicrobial Usage on Prevalence of Antimicrobial Resistance in



*Escherichia coli* Isolates From Fecal and Manure Pit Samples on Dairy Farms in Québec, Canada. *Frontiers in Veterinary Science*. 2022;9.

183. Muloi DM, Wee BA, McClean DMH, Ward MJ, Pankhurst L, Phan H, et al. Population genomics of *Escherichia coli* in livestock-keeping households across a rapidly developing urban landscape. *Nature microbiology*. 2022;7(4):581-9.

184. Ludden C, Coll F, Gouliouris T, Restif O, Blane B, Blackwell GA, et al. Defining nosocomial transmission of *Escherichia coli* and antimicrobial resistance genes: a genomic surveillance study. *The Lancet Microbe*. 2021;2(9):e472-e80.

185. Clermont O, Dixit OVA, Vangchhia B, Condamine B, Dion S, Bridier-Nahmias A, et al. Characterization and rapid identification of phylogroup G in *Escherichia coli*, a lineage with high virulence and antibiotic resistance potential. *Environ Microbiol*. 2019;21(8):3107-17.

186. Skarżyńska M, Zaja CM, Bomba A, Bocian Ł, Kozdruń W, Polak M, et al. Antimicrobial Resistance Glides in the Sky-Free-Living Birds as a Reservoir of Resistant *Escherichia coli* With Zoonotic Potential. *Front Microbiol*. 2021;12:656223.

187. Kuipers A, Koops WJ, Wemmenhove H. Antibiotic use in dairy herds in the Netherlands from 2005 to 2012. *J Dairy Sci*. 2016;99(2):1632-48.

188. Saini V, McClure JT, Scholl DT, DeVries TJ, Barkema HW. Herd-level relationship between antimicrobial use and presence or absence of antimicrobial resistance in gram-negative bovine mastitis pathogens on Canadian dairy farms. *J Dairy Sci*. 2013;96(8):4965-76.

189. Higham LE, Deakin A, Tivey E, Porteus V, Ridgway S, Rayner AC. A survey of dairy cow farmers in the United Kingdom: knowledge, attitudes and practices surrounding antimicrobial use and resistance. *Vet Rec*. 2018;183(24):746.

190. Kramer T, Jansen LE, Lipman LJA, Smit LAM, Heederik DJJ, Dorado-García A. Farmers' knowledge and expectations of antimicrobial use and resistance are strongly related to usage in Dutch livestock sectors. *Prev Vet Med*. 2017;147:142-8.

191. Government of Québec. Bilan réseau bovin 2020. In: Ministère de l'agriculture des pêcheries et de l'alimentation du Québec (MAPAQ), editor. 2020.

192. Zhang X, Yi X, Zhuang H, Deng Z, Ma C. Invited Review: Antimicrobial Use and Antimicrobial Resistance in Pathogens Associated with Diarrhea and Pneumonia in Dairy Calves. *Animals : an open access journal from MDPI*. 2022;12(6).

193. Adler A, Sturlesi N, Fallach N, Zilberman-Barzilai D, Hussein O, Blum SE, et al. Gentamicin- and Ciprofloxacin-Resistant Enterobacteriaceae in Cattle Farms in Israel: Risk Factors for Carriage and the Effect of Microbiological Methodology on the Measured Prevalence. *Microbial drug resistance (Larchmont, NY)*. 2017;23(5):660-5.

194. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters version 10.0 2020 [Available from: [http://www.eucast.org/clinical\\_breakpoints/](http://www.eucast.org/clinical_breakpoints/)].

195. Berge AC, Moore DA, Sischo WM. Prevalence and antimicrobial resistance patterns of *Salmonella enterica* in preweaned calves from dairies and calf ranches. *Am J Vet Res*. 2006;67(9):1580-8.

196. Pereira RV, Santos TM, Bicalho ML, Caixeta LS, Machado VS, Bicalho RC. Antimicrobial resistance and prevalence of virulence factor genes in fecal *Escherichia coli* of Holstein calves fed milk with and without antimicrobials. *J Dairy Sci*. 2011;94(9):4556-65.

197. Roy JP, Archambault M, Desrochers A, Dubuc J, Dufour S, Francoz D, et al. New Quebec regulation on the use of antimicrobials of very high importance in food animals: Implementation and impacts in dairy cattle practice. *Can Vet J*. 2020;61(2):193-6.

198. Snow LC, Warner RG, Cheney T, Wearing H, Stokes M, Harris K, et al. Risk factors associated with extended spectrum beta-lactamase *Escherichia coli* (CTX-M) on dairy farms in North West England and North Wales. *Prev Vet Med.* 2012;106(3-4):225-34.
199. Krogh MA, Nielsen CL, Sørensen JT. Antimicrobial use in organic and conventional dairy herds. *Animal.* 2020;14(10):2187-93.
200. Melchner A, van de Berg S, Scuda N, Feuerstein A, Hanczaruk M, Schumacher M, et al. Antimicrobial Resistance in Isolates from Cattle with Bovine Respiratory Disease in Bavaria, Germany. *Antibiotics (Basel, Switzerland).* 2021;10(12).
201. Sali V, Nykäsenoja S, Heikinheimo A, Hälli O, Tirkkonen T, Heinonen M. Antimicrobial Use and Susceptibility of Indicator *Escherichia coli* in Finnish Integrated Pork Production. *Front Microbiol.* 2021;12:754894.
202. Um MM, Castonguay MH, Arsenault J, Bergeron L, Côté G, Fecteau G, et al. Estimation of the accuracy of an ELISA test applied to bulk tank milk for predicting herd-level status for *Salmonella* Dublin in dairy herds using Bayesian Latent Class Models. *Prev Vet Med.* 2022;206:105699.
203. Massé J, Vanier G, Fairbrother JM, de Lagarde M, Arsenault J, Francoz D, et al. Description of Antimicrobial-Resistant *Escherichia coli* and Their Dissemination Mechanisms on Dairy Farms. *Veterinary sciences.* 2023;10(4).
204. Gaire TN, Scott HM, Sellers L, Nagaraja TG, Volkova VV. Age Dependence of Antimicrobial Resistance Among Fecal Bacteria in Animals: A Scoping Review. *Frontiers in Veterinary Science.* 2020;7:622495.
205. Literak I, Petro R, Dolejska M, Gruberova E, Dobiasova H, Petr J, et al. Antimicrobial resistance in fecal *Escherichia coli* isolates from healthy urban children of two age groups in relation to their antibiotic therapy. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011;55(6):3005-7.
206. Robey RC, Drysdale SB, Kelly DF, Bowler IC, Sadarangani M. Age-specific trends in antibiotic resistance in *Escherichia coli* infections in Oxford, United Kingdom 2013-2014. *J Infect.* 2017;74(2):195-8.
207. Lebeaux RM, Coker MO, Dade EF, Palys TJ, Morrison HG, Ross BD, et al. The infant gut resistome is associated with *E. coli* and early-life exposures. *BMC Microbiol.* 2021;21(1):201.
208. Agersø Y, Jensen JD, Hasman H, Pedersen K. Spread of extended spectrum cephalosporinase-producing *Escherichia coli* clones and plasmids from parent animals to broilers and to broiler meat in a production without use of cephalosporins. *Foodborne Pathog Dis.* 2014;11(9):740-6.
209. EURL-AR. Laboratory Protocol -Isolation of ESBL-, AmpC- and carbapenemase-producing *E. coli* from caecal samples, Version 6 2018 [updated February 2018. Available from: <https://www.eurl-ar.eu/protocols.aspx>.
210. Cebrian L, Sirvent E, Rodríguez Díaz JC, Ruiz M, Royo G. Characterisation of *Salmonella* spp. mutants produced by exposure to various fluoroquinolones. *Int J Antimicrob Agents.* 2003;22(2):134-9.
211. Poirel L, Madec J-Y, Lupo A, Schink A-K, Kieffer N, Nordmann P, et al. Antimicrobial Resistance in *Escherichia coli*. *Microbiology Spectrum.* 2018;6(4):10.1128/microbiolspec.arba-0026-2017.
212. Ziv G, Schultze WD. Pharmacokinetics of polymyxin B administered via the bovine mammary gland. *J Vet Pharmacol Ther.* 1982;5(2):123-9.
213. Poirel L, Jayol A, Nordmann P. Polymyxins: Antibacterial Activity, Susceptibility Testing, and Resistance Mechanisms Encoded by Plasmids or Chromosomes. *Clin Microbiol Rev.* 2017;30(2):557-96.
214. Adkins PRF, Ericsson AC, Middleton JR, Witzke MC. The effect of intramammary pirlimycin hydrochloride on the fecal microbiome of early-lactation heifers. *J Dairy Sci.* 2020;103(4):3459-69.

215. Dutil L, Irwin R, Finley R, Ng LK, Avery B, Boerlin P, et al. Ceftiofur resistance in *Salmonella enterica* serovar Heidelberg from chicken meat and humans, Canada. *Emerg Infect Dis*. 2010;16(1):48-54.
216. Zadoks RN, Middleton JR, McDougall S, Katholm J, Schukken YH. Molecular epidemiology of mastitis pathogens of dairy cattle and comparative relevance to humans. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. 2011;16(4):357-72.
217. Munoz MA, Welcome FL, Schukken YH, Zadoks RN. Molecular epidemiology of two *Klebsiella pneumoniae* mastitis outbreaks on a dairy farm in New York State. *J Clin Microbiol*. 2007;45(12):3964-71.
218. Schukken Y, Chuff M, Moroni P, Gurjar A, Santisteban C, Welcome F, et al. The "other" gram-negative bacteria in mastitis: *Klebsiella*, *serratia*, and more. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*. 2012;28(2):239-56.
219. Olde Riekerink RG, Barkema HW, Kelton DF, Scholl DT. Incidence rate of clinical mastitis on Canadian dairy farms. *J Dairy Sci*. 2008;91(4):1366-77.
220. Oliveira L, Hulland C, Ruegg PL. Characterization of clinical mastitis occurring in cows on 50 large dairy herds in Wisconsin. *J Dairy Sci*. 2013;96(12):7538-49.
221. Levison LJ, Miller-Cushon EK, Tucker AL, Bergeron R, Leslie KE, Barkema HW, et al. Incidence rate of pathogen-specific clinical mastitis on conventional and organic Canadian dairy farms. *J Dairy Sci*. 2016;99(2):1341-50.
222. Fuenzalida MJ, Ruegg PL. Negatively controlled, randomized clinical trial to evaluate intramammary treatment of nonsevere, gram-negative clinical mastitis. *J Dairy Sci*. 2019;102(6):5438-57.
223. Grohn YT, Wilson DJ, Gonzalez RN, Hertl JA, Schulte H, Bennett G, et al. Effect of pathogen-specific clinical mastitis on milk yield in dairy cows. *J Dairy Sci*. 2004;87(10):3358-74.
224. Osman KM, Hassan HM, Orabi A, Abdelhafez AS. Phenotypic, antimicrobial susceptibility profile and virulence factors of *Klebsiella pneumoniae* isolated from buffalo and cow mastitic milk. *Pathog Glob Health*. 2014;108(4):191-9.
225. Drancourt M, Bollet C, Carta A, Rousselier P. Phylogenetic analyses of *Klebsiella* species delineate *Klebsiella* and *Raoultella* gen. nov., with description of *Raoultella ornithinolytica* comb. nov., *Raoultella terrigena* comb. nov. and *Raoultella planticola* comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2001;51(Pt 3):925-32.
226. Diancourt L, Passet V, Verhoef J, Grimont PA, Brisse S. Multilocus sequence typing of *Klebsiella pneumoniae* nosocomial isolates. *J Clin Microbiol*. 2005;43(8):4178-82.
227. Brisse S, Duijkeren E. Identification and antimicrobial susceptibility of 100 *Klebsiella* animal clinical isolates. *Vet Microbiol*. 2005;105(3-4):307-12.
228. Zadoks RN, Griffiths HM, Munoz MA, Ahlstrom C, Bennett GJ, Thomas E, et al. Sources of *Klebsiella* and *Raoultella* species on dairy farms: be careful where you walk. *J Dairy Sci*. 2011;94(2):1045-51.
229. Podder MP, Rogers L, Daley PK, Keefe GP, Whitney HG, Tahlan K. *Klebsiella* species associated with bovine mastitis in Newfoundland. *PLoS One*. 2014;9(9):e106518.
230. Chung PY. The emerging problems of *Klebsiella pneumoniae* infections: carbapenem resistance and biofilm formation. *FEMS Microbiol Lett*. 2016;363(20).
231. Vuotto C, Longo F, Balice MP, Donelli G, Varaldo PE. Antibiotic Resistance Related to Biofilm Formation in *Klebsiella pneumoniae*. *Pathogens (Basel, Switzerland)*. 2014;3(3):743-58.
232. Schonborn S, Wente N, Paduch JH, Kromker V. In vitro ability of mastitis causing pathogens to form biofilms. *J Dairy Res*. 2017;84(2):198-201.

233. de Jong A, Garch FE, Simjee S, Moyaert H, Rose M, Youala M, et al. Monitoring of antimicrobial susceptibility of udder pathogens recovered from cases of clinical mastitis in dairy cows across Europe: VetPath results. *Vet Microbiol.* 2018;213:73-81.
234. Paulin-Curlee GG, Sreevatsan S, Singer RS, Isaacson R, Reneau J, Bey R, et al. Molecular subtyping of mastitis-associated *Klebsiella pneumoniae* isolates shows high levels of diversity within and between dairy herds. *J Dairy Sci.* 2008;91(2):554-63.
235. Reyher KK, Dufour S, Barkema HW, Des Coteaux L, Devries TJ, Dohoo IR, et al. The National Cohort of Dairy Farms--a data collection platform for mastitis research in Canada. *J Dairy Sci.* 2011;94(3):1616-26.
236. Dufour S, Labrie J, Jacques M. The Mastitis Pathogens Culture Collection. Microbiology resource announcements. 2019;8(15).
237. CLSI. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 28th ed. CLSI supplement M100: Wayne, PA : Clinical and Laboratory Standards Institute; 2018.
238. CLSI. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, 22nd ed. CLSI document M100-22: Wayne, PA : Clinical and Laboratory Standards Institute; 2012.
239. Vogel L, Jones G, Triep S, Koek A, Dijkshoorn L. RAPD typing of *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Serratia marcescens* and *Pseudomonas aeruginosa* isolates using standardized reagents. *Clin Microbiol Infect.* 1999;5(5):270-6.
240. de Campos PA, Royer S, Batistao DW, Araujo BF, Queiroz LL, de Brito CS, et al. Multidrug Resistance Related to Biofilm Formation in *Acinetobacter baumannii* and *Klebsiella pneumoniae* Clinical Strains from Different Pulsotypes. *Curr Microbiol.* 2016;72(5):617-27.
241. Naparstek L, Carmeli Y, Navon-Venezia S, Banin E. Biofilm formation and susceptibility to gentamicin and colistin of extremely drug-resistant KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*. *J Antimicrob Chemother.* 2014;69(4):1027-34.
242. Aghamohammadi M, Haine D, Kelton DF, Barkema HW, Hogeveen H, Keefe GP, et al. Herd-Level Mastitis-Associated Costs on Canadian Dairy Farms. *Frontiers in Veterinary Science.* 2018;5:100.
243. Oikonomou G, Machado VS, Santisteban C, Schukken YH, Bicalho RC. Microbial diversity of bovine mastitic milk as described by pyrosequencing of metagenomic 16s rDNA. *PLoS One.* 2012;7(10):e47671.
244. Walckenaer E, Leflon-Guibout V, Nicolas-Chanoine MH. How to identify *Raoultella* spp. including *R. ornithinolytica* isolates negative for ornithine decarboxylase? The reliability of the chromosomal bla gene. *J Microbiol Methods.* 2008;75(3):405-10.
245. Ponce-Alonso M, Rodriguez-Rojas L, Del Campo R, Canton R, Morosini MI. Comparison of different methods for identification of species of the genus *Raoultella*: report of 11 cases of *Raoultella* causing bacteraemia and literature review. *Clin Microbiol Infect.* 2016;22(3):252-7.
246. Fluit AC, Schmitz FJ. Resistance integrons and super-integrons. *Clin Microbiol Infect.* 2004;10(4):272-88.
247. Tremblay YD, Caron V, Blondeau A, Messier S, Jacques M. Biofilm formation by coagulase-negative staphylococci: impact on the efficacy of antimicrobials and disinfectants commonly used on dairy farms. *Vet Microbiol.* 2014;172(3-4):511-8.
248. Bokaeian M, Saeidi S, Shahi Z, Kadaei V. tetA and tetB Genes in *Klebsiella Pneumoniae* Isolated From Clinical Samples. *Gene, Cell and Tissue.* 2014;1(2):e18152.
249. Fluit AC, Florijn A, Verhoef J, Milatovic D. Presence of tetracycline resistance determinants and susceptibility to tigecycline and minocycline. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005;49(4):1636-8.
250. Frank T, Gautier V, Talarmin A, Bercion R, Arlet G. Characterization of sulphonamide resistance genes and class 1 integron gene cassettes in Enterobacteriaceae, Central African Republic (CAR). *J Antimicrob Chemother.* 2007;59(4):742-5.

251. Kozak GK, Boerlin P, Janecko N, Reid-Smith RJ, Jardine C. Antimicrobial resistance in *Escherichia coli* isolates from swine and wild small mammals in the proximity of swine farms and in natural environments in Ontario, Canada. *Appl Environ Microbiol.* 2009;75(3):559-66.
252. Sears PM, McCarthy KK. Diagnosis of mastitis for therapy decisions. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* 2003;19(1):93-108, vi.

## **Annexes**

## **Annexe 1 – Questionnaire pour les éleveurs de bovins laitiers**

Ce questionnaire a été développé dans le cadre de ce projet.

Hélène Lardé et Jonathan Massé ont participé à l'élaboration de la première version, la correction et la préparation de la version finale du questionnaire.

David Francoz, Jean-Philippe Roy, Marie Archambault et Simon Dufour ont contribué par leurs avis, à la correction et l'amélioration de ce questionnaire dans sa version finale.

Il s'agit de la version finale selon la mise en page d'origine en format paysage avec des marges étroites.

Date (JJ/MM/AAAA) : \_\_\_\_\_

Numéro de ferme : \_\_\_\_\_

Personne qui interroge : HL / JM

Heure de début : \_\_\_\_\_

Personne interrogée (responsable des soins et des traitements aux animaux) : \_\_\_\_\_

### Questionnaire à l'attention des éleveurs de bovins laitiers du Québec

Ce questionnaire vise d'abord à décrire comment les antibiotiques sont utilisés sur vos fermes. Dans un deuxième temps, le questionnaire cherche à déterminer quelles sont vos perceptions concernant l'évolution des pratiques d'utilisation des antibiotiques ainsi que vos inquiétudes concernant l'émergence de la résistance aux antibiotiques sur les fermes laitières.

Les réponses seront analysées de façon anonyme. Une fois l'analyse réalisée, les données du questionnaire seront détruites et ne seront pas utilisées à des fins autres que pour l'étude en cours. Un résumé des résultats de ce projet vous sera remis à la fin de l'étude.

Il n'y a pas de bonne ou de mauvaise réponse concernant vos décisions et opinions concernant l'utilisation des antibiotiques, sélectionnez la réponse qui s'applique le plus à votre situation.

#### A- Données générales

1. Quel est votre quota laitier possédé ? \_\_\_\_\_ kg de matière grasse par jour

2. Avez-vous une activité de transformation de produits laitiers (fromages, yogourts, crème...) sur votre ferme ?

Oui

Non

3. Votre activité « Bovins laitiers et production laitière » est-elle certifiée biologique ?

Oui

Non

4. Indiquez le pourcentage du revenu agricole de la ferme attribuable aux BOVINS LAITIERS ET PRODUCTION LAITIÈRE (toutes entreprises confondues) :  
\_\_\_\_\_ %

5. Indiquer les races de bovins laitiers dans votre troupeau (pourcentage approximatif pour chaque race) :

---



6. Avez-vous suivi une formation en groupe sur l'usage judicieux des antibiotiques offerte par votre vétérinaire au début de l'année 2018 ?
- Oui
- Non

7. Pensez-vous que les produits suivants contiennent des antibiotiques de très haute importance en santé humaine? (Cochez la case qui s'applique)

	Cet antibiotique est « de très haute importance en santé humaine ».	Cet antibiotique n'est pas « de très haute importance en santé humaine »	Je connais cet antibiotique, mais je ne connais pas son importance en santé humaine.	Je ne connais pas ce(s) produit(s).
Baytril ou A180				
Borgal ou Trimidox				
Cefa-lak, Cefa-dri ou Metricure				
Excenel, Excede, Ceftiocyl ou Eficur				
Micotil, Draxxin, Zactran, Zuprevo ou Tylan 200				
Rumensin ou monensin				
Oxyvet, Oxymycine ou Liquamycin				
Depocillin, Penpro, Procillin, Pen Vet 300, Duplocillin ou Propen				
Spectramast				
Special Formula 17900 – Forte				

8. Au cours de la dernière année, quel a été le nombre de visites vétérinaires, par mois ou par année, pour votre élevage ?

- a) pour le préventif (visites planifiées) : \_\_\_\_\_ visites par mois / année
- b) pour le curatif (comprenant les urgences) : \_\_\_\_\_ visites par mois / année

9. Pour les périodes suivantes d'entente ASAQ, avez-vous dépassé (ou prévoyez-vous dépasser) le plafond fixé pour le remboursement des frais vétérinaires par le MAPAQ ?

Période	CHOIX DE RÉPONSE :	À partir de quelle date étiez-vous (ou prévoyez-vous être) au-delà du plafond fixé ?
	- Oui - Non - Ne sait pas (indiquer quelle personne contacter pour le savoir)	
1 <sup>er</sup> avril 2015 au 31 mars 2016		
1 <sup>er</sup> avril 2016 au 31 mars 2017		
1 <sup>er</sup> avril 2017 au 31 mars 2018		

10. Au cours de la dernière année, vous êtes-vous procuré des antibiotiques :

		Si OUI :				
		Provenance ?	Pour quels antibiotiques en particulier ?	Quantité et fréquence d'achat ?	Raison pour laquelle vous utilisez ces fournisseurs (plutôt que vos vétérinaires réguliers) :	Commentaires (si besoin)
<b>Auprès de vétérinaires autres que vos vétérinaires réguliers</b>	<input type="checkbox"/> oui <input type="checkbox"/> non	<input type="checkbox"/> province QC <input type="checkbox"/> autre province <input type="checkbox"/> États-Unis <input type="checkbox"/> autre : préciser SVP _____				
<b>Auprès d'autres producteurs</b>	<input type="checkbox"/> oui <input type="checkbox"/> non	<input type="checkbox"/> province QC <input type="checkbox"/> autre province <input type="checkbox"/> États-Unis <input type="checkbox"/> autre : préciser SVP _____				
<b>Sur internet</b>	<input type="checkbox"/> oui <input type="checkbox"/> non	<input type="checkbox"/> province QC <input type="checkbox"/> autre province <input type="checkbox"/> États-Unis <input type="checkbox"/> autre : préciser SVP _____				
<b>Autre source d'achat de médicaments, précisez SVP : _____</b>	<input type="checkbox"/> oui <input type="checkbox"/> non	<input type="checkbox"/> province QC <input type="checkbox"/> autre province <input type="checkbox"/> États-Unis <input type="checkbox"/> autre : préciser SVP _____				

**11. Vous êtes-vous procurés des médicaments grâce au système AMVPQsec, c'est-à-dire directement auprès du CDMV (Centre de Distribution des Médicaments Vétérinaires), après avoir demandé une prescription à votre vétérinaire ?**

Oui, précisez combien de commandes depuis le 1<sup>er</sup> janvier 2017 : \_\_\_\_\_

Non

**12. Est-ce que vous gardez tous vos antibiotiques au même endroit ?**

Oui

Non, précisez SVP (nombre de pharmacies, bâtiments différents...) : \_\_\_\_\_



- nombre de BOVINS ENTRE LE SEVRAGE ET LE PREMIER VÊLAGE : \_\_\_\_\_

- nombre de VACHES EN LACTATION de 1<sup>e</sup> LACTATION : \_\_\_\_\_

- nombre de VACHES EN LACTATION de 2<sup>e</sup> LACTATION ET PLUS : \_\_\_\_\_

- nombre de VACHES TARIÉS : \_\_\_\_\_

- nombre de TAUREAUX LAITIERS : \_\_\_\_\_

- animaux AUTRES QUE DES BOVINS LAITIERS (bovins de boucherie, chevaux, petits ruminants...) [remarque : lister uniquement les animaux pouvant contribuer à la consommation d'antibiotiques sur la ferme] : \_\_\_\_\_

---

**17. Au cours de la dernière année,**

**a. avez-vous achetés des animaux ?**

Non

Oui, remplissez le tableau suivant :

<b>Veaux non-sevrés</b>	<b>Bovins entre le sevrage et la première mise-bas</b>	<b>Vaches</b>	<b>Taureaux</b>

**b. avez-vous transportés des animaux hors de votre ferme, et qui sont revenus vivants sur la ferme après le transport (exemple : expositions agricoles, hospitalisations au Centre Hospitalier Universitaire Vétérinaire, animaux en pension, etc...) ?**

Non

Oui, remplissez le tableau suivant :

<b>Veaux non-sevrés</b>	<b>Bovins entre le sevrage et la première mise-bas</b>	<b>Vaches</b>	<b>Taureaux</b>

### 18. Dans quel type de logement sont gardés les VEAUX NON SEVRÉS ?

Âge	Type de logement	Préciser	Contact physique possible avec d'autres animaux	Contact possible avec de la litière partagée d'autres animaux	Système d'alimentation	Lait servi (après le colostrum) PLUSIEURS CHOIX DE RÉPONSES POSSIBLES
_____	<input type="checkbox"/> individuel <input type="checkbox"/> à l'intérieur <input type="checkbox"/> à l'extérieur	<input type="checkbox"/> attaché <input type="checkbox"/> petit enclos individuel <input type="checkbox"/> huche <input type="checkbox"/> autre, préciser : _____	<input type="checkbox"/> oui, d'autres veaux (museaux qui se touchent au-dessus d'une séparation...) <input type="checkbox"/> oui, des vaches ou taures <input type="checkbox"/> non	<input type="checkbox"/> oui, litière d'autres veaux (séparation ajourée entre les enclos...) <input type="checkbox"/> oui, litière des vaches ou taures <input type="checkbox"/> non	<input type="checkbox"/> manuel / biberon ou chaudière individuelle <input type="checkbox"/> système automatique de distribution (louve)	<input type="checkbox"/> lait en poudre, médicamenté ? <input type="checkbox"/> non <input type="checkbox"/> oui, préciser : _____  <input type="checkbox"/> lait des vaches en début de lactation (lait impropre à la consommation humaine)  <input type="checkbox"/> lait des vaches en période de retrait de lait suite à l'utilisation de médicaments  <input type="checkbox"/> lait de vaches non en retrait
	<input type="checkbox"/> en groupe <input type="checkbox"/> à l'intérieur <input type="checkbox"/> à l'extérieur	Nombre de veaux par groupe en moyenne : _____	<input type="checkbox"/> oui, des vaches ou taures <input type="checkbox"/> non	<input type="checkbox"/> oui, litière des autres enclos, ou des vaches ou taures (séparations incomplètes...) <input type="checkbox"/> non	<input type="checkbox"/> manuel / biberon ou chaudière individuelle <input type="checkbox"/> manuel / chaudière commune au groupe (avec plusieurs tétines) <input type="checkbox"/> système automatique de distribution (louve)	<input type="checkbox"/> lait en poudre, médicamenté ? <input type="checkbox"/> non <input type="checkbox"/> oui, préciser : _____  <input type="checkbox"/> lait des vaches en début de lactation (lait impropre à la consommation humaine)  <input type="checkbox"/> lait des vaches en période de retrait de lait suite à l'utilisation de médicaments  <input type="checkbox"/> lait de vaches non en retrait
_____	<input type="checkbox"/> individuel <input type="checkbox"/> à l'intérieur <input type="checkbox"/> à l'extérieur	<input type="checkbox"/> attaché <input type="checkbox"/> petit enclos individuel <input type="checkbox"/> huche <input type="checkbox"/> autre, préciser : _____	<input type="checkbox"/> oui, d'autres veaux (museaux qui se touchent au-dessus d'une séparation...) <input type="checkbox"/> oui, des vaches ou taures <input type="checkbox"/> non	<input type="checkbox"/> oui, litière d'autres veaux (séparation ajourée entre les enclos...) <input type="checkbox"/> oui, litière des vaches ou taures <input type="checkbox"/> non	<input type="checkbox"/> manuel / biberon ou chaudière individuelle <input type="checkbox"/> système automatique de distribution (louve)	<input type="checkbox"/> lait en poudre, médicamenté ? <input type="checkbox"/> non <input type="checkbox"/> oui, préciser : _____  <input type="checkbox"/> lait des vaches en début de lactation (lait impropre à la consommation humaine)  <input type="checkbox"/> lait des vaches en période de retrait de lait suite à l'utilisation de médicaments  <input type="checkbox"/> lait de vaches non en retrait
	<input type="checkbox"/> en groupe <input type="checkbox"/> à l'intérieur <input type="checkbox"/> à l'extérieur	Nombre de veaux par groupe en moyenne : _____	<input type="checkbox"/> oui, des vaches ou taures <input type="checkbox"/> non	<input type="checkbox"/> oui, litière des autres enclos, ou des vaches ou taures (séparations incomplètes...) <input type="checkbox"/> non	<input type="checkbox"/> manuel / biberon ou chaudière individuelle <input type="checkbox"/> manuel / chaudière commune au groupe (avec plusieurs tétines) <input type="checkbox"/> système automatique de distribution (louve)	<input type="checkbox"/> lait en poudre, médicamenté ? <input type="checkbox"/> non <input type="checkbox"/> oui, préciser : _____  <input type="checkbox"/> lait des vaches en début de lactation (lait impropre à la consommation humaine)  <input type="checkbox"/> lait des vaches en période de retrait de lait suite à l'utilisation de médicaments  <input type="checkbox"/> lait de vaches non en retrait
_____	<input type="checkbox"/> individuel <input type="checkbox"/> à l'intérieur <input type="checkbox"/> à l'extérieur	<input type="checkbox"/> attaché <input type="checkbox"/> petit enclos individuel <input type="checkbox"/> huche <input type="checkbox"/> autre, préciser : _____	<input type="checkbox"/> oui, d'autres veaux (museaux qui se touchent au-dessus d'une séparation...) <input type="checkbox"/> oui, des vaches ou taures <input type="checkbox"/> non	<input type="checkbox"/> oui, litière d'autres veaux (séparation ajourée entre les enclos...) <input type="checkbox"/> oui, litière des vaches ou taures <input type="checkbox"/> non	<input type="checkbox"/> manuel / biberon ou chaudière individuelle <input type="checkbox"/> système automatique de distribution (louve)	<input type="checkbox"/> lait en poudre, médicamenté ? <input type="checkbox"/> non <input type="checkbox"/> oui, préciser : _____  <input type="checkbox"/> lait des vaches en début de lactation (lait impropre à la consommation humaine)  <input type="checkbox"/> lait des vaches en période de retrait de lait suite à l'utilisation de médicaments  <input type="checkbox"/> lait de vaches non en retrait
	<input type="checkbox"/> en groupe <input type="checkbox"/> à l'intérieur <input type="checkbox"/> à l'extérieur	Nombre de veaux par groupe en moyenne : _____	<input type="checkbox"/> oui, des vaches ou taures <input type="checkbox"/> non	<input type="checkbox"/> oui, litière des autres enclos, ou des vaches ou taures (séparations incomplètes...) <input type="checkbox"/> non	<input type="checkbox"/> manuel / biberon ou chaudière individuelle <input type="checkbox"/> manuel / chaudière commune au groupe (avec plusieurs tétines) <input type="checkbox"/> système automatique de distribution (louve)	<input type="checkbox"/> lait en poudre, médicamenté ? <input type="checkbox"/> non <input type="checkbox"/> oui, préciser : _____  <input type="checkbox"/> lait des vaches en début de lactation (lait impropre à la consommation humaine)  <input type="checkbox"/> lait des vaches en période de retrait de lait suite à l'utilisation de médicaments  <input type="checkbox"/> lait de vaches non en retrait
_____	<input type="checkbox"/> individuel <input type="checkbox"/> à l'intérieur <input type="checkbox"/> à l'extérieur	<input type="checkbox"/> attaché <input type="checkbox"/> petit enclos individuel <input type="checkbox"/> huche <input type="checkbox"/> autre, préciser : _____	<input type="checkbox"/> oui, d'autres veaux (museaux qui se touchent au-dessus d'une séparation...) <input type="checkbox"/> oui, des vaches ou taures <input type="checkbox"/> non	<input type="checkbox"/> oui, litière d'autres veaux (séparation ajourée entre les enclos...) <input type="checkbox"/> oui, litière des vaches ou taures <input type="checkbox"/> non	<input type="checkbox"/> manuel / biberon ou chaudière individuelle <input type="checkbox"/> système automatique de distribution (louve)	<input type="checkbox"/> lait en poudre, médicamenté ? <input type="checkbox"/> non <input type="checkbox"/> oui, préciser : _____  <input type="checkbox"/> lait des vaches en début de lactation (lait impropre à la consommation humaine)  <input type="checkbox"/> lait des vaches en période de retrait de lait suite à l'utilisation de médicaments  <input type="checkbox"/> lait de vaches non en retrait
	<input type="checkbox"/> en groupe <input type="checkbox"/> à l'intérieur <input type="checkbox"/> à l'extérieur	Nombre de veaux par groupe en moyenne : _____	<input type="checkbox"/> oui, des vaches ou taures <input type="checkbox"/> non	<input type="checkbox"/> oui, litière des autres enclos, ou des vaches ou taures (séparations incomplètes...) <input type="checkbox"/> non	<input type="checkbox"/> manuel / biberon ou chaudière individuelle <input type="checkbox"/> manuel / chaudière commune au groupe (avec plusieurs tétines) <input type="checkbox"/> système automatique de distribution (louve)	<input type="checkbox"/> lait en poudre, médicamenté ? <input type="checkbox"/> non <input type="checkbox"/> oui, préciser : _____  <input type="checkbox"/> lait des vaches en début de lactation (lait impropre à la consommation humaine)  <input type="checkbox"/> lait des vaches en période de retrait de lait suite à l'utilisation de médicaments  <input type="checkbox"/> lait de vaches non en retrait

**19. Dans quel type de logement sont gardés les bovins laitiers, par catégories d'âge, et ont-ils accès à l'extérieur : (veaux sevrés, taures, vaches en lactation, vaches tarées)**

---

---

---

---

---

**20. Vous arrive-t-il d'utiliser le lait des vaches en période de retrait suite à l'utilisation d'antibiotiques pour nourrir vos veaux ?**

Oui

- Pour quels veaux en particulier :
  - o mâles / femelles / pas de distinction de sexe
  - o veaux de quel âge ? \_\_\_\_\_
  - o veaux malades seulement / veaux sains uniquement / pas de distinction
- Sur la dernière année, de façon générale, quel pourcentage de lait des vaches en période de retrait est donné aux veaux ? \_\_\_\_\_%
- Le lait utilisé provient des vaches :
  - o encore sous traitement antibiotique / en période de retrait mais plus sous traitement antibiotique / pas de distinction

Non

**21. Est-ce que votre élevage a déjà été diagnostiqué positif pour *Salmonella Dublin* ?**

Oui

- Si oui, préciser la date et le type d'échantillon positif (lait, sang ou nécropsie) : \_\_\_\_\_
- Si oui, votre vétérinaire a-t-il identifié des animaux malades de *S. Dublin* dans l'élevage ? \_\_\_\_\_

Non, testé et négatif

Non, pas testé

## B- Pratiques d'utilisation des antibiotiques dans votre ferme

### 22. Prenez-vous la température d'un animal avant de mettre en place un traitement antibiotique ?

- oui, toujours } À partir de quelle température rectale mettez-vous en place un traitement antibiotique sur une vache adulte : \_\_\_\_\_ °C ou F  
 oui, parfois } À partir de quelle température rectale mettez-vous en place un traitement antibiotique sur un veau : \_\_\_\_\_ °C ou F  
 non

### 23. Pour chacune des conditions suivantes, indiquer si vous traitez les animaux par vous-même, sans examen vétérinaire. Il s'agit des VEAUX traités DANS LA DERNIÈRE ANNÉE.

Conditions cliniques	Nombre d'animaux affectés de cette condition dans la dernière année	Nombre de ces animaux que vous avez traités par vous-même (sans examen vétérinaire)	Quels traitements ? (Lister juste les antibiotiques) +/- Commentaires	Voie(s) d'administration	Dose	Fréquence	Durée du traitement	Protocoles discutés avec vos vétérinaires
<b>Pneumonie aiguë</b> : veau qui respire vite et superficiel, toux possible, jetage nasal purulent								<input type="checkbox"/> oui, oral <input type="checkbox"/> oui, standardisé écrit <input type="checkbox"/> non, traitement habituel
<b>Diarrhée aiguë</b> : veau en diarrhée profuse, avec possibilité de sang frais dans le fumier, fesses souillées, abattu								<input type="checkbox"/> oui, oral <input type="checkbox"/> oui, standardisé écrit <input type="checkbox"/> non, traitement habituel
<b>Infection de l'ombilic</b> : gros ombilic non rétractable dans l'abdomen, ferme et inconfort à la palpation, avec possibilité de pus s'écoulant ou croûtes / poils collés								<input type="checkbox"/> oui, oral <input type="checkbox"/> oui, standardisé écrit <input type="checkbox"/> non, traitement habituel
<b>Otite</b> : veau présentant une tête penchée, une ou 2 oreilles pendantes, pus pouvant s'écouler de l'oreille, difficultés à manger possible								<input type="checkbox"/> oui, oral <input type="checkbox"/> oui, standardisé écrit <input type="checkbox"/> non, traitement habituel
<b>Arthrite septique</b> : veau avec non-appui ou appui léger sur une patte, grosse articulation, douleur à la pression, possibilité d'un écoulement de pus de l'articulation								<input type="checkbox"/> oui, oral <input type="checkbox"/> oui, standardisé écrit <input type="checkbox"/> non, traitement habituel

**24. Pour chacune des conditions suivantes, indiquer si vous traitez les animaux par vous-même, sans examen vétérinaire. Il s'agit des VACHES EN LACTATION traitées DANS LA DERNIÈRE ANNÉE.**

Conditions cliniques	Nombre d'animaux affectés de cette condition dans la dernière année	Nombre de ces animaux que vous avez traités par vous-même (sans examen vétérinaire)	Quels traitements ? (Lister juste les antibiotiques) +/- Commentaires	Voie(s) d'administration	Dose	Fréquence	Durée du traitement	Protocoles discutés avec vos vétérinaires
<b>Pneumonie aiguë</b> : vache qui respire vite et superficiel, toux possible, jetage nasal purulent								<input type="checkbox"/> oui, oral <input type="checkbox"/> oui, standardisé écrit <input type="checkbox"/> non, traitement habituel
<b>Diarrhée aiguë</b> : vache en diarrhée profuse avec possibilité de sang frais dans le fumier, abattue, mange moins								<input type="checkbox"/> oui, oral <input type="checkbox"/> oui, standardisé écrit <input type="checkbox"/> non, traitement habituel
<b>Rétention placentaire</b> : vache vêlée depuis plus de 24h, qui n'a pas délivré, bon état général								<input type="checkbox"/> oui, oral <input type="checkbox"/> oui, standardisé écrit <input type="checkbox"/> non, traitement habituel
<b>Métrite aigue</b> : écoulement brunâtre nauséabond à la vulve, vache abattue, mange moins, fièvre								<input type="checkbox"/> oui, oral <input type="checkbox"/> oui, standardisé écrit <input type="checkbox"/> non, traitement habituel
<b>Mammite légère ou modérée</b> : lait présentant des grumeaux, quartier normal ou modérément induré, bon état général								<input type="checkbox"/> oui, oral <input type="checkbox"/> oui, standardisé écrit <input type="checkbox"/> non, traitement habituel
<b>Mammite sévère</b> : lait modifié (plus aqueux) et quartier induré, vache abattue, mange moins, difficile à lever, fièvre								<input type="checkbox"/> oui, oral <input type="checkbox"/> oui, standardisé écrit <input type="checkbox"/> non, traitement habituel
<b>Piétin d'Italie</b> (dermatite digitale) PHOTO								<input type="checkbox"/> oui, oral <input type="checkbox"/> oui, standardisé écrit <input type="checkbox"/> non, traitement habituel
« <b>File pas, mange pas</b> » d'origine indéterminée : vache qui mange « on and off » et qui produit moins de lait								<input type="checkbox"/> oui, oral <input type="checkbox"/> oui, standardisé écrit <input type="checkbox"/> non, traitement habituel



**25. Pour chacune des conditions suivantes, indiquer si vous traitez les animaux par vous-même, sans examen vétérinaire. Il s'agit des TAURES et VACHES TARIÉS traités DANS LA DERNIÈRE ANNÉE.**

Conditions cliniques	Nombre d'animaux affectés de cette condition dans la dernière année	Nombre de ces animaux que vous avez traités par vous-même (sans examen vétérinaire)	Quels traitements ? ( <u>Lister juste les antibiotiques</u> ) +/- Commentaires	Voie(s) d'administration	Dose	Fréquence	Durée du traitement	Protocoles discutés avec vos vétérinaires
<b>Pneumonie aiguë</b> : taure ou vache tarie, qui respire vite et superficiel, toux possible, jetage nasal purulent								<input type="checkbox"/> oui, oral <input type="checkbox"/> oui, standardisé écrit <input type="checkbox"/> non, traitement habituel
<b>Diarrhée aiguë</b> : taure ou vache tarie, en diarrhée profuse avec possibilité de sang frais dans le fumier, abattue, mange moins								<input type="checkbox"/> oui, oral <input type="checkbox"/> oui, standardisé écrit <input type="checkbox"/> non, traitement habituel
<b>Piétin d'Italie</b> (dermatite digitale) PHOTO								<input type="checkbox"/> oui, oral <input type="checkbox"/> oui, standardisé écrit <input type="checkbox"/> non, traitement habituel
<b>« File pas, mange pas » d'origine indéterminée</b> : taure ou vache tarie qui mange « on and off »								<input type="checkbox"/> oui, oral <input type="checkbox"/> oui, standardisé écrit <input type="checkbox"/> non, traitement habituel

**26. Dans la dernière année, avez-vous utilisé des médicaments dans l'alimentation de vos animaux sevrés ?**

Oui, précisez (quels animaux, quel médicament, période de l'année) : \_\_\_\_\_

Non

**27. Dans la dernière année, avez-vous utilisé de l'amprolium (exemples : Amprol solution à 9,6% ou Ampromed) dans l'eau des veaux (traitement de la coccidiose) ?**

non

oui, systématiquement

oui, parfois, précisez SVP : \_\_\_\_\_

28. Dans la dernière année, avez-vous utilisé des antibiotiques appliqués localement sur la peau ou les pieds de vos vaches ?

- non  
 oui, remplissez le tableau suivant :

	Quel antibiotique ?	Nombre de vaches traitées au cours de la dernière année	Fréquence du traitement lorsqu'appliqué	Temps de retrait appliqués (lait et viande)
<input type="checkbox"/> antibiotiques en poudre appliquée dans un bandage sur les onglons				
<input type="checkbox"/> antibiotiques en spray appliqué sur les onglons				
<input type="checkbox"/> antibiotiques en pâte (exemple : mélange poudre avec glycol) appliquée sur les onglons				
<input type="checkbox"/> antibiotiques dans un pédiluve où passent les vaches				

29. Quand votre vétérinaire prescrit un traitement antibiotique, dans quelle proportion des cas respectez-vous le nombre de jours prescrits ? \_\_\_\_\_%

Si moins de 100%, remplir le tableau :

	Vous arrêtez le traitement antibiotique avant la fin de la durée prescrite	Vous continuez le traitement antibiotique jusqu'à la fin de la durée prescrite	Vous continuez le traitement antibiotique au-delà de la durée prescrite	Vous consultez votre vétérinaire pour modifier le traitement antibiotique (l'arrêter, le changer...)	Vous avez une autre approche concernant le respect de la durée prescrite, précisez SVP
Dans le cas d'un animal dont les signes cliniques s'améliorent avant la fin de la durée du traitement					
Dans le cas d'un animal dont les signes cliniques se détériorent avant la fin de la durée du traitement					
Dans le cas d'un animal dont les signes cliniques restent stables avant la fin de la durée du traitement					

30. Lorsque vous mettez en place un traitement antibiotique sans faire appel à votre vétérinaire, que faites-vous dans les cas suivants :

	Vous arrêtez le traitement antibiotique	Vous continuez le traitement antibiotique pour la durée recommandée sur la bouteille	Vous continuez le traitement antibiotique au-delà de la durée recommandée sur la bouteille	Vous consultez votre vétérinaire pour modifier le traitement antibiotique (l'arrêter, le changer...)	Vous avez une autre approche, précisez SVP
Dans le cas d'un animal dont les signes cliniques s'améliorent					
Dans le cas d'un animal dont les signes cliniques se détériorent					
Dans le cas d'un animal dont les signes cliniques restent stables					

**31. Concernant votre méthode de tarissement, au cours de la dernière année,**

**a. quelle est votre méthode de tarissement, et l'antibiotique utilisé si applicable ?**

**traitement antibiotique UNIVERSEL** (traitement de TOUS les quartiers, de TOUTES les vaches)

- Tubes intra-mammaires utilisés : \_\_\_\_\_

**traitement antibiotique SÉLECTIF** (traitement de CERTAINS quartiers seulement, de CERTAINES vaches seulement)

- Proportion de vaches dont au moins un quartier est traité au tarissement : \_\_\_\_\_%

- Proportion des quartiers traités : Lorsqu'une vache est tarie avec un traitement antibiotique IMM, alors en moyenne 1 / 2 / 3 / 4 quartiers sont traités (entourer le bon nombre de quartiers).

- Tubes intra-mammaires utilisés : \_\_\_\_\_

- Critères utilisés pour traiter une vache au tarissement : (cocher dans la liste suivante tout ce qui s'applique)

- CMT positif
- Culture de lait positive envoyée dans un laboratoire de bactériologie
- Pétrifilm positif réalisé à la ferme ou en clinique vétérinaire
- Comptage des Cellules Somatiques élevé
- Historique de mammite
- Autre(s) critère(s) utilisé(s), préciser SVP : \_\_\_\_\_

**aucun traitement antibiotique**

**b. utilisez-vous un scellant à trayon (OrbeSeal®) lors du tarissement ?**

**oui, systématiquement**

**oui, occasionnellement**

- Proportion des vaches qui reçoivent un scellant lors du tarissement : \_\_\_\_\_%
- Préciser quelles sont les critères pour appliquer un scellant à certaines vaches en particulier : \_\_\_\_\_

**non, jamais**

**c. avez-vous changé votre méthode de tarissement ? oui / non**

SI OUI, préciser le(s) changement(s) SVP : \_\_\_\_\_

**32. Connaissez-vous la colistine ?**

**Oui**

si oui : l'avez-vous utilisée au cours de la dernière année pour traiter vos animaux ? Précisez les situations : \_\_\_\_\_

**Non**

33. **Au cours de la dernière année, indiquez le nombre d'animaux traités avec les produits suivants (rayer dans le tableau les produits qui ne sont jamais utilisés sur la ferme).**

	Veaux non-sevrés	Bovins sevrés, avant le premier vêlage	Vaches en lactation	Vaches tarées
Excenel				
Excede				
Spectramast LC	NA	NA		NA
Spectramast DC	NA	NA		
Ceftiocyl				
Eficur				
Baytril				
A180 (danofloxacin)				

34. **Concernant le CEFTIOFUR INJECTABLE (Excenel, Excede, Ceftiocyl ou Eficur) :**

Je n'ai pas utilisé de ceftiofur injectable sur ma ferme dans la dernière année. **PASSER À LA QUESTION SUIVANTE.**

J'ai utilisé du ceftiofur injectable dans la dernière année. **Indiquez alors votre niveau d'accord avec les énoncés suivants :**

	Totalement en accord	Plutôt en accord	Pas d'opinion	Plutôt en désaccord	Totalement en désaccord
Le ceftiofur est en général plus efficace que la pénicilline.					
C'est à cause de la grande <b>valeur génétique</b> d'un animal que je préfère le traiter avec du ceftiofur plutôt qu'un autre antibiotique.					
C'est parce qu'une vache a une <b>forte production laitière</b> que je préfère la traiter avec du ceftiofur plutôt qu'un autre antibiotique.					
Une vache <b>en lactation</b> sera traitée préférentiellement avec du ceftiofur par rapport à une vache tarée.					
Quand un <b>grand nombre d'animaux</b> est malade, je préfère traiter avec du ceftiofur.					
Quand la <b>maladie est sévère</b> , je préfère traiter avec du ceftiofur.					
Pour les <b>maladies chroniques</b> (depuis plus d'une semaine), je préfère traiter avec du ceftiofur.					
Je préfère traiter les <b>jeunes animaux</b> (avant le 1 <sup>e</sup> vêlage) avec du ceftiofur.					
À cause du <b>coût élevé</b> du ceftiofur, je préfère utiliser un autre antibiotique.					
<b>Uniquement pour les producteurs qui utilisent l'EXCEDE :</b> Concernant l'Excede, le fait que le traitement consiste en une seule injection me fait préférer ce traitement par rapport à un autre antibiotique.					

**35. Concernant le SPECTRAMAST LC pour le traitement des mammites cliniques durant la lactation :**

- Je n'ai pas utilisé de Spectramast LC dans la dernière année. **PASSER À LA QUESTION SUIVANTE.**
- J'ai utilisé du Spectramast LC dans la dernière année. **Indiquez alors votre niveau d'accord avec les énoncés suivants :**

	Totalement en accord	Plutôt en accord	Pas d'opinion	Plutôt en désaccord	Totalement en désaccord
Le Spectramast LC est en général plus efficace que les autres produits intra-mammaires.					
C'est à cause de la grande <b>valeur génétique</b> d'une vache que je préfère la traiter avec Spectramast LC.					
Quand la <b>mammite est sévère</b> , je préfère traiter avec Spectramast LC.					
Pour les cas de <b>récidive de mammite</b> clinique ou qui <b>répondent mal à un premier traitement intra-mammaire</b> , je préfère traiter avec Spectramast LC.					

**36. Concernant le SPECTRAMAST DC pour le tarissement, indiquez votre niveau d'accord avec les énoncés suivants :**

- Je n'ai pas utilisé de Spectramast DC dans la dernière année. **PASSER À LA QUESTION SUIVANTE.**
- J'ai utilisé du Spectramast DC dans la dernière année. **Indiquez alors votre niveau d'accord avec les énoncés suivants :**

	Totalement en accord	Plutôt en accord	Pas d'opinion	Plutôt en désaccord	Totalement en désaccord
Le Spectramast DC est en général plus efficace que les autres produits intra-mammaires.					
C'est à cause de la grande <b>valeur génétique</b> d'une vache que je préfère la traiter avec Spectramast DC.					
Pour les vaches qui arrivent au tarissement avec une <b>infection chronique du pis</b> (exemple : <i>Staphylococcus aureus</i> ), je préfère traiter avec Spectramast DC.					

**37. Concernant le BAYTRIL et/ou le A180 pour le traitement des maladies respiratoires chez les animaux de remplacement et les vaches tarées :**

- Je n'ai pas utilisé de Baytril ou de A180 dans la dernière année. **PASSER À LA QUESTION SUIVANTE.**
- J'ai utilisé du Baytril ou du A180 dans la dernière année. **Indiquez alors votre niveau d'accord avec les énoncés suivants :**

	Totalement en accord	Plutôt en accord	Pas d'opinion	Plutôt en désaccord	Totalement en désaccord
Le Baytril ou le A180 est en général plus efficace que les autres antibiotiques pour le traitement des maladies respiratoires.					
C'est à cause de la grande <b>valeur génétique</b> d'un animal que je préfère le traiter avec du Baytril ou du A180 plutôt qu'un autre antibiotique.					
Je préfère traiter les animaux de remplacement ou les vaches tarées ayant un <b>potentiel de production important</b> avec du Baytril ou du A180.					
Je préfère traiter les <b>jeunes animaux</b> (avant le 1 <sup>er</sup> vêlage) avec du Baytril ou du A180.					
Quand un <b>grand nombre d'animaux</b> est malade, je préfère traiter avec du Baytril ou du A180.					
Quand la <b>maladie respiratoire est sévère</b> , je préfère traiter avec du Baytril ou du A180.					
Pour les <b>maladies respiratoires chroniques</b> (depuis plus d'une semaine), je préfère traiter avec du Baytril ou du A180.					
À cause du <b>coût élevé</b> du Baytril ou du A180, je préfère utiliser d'autres antibiotiques.					

### C- Perceptions vis-à-vis de l'utilisation des antibiotiques sur les fermes laitières au Québec

**38. Pensez-vous que l'utilisation des antibiotiques pourrait être réduite sur votre ferme sans avoir d'impact sur la santé de votre élevage ?**

Oui ; Quel pourcentage de réduction pourrait être appliqué d'après vous sans affecter la santé ? \_\_\_\_\_%

Non

**39. Pensez-vous que l'utilisation des antibiotiques pourrait être réduite au Québec sans avoir d'impact sur la santé des élevages ?**

Oui ; Quel pourcentage de réduction pourrait être appliqué d'après vous sans affecter la santé ? \_\_\_\_\_%

Non

**40. Connaissez-vous le phénomène de résistance aux antibiotiques chez les bactéries avant d'être impliqué dans ce projet ? (encercler)**

Non                      un peu                      moyennement                      très bien

**41. Avez-vous déjà été face à un problème de bactérie multi-résistante confirmé par une analyse de laboratoire dans votre élevage ?**

Oui, précisez pour quelle(s) condition(s) clinique(s) : \_\_\_\_\_

Non

Je ne sais pas

**42. Selon vous, est-ce que la résistance aux antibiotiques dans les fermes pourrait avoir des répercussions en santé humaine ?**

Oui, préciser comment selon vous : \_\_\_\_\_

Non

**43. Pensez-vous que l'interdiction d'utiliser des antibiotiques de très haute importance en Santé Humaine (tels que Spectramast, Excenel, Baytril) pourrait avoir des répercussions négatives sur votre élevage ?**

Oui

Si oui, spécifiez les répercussions négatives attendues :

Sur la rentabilité / productivité de mon élevage (économique)

Sur la santé des animaux

Sur le bien-être des animaux

Autre répercussion(s) négative(s) attendue(s), précisez SVP : \_\_\_\_\_

Non

44. Indiquez votre niveau d'accord avec les énoncés suivants :

	Totalement en accord	Plutôt en accord	Pas d'opinion	Plutôt en désaccord	Totalement en désaccord
Les antibiotiques utilisés chez les bovins laitiers sont similaires à ceux utilisés chez les humains.					
Les antibiotiques sont aussi efficaces que par le passé pour traiter les infections.					
Un antibiotique peut être utilisé pour traiter plusieurs maladies infectieuses différentes toujours avec la même efficacité.					
On devrait <b>LIMITER l'utilisation</b> de certains antibiotiques chez les bovins laitiers afin de limiter l'apparition de résistance <b>dans les fermes laitières</b> .					
On devrait <b>INTERDIRE l'utilisation</b> de certains antibiotiques chez les bovins laitiers afin de limiter l'apparition de résistance <b>dans les fermes laitières</b> .					
On devrait <b>LIMITER l'utilisation</b> de certains antibiotiques chez les bovins laitiers afin de limiter l'apparition de résistance <b>en médecine humaine</b> .					
On devrait <b>INTERDIRE l'utilisation</b> de certains antibiotiques chez les bovins laitiers afin de limiter l'apparition de résistance <b>en médecine humaine</b> .					

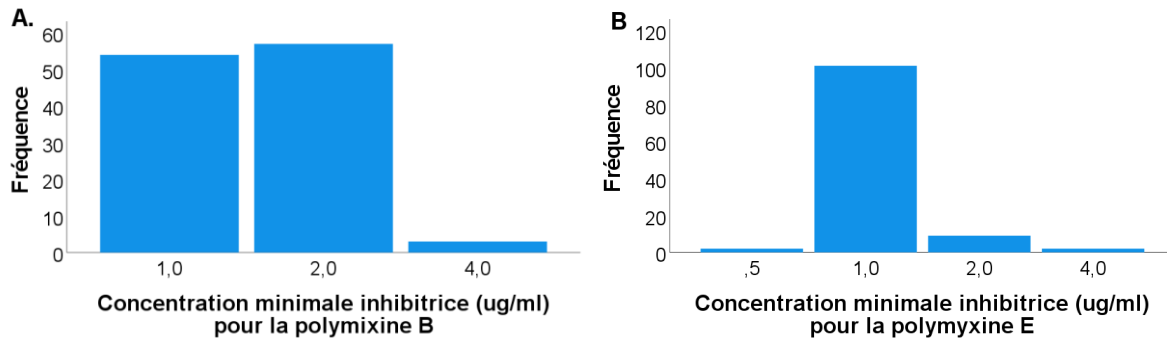
45. Pour les énoncés suivants, concernant les fermes de bovins laitiers au Québec, choisissez un choix de réponse parmi les possibilités suivantes :

	Je pense que cette utilisation devrait être <b>interdite</b> .	Je pense qu'une <b>loi</b> devrait encadrer précisément cette utilisation.	Je pense que des <b>recommandations</b> devraient être émises par le MAPAQ.	Je ne pense pas qu'il y ait besoin de changement.	Je n'ai <b>pas d'opinion</b> pour cet énoncé.
Concernant l'utilisation des <b>antibiotiques de très haute importance</b> en Santé Humaine (tels que Spectramast, Excenel, Baytril) :					
Concernant le traitement antibiotique <b>universel</b> au tarissement :					
Concernant l'utilisation des antibiotiques <b>en prévention</b> (administration d'antibiotiques à des animaux à risque de développer une maladie) :					
Concernant l'utilisation des antibiotiques <b>en métaphylaxie</b> (administration d'antibiotiques à des animaux appartenant à un groupe dans lequel des animaux sont malades) :					
Concernant l'utilisation des antibiotiques <b>comme promoteurs de croissance</b> (administration de faibles doses d'antibiotiques en absence de maladie, pour améliorer la croissance et favoriser le gain de poids) :					

**FIN! Merci de votre participation !!**

Heure de fin du questionnaire : \_\_\_\_\_ Durée du questionnaire (en minutes) : \_\_\_\_\_

## Annexe 2 – Résultats supplémentaires de concentration minimale inhibitrice pour la polymyxine B et E



Concentration minimale inhibitrice pour A) la polymyxine B et B) la polymyxine E (colistine) obtenue à partir de *E. coli* ( $n=114$ ) isolés de fumiers de veaux pré-sevrages sur des fermes laitières du Québec. Les isolats avec une concentration minimale inhibitrice de  $4\mu\text{g/ml}$  ont été obtenus durant la même journée d'expérimentation suggérant une possible variation normale de cette concentration attribuable à la manipulation. Malheureusement, par manque de temps, les échantillons n'ont pas été repris pour confirmer cette hypothèse.



### Annexe 3 – Résultats supplémentaires de la répartition du nombre de veaux par pool de fumier

		Croissance de <i>E. coli</i> producteur de BLSE/AmpC		
		Négatif	Positif	Total
	1	14	8	22
Nombre de veaux dans un pool de fumier	2	9	17	26
	3	10	15	25
	4	17	22	39
	5	22	61	83
	Total	72	123	195

Un protocole sélectif standardisé utilisant le céfotaxime a été utilisé pour déterminer si un pool d'échantillon de fumier avait un *E. coli* producteur de BLSE/AmpC. Les fumiers des veaux pré-sevrage proviennent de 101 fermes de bovins laitiers au Québec répartis en deux périodes d'échantillonnage. Il y avait 5 fermes sans veau pour l'une des visites et une ferme sans veau pour les deux visites d'échantillonnage. Ces 7 échantillons manquants ne sont pas présentés dans ce tableau.

## Annexe 4 – Formulaires d'éthique



N° de certificat  
16-166-CERES-D

Comité d'éthique de la recherche en santé

### CERTIFICAT D'APPROBATION ÉTHIQUE

Le Comité d'éthique de la recherche en santé (CERES), selon les procédures en vigueur, en vertu des documents qui lui ont été fournis, a examiné le projet de recherche suivant et conclu qu'il respecte les règles d'éthique énoncées dans la Politique sur la recherche avec des êtres humains de l'Université de Montréal.

Projet	
<b>Titre du projet</b>	<b>Prévalence, cause et contrôle de l'antibiorésistance sur les fermes laitières québécoises</b>
<b>Chercheurs requérants</b>	<b>Marie Archambault</b> (ND), Professeure titulaire, Faculté de médecine vétérinaire - Département de pathologie et microbiologie <b>David Francoz</b> (ND), Professeure titulaire, Faculté de médecine vétérinaire - Département des sciences cliniques <b>Simon Dufour</b> (ND), Professeure adjoint, Faculté de médecine vétérinaire - Département de pathologie et microbiologie <b>Jean-Philippe Roy</b> (ND), Professeure titulaire, Faculté de médecine vétérinaire - Département des sciences cliniques

Autres collaborateurs: Soulyvane Nguon & Olivia Labrecque (MAPAQ), Marie-Ève Paradis (AMVPQ) & Jonathan Massé (Candidat à la M. Sc. en sciences vétérinaires, UdeM)


Financement	
<b>Organisme</b>	MAPAQ
<b>Programme</b>	Innov'Action Agroalimentaire
<b>Titre de l'octroi si différent</b>	
<b>Numéro d'octroi</b>	IA116596
<b>Chercheur principal</b>	
<b>No de compte</b>	

#### MODALITÉS D'APPLICATION

Tout changement anticipé au protocole de recherche doit être communiqué au CERES qui en évaluera l'impact au chapitre de l'éthique.

Toute interruption prématurée du projet ou tout incident grave doit être immédiatement signalé au CERES

Selon les règles universitaires en vigueur, un suivi annuel est minimalement exigé pour maintenir la validité de la présente approbation éthique, et ce, jusqu'à la fin du projet. Le questionnaire de suivi est disponible sur la page web du CERES.

  
Dominique Langelier, présidente  
Comité d'éthique de la recherche en santé  
Université de Montréal

**11 janvier 2017**  
Date de délivrance

**1er juillet 2019**  
Date de fin de validité

#### adresse postale

C.P. 6128, succ. Centre-ville  
Montréal QC H3C 3J7

3744 Jean-Brillant  
4e étage, bur. 430-11  
Montréal QC H3T 1P1

Téléphone : 514-343-6111 poste 2604  
ceres@umontreal.ca  
www.ceres.umontreal.ca

Le 24 novembre 2016

Madame Marie Archambault  
Professeure titulaire  
Faculté de médecine vétérinaire – département de pathologie et microbiologie

Madame Archambault,

À la suite de l'évaluation de votre demande d'autorisation d'utiliser des animaux pour le projet :

**Projet : 16-Rech-1759**

**Titre : Prévalence, cause et contrôle de l'antibiorésistance sur les fermes laitières québécoises**

**Date d'échéance de l'autorisation d'utiliser les animaux : 1<sup>er</sup> décembre 2017**

Le Comité d'éthique de l'utilisation des animaux (CÉUA) vous remercie pour les réponses reçues et **approuve votre nouveau projet**.

Commentaires :

- Le CÉUA tient à souligner l'excellent formulaire de consentement du client qui est bien détaillé.
- Lorsque des internes se joindront au projet, il faudra fournir au secrétariat du CÉUA le nom de ces internes et ils devront suivre la partie théorique de la formation en expérimentation animale avant d'entreprendre les travaux avec les animaux.

Le secrétariat du CÉUA vous enverra sous peu une fiche d'autorisation d'utiliser des animaux. L'autorisation du CÉUA est valide pour une période **d'un an**.

Je demeure à votre entière disposition pour toute information supplémentaire et vous prie de recevoir, Madame Archambault, mes meilleures salutations.

Le président du CÉUA,



Jean-Pierre Vaillancourt  
Courriel : [Jean-pierre.vaillancourt@umontreal.ca](mailto:Jean-pierre.vaillancourt@umontreal.ca)  
Tél. : 8678

JPV/sj

- |   |
|---|
| <ul style="list-style-type: none"><li>➤ Il est important de noter le numéro de votre projet pour commander vos animaux et réserver des espaces d'hébergement (Normand Lacasse : tél. : 8303, courriel : <a href="mailto:normand.lacasse@umontreal.ca">normand.lacasse@umontreal.ca</a>).</li><li>➤ Toute approbation d'utilisation d'animaux vivants à des fins d'enseignement ou de recherche par le CÉUA est <u>conditionnelle</u> à la disponibilité du personnel technique et animalier (ressources humaines) nécessaires, des locaux et de l'équipement appropriés à l'hébergement des animaux.</li><li>➤ Le CÉUA se réserve le droit de s'assurer que le déroulement du projet en temps réel est conforme au protocole approuvé par le comité dans le cadre de son programme de soutien post-approbation.</li></ul> |
|---|

## **Annexe 5 – Article *Klebsiella***

J'ai travaillé sur cet article portant sur les mammites à *Klebsiella* chez des bovins laitiers lors de ma maîtrise et publié l'article durant le début de mon PhD. Bien que le sujet principal sort du cadre de cette thèse, il montre l'impact clinique que peut avoir la résistance aux antimicrobiens chez les bovins laitiers.

### **Characterization of *Klebsiella* isolates obtained from clinical mastitis cases in dairy cattle**

Jonathan Massé, <sup>1,2</sup> Simon Dufour, <sup>1,3</sup> and Marie Archambault <sup>1,2 \*</sup>

Affiliations:

<sup>1</sup> Department of Pathology and Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, Université de Montréal, Regroupement de Recherche pour un Lait de Qualité Optimale (Op+Lait), Saint-Hyacinthe, Québec, J2S 2M2, Canada

<sup>2</sup> Groupe de Recherche sur les Maladies Infectieuses en Productions Animales (GREMIP), Saint-Hyacinthe, Québec, J2S 2M2, Canada

<sup>3</sup> Mastitis Network, Saint-Hyacinthe, Québec, J2S 2M2, Canada

\*Corresponding author: marie.archambault@umontreal.ca

Mots-clés: cattle, clinical mastitis, *Klebsiella*, *Raoultella*

Article publié dans la revue Journal of Dairy Science en avril 2020

(<https://doi.org/10.3168/jds.2019-17324>)

Contribution de Jonathan Massé à cet article :

JM a préparé les protocoles de laboratoire en plus de faire la majorité des expérimentations. JM a fait l'analyse et l'interprétation des données en plus d'écrire la première version, fait la correction et révisé la version publiée de l'article.

## Abstract

*Klebsiella* spp. are important opportunistic pathogens commonly defined as environmental clinical mastitis agents. Despite *Klebsiella* mastitis being clinically impairing in cows and costly to the industry, only a few studies describe *Klebsiella* isolated from mastitis cases. The aim of this work was to characterize species of *Klebsiella* involved in clinical mastitis cases in Canada. *Klebsiella* isolated from clinical mastitis cases (n = 53) were identified to the species level using a biochemical test panel and matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. The *rpoB* gene sequence was used as the gold standard method and identified *Klebsiella pneumoniae* (n = 40), *Klebsiella oxytoca* (n = 9), *Raoultella ornithinolytica* (n = 2), and *Raoultella planticola* (n = 2). *Raoultella*, a genus closely related to *Klebsiella*, was also accurately identified using mass spectrometry but not via biochemical testing. Using the disc diffusion technique, 31 (58%) isolates were found to be susceptible to all antimicrobials tested (n = 18). The remaining 22 (42%) isolates were resistant to 1 or more of the following antimicrobials: kanamycin (2%), streptomycin (38%), spectinomycin (13%), sulfisoxazole (13%), and tetracycline (19%). The following antimicrobial resistance genes were identified: *tetA*, *tetB*, *sul1*, *strA/strB*, and *aadA*. Random amplified polymorphic DNA revealed the majority of our isolates as unrelated and having different patterns, indicating environmental contamination as the primary source of infection. All isolates were shown to be biofilm producers. In conclusion, although antimicrobial resistance was low for both *Klebsiella* and *Raoultella* species, genetically related *Klebsiella* spp. isolates appeared to be more resistant.

## Introduction

*Klebsiella* and *Raoultella* belong to the *Enterobacteriaceae* family. They are gram-negative bacteria found in the rumen, in bovine fecal material, and in the dairy environment(216, 217). *Klebsiella* is an opportunistic pathogen causing environmental clinical mastitis(218). It is isolated in 2 to 9% of milk samples from clinical mastitis cases(219-221). Infections of the mammary gland by *Klebsiella* spp. are characterized by severe clinical signs and poor bacteriological cure rates following administration of antimicrobials (218, 220, 222). *Klebsiella* infection is also associated with a major decrease in milk production (223) and thus leads to important economic losses. Affected animals are frequently removed from the herd. The reported pathogenicity in the udder is not well understood, but some virulence determinants have been shown to play a role: K1, K2, *magA* (mucoviscosity-associated gene, specific to K1 capsule serotype), *uge* (uridine diphosphate galactose 4 epimerase encoding gene, responsible for capsule and smooth lipopolysaccharide synthesis), *kfu* (iron uptake system gene), and the *rmpA* gene (regulator of the mucoid phenotype; (224). Because *Raoultella* is a new genus that was previously classified as *Klebsiella* (225), no data is presently available on this bacterium for mastitis in dairy cattle. In diagnostic laboratories, biochemical tests are frequently used for identification of *Klebsiella*, and identification beyond the genus level is not often attempted. Molecular techniques such as *rpoB* sequencing ( $\beta$  subunit of RNA polymerase (226) would allow for species identification and are commonly used for characterization of *Klebsiella* isolates obtained from clinical mastitis cases in dairy cattle used in research (217, 227, 228). These techniques, however, are time-consuming, expensive, and difficult to implement in a routine diagnostic laboratory. However, MALDI-TOF mass spectrometry offers rapid, precise, and economical routine identification to the species level and is gaining in popularity in veterinary diagnostic laboratories. Moreover, guidelines for this technique are now available from the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2017). The most important *Klebsiella* species isolated from the milk of cows with clinical mastitis is *Klebsiella pneumoniae*, followed by *Klebsiella oxytoca* (216, 217, 228). One case of *Klebsiella variicola* has also been reported (229). *Klebsiella pneumoniae* can also cause many nosocomial infections in humans. It belongs to a

group of bacteria frequently associated with antimicrobial resistance (AMR) known as ESKAPE (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *K. pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Enterobacter* spp.; (40). One of the proposed mechanisms for the persistence of *K. pneumoniae* in human infections is the formation of biofilms, which consist of bacteria embedded in a self-produced polysaccharide matrix (230). The ability to form biofilms has been correlated with AMR (231). In a study by (232), 84% of *Klebsiella* spp. isolates were shown to produce visible quantities of biofilm in a tube method. To our knowledge, this is the only study describing biofilm formation for this pathogen in isolates recovered from bovine mastitis cases. In *Klebsiella* isolated from bovine milk, AMR is reported as uncommon (133, 233), and, when it was present, the genes responsible for the observed resistances were not described. Molecular analysis, as by random amplified polymorphic DNA (RAPD), can assess relatedness of isolates and thereby identify sources and transmission routes for *Klebsiella*. This analysis has been used to help distinguish between contagious transmission and opportunistic infection from the environment (217, 229, 234). The aim of this study was to characterize *Klebsiella* in clinical mastitis in Canada in terms of microbiological identification and discrimination, AMR, biofilm production, and genetic diversity.

## Materials and methods

### Culture Collection

Isolates were obtained from the Mastitis Pathogen Culture Collection (MPCC) of the Canadian Bovine Mastitis and Milk Quality Research Network. This collection was assembled during a 2-year cohort study conducted on 91 Canadian dairies. Herd selection, sampling, and bacterial culturing were previously described by (235), and the MPCC itself is described by (236). Briefly, during that study quarter-milk sample series were collected from apparently normal milking cows and at diagnosis of clinical mastitis. Routine bacteriological milk culture was performed, and *Klebsiella* spp. were identified based on the following criteria: gram-negative rods, lactose fermentation on MacConkey agar, negative oxidase testing, non-motility, production of urease, utilization of citrate, and usually indole negativity. All *Klebsiella* spp. isolates recovered in concentration  $>1$  cfu/0.01 mL and from a plate that was not considered contaminated (i.e.,  $\geq 3$  phenotypically different types of colonies on the plate) were sent for conservation in the MPCC to the Faculté de médecine vétérinaire of the Université de Montréal. The MPCC contained 194 presumed *Klebsiella* spp. isolates identified via traditional biochemical methods, and, of these, 139 had some AMR data (133). We selected isolates retrieved from clinical mastitis cases only, and only 1 isolate was included per quarter for each cow presenting clinical mastitis, yielding a total of 53 presumed *Klebsiella* spp. Verification in our database revealed that isolates came from 21 farms. Frozen isolates were thawed at room temperature, cultured on Columbia agar with 5% sheep blood (Oxoid, Nepean, Canada), and incubated overnight at 35°C. A single colony was subcultured on fresh Columbia agar with 5% sheep blood and incubated overnight at 35°C.

### Species Identification

Biochemical identification for each isolate was performed using API-20E test strips (Biomérieux, Marcy L'Etoile, France) according to the manufacturer's recommendations. Isolates were also identified via MALDI-TOF using a Microflex LT instrument (Bruker Daltonics, Bremen, Germany). Each isolate was applied on a polished steel MSP 96 target (Bruker



Daltonics), extracted with 1  $\mu$ L of 70% formic acid, and overlaid with 1  $\mu$ L of HCCA matrix before automatic spectra acquisition was launched, using default settings. The instrument was calibrated with a bacterial test standard, and identification to the species level was deemed valid when a score  $\geq 2.0$  was obtained. Spectra analyses were conducted using the manufacturer reference database, containing, at the time, 6,903 different spectra. Sequencing of the *rpoB* gene ( $\beta$ -subunit of RNA polymerase B) was also performed for species-level identification, using primers VIC2 and VIC3, as previously described (226). Following PCR amplification, products migrated in a 1.5% agarose gel for 25 min at 150 V. Gels were stained with bromide ethidium and visualized with UV transillumination. A single band at approximately 1,000 bp was present for each isolate and purified by QIAquick PCR purification kit (Qiagen, Hilden, Germany). Purified DNA products were sequenced via pyrosequencing at the Plateforme d'analyse génomique (Université Laval, Québec, Canada). Sequences were manually proofread using SnapGene viewer software (GSL Biotech, Chicago, IL) and were compare with BLAST public database for species identification. *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883 was used as a control. When identification could not be obtained with the *rpoB* sequence, 16S sequencing was performed at the Animal Health Laboratory (AHL, University of Guelph, Guelph, Canada).

#### Antimicrobial Susceptibility Testing

Antimicrobial susceptibility testing for 18 antimicrobials was performed on all isolates of this study, using the disc diffusion method on Mueller Hinton agar, according to (123). The following commercially available discs (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ) were tested (disc concentrations, breakpoints for susceptibility): amikacin (30  $\mu$ g,  $\geq 17$  mm), amoxicillin/clavulanic acid (20/10  $\mu$ g,  $\geq 18$  mm), ceftiofur (30  $\mu$ g,  $\geq 21$  mm), ceftriaxone (30  $\mu$ g,  $\geq 23$  mm), cephalotin (30  $\mu$ g,  $\geq 18$  mm), chloramphenicol (30  $\mu$ g,  $\geq 18$  mm), ciprofloxacin (5  $\mu$ g,  $\geq 21$  mm), florfenicol (30  $\mu$ g,  $\geq 19$  mm), gentamicin (10  $\mu$ g,  $\geq 15$  mm), kanamycin (30  $\mu$ g,  $\geq 18$  mm), nalidixic acid, (30  $\mu$ g,  $\geq 19$  mm), neomycin (30  $\mu$ g,  $\geq 17$  mm), spectinomycin (100  $\mu$ g,  $\geq 14$  mm), streptomycin (10  $\mu$ g,  $\geq 15$  mm), sulfamethoxazole/trimethoprim (23.75/1.25  $\mu$ g,  $\geq 16$  mm), sulfisoxazole (250  $\mu$ g,  $\geq 17$  mm), and

tetracycline (30 µg, ≥15 mm). Isolates were defined as susceptible, intermediate, or resistant according to CLSI (123) for ceftiofur (breakpoint of *Escherichia coli* in mastitis), florfenicol, and spectinomycin (for both, breakpoints of respiratory pathogens in cattle: *Mannheimia haemolytica*, *Histophilus somni*, and *Pasteurella multocida*). For all other antimicrobials, except neomycin and cephalotin, the interpretation was based on human-derived zone diameters for *Enterobacteriaceae* from CLSI M100 (237). Interpretation for cephalotin came from a previous version of CLSI M100 (238). No zone diameter is available for neomycin; thus, that of amikacin was used (<17 mm indicates resistance). For the current study, intermediate and resistant isolates were grouped together in a “resistant” category.

### Genotyping

Bacteria from a fresh overnight culture was suspended in 100 µL of 10% Chelex (Bio-Rad, Hercules, CA) and heated at 95°C for 20 min. After centrifugation at 13,000 × g for 2 min, the supernatant was used as bacterial DNA. All PCR assays were performed in a total volume of 25 µL mixture containing the following reagents: 10× PCR Buffer (2.5 µL; New England Biolabs, Ipswich, MA), dNTP (0.4 mM), bacterial DNA (2.5 µL), MgCl<sub>2</sub> (1 mM), Taq polymerase (1 U), and the corresponding primers for AMR genes (Table 1). After migration on 1.5% agarose gel for 25 min at 150 V with bromide ethidium, all PCR products were visualized using UV transillumination. To determine relatedness between isolates, RAPD PCR was conducted, using a method previously described by (217) and (239), with slight modifications. Briefly, ERIC-2/ERIC-1026 primers were used, and thermal conditions were as follows: 2 cycles (94°C for 5 min, 35°C for 5 min, and 72°C for 5 min), followed by 31 cycles (94°C for 1 min, 62°C for 1 min, and 72°C for 2 min) and a final extension at 72°C for 8 min (Vogel et al., 1999). After migration on 1.5% agarose gel with bromide ethidium for 90 min at 90 V, products were visualized using UV transillumination. The gels were read visually (2 independent readers) to compare banding patterns for each isolate. Identical patterns (no band differences) were classified as a single RAPD pattern. *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883 was used in all reactions as a control.

## Biofilm Formation

Biofilm production and quantification were conducted as described by (240), with some modifications. Briefly, 1 colony from an overnight culture was added to 5 mL of brain heart infusion (BHI) broth and incubated for 24 h at 35°C with rotation at 180 rpm. This broth was diluted 1:125 in a fresh 5 mL of BHI broth, then 200 µL was added in triplicate to a 96-well flat-bottom polystyrene plate (Costar 3595, Corning Life Sciences, Kennebunk, ME). After static incubation for 24 h at 35°C, plates were washed twice with deionized water, and 200 µL of crystal violet 0.1% was added and incubated for 15 min at room temperature. Plates were washed twice with deionized water and allowed to dry for 30 min at 35°C; then 200 µL of ethanol 70% was added for 15 min for elution. Absorbance was read at 570 nm with a spectrophotometer plate reader. Three independent technical replicates were performed on 3 different days. The negative control was BHI broth without bacteria, and optical density for this control was subtracted to all samples. Two controls (low and high biofilm-forming isolate) were added according to (241). *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883 and internal control *K. pneumoniae* 12 were used as controls in each assay. Wells with optical densities greater than 2 times the average of the triplicate were considered contaminated.

## Statistical Analysis

Descriptive statistics and statistical analyses were computed using SPSS Statistics version 25 (IBM Corp., Armonk, NY). Comparison of species as functions of different factors (biofilm production, mastitis severity score, DIM, lactation number, and AMR) was performed using the Kruskal-Wallis test for independent samples. Fisher's exact test was used to compare numbers of AMR between 2 groups, according to RAPD type: the first group constituted isolates with similar RAPD patterns (thus, related isolates); the second represented isolates with independent RAPD patterns (thus, the remaining unrelated isolates). An  $\alpha$  of 0.05 was considered for inferring statistical significance.

## Results

### Bacterial Identification

Table 2 presents the comparison between biochemical tests, MALDI-TOF, and *rpoB* sequencing for bacterial identification. The *rpoB* sequencing could not give an accurate identification for 1 isolate, identified as either *K. pneumoniae* or *K. variicola* (506/506 bp for both). Complete 16S RNA sequencing revealed this isolate to be a *K. pneumoniae* (1,166/1,167 bp) with a close association to *K. variicola* (1,164/1,167 bp). Except for this isolate of *K. pneumoniae* mistakenly identified as *K. variicola* by MALDI-TOF, we found no disparities between the MALDI-TOF results and the *rpoB* sequencing data for *Klebsiella* and *Raoultella* spp. On the other hand, biochemical tests could not identify *Raoultella planticola* and *Raoultella ornithinolytica* misidentified as *K. pneumoniae* and *K. oxytoca*, respectively.

### AMR Phenotypes

Among the 53 isolates tested, 31 (58%) were susceptible to all antimicrobials tested. The remaining 22 (42%) isolates were resistant to 1 or more of the following antimicrobials: kanamycin (2%: 1 *K. oxytoca*), streptomycin (38%: 3 *K. oxytoca*, 16 *K. pneumoniae*, and 1 *R. planticola*), spectinomycin (13%: 1 *K. oxytoca*, 5 *K. pneumoniae*, and 1 *R. planticola*), sulfisoxazole (13%: 1 *K. oxytoca*, 5 *K. pneumoniae*, and 1 *R. planticola*), and tetracycline (19%: 9 *K. pneumoniae*, and 1 *R. ornithinolytica*; Table 3). Only 1 (2%) *K. pneumoniae* isolate was resistant to 3 antimicrobial classes (aminoglycosides, tetracyclines, and sulfonamides) and thus considered multi-drug resistant (Table 3). Isolates resistant to sulfisoxazole (n = 7) were also resistant to spectinomycin and streptomycin, and vice versa. No resistance to the remaining 13 antimicrobials was observed.

### AMR Genotypes

Table 3 shows the distribution of tested AMR genes *tetA*, *tetB*, *sul1*, *strA/strB*, and *aadA* found in resistant isolates of *Klebsiella* and *Raoultella*. Briefly, all *K. pneumoniae* and *R. ornithinolytica* that were resistant to tetracycline (n = 10) harbored *tetB* and *tetA* genes, respectively. All

sulfisoxazole-resistant strains (n = 7) carried the *sul1* gene. Of 7 isolates resistant to streptomycin and spectinomycin, 6 harbored the gene *aadA*. The remaining isolates resistant to streptomycin (n = 13) harbored the gene *strA/strB*. The *tetD* gene was not present in any of the resistant isolates of *Klebsiella* or *Raoultella*.

#### RAPD Typing

Overall, 40 RAPD patterns were observed among isolates tested (n = 53; Figure 1). From those, 36 unique patterns originated from 20 different farms, and the remaining 4 patterns (A, B, C, and D) contained 8, 3, 2, and 4 isolates and originated from 2, 2, 1, and 1 farm or farms, respectively (Table 3). Those related isolates showed greater AMR (13 out of 17 were resistant to at least 1 antimicrobial) compared with the 36 unrelated isolates with individual RAPD patterns (9 out of 36 were resistant to at least 1 antimicrobial; P < 0.001).

#### Biofilm Formation

*Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883 and internal control *K. pneumoniae* 12 were used as relatively low and high biofilm-forming isolates, respectively, with average optical density values of 570 nm and standard deviations of  $0.035 \pm 0.038$  and  $1.575 \pm 0.583$ , respectively. All *Klebsiella* and *Raoultella* in this study were shown to produce biofilms. Figure 2 shows the variable quantities of biofilm observed for each species, and Table 2 presents average biofilm production for each species. Five out of 561 wells were considered contaminated and were excluded from the results.

## Discussion

Mastitis contributes to major economic losses in the dairy industry (242). The prevalence of mastitis varies between geographical locations due to differences in legislation, veterinary and laboratory services, and management practices (224). Among environmental agents causing mastitis, *Klebsiella* spp. are frequently identified by biochemical tests. As previously reported (217, 228, 243), these tests do not yield accurate *Klebsiella* and *Raoultella* discrimination. As indicated by the name, *R. ornithinolytica* is the only species of the genera *Klebsiella* or *Raoultella* positive for ornithine decarboxylase (225). However, even if the reference strains of *R. ornithinolytica* are positive, most clinical isolates described to date are negative for this test (244, 245) as noted for the 2 *R. ornithinolytica* in this study identified via API-20E. The *rpoB* gene sequencing was described and developed as a valid identification technique for *Klebsiella* (225). It has been used for *Klebsiella* and *Raoultella* identification in dairy farms (217, 228, 229). In our study, we had only 1 identification problem, regarding an isolate whose *rpoB* sequence was identical for both *K. variicola* and *K. pneumoniae*. The final identification had to be confirmed using 16S RNA, which was more discriminant for identification of this isolate. In contrast, a past study reported adequate identification for *K. pneumoniae* and *K. variicola* by *rpoB* even if MALDI-TOF could not yield a definitive identification (217). All other identifications in our study were the same between *rpoB* and MALDI-TOF, as reported in another study (245), indicating that MALDI-TOF is a suitable alternative to sequencing for identification.

After molecular identification, 1 study reported *Raoultella* in 4.6% (11 out of 240) of isolates first identified as *Klebsiella* (245). This concurs with our results of 7.5% (4/53). The *Raoultella* genus was created in 2001, after phylogenetic analysis. Before that, it had been classified as *Klebsiella* (225). This explains the close relationship between the 2 genera and the difficulty for their accurate differentiation. *Raoultella* was previously reported on farm environments and in the rumen and manure samples of cows, but not in mastitis cases (228, 243). To our knowledge, this is the first study to publish on *Raoultella* as a clinical mastitis agent.

In an antimicrobial susceptibility surveillance program conducted in Europe (233), low percentages of AMR for *Klebsiella* spp. isolated from acute mastitis were observed, with the

greatest levels of resistance being toward tetracyclines (19%). The same tetracycline resistance percentage is reported in this study; however, the most prevalent resistance we observed was toward streptomycin, which was not reported in the European program (233). As previously reported (233), we also did not observe resistance to first-, second-, or third-generation cephalosporins and fluoroquinolones. The most commonly used antimicrobials in 2008 in Canada for clinical mastitis were  $\beta$ -lactams (133). However, acquired resistance to  $\beta$ -lactams was not observed in our study. Interestingly, *Raoultella* was previously described as naturally resistant to ampicillin through a chromosomally encoded class A  $\beta$ -lactamase (245) similar to *Klebsiella*. In general, the AMR phenotypes observed were well explained by the AMR genes tested, with the exception of 1 isolate that did not carry the *aadA* gene. The correlation observed between sulfonamide and spectinomycin resistance suggests a common mobile genetic element such as an integron for both *sul1* and *aadA*, as previously reported (246). Susceptible isolates were not tested for the presence of resistance genes, because they did not express AMR on disc diffusion. In a study by Tyson and colleagues (81), sensitivity and specificity were higher than 97% between phenotypes (minimum inhibitory concentration) and genotypes (whole-genome sequencing) in *E. coli* from cattle. The only exception was for streptomycin, for which half of susceptible *E. coli* carried a resistance gene (81).

Biofilms have been associated with tolerance to antimicrobials (247). Biofilm production was previously reported for 84% of *Klebsiella* spp. isolated from mastitis cases (232). It is difficult to compare our results with those of Schönborn and colleagues, because the methodologies used in both studies were different. Also, no significant associations were observed between bacterial genus, species, AMR, biofilm production, and cow variable such as mastitis severity score, DIM, and lactation number. In this study, biofilm production has been tested only in isolates from clinical cases and not in isolates from the environment for a comparison.

Interestingly, some isolates with the same RAPD pattern did not have similar AMR genotypes and phenotypes. This suggests that various AMR profiles can be obtained within a unique RAPD pattern, indicating that this technique is not sufficiently discriminant to group DNA fragments associated with AMR. A unique RAPD pattern or closely related RAPD patterns associated with

a single farm may indicate contagiousness or a common point-source environmental origin, whereas unrelated patterns are commonly associated with environmental contamination. Previous studies have observed both routes of transmission for *Klebsiella* on dairy farms ((217, 229, 234). In our case, the majority of our isolates were unrelated based on RAPD patterns, indicating environmental contamination. Only a small number of isolates showed similar RAPD patterns. Interestingly, isolates with an identical RAPD pattern carried more AMR phenotypes, indicating a possible link between AMR and contagiousness, but this hypothesis warrants further investigation.

## **Conclusions**

Characterization of *Klebsiella* species involved in clinical mastitis cases in Canada revealed that accurate identification was provided by MALDI-TOF. Antimicrobial resistance was generally low, with AMR genes correlating well with AMR phenotypes. All isolates were shown to produce biofilms. This study also determined that environmental contamination was likely the primary source of *Klebsiella* infection in cows.

## **Acknowledgments**

This work was supported by the Natural Sciences and Engineering Research Council (NSERC) of Canada (M. Archambault, RGPIN-191461; Ottawa, Canada). Jonathan Massé received an undergraduate student research award from NSERC to accomplish this work and a graduate grant from the Regroupement de Recherche Pour un Lait de Qualité Optimale (Op+Lait; Université de Montréal, Saint-Hyacinthe, Canada). We thank Josée Harel (Université de Montréal) and Patrick Boerlin (University of Guelph, Guelph, Canada) for sharing their control strains. We also thank Claudia Duquette, Audrey Charlebois, and Josée Labrie (Université de Montréal) for their technical assistance. The authors have not stated any conflicts of interest



## Tables

**Table 1.** PCR conditions, primers and controls for detection of antimicrobial resistance (AMR) genes

PCR	Resistance phenotype	Gene	Primers and PCR	Final primer	Product	Annealing	Control strain
1	Tetracycline	<i>tetA</i>	(248)	0.2	888	55	<i>E coli</i> SAS1393
2	Tetracycline	<i>tetB</i>	(249)	1	305	56	<i>E .coli</i> CT4afooB
3	Tetracycline	<i>tetD</i>	(249)	1	477	61	<i>E. coli</i> D7-5
4	Sulfonamide	<i>sul1</i>	(250)	1	433	61	<i>E. coli</i> pACYC184
5	Streptomycin	<i>srtA/strB</i>	(251)	0.4	893	63	AMR 075
5	Streptomycin/spectinomyci	<i>aadA</i>	(251)	0.1	525	63	AMR 075

**Table 2.** Comparison between biochemical tests, *rpoB* sequencing and MALDI-TOF identification for *Klebsiella* and *Raoultella* isolates (*n* = 53) and their specific characteristics<sup>1</sup>

Species	Identification Technique			Biofilm formation (OD <sub>570nm</sub> )	DIM	Mastitis severity scores <sup>2</sup>	Lactation number	AMR <sup>3</sup>
	<i>rpoB</i>	Biochemical tests	MALDI-ToF	Average ± SD				
<i>Klebsiella pneumoniae</i> <sup>4</sup>	40	43	39	0.77 ± 0.57	157 ± 127	1.8 ± 0.7	2.8 ± 2.0	0.9 ± 1.2
<i>Klebsiella oxytoca</i>	9	10	9	0.80 ± 0.85	83 ± 65	1.8 ± 0.8	3.0 ± 1.3	0.7 ± 1
<i>Raoultella planticola</i>	2	0	2	0.68 ± 0.26	189 ± 189	1.5 ± 0.7	2.0 ± 0.7	1.5 ± 2.1
<i>Raoultella ornithinolytica</i>	2	0	2	0.10 ± 0.06	149 ± 49	1.5 ± 0.7	3.5 ± 1.4	0.5 ± 0.7
<i>Klebsiella variicola</i>	0	0	1	-	-	-	-	-

<sup>1</sup>AMR : Antimicrobial Resistance, OD : Optical Density

<sup>2</sup> Mastitis severity scores were attributed by the dairy producer at clinical mastitis diagnosis according to the scale proposed by Sears et al., (252): 1= only the milk is abnormal, 2= milk and quarter appearance are abnormal, and 3= the animal is sick.

<sup>3</sup> Tested for 18 antimicrobials by the disk diffusion technique

<sup>4</sup> RNA 16S identified as *Klebsiella pneumoniae* (1,166/1,167pb), also closely related to *Klebsiella variicola* (1,164/1,167pb)

**Table 3.** Antimicrobial resistance (AMR) phenotypes and genotypes observed in the Random amplified polymorphic DNA (RAPD) patterns of this study.

RAPD patterns (No. of isolates)	Farms of origin (No. of isolate)	AMR phenotype <sup>1</sup>	AMR genotype <sup>2</sup>	Species <sup>3</sup>
A (8)	Farm 101 (5)	5 : STR-TET	<i>strA/strB – tetB</i>	5 <i>K. pneumoniae</i>
	Farm 101 (2), Farm 103 (1)	3: None	Not tested	3 <i>K. pneumoniae</i>
B (3)	Farm 415 (2)	2 : STR	<i>strA/strB</i>	2 <i>K. pneumoniae</i>
	Farm 103 (1)	1: None	Not tested	1 <i>K. pneumoniae</i>
C (2)	Farm 104 (1)	1: STR-SPE-TET-FIS <sup>3</sup>	<i>strA/strB – aadA – tetB – sul1</i>	1 <i>K. pneumoniae</i>
	Farm 104 (1)	1:STR-TET	<i>strA/strB – tetB</i>	1 <i>K. pneumoniae</i>
D (4)	Farm 110 (4)	4:STR-SPE-FIS	<i>aadA-sul1</i>	4 <i>K. pneumoniae</i>
Other patterns (36)	15 different farms (27)	27: None	Not tested	5 <i>K. oxytoca</i> , 20 <i>K. pneumoniae</i> , 1 <i>R. ornithinolytica</i> , 1 <i>R. planticola</i>
	Farm 104 (1), Farm 110 (1)	2 : STR-TET	<i>strA/strB – tetB</i>	2 <i>K. pneumoniae</i>
	Farm 202 (1)	1 : STR-SPE-FIS	<i>aadA – sul1</i>	1 <i>K. oxytoca</i>
	Farm 407 (1)	1 : STR-SPE-FIS	Not found – <i>sul1</i>	1 <i>R. planticola</i>
	Farm 408 (2), Farm 310 (1)	3 : STR	<i>strA/strB</i>	2 <i>K. oxytoca</i> , 1 <i>K. pneumoniae</i>
	Farm 416 (1)	1 : KAN	Not tested	1 <i>K. oxytoca</i>
	Farm 101 (1)	1 : TET	<i>tetA</i>	1 <i>R. ornithinolytica</i>

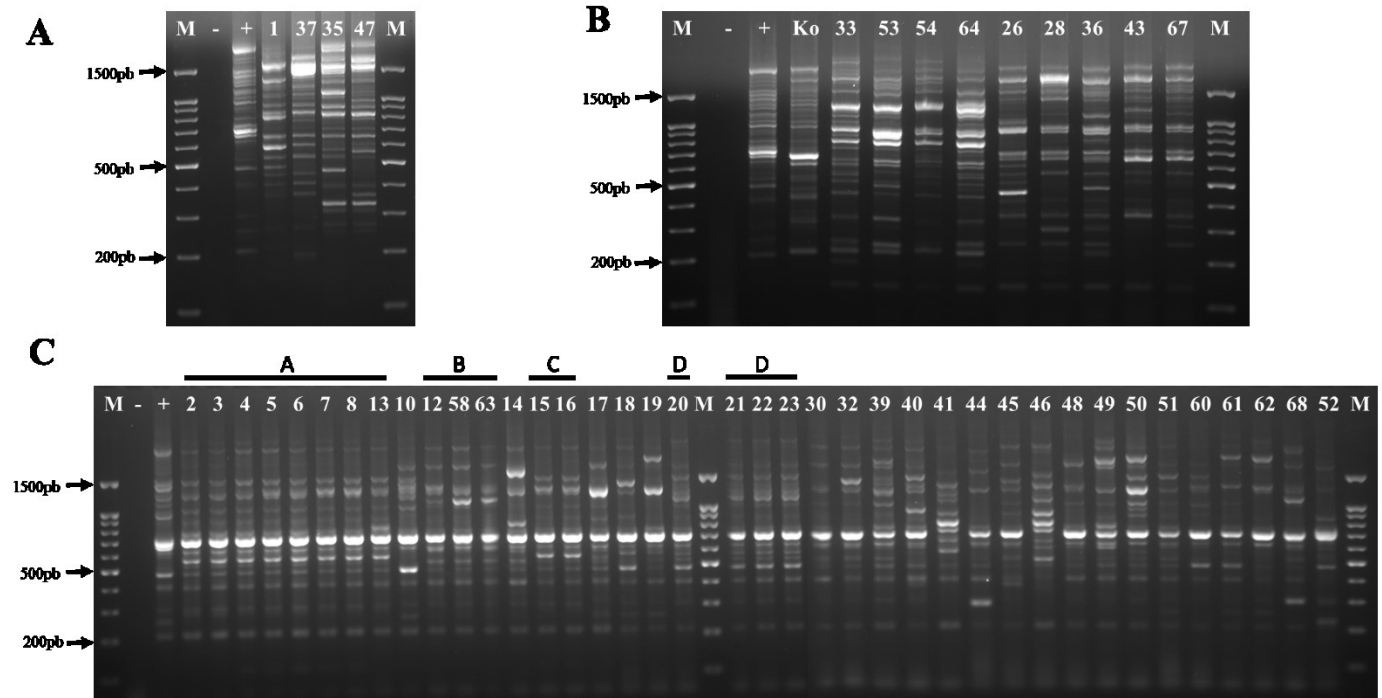
<sup>1</sup> STR = Streptomycin ; TET = Tetracycline ; FIS = Sulfisoxazole ; SPE = Spectinomycin ; KAN = Kanamycin

<sup>2</sup> Antimicrobial resistance genes tested by simplex PCR for *tet(A)*, *tet(B)*, *tet(D)*, and *sul1*, and multiplex PCR for *str(A)/str(B)* and *aad(A)*

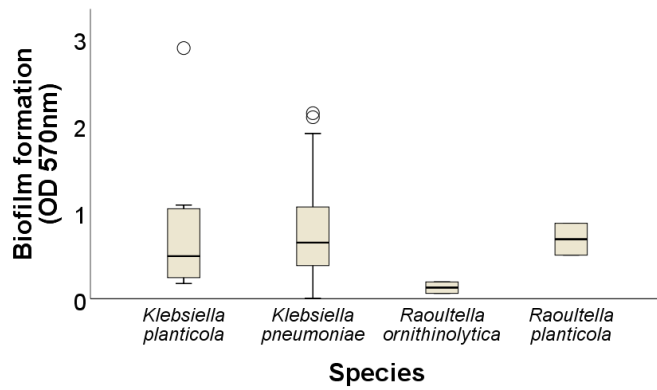
<sup>3</sup>Obtain by *rpoB* or 16S RNA sequencing; *K.* = *Klebsiella*; *R.* = *Raoultella*

<sup>3</sup>Multidrug resistant patterns

## Figures



**Figure 1.** Random amplified polymorphic DNA banding patterns for *Klebsiella* and *Raoultella* obtained from dairy cattle clinical mastitis cases. (A) Results for *R. ornithinolytica* (Samples 1 and 37) and *R. planticola* (Samples 35 and 47). (B) Results for *K. oxytoca*. (C) Results for *K. pneumoniae*; letters above the gel represent isolates with a same RAPD banding pattern. One isolate (number 25) is missing due to technical difficulties and is not presented here, however it was not correlated with any RAPD patterns. M = molecular weight marker; - = negative control (water); + = positive control (*K. pneumoniae* ATCC 13883); Ko = positive control (*K. oxytoca* ATCC 13182).



**Figure 2.** Whisker plot of biofilm formation analysed by a static technique in 96 wells/plate for *Klebsiella* and *Raoultella* spp. obtained from dairy cattle clinical mastitis cases. The midline represents median observation. Lower and upper boxes represent first and third quartile, respectively. Whiskers are minimum and maximum observed values. Empty circles represent outlier observations. OD 570 nm = optical density at 570 nm.