

Université de Montréal

**Étude de prévalence et associations des gènes de virulence et résistance
aux antimicrobiens d'*Escherichia coli* de la flore intestinale du poulet sain**

Par

Kiswendsida Paul Kaboré

Département de pathologie et microbiologie

Faculté de médecine vétérinaire

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

Août 2011

©Kiswendsida Paul Kaboré 2011

Université de Montréal
Faculté de médecine vétérinaire

Ce mémoire intitulé

**Étude de prévalence et associations des gènes de virulence et résistance
aux antimicrobiens d'*Escherichia coli* de la flore intestinale du poulet sain**

Présenté par

Kiswendsida Paul Kaboré

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes

Dre Josée Harel, présidente-rapporteuse
Dr John Morris Fairbrother, directeur de recherche
Dre Ann Letellier, codirectrice de recherche
Dr Philippe Fravallo, membre du jury

RÉSUMÉ

Résumé

Les *Escherichia coli* pathogènes de la volaille (APEC) font partie des *E. coli* extra-intestinaux pathogènes (ExPEC) et seraient un réservoir possible de gènes de virulence et de résistance aux antimicrobiens (RAM) des ExPEC chez l'humain. L'objectif de cette étude était d'évaluer l'effet d'un prébiotique et d'un mélange d'acide organique et d'huiles essentielles encapsulés sur la prévalence des gènes de virulence des ExPEC et de RAM, ainsi que les associations entre ces gènes chez *E. coli* de l'intestin du poulet sain. Des échantillons de contenus caecaux de poulets de 29 jours d'âge ayant reçu un de ces ingrédients alimentaires comparativement à des témoins ont été analysés pour la présence des gènes de virulence *iucD*, *tsh*, *papC* et des gènes de RAM *bla_{TEM}*, *bla_{SHV}*, *tetA*, *tetC*, *bla_{CMY-2}*, *aadA1*, *aac3* par PCR. La prévalence d'*iucD* était supérieure dans le groupe témoin comparativement aux groupes «prébiotique» et «acide organique» et la prévalence de *papC* était affectée dans le groupe «acide organique». La prévalence d'isolats d'*E.coli* positifs pour *bla_{CMY-2}* était supérieure dans le groupe témoin comparée aux groupes «prébiotique» et «acide organique», tel que démontré par la technique d'hybridation de l'ADN sur HGMF (Hydrophobic Grid Membrane Filter). De plus, la prévalence des isolats d'*E. coli* positifs pour *tetA*, *bla_{TEM}*, *aadA1* ou *tsh* était affectée par les ingrédients alimentaires. Dans l'ensemble, des associations entre la présence de *tsh* et *iucD*, *bla_{TEM}* et *aadA1*, et *iucD* et *bla_{CMY-2}* ont été observées. Cette étude démontre l'utilité de certains ingrédients alimentaires pour diminuer le risque d'exposition en santé publique.

Mots clés : Gènes de résistance aux antimicrobiens, gènes de virulence, poulets sains, *E. coli* caecaux, ingrédients alimentaires prébiotique, acide organique, ExPEC, APEC, HGMF, PCR.

Summary

Avian Pathogenic *E. coli* (APEC) belong to the extra-intestinal pathogenic *E. coli* (ExPEC) pathotype, and may be a virulence and antimicrobial resistance (AMR) gene reservoir for ExPEC in humans. The aim of this study was to evaluate the effect of addition to the feed of a prebiotic or an organic acid on the prevalence of ExPEC-associated virulence genes and antimicrobial resistance (AMR) genes and the association between these genes in *E. coli* of the intestinal microflora of healthy chickens. Caecal contents from 29-day-old chickens having received one of these feed ingredients in comparison to a control group were examined for the presence of virulence genes *iucD*, *tsh*, and *papC* and AMR genes *bla_{TEM}*, *bla_{SHV}*, *tetA*, *tetC*, *bla_{CMY-2}*, *aadA1*, and *aac3* by PCR. The prevalence of *iucD* was significantly higher in the control group than in the prebiotic and organic acid groups and prevalence of *papC* was affected by the use of the organic acid. The prevalence of *bla_{CMY-2}*-positive *E. coli* isolates was higher in the control group than the prebiotic or organic acid groups, as demonstrated by Hydrophobic-grid membrane filter (HGMF) DNA probe colony hybridization. In addition, the prevalence of *E. coli* isolates positive for *tetA*, *bla_{TEM}*, *aadA1* or *tsh* was affected by the use of these feed ingredients. Overall, associations between the presence of *iucD* and *tsh*, *bla_{TEM}* and *aadA1*, and *iucD* and *bla_{CMY-2}* were observed. This study demonstrates that the use of certain feed ingredients could reduce the risk of exposure in a public health perspective.

Key words: Antimicrobial resistance genes, virulence genes, healthy chickens, caecal *E. coli*, feed ingredients prebiotic, organic acid, ExPEC, APEC, HGMF, PCR.

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ.....	iii
Résumé.....	v
Summary.....	vi
Liste des tableaux.....	x
Liste des figures	xi
Liste des abréviations.....	xii
INTRODUCTION.....	3
REVUE DE LA LITTÉRATURE.....	3
1. Les principaux pathotypes des <i>Escherichia coli</i>	5
2. Facteurs de virulence des APEC et les pathologies aviaires associées	8
2.1. Sérogroupes O.....	8
2.2. Les systèmes d'acquisition du fer	8
2.3. Les protéines de la membrane externe OMPS (Iss et traT)	12
2.4. Les adhésines	12
2.5. Hémagglutinine thermosensible.....	17
2.6. Les capsules.....	18
3. Rôle des plasmides dans la virulence des APEC.....	18
3.1. Rôle des plasmides dans l'évolution de la pathogénicité des APEC	18
3.2. Rôle des plasmides dans le degré de virulence et la pathodiversité des APEC	21
4. Résistance aux antimicrobiens (RAM) des souches d' <i>E. coli</i>	22
4.1. Utilisation des antimicrobiens en production aviaire.....	25
4.2. Résistance des souches d' <i>E. coli</i> aux antimicrobiens de catégorie I.....	27
4.2.1. Exemple du ceftiofur.....	27
4.2.2. Exemple des fluoroquinolones	27
4.3. Résistance des souches d' <i>Escherichia coli</i> aux antimicrobiens de catégorie II.....	28

4.3.1.	Exemple des pénicillines	28
4.3.2.	Exemple du triméthoprim /sulfaméthoxazole (TMP-SMX)	29
4.4.	Résistance des souches d' <i>Escherichia coli</i> aux antimicrobiens de catégorie III.....	30
4.4.1.	Exemple des tétracyclines.....	30
4.4.2.	Exemple de la streptomycine.....	30
5.	La multi-résistance aux antimicrobiens chez les <i>E. coli</i> et autres entérobactéries	31
5.1.	Le rôle des principaux éléments génétiques impliqués dans la multi-résistance bactériennes aux antimicrobiens.....	31
5.2.	Multi-résistance associée à la production de β -lactamases ESBLs de type CTX-M	31
5.3.	Multi-résistance associée à la production de β -lactamases de type AmpC	32
5.4.	La multi-résistance associée à la production de carbapénemases.....	32
5.5.	Multi-résistance aux quinolones et/ou aux aminoglycosides, associée à la présence des gènes qnr et des gènes des méthylases 16SrRNA.....	33
6.	Association entre la virulence et la résistance aux antimicrobiens des souches d' <i>E. coli</i>	33
6.1.	Associations statistiques	33
6.2.	Associations génétiques.....	35
7.	Effet des additifs alimentaires sur les pathogènes de l'intestin de la volaille	38
7.1.	Généralités sur les additifs alimentaires.....	38
7.2.	Effet des acides organiques	38
7.3.	Effet des prébiotiques.....	40
8.	Utilisations des membranes filtrantes hydrophobes quadrillées: Hydrophobic-Grid Membrane Filters (HGMFs).....	44
8.1.	Généralités sur la technique HGMF	44
8.2.	Technique de culture bactérienne et dénombrement des colonies sur filtre HGMF.	44
8.3.	Utilisation des filtres HGMF dans le dénombrement d' <i>E. coli</i> et des autres entérobactéries.....	45
8.4.	Utilisation des filtres HGMF dans la détection de l'ADN bactérien par hybridation	46

8.5.	Autres applications des filtres HGMF.....	47
8.6.	Avantages comparatifs de la technique HGMF.....	47
9.	Problématique et objectifs de l'étude	49
	MÉTHODOLOGIE ET RÉSULTATS	40
	ARTICLE EN PREPARATION.....	46
	DISCUSSION.....	88
	CONCLUSION.....	99
	RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	85
	ANNEXES.....	110
	ABSTRACT 1: SYMPOSIUM SAFEPOK 2009	111
	ABSTRACT 2: 2ND ASM CONFERENCE ON ANTIMICROBIAL RESISTANCE IN ZOONOTIC BACTERIA AND FOODBORNE PATHOGENS IN ANIMALS, HUMANS AND THE ENVIRONMENT .	120

Liste des tableaux

REVUE DE LITTÉRATURE

Tableau I : Classification des antimicrobiens selon leur importance en médecine humaine par la direction des médicaments du Canada.....	23
Tableau II : Antimicrobiens homologués aux fins d'utilisation chez la volaille au Canada.....	26
Tableau III : Principaux prébiotiques utilisés en production aviaires.....	39

ARTICLE EN PRÉPARATION

Table I: List of primers used in the PCR and HGMF DNA probe Hybridization, single PCR conditions and control strains.....	65
Table II: List of primers used in multiplex PCR, PCR conditions and control strains.....	66
Table III: Prevalence of virulence and AMR genes in caecal samples from growing chickens receiving different feed ingredients, as detected by PCR	67
Table IV: Prevalence of AMR genes in <i>E. coli</i> isolates from the caeca of growing chickens receiving different feed ingredients	68
Table V: Prevalence of AMR genes combination in <i>E. coli</i> isolates from caeca of growing chickens receiving different feed ingredients.....	69
Table VI: Association between presence of virulence and AMR genes in <i>E.coli</i> isolates from the caeca of growing chickens.....	70
Table VII: Relationship between virotype and presence of AMR genes in 88 isolates from the caeca of growing chickens.....	71
Table VIII: Association between presence of virulence and AMR genes in 88 selected isolates representing all virulence and AMR genes.....	72

ABSTRACT 1: SYMPOSIUM SAFEPORK 2009

Table I: PCR and HGMFs probe hybridization from 11 rectal swabs from pigs.....	114
--------------------------------------------------------------------------------	-----

Liste des figures

REVUE DE LITTERATURE

- Figure 1 : Trois plasmides de virulence isolés à partir de 3 sérotypes différents appartenant aux APEC, et ayant en commun des gènes de virulence tels-que *iutA*, *iucABCD*, *iroBCDEN*, *etsABC*, *sitABCD*, et *OmpT'*11
- Figure 2 : Evolution et relation génétique entre différents plasmides appartenant aux APEC et autres ExPEC, comparativement aux plasmides d'autres pathotypes d'*E. coli* (Johnson et al ., 2009).....19
- Figure 3 : ORFs majeurs de 30kpb pTJ100, un plasmide putatif de virulence qui codent également pour la résistance de 8 antimicrobiens (Jonhson et al ; 2004).....33
- Figure 4 : Plasmide de virulence pCVM29188_146 provenant de *Salmonella*, portant des gènes de résistance aux antimicrobiens (*strAB* , *tetAR*) et génétiquement proche des plasmides de virulences pAPEC1, pAPEC-O1-ColBM et pAPEC-O2-ColV provenant de souches d'*E. coli* pathogènes chez le poulet. (Fricke et al ., 2009).....34

ABSTRACT 1: SYMPOSIUM SAFEPORK 2009

- Figure 1: HGMFs bearing *Escherichia coli* colonies after overnight incubation at 37°C onto MacConkey agar.....115
- Figure 2: HGMF Positive control after hybridization and colorimetrically detection.....115

Liste des abréviations

A/E	Attaching and effacing
Aac3	Aminoglycoside acetyltransferase
Aada	Aminoglycoside resistance protein
APEC	Avian pathogenic <i>E. coli</i>
AMR	Antimicrobial resistance
AstE	<i>Astragalus membranaceus</i> polysaccharide extract
Bla	Beta-lactamase
CMHI	Complexe majeur d'histocompatibilité de classe I
CNF	Cytotoxic Necrotoxic Factor
ColBM	Colicins B and M
ColV	Colicin V
Dfr	Dihydrofolate reductase
DIG	Digoxigénine
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EHEC	Enterohemorrhagic <i>Escherichia coli</i>
eitA	ABC iron transporter, periplasmic binding protein
eitB	ABC iron transporter, permease protein
eitC	ABC iron transporter, ATP-binding protein
eitD	ABC iron transporter, membrane protein

EPEC	Enteropathogenic <i>Escherichia coli</i>
ESBLs	Extended-Spectrum Beta-Lactamases
ETEC	Enterotoxigenic <i>Escherichia coli</i>
ExPEC	Extra-intestinal pathogenic <i>Escherichia coli</i>
Fep	Ferric-Enterobactin Protein
Fim	Fimbriae
FOS	Fructo-oligosaccharide
GOS	Galacto-oligosaccharide
GU	Growth unit
GyrA	DNA gyrase (type II topoisomerase), subunit A
GyrB	DNA gyrase (type II topoisomerase), subunit B
HGMF	Hydrophobic Grid Membrane Filter
IMP	One of the metallo- β -lactamases
IROMPs	Iron-regulated OMPs
IRT	Inhibitor-resistant TEMs
Iss	Increased serum survival
Iuc	Iron- Uptake Chelate
Iut	Iron-Uptake Transport
kDA	kilodalton
LEE	Locus of enterocytes effacement
<i>LenE</i>	<i>Lentinus edodes</i> extract

LPS	Lipopolysaccharide
LT	Heat-labile toxin
MBLs	Métallo- β -lactamases
MF	Membrane filter
mHC	Modified hemorrhagic colitis
MOS	Mannan-oligosaccharide
MPN	Most Probable Number
NBT	Nitroblue tetrazolium
OMP	Outer membrane protein
Pap	Pyelonephritis associated pili
ParC	Polymerase chain reaction
PGC	positive grid cell
PMQR	Plasmid-mediated quinolone resistance
Prs	Pap-related sequence
RAM	Résistance aux antimicrobiens
SitA	Périplasmique iron-binding protein
SitB	Iron transport protein ATP-binding component
SitCD	Iron transport protein inner membrane component
ST	Heat-stable toxin
StrB	Aminoglycoside-6''-phosphotransferase
STX	Shiga-toxin

T3 SS	Type III Secretion System
Tet	Tetracycline resistance protein
TMP-S	Trimethoprim-sulfonamides
TMP-SMX	Trimethoprim /sulfaméthoxazole
TreE	<i>Tremella fuciformis</i> extract.
Tsh	Temperature-sensitive hemagglutinin
UPEC	Uropathogenic <i>E.coli</i>
VIM	Verona integron-encoded metallo- β -lactamase
VT	Vérottoxine

Remerciements

Mes remerciements vont tout d'abord au **Dr John Morris Fairbrother** pour la confiance qu'il a placée en moi, en me confiant ce projet, et en m'accueillant dans son laboratoire. Merci surtout pour l'intérêt que vous avez démontré pour ce travail, en investissant énormément de temps dans ma formation scientifique et en m'encourageant à viser l'excellence scientifique.

Je tiens à remercier **Dre Ann Letellier** sans qui ce projet n'aurait pas pu voir le jour. Merci pour vos encouragements et pour votre participation à qualité scientifique de ce travail.

Je voudrais dire un grand merci au **Dr Philippe Fravallo**, pour sa disponibilité et son implication sans faille dans ce projet. Merci pour vos conseils de scientifique éclairés, vous êtes incontestablement une des quatre pierres angulaires pour la réussite de ce projet.

Je remercie **Mme Clarisse Desautels** pour son assistance technique et sa disponibilité au sein du laboratoire.

Je remercie les techniciennes de laboratoire, les agents de recherche, les techniciennes administratives, les étudiants du laboratoire ECL et de la CRSV pour leur contribution et collaboration à la réussite de ce travail.

Mes remerciements s'adressent aussi **Dre Sylvie D'Allaire** membre de mon comité scientifique et **Dre Josée Harel**, présidente du jury de mon mémoire, pour leur contribution à la qualité scientifique de ce travail.

Je voudrais également remercier tous mes amis étudiants du pavillon de Santé Publique, du GREMIP et en dehors du cadre universitaire pour leur soutien moral, leurs conseils et leur réconfort dans les moments de doute.

INTRODUCTION

Les *Escherichia coli* sont communément trouvés dans la microflore intestinale de la volaille. On y trouve une variété de clones comprenant des souches hautement pathogènes et des souches commensales non pathogènes (Mühldorfer et al., 1996; Dozois et al., 2000). La pathogénicité est caractérisée par l'expression d'un certain nombre de combinaisons spécifiques de facteurs de virulence causant des aérosacculites, des colibacillooses, des colisepticémies, des omphalites, des péritonites, des péricardites, des périhépatites, des salpingites et des synovites (Dozois et al., 2000; Mellata et al., 2003a; Mellata et al., 2003b; Ghanbarpour et al., 2011; Knöbl *et al.*, 2004; Janßen et al., 2001; Blanco et al., 1997). Collectivement, les souches pathogènes aviaires sont désignées par le terme APEC et les pathologies qu'elles causent sont responsables de pertes économiques importantes. Les APEC constituent une sous-classe du groupe des Extra-intestinal pathogenic *Escherichia coli* (ExPEC), qui semblent ne pas connaître la barrière d'espèce, les souches humaines étant génétiquement proches des souches aviaires (Johnson et al., 2003; Johnson et al., 2009; Rodriguez –Siek et al., 2005; Mellata et al., 2010). En effet, il existe des similitudes génotypiques entre les APEC et les ExPEC associés aux infections du tractus urinaire, aussi désignés comme uropathogenic *E. coli* (UPEC), de même que les *E. coli* causant des méningites et des septicémies néonatales (Ewers et al., 2007; Johnson and Nolan 2009; Johnson et al., 2006a; Mellata et al., 2009; Moulin-Schouleur et al., 2007; Skyberg et al., 2006). De plus, les gènes de virulence qui caractérisent les APEC peuvent également se retrouver chez les autres ExPEC.

Plusieurs facteurs de virulence ont été décrits chez les APEC, incluant les adhésines, les systèmes d'acquisition du fer, les capsules K1 et K80, l'hémagglutinine thermosensible, et les protéines de la membrane externe. Plusieurs des gènes codant pour ces facteurs de virulence sont portés par des larges plasmides qui sont communs chez les APEC (Mellata et al., 2010; Mellata et al., 2009; Johnson et al., 2006a; Johnson et al., 2006b; Johnson et al., 2009). D'autre part, de fortes prévalences de RAM ont été trouvées chez les *E. coli* provenant de la volaille en santé (Blanco et al., 1997; Gyles, 2008) et on assiste depuis la dernière décennie à l'émergence de certaines résistances antimicrobiennes comme celle à la quinolone et au ceftiofur (White et al., 2000; Blanco et al., 1997, McDonald et al., 2001; Dutil et al., 2010). La résistance bactérienne dans les élevages est considérée comme une

source potentielle de RAM chez les humains et *E. coli* est considéré comme une source de résistance pour d'autres bactéries pathogènes. Par ailleurs, des études montrent que certains ingrédients alimentaires comme les acides organiques pourraient affecter différemment les souches d'*E. coli* de la microflore intestinale chez les animaux (Bjornsdottir et al., 2006; Diez-Gonzalez and Russell., 1999). L'objectif de cette étude est d'évaluer l'effet de deux ingrédients alimentaires, un prébiotique à courte chaîne de fructo-oligosaccharides (Profeed™) et un mélange d'acide organique et d'huiles essentielles micro-encapsulé (Galliacid S™) sur la prévalence des *E. coli* porteurs des gènes de virulence et de RAM, de même que les associations entre ces gènes chez les *E. coli* de la flore intestinale de la volaille en santé.

REVUE DE LA LITTÉRATURE

1. Les principaux pathotypes des *Escherichia coli*

1.1. *E. coli* entéro-pathogènes (EPEC)

Les *E. coli* entéro-pathogènes (EPEC) sont responsables des gastroentérites chez les enfants et les jeunes animaux (chien, chat, ovin, porc). L'adhésion de la bactérie aux entérocytes du duodénum et du jéjunum et la destruction des microvillosités de la bordure en brosse donnent des lésions caractéristiques dites lésions d'attachement effacement (A/E) (Nataro et Kaper., 1998 ; Milon et al., 1999 ; Fairbrother, 1993 ; Beutin et al., 1999). La lésion A/E est caractérisée par un attachement de façon intime de la bactérie, la formation d'une structure pedestale en forme de coupe riche en actine et la destruction de la bordure en brosse des microvillosités (Knutton et al., 1987). Les gènes qui interviennent dans la formation des lésions A/E sont regroupés sur l'îlot de pathogénicité (Locus of enterocytes effacement (LEE)) qui code pour le système de sécrétion de type III (T3SS). Le T3SS agit par translocation du récepteur de l'intimine, Tir, lequel est inséré dans la membrane plasmique de la cellule de l'hôte et interagit avec l'intimine, la protéine de surface de la bactérie. L'interaction Tir-intimine entraîne l'attachement intime de la bactérie à la surface de la cellule de l'hôte. L'attachement de la bactérie est mis en évidence in vitro par coloration fluorescente de l'actine (Knutton et al., 1989).

1.2. *E. coli* entéro-hémorragiques (EHEC)

Les EHEC produisent des toxines Shiga (Stx) anciennement appelées vérotoxines (VT). Plusieurs espèces animales (bovin, ovin, chat, chien, lapin) sont considérées comme réservoirs (Verweyen et al., 2000). Les EHEC causent des colites hémorragiques et le Syndrome urémique-hémorragique chez l'humain, le sérotype O157:H7 étant le plus mis en cause et le premier identifié aux USA en 1982. L'ingestion des aliments contaminés par les EHEC entraîne après 3-4 jours d'incubation des symptômes, tel que la fièvre, la diarrhée aqueuse et hémorragique, des vomissements, des douleurs abdominales, et le tableau clinique peut s'aggraver avec l'apparition d'un syndrome hémolytique et urémique, des troubles neurologiques. Deux toxines sont principalement impliquées dans la pathogénie de la maladie (Stx1 et Stx2), Elles entraînent une mort cellulaire en inhibant la synthèse intracellulaire des protéines (Nataro and Kaper, 1998).

1.3. *E. coli* entérotoxigènes (ETEC)

Les ETEC produisent des toxines qui stimulent une sécrétion excessive de fluide dans la lumière intestinale entraînant la diarrhée. Les ETEC ont d'abord été reconnus comme des agents de maladies diarrhéiques chez les humains dans les années 60. Dès lors, ils ont été considérés progressivement comme une cause majeure de diarrhées associées à des intoxications alimentaires chez des voyageurs et des enfants dans les pays en développement (Nataro and Kaper, 1998). Ils ont été ensuite reconnus comme des agents de diarrhées néonatales du porcelet, du veau, de l'agneau et du chevreau, mais aussi comme agent de diarrhée de post-sevrage du porcelet (Nagy and Fekete, 1999). D'une manière générale, les ETEC adhèrent aux microvillosités de l'intestin grêle sans provoquer de lésions morphologiques grâce aux adhésines fimbriaires, puis produisent des entérotoxines qui entraînent l'hypersécrétion de fluides et d'électrolytes tout en réduisant la capacité d'absorption de l'intestin (Gyles, 1994 ; Nair and takeda, 1997 ; Nagy and Fekete, 1999). Les adhésines et les toxines sont les facteurs déterminant de la virulence des ETEC. Les adhésines présentent souvent des spécificités d'hôte comme F4 (K88) pour les souches porcines, F5 (K99) pour les souches porcines et bovines. D'autres adhésines fimbriaires ont été retrouvés chez les animaux F6 (987P), F41, F42, F165, F165, F17, F18 (Nagy and Fekete, 1999). Les toxines sont des protéines extracellulaires ou des peptides qui sont classés dans deux principaux groupes, les toxines stables à la chaleur (ST) et les toxines instables à la chaleur LT. Ces 2 groupes se subdivisent également en fonction de propriétés biologiques et antigéniques (LT-h, LTp-I, LTIIa, LTIIb) pour la toxine thermosensible LT, et (STaP, STb) pour la toxine thermostable ST (Nagy and Fekete , 1999).

1.4. *E. coli* pathogènes à tropisme extra-intestinal (ExPEC)

Les ExPEC ont souvent été décrits comme des *E.coli* opportunistes chez les humains et les animaux. Ils ont la capacité de se développer dans des milieux pauvres en fer et en présence des défenses immunitaires de l'hôte. Bien que pathogènes facultatifs, les ExPEC sont associés à plusieurs types d'infections, notamment des infections urinaires chez les humains (Nakazato et al., 2009 ; Pechere, 1985), des septicémies chez les humains (Orskov and Orskov, 1985 ; Nakazato et al., 2009) des méningites néonatales de l'enfant

(Overall Jr , 1970), des infections urinaires et pyomètres chez le chien (Wooley and Blue, 1976 ; Bjurstrom, 1993), et des colibacillooses systémiques chez les oiseaux (Dozois et al., 2000 ; Rodriguez Siek et al., 2005 ; Ron et al., 2006 ; Johnson et al., 2002 ; Mokady et al., 2005). Des infections urinaires et des septicémies ont également été rapportées chez le chat, le veau et le porc.

Certain facteurs de virulence caractérisent les ExPEC, incluant les adhésines fimbriaires (F1, P, S), les systèmes de séquestration du fer (aérobactine et gènes *iro*), les hémolysines (CNF1), la capsule, et bien d'autres (Rodriguez Siek et al., 2005 ; De Lorenzo et al., 1986). Les ExPEC semblent ne pas connaître la barrière d'espèces, et les souches humaines sont génétiquement proches des souches aviaires (Johnson et al., 2003 ; Johnson et al., 2009 ; Rodriguez –Siek et al., 2005 ; Mellata et al., 2010). Les APEC et les UPEC sont les deux grands groupes au sein des ExPEC, et ont parmi eux un nombre important de souches non sérotypables (Rodriguez –Siek et al., 2005). Parmi les souches sérotypables, on trouve une grande diversité chez les APEC de même que parmi les UPEC. Rodriguez–Siek et al., 2005 montrèrent que, parmi 524 isolats APEC on distinguait 60 sérogroupes différents, dont 39 étaient spécifiques aux APEC. Parmi 200 isolats UPEC, on distinguait 37 sérotypes différents, dont 17 spécifiques aux UPEC. Seulement 14% des souches appartenaient à des sérogroupes spécifiques aux UPEC. Parmi les sérogroupes communs aux UPEC et APEC, le sérotype O2 est le plus fréquent. L'analyse phylogénique selon la méthode de Clermont et al., 2000, montre que la majorité des APEC appartiennent au groupe A, alors que la majorité des UPEC appartiennent au groupe B2. Cependant un nombre important des UPEC (18.5%) et des APEC (29. %) appartiennent au groupe D (Rodriguez –Siek et al., 2005).

1.5. *E. coli* pathogènes aviaires (APEC)

Les APEC sont responsables de nombreuses pathologies aviaires dont, les aérosacculites, les péricardites, les péritonites, les salpingites, les ostéomyélites, les omphalites, l'infection la plus importante étant celle des voies respiratoires. Les sérotypes prédominants sont O1 :K1; O2 :K1; et O78 : K80 (Janben et al., 2001; Blanco et al., 1997). Plusieurs facteurs de virulence ont été décrits chez les APEC, on distingue principalement

les adhésines, les systèmes d'acquisition du fer, les capsules K1 et K80, l'hémagglutinine thermosensible, les protéines de la membrane externe. Plusieurs gènes de ces facteurs de virulence sont portés par des larges plasmides qui sont communs chez les APEC (Mellata et al., 2010; Mellata et al., 2009; Johnson et al., 2006a; Johnson et al., 2006b; Johnson et al., 2009).

2. Facteurs de virulence des APEC et les pathologies aviaires associées

2.1. Sérogroupes O

Bien qu'une proportion importante de souches APEC soit non-sérotypable, les sérogroupes O1, O2, et O78 sont reconnus comme les plus prépondérantes (Dozois et al., 2000 ; Mellata et al., 2003a). Plus d'une vingtaine d'autres sérogroupes d'*E. coli* ont été associés aux APEC, parmi lesquels on retrouve O5, O8, O11, O12, O14, O15, O18, O20, O35, O36, O53, O55, O81, O83, O85, O88, O102, O103, O115, O116, O132, et O152, (Rodriguez –Siek et al., 2005 ; Blanco et al., 1998 ; Cloud et al., 1985 ; Ike et al., 1990 ; Panigraphy and Yushen, 1990, Dozois et al., 1992 ; Allan et al., 1993 ; Gross, 1994). Les sérogroupes O12, O14, O18, O53, O78, O81, O102, O115, O116, et O132 ont été identifiés comme presque exclusivement associés à la septicémie (Blanco et al., 1998) ; d'autres sérogroupes ont été rattachés à des pathologies en particulier, comme O15 à la synovite, O109 à l'aérosacculite et O115 à la dermatite nécrotique (Gross, 1994 ; Peighambari et al., 1995 ; Ngeleka et al., 1996). La prévalence des différents sérogroupes associés aux APEC varie cependant en fonction de la région et du temps (Cloud et al., 1985; Ike et al., 1990 ; Blanco et al., 1998).

2.2. Les systèmes d'acquisition du fer

Le système de transport du fer est considéré comme faisant partie du système de défense inné de l'hôte. Naturellement l'hôte limite la disponibilité du fer nécessaire à la croissance bactérienne, via des liaisons fer-protéine (Mainil et al., 2003 ; Mellata et al., 2010). Pour palier la faible disponibilité de fer chez l'hôte, les bactéries pathogènes ont élaboré des systèmes de captation du fer ou «iron-regulated OMPs» (IROMPs) comprenant des chélateurs de faible poids moléculaire, des sidérophores (phénolates ou hydroxymates) et des transporteurs de protéines (G proteine-like transporter).

L'hydroximate aéro bactéine fait partie des sidérophores fréquemment associés aux APEC. La synthèse de l'aéro bactéine se fait grâce aux enzymes codées par les gènes *iucABCD* (*iuc*; Iron- Uptake Chelate) qui codent pour l'aéro bactéine et au gène *iut* (Iron-Uptake Transport) qui est un récepteur membranaire de l'aéro bactéine (Carbonetti and Williams, 1984). Il a été démontré que la production de l'aéro bactéine est plus fréquente chez les APEC que chez les souches non-pathogènes d'*Escherichia coli* (Dozois et al., 1992, Emery et al., 1992).

Les gènes *eitABCD* (periplasmique binding protein, iron transport) sont plasmidiques et sont généralement associés à ColV et ColBM, deux plasmides assez communs chez les APEC et détectés respectivement chez des souches APEC O2, et APEC O1 (Johnson et al., 2006a, Johnson et al., 2006b). En outre *eitA* a été récemment identifié sur un plasmide pAPEC-2 de la souche APEC (O78 :K80 :H9) (Mellata et al., 2010).

Le locus *iro* qui code pour le système sidérophore d'entérobactine anciennement appelé salmo chéline, mais aussi locus *iroA* chez *Salmonella enterica serovar* Typhimurium (Caza et al., 2008 ; Foster et al., 1992 ; Foster et al., 1994). Il a été ensuite montré que le locus *iroA* comprend deux groupes de gènes, dont *iroBCDE* et *iroN* (Bäumler et al 1998, Caza et al., 2008). Les gènes *iroBCDEN* contribuent à la virulence des souches ExPEC, et plus particulièrement des APEC (Caza et al ., 2008 ; Mellata et al., 2010). Une complémentation avec les gènes *iroBCDEN* chez *E. coli* non pathogène permet à la bactérie d'acquérir de la virulence, alors que l'absence de gènes *iroC*, *iroDE* ou *iroN* s'accompagnait d'une abrogation de la virulence chez la bactérie. Par contre, la présence du gène *iroE* n'est pas nécessaire pour le maintien de la virulence puisque la présence de *iroBCDN* est suffisante pour rétablir complètement la virulence des souches (Caza et al., 2008). D' autre part, la même étude a montré que sur un total de 298 souches APEC la prévalence des gènes *iro* était de 82% et que la prévalence du gène est encore plus importante parmi les souches APEC les plus virulentes (91%), alors que seulement 31% des 32 isolats commensaux de la flore fécale du poulet étaient porteurs des gènes *iro*.

Les gènes *fepA-G* (Ferric-Enterobactin Protein) participent à la synthèse de l'entérobactine, ayant spécifiquement un rôle dans la synthèse du récepteur membranaire

FepA et du transporteur périplasmique FepB. Le gène *fepC*, et plus récemment *fepA*, ont été associés aux APEC (Nakazato et al., 2009; Okeke et al., 2004; Mellata et al., 2010).

Les gènes *sitABCD* ont été également identifiés chez les souches APEC. Ces gènes de virulence, malgré une grande similarité avec leurs homologues chez *Shigella spp* qui sont chromosomiques chez cette dernière, sont portés par le plasmide pAPEC-1. D'autre part, les gènes *sitABCD* fonctionnent comme un système de transport du fer et du manganèse et leur présence confère à la bactérie une résistance aux effets bactéricides du peroxyde d'hydrogène (Sabri et al., 2006 ; Sabri et al.,2008).

Les différents systèmes de captation du fer jouent un rôle important dans la virulence des APEC, ils sont souvent plasmidiques (Figure 1) et parfois chromosomiques. Ils coexistent fréquemment chez la même bactérie (Mellata et al., 2010 ; Johnson et al 2006a).

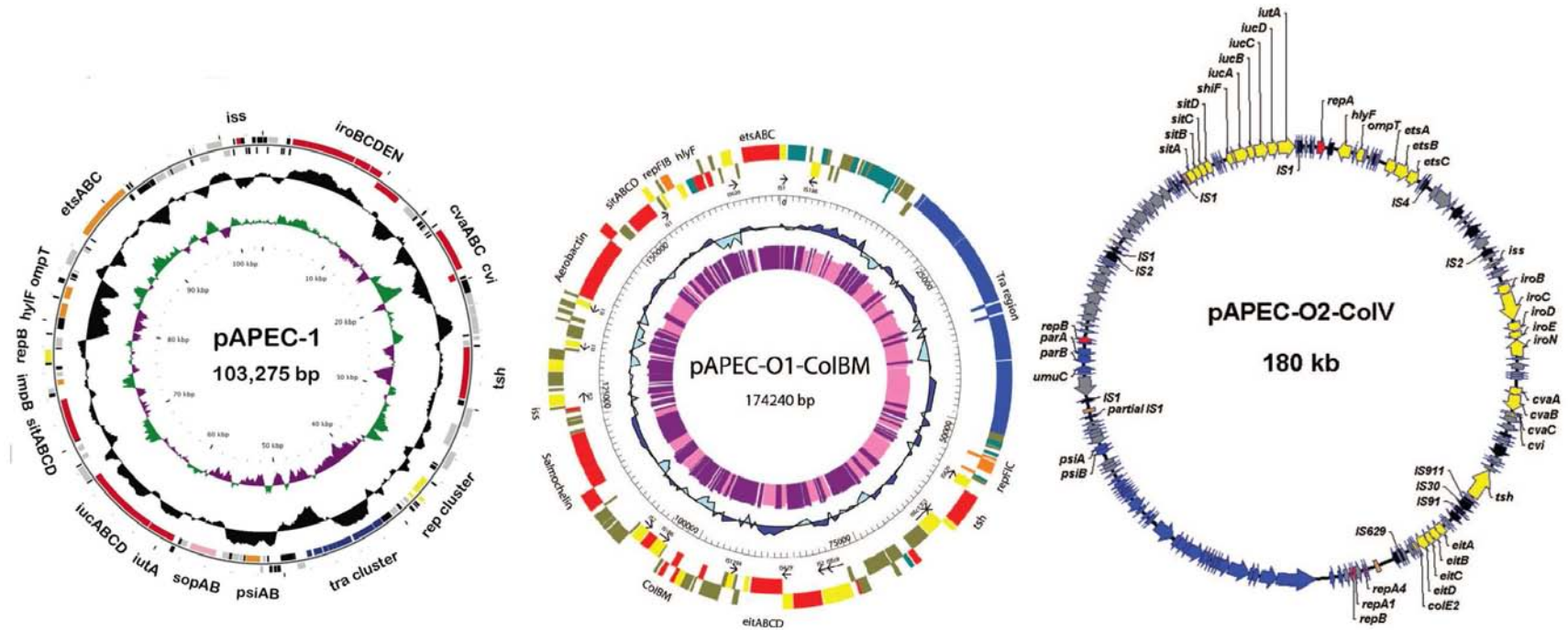


Figure 1 : Trois plasmides de virulence isolés à partir de 3 sérotypes différents appartenant aux APEC, et ayant en commun des gènes de virulence tels que *iutA*, *iucABCD*, *iroBCDEN*, *etsABC*, *sitABCD*, et *OmpT*'.

pAPEC1 a été isolé à partir d'une souche virulente de sérotype O78 (Mellata et al ., 2009)

pAPEC-01-ColBM a été isolé à partir d'une souche virulente de sérotype O1 (Johnson et al ., 2006b)

pAPEC-02-CoIV a été isolé à partir d'une souche virulente de sérotype O2 (Johnson et al ., 2006a)

2.3. Les protéines de la membrane externe OMPS (Iss et traT)

Les gènes *iss* («increased serum survival») et *traT* codent respectivement pour les protéines de la membrane externe Iss et traT et leur rôle dans la virulence des souches APEC n'est pas complètement élucidé. Le gène *iss* a été trouvé sur le plasmide ColV et *traT* sur les plasmides ColV, R6-5, R100. Ce sont des gènes rencontrés plus fréquemment chez les APEC que chez les souches commensales. En effet, De Brito et al., 2003 ont montré que 83% des isolats de *E. coli* provenant des cas de cellulite possédaient le gène *iss* alors qu'aucun isolat provenant d'animaux sains ne possédait ce gène (De Brito et al., 2003). De même, Delicato et al., 2003 montrèrent que parmi les isolats provenant des cas de colibacillose, 38.5% possédaient le gène *iss*, alors que seulement 16% des isolats provenant d'animaux sains étaient porteurs du gène (Delicato et al., 2003). Du fait de la fréquence plus importante de ces gènes parmi les souches APEC, il a été admis qu'ils jouent un rôle dans la virulence associé à une augmentation de la résistance de la bactérie au sérum. En effet, il a été démontré que la présence de *iss* sur le plasmide ColV augmenterait 100 fois la virulence des souches chez le poussin d'un jour (Binns et al., 1979) et de 20 fois la résistance au complément (Chuba et al., 1986 ; Barondess et al., 1990) montrant ainsi l'importance de *iss* dans la résistance au sérum.

Le gène *traT* avait été associé à la résistance au sérum chez les *Enterobacteriaceae* (La ragione and Woodward, 2002; Mellata et al , 2003b). Le rôle du gène *traT* dans la virulence des *E.coli* a été rarement abordé dans les récentes études et son rôle spécifique dans la virulence des souches d'*E. coli* semble limité et probablement attribuable à d'autres gènes de virulence portés sur le même plasmide de virulence ColV (Jonhson et al 2006a; Johnson et al., 2009; Mellata et al , 2003b).

Mellata et al., 2003 ont montré que les souches *iss* et *traT* positifs qui ont perdu les antigènes K1 et O n'étaient plus protégées contre l'effet bactéricide du sérum. Par contre, elles étaient plus résistantes qu'une souche sauvage qui était *iss* négatif, suggérant un rôle limité du gène *iss* et *traT* dans la protection contre le sérum.

2.4. Les adhésines

Les adhésines ont été proposées comme facteurs de virulence bactérienne chez les APEC pour la première fois par Arp and Jensen., 1980, qui observèrent dans la trachée des

dindons une persistance plus importante des souches virulentes d'*E. coli* pourvues de fimbriae comparativement à des souches non virulentes et dépourvues de fimbriae (Arp and Jensen., 1980). En effet les adhésines procurent à la bactérie la capacité d'adhérer aux tissus épithéliaux de l'hôte, cette phase d'adhésion étant une étape importante pour la pathogenèse de l'infection à *E. coli*. L'adhésion permet à la bactérie de résister au système de défense, favorise la multiplication bactérienne et la formation de microcolonies (Moon, 1990). Les fimbriae de type 1, les fimbriae P et les curli sont les adhésines les mieux décrites dans la littérature concernant les APEC, mais de nouvelles adhésines impliquées dans la virulence des APEC sont régulièrement découvertes.

2.1.1. Fimbriae de type 1

Les fimbriae de type 1 sont les structures somatiques que l'on trouve chez *E. coli* et plusieurs autres entérobactéries, (Duguid and Old., 1980; Klemm and Krogfelt., 1994). Ils sont impliqués dans l'initiation de la colonisation de l'épithélium des voies respiratoires (Wooley et al., 1998). Cependant, d'autres facteurs comme la mobilité et la production de colicine V seraient également nécessaires à une persistance de la colonisation (Marc et al., 1998, Nakazato et al., 2009). Les fimbriae de type 1 sont capables de se fixer sur les récepteurs riches en mannosides des cellules épithéliales de la trachée, des macrophages et d'autres cellules (Duguid et Old., 1980). Les propriétés adhésives des fimbriae de type 1 sont inhibées par des antisérums spécifiques et par le carbohydrate D-mannose (Gyimah et Panigraphy, 1988 ; Pourbaskhsh.et al., 1997 ; Nakazato et al., 2009). Les fimbriae de type 1 sont codés par le locus *fim* (Orndorff et al., 1994). C'est un opéron formé de neuf gènes (*fimA fimB fimC fimD fimE fimI fimF et fimH*) qui codent pour les sous-unités de structure, les chaperons et les protéines régulatrices de l'expression des fimbriae.

Les études de prévalence montrent que les fimbriae de type 1 sont fréquents parmi les APEC. Des prévalences de 90% et plus du gène *fim* ont été régulièrement rapportées pour ces *E. coli* (Delicato et al., 2003; Kawano et al., 2006; Ewers et al., 2004). Les études de prévalence sur des APEC associés à des pathologies spécifiques montrent que la prévalence du gène *fim* peut atteindre 100% dans les cas de colisepticémie (Moulin-Schouleur et al., 2007; Vandekerchove et al., 2005). D'autre part, la prévalence du gène

fim parmi les *E. coli* associés aux omphalites est élevé (77.88%) (Ghanbarpour et al., 2010) malgré le fait que dans cette étude, seule la prévalence du gène *fimH* ait été examinée.

2.1.2. Fimbriae P

Les adhésines fimbriaires de la famille P se définissent sur la base de leurs propriétés d'agglutination des érythrocytes humains du groupe sanguin P. Les récepteurs des fimbriae sont constitués de différentes parties des oligosaccharides déterminant le groupe sanguin P (Mainil et al., 2002, Hacker, 1990 ; Orskov and Orskov, 1990). Les adhésines fimbriaires de la famille P ont d'abord été décrites chez les *E. coli* appartenant aux UPEC (Kallenius et al., 1980), puis chez les APEC (Achtman et al., 1983, Dozois et al., 1992, Nakazato et al., 2009). Le fimbriae P est codé par différents opérons comme les opérons *pap* et *prs*. Le gène *papC* est très important dans la détection du fimbriae P parce qu'il représente une séquence commune à tous les fimbriae de cette famille et est utilisé dans le PCR pour détecter le fimbriae (Lebouguenec et al ; 1992 ; Blum et al., 1995). Sur l'opéron *prs* (Pap-related sequence) on trouve 11 gènes (Blum et al., 1995). Le gène *papA* code pour la protéine structurale majeure (PapA), *papB* et *papI* sont des gènes de régulation responsables du processus de variation de phase (Mol and Oudega, 1996). Le gène *papE* code pour une sous unité mineure de l'extrémité de la structure fimbriaire. Le pouvoir adhésif du fimbriae lui est conféré par l'adhésine papG située à l'extrémité distale du fimbriae. Il existe trois classes d'adhésines papG (I, II, et III). Les différentes adhésines ont des affinités avec différents syndromes cliniques, ainsi l'adhésine papGI est associée à la pyélonéphrite humaine, papGII est associée aux pyélonéphrites et bactériémies humaines, papGIII est associée aux cystites humaines, et aux infections génito-urinaires chez le chien et le chat. L'adhésine papG est reliée à l'ensemble de la structure fimbriaire par papF. En outre, *papD*, *papH*, *papJ*, *papF* et *papK* sont responsables de l'expression des protéines associées à l'intégrité de l'assemblage du complexe fimbriaire (Mol and Oudega, 1996; Nakazato et al., 2009). Sur le plan de la pathogénicité, le rôle des fimbriae P n'est pas encore complètement élucidé. En effet, Pourbakhsh et al., 1997, observèrent que les fimbriae P présentent une variation de phase et ont suggéré que les adhésines ne joueraient pas un rôle important dans la colonisation des voies respiratoires supérieures mais qu'elles interviendraient plutôt à un stade avancé de l'infection (Edelman et al.,

2003; Pourbakhsh et al., 1997). Plus récemment Kariyawasam et al., 2006 ont démontré que l'opéron de *pap* est présent sur un îlot de pathogénicité des souches APEC-O1. Les auteurs ont suggéré que la présence de *pap* dans une région qui peut être horizontalement acquise pourrait entraîner la transformation des souches avirulentes en souches virulentes (Kariyawasam et al., 2006). Chez la volaille, les fimbriae P sont principalement associés aux colisepticémies mais sont relativement moins fréquents que les fimbriae de type 1 chez les APEC. Cependant, les prévalences rapportées restent importantes, supérieures à 20% chez les APEC (Ewers *et al.* 2004; Kawano et al., 2006; Rodriguez-Siek et al., 2005) et sont encore plus importantes dans les cas de septicémies. Les gènes *pap* ont été retrouvés dans 41.2% des souches colisepticémiques APEC, ce qui représente environ trois fois la prévalence des gènes *pap* chez les *E. coli* des oiseaux en santé (McPeake et al., 2005). Les gènes de l'opéron *pap* ont été aussi détectés dans 20% des isolats d'*E. coli* provenant de cas de colibacilloses (Delicato et al., 2003). Dans les cas d'omphalites et salpingites, les prévalences rapportées de l'opéron *pap* dans les populations d'*E. coli* sont encore plus faibles, de l'ordre de 8% (Ghanbarpour et al., 2010, Knöbl *et al.*, 2004)

2.1.3. Les curli

Les curli sont des minces fibres agrégatives de surface que l'on trouve chez les *E. coli* aussi bien pathogènes que non-pathogènes (Mellata et al., 2010; Olsen et al., 1989). Les gènes responsables de l'expression des curli sont codés par 2 opérons, *csgBAC* et *csgDEFG*. Le gène *csgA* code pour la sous-unité majeure du curli appelé curlina, et le gène *csgB* code pour la protéine nécessaire à la stabilité du complexe (La Ragione and Woodward, 2002 ; Nakazato et al., 2009). L'expression de l'opéron *csgDEGF* est contrôlée par des facteurs environnementaux tels que la température, l'osmolarité, le pH et d'autres facteurs de stress (La Ragione and woodward., 2002 ; Nakazato et al., 2009), les curli étant exprimés de manière optimale à 26°C et dans des conditions de faible osmolarité (Olsen et al., 1993). D'autre part, l'opéron curli est régulé par le locus *crl rpoS* et *csgD* (Olsen et al., 1993 ; Hammar et al., 1996). Les curli possèdent plusieurs propriétés tels que la capacité de fixer la fibronectine, la lamine, et d'autre protéines du sérum ainsi que les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I (CMHI) et le rouge Congo (Olsén et

al., 1993; Hammar et al., 1995). Selon Persson et al., 2003, les curli pourraient avoir un rôle d'activation de la coagulation en cascade du fibrinogène et d'induction des cytokines proinflammatoires (Persson et al., 2003). Dans la plus part des études, la présence des curli est plus souvent associée aux *E. coli* pathogènes qu'aux *E. coli* saprophytes (Maurer et al., 1998 ; La Ragione et al., 1999 ; Amabile de Campos et al., 2005). En effet, le gène *csgA* qui code pour les curli est fréquemment présent chez les souches APEC (Maurer et al., 1998 ; Knöbl et al., 2001 ; Amabile de Campos et al., 2005). D'autre part, Amabile de Campos et al., 2005 ont montré que la totalité des souches d'*E.coli* associées aux septicémies étaient porteuses du gène *csgA*, alors que ce gène n'a pu être trouvé parmi les isolats d'*E. coli* provenant de la flore microbienne intestinale (Amabile de Campos et al., 2005). Par contre, Mcpeake et al., 2005 démontrèrent que *csgA* est présent chez les souches d'*E. coli* isolées aussi bien du poulet septicémique que du poulet sain (Mcpeake et al., 2005), ceci est en accord avec les résultats de Mellata et al., 2010 . Ces derniers démontrèrent que *csgA* est présent chez les *E. coli* virulents mais aussi chez la souche non virulente K-12 (Mellata et al., 2010).

2.1.4. Autres adhésines

PilS est une adhésine qui code pour des composants majeurs des fimbriae de type IV. Les gènes codant pour cette adhésine sont détectés sur le plasmide pAPEC-3 de la souche APEC (O78 :K80 :H9) (Mellata et al., 2010). Le rôle du gène *pilS* dans la virulence des souches APEC n'a pas encore été élucidé mais les fimbriae de type IV sont connus chez plusieurs bactéries à Gram négatifs où ils sont également codés par des plasmides, et considérés comme des facteurs de virulence clés. En effet les fimbriae de type IV sont impliqués dans les processus d'adhésion des bactéries aux cellules de l'hôte, la formation de microcolonies et de biofilms bactériens, l'agrégation bactérienne, et constituent des récepteurs de phages.

La présence d'autres adhésines a été démontré parmi les souches APEC, telles que les fimbriae AC/1, F17, Afa, Sfa, Eae, (Nakazato et al., 2009 ; La Ragione and Woodward, 2002 ; Stordeur et al., 2002 ; Amabile de Campos et al., 2005 ; McPeake et al., 2005).

2.5. Hémagglutinine thermosensible

Tsh est un des facteurs de virulence les mieux étudiés chez les APEC. Il a été rapporté pour la première fois en 1994 (Provence et Curtiss III, 1994), puis il a été proposé comme marqueur moléculaire pour détecter les APEC (Ewers et al., 2004). C'est une protéine de surface thermosensible, qui possède la capacité d'agglutiner les érythrocytes à température basse (26°C-30°C) et son activité est réprimée à 42°C (Provence et Curtiss III, 1994). Tsh est une protéine autotransporteur de la serine-protéase, synthétisée sous forme de protéine précurseur de 140 kDa dont la forme mature est de 118 kDa. La protéine précurseur est formée de deux sous-unités, une de 33 kDa insérée sur la membrane externe et fonctionnant comme un domaine passager. Une deuxième sous-unité de 106 kDa est sécrétée dans l'environnement extracellulaire, se trouvant temporairement dans la membrane externe de la bactérie où elle joue un rôle d'adhésion dans la phase initiale de l'infection (Nakazato et al., 2009; Stathopoulos et al., 1999). Après la sécrétion de la sous unité de 106 kDa, Tsh présente probablement une activité protéolytique faisant d'elle une protéine bifonctionnelle, avec d'une part une activité adhésive et d'autre part une activité protéolytique (Kostatkiati and Stathopoulos, 2004., Nakazato 2009). Tsh est codé par le gène *tsh* (Provence et Curtiss III, 1994) situé sur les plasmides ColV, ColBM, et pAPEC-1 qui sont communs chez les APEC (Johnson et al., 2006a; Johnson et al., 2006b, Mellata et al., 2009). Il a été aussi démontré que la présence du gène chez les APEC permettait de classer les souches parmi les plus virulentes, et que la présence de *tsh* contribue au développement de lésions dans les sacs aériens, mais n'est pas déterminant dans l'infection généralisée (Dozois et al., 2000). D'autre part, environ la moitié des souches d'*E. coli* provenant de cas cliniques aviaires posséderaient le gène *tsh* (Maurer et al., 1998, Dozois et al., 2000; Amabile de Campos et al., 2005). Les travaux de Amabile de Campos et al., 2005 ont également montré que 50% souches d'*E. coli* isolées de poulets avec des signes respiratoires possédaient le gène *tsh*. Cependant, la prévalence du gène est plus faible chez les souches d'*E. coli* provenant de poulets septicémiques (25%) de même que parmi les *E. coli* commensaux (Amabile de Campos et al., 2005).

2.6. Les capsules

Plus de 80 capsules polysaccharidiques (antigène K) chimiquement distinctes ont été décrites chez les *E. coli*, cependant très peu d'entre elles sont associées aux infections invasives (Orkov and Orkov , 1992). Les capsules confèrent à la bactérie de la résistance à l'immunité spécifique et non spécifique de l'hôte. En absence d'anticorps spécifiques, la capsule joue un rôle de protection de la bactérie contre l'effet bactéricide du sérum et contre la phagocytose (Howard and Glynn, 1971). La capsule K1 est fréquemment associée aux APEC de séro groupe O1, O2 et non typables (Gross et al., 1991; Nakazato et al ., 2009; Dho Moulin and Fairbrother, 1999). La capsule K80 est associée au séro groupe O78 (Dho-Moulin and Fairbrother, 1999). En effet, Pourbakhsh et al; 1997 ont démontré que 3 souches APEC exprimant la capsule K1 étaient plus résistantes aux effets bactéricides du sérum comparativement aux autres souches APEC qui expriment d'autres antigènes K (Pourbakhsh et al., 1997). Ces résultats ont été confirmés par ceux de Mellata et al; 2003, qui ont démontré que la capsule K1 augmente la résistance aux sérum des souches APEC, de même que la capacité de colonisation des organes internes chez la volailles (Mellata et al., 2003b). Ainsi, la capsule K1 est associée aux souches septicémiques humaines et animales (Ngeleka et al., 1996)

3. Rôle des plasmides dans la virulence des APEC

3.1. Rôle des plasmides dans l'évolution de la pathogénicité des APEC

La caractérisation moléculaire des ExPEC a permis de mieux connaître la grande diversité au sein de ce groupe. Une analyse génomique montre que la transition entre commensalisme et pathogénicité pourrait résulter de l'acquisition et la perte de plasmides (Touchon et al., 2009). En effet, les ExPEC portent différents gènes de virulence qui leur permettent de s'adapter à la vie extra-intestinale et leur conférer une pathogénicité (Johnson and Russo, 2002 ; Johnson et al., 2009). Plusieurs de ces gènes de virulence sont portés par des plasmides fréquents chez les ExPEC. Ces derniers constituent une base commune en qui ce concerne l'acquisition des traits essentiels et spécifiques pour leurs pathotypes respectives. Les plasmides ColV, ColBM et pAPEC-1 (Figure 1) font partie des plasmides les plus importants conférant de la virulence aux APEC. Ces plasmides des

souches APEC et des autres ExPEC présentent de grandes similitudes génétiques, suggérant le potentiel zoonotique des souches APEC (Figure 2).

D'autre part Mellata et al., 2010 démontrèrent que les plasmides pAPEC-1 et pAPEC-2 sont absent chez *E. coli* K-12, et ont suggéré que ces plasmides ont été acquis durant l'évolution constituant une étape du passage de la bactérie d'un état commensal à un état de pathogène. De même, plusieurs autres études démontrèrent que les plasmides de virulence trouvés chez les APEC sont facilement transférables à d'autres souches d'*E. coli*, et que le transfert s'accompagnait d'un transfert de virulence (Johnson et al., 2009 ; Mellata et al.,2009). L'acquisition de plasmides de virulence par les APEC se fait souvent à partir de souches d'*E. coli* mais aussi à partir d'autres espèces bactériennes de la même famille qui cohabitent avec *E.coli* dans le tube digestif (Johnson et al ., 2006a; Fricke et al., 2009; Mellata et al., 2009).

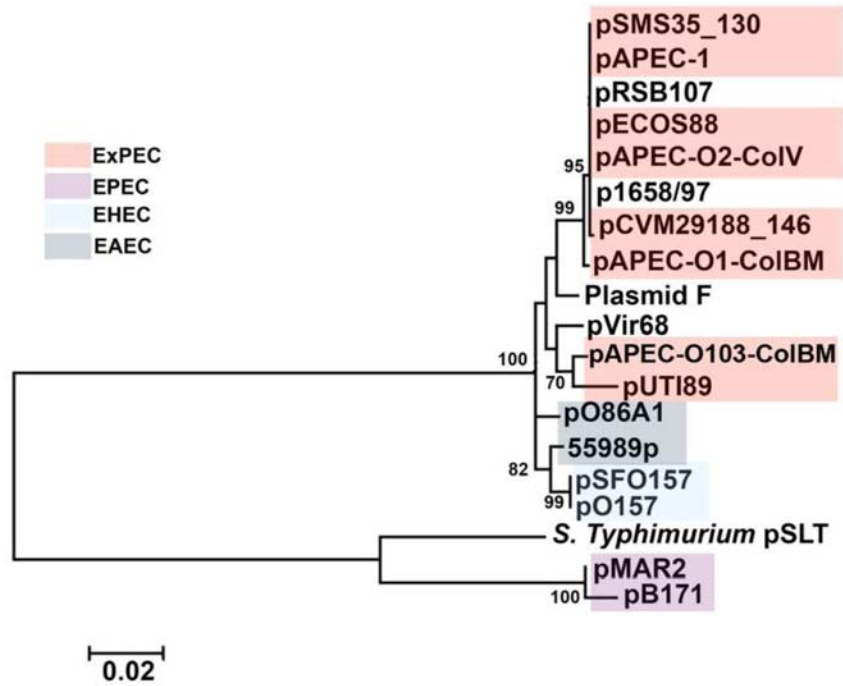


Figure 2 : Evolution et relation génétique entre différents plasmides appartenant aux APEC et autres ExPEC, comparativement aux plasmides d'autres pathotypes d'*E. coli* (Johnson et al., 2009)

3.2. Rôle des plasmides dans le degré de virulence et la pathodiversité des APEC

Chez les APEC, le nombre de gènes de virulence portés par les plasmides est très variable (Johnson et al., 2006a; Johnson et al., 2006b; Johnson et al., 2009; Mellata et al., 2009; Mellata et al., 2010). Certains plasmides, comme le pAPEC-3(60Kb), portent un petit nombre de facteurs de virulence, d'autres plasmides portent plusieurs facteurs de virulence, comme le pAPEC-1 (103Kb) qui porte jusqu'à neuf gènes de virulence connus (Mellata et al., 2010). Les gènes de virulence trouvés sur le même plasmide contribuent parfois au même trait de virulence. Par exemple Mellata et al., 2009 ont montré que le plasmide pAPEC1 possède 4 systèmes d'acquisition du fer différents (*iutA*, *iucABCD*, *sitABCD*, *iroBCDN*). La combinaison des gènes de virulence sur un même plasmide comme dans les cas des plasmides ColV, pAPEC1, et ColBM est déterminante dans la virulence des souches (Johnson et al., 2006a ; Johnson et al., 2006b ; Mellata et al., 2010).

D'autre part, la coexistence de plusieurs plasmides de virulence a été également observée chez les APEC, et la conséquence de ce phénomène se traduit parfois par une synergie des facteurs de virulence portés par les différents plasmides procurant une plus grande virulence à la bactérie (Mellata et al., 2010 ; Fricke et al., 2009). En effet, la coexistence des plasmides pAPEC-1 et pAPEC-3 a un effet cumulatif et donne une virulence supérieure à la souche sauvage (Mellata et al., 2010).

Les pathologies causées par les APEC sont diverses et dépendent intimement des gènes de virulence, très souvent plasmidiques, que l'on retrouve chez la bactérie. La combinaison des gènes de différentes origines vont généralement déterminer le type de pathologie causé par la bactérie. La présence ou l'absence de certains plasmides chez les APEC suffit parfois à déterminer le type de lésions et la virulence de la souche bactérienne (Johnson et al., 2006a., Johnson et al., 2009 ; Mellata et al., 2010). L'étude de Mellata et al., 2010 ; démontre que le pAPEC-1 est associé à une colonisation des sacs aériens, du fluide péricardique, du poumon, de la rate, du foie alors que pAPEC-2 et pAPEC-3 sont faiblement associés à ces processus de pathogénie mais leur présence conjointe avec pAPEC-1 favorise la colonisation. Le plasmide pAPEC-1 est requis pour que la colonisation de l'hôte soit effective, mais la présence du seul plasmide ne permet pas d'atteindre le même niveau de virulence que la souche sauvage. Par contre, une combinaison des

plasmides pAPEC-1 et pAPEC-3 favorisent la dissémination d'*E. coli* dans le sang et les organes du poulet infecté, une plus grande colonisation des organes et une virulence supérieure à la souche sauvage (Mellata et al., 2010).

4. Résistance aux antimicrobiens (RAM) des souches d'*E. coli*.

La thérapie antimicrobienne est utilisée comme un outil puissant de réduction de la mortalité en production aviaire (Blanco et al., 1997). Cependant, une utilisation abusive des antimicrobiens peut devenir une source de sélection de résistance et joue un rôle dans l'émergence de nouvelles résistances (Saylers and Amàbile-Cuevas, 1997 ; Nowak, 1994 ; Dutil et al., 2010). Aussi le contrôle de l'utilisation des antimicrobiens, spécialement dans le domaine vétérinaire est devenu une préoccupation de nombreuses autorités gouvernementales. Au Canada, l'encadrement de l'utilisation des antimicrobiens a conduit la direction des médicaments du Canada à classer les antimicrobiens en quatre grandes catégories (Tableau I). En effet, il existe un large consensus sur l'impact de l'utilisation des antibiotiques sur le développement de la résistance aux antimicrobiens (RAM) des souches. Cependant il est illusoire d'espérer une disparition de la résistance bactérienne à certains antimicrobiens suite à la cessation de leur utilisation (Saylers and Amàbile-Cuevas, 1997). Pour certains antimicrobiens, une diminution importante de la résistance est observée suite à leur retrait, comme dans le cas du ceftiofur vis à vis de *Salmonella* et *E. coli* (Dutil et al., 2010), de la pénicilline vis-à-vis de *Streptococcus pneumoniae* (Saylers and Amàbile-Cuevas, 1997 ; Nowak, 1994). Cependant, il est difficile d'obtenir une disparition de la résistance, car il reste toujours un résidu de résistance et une réintroduction de l'antimicrobien entraîne un rebond de la résistance qui est parfois assez rapide, aboutissant à une prédominance des souches résistantes (Dutil et al., 2010 ; Saylers et Amàbile-Cuevas, 1997 ; Nowak, 1994).

Les études de prévalence phénotypique et génotypique de la résistance aux antimicrobiens, montrent que des variations spatio-temporelles plus ou moins importantes peuvent être observées (Blanco et al., 1997 ; Kim et al., 2007). Cependant, les variations de prévalence sont aussi liées au statut sanitaire des animaux (Blanco et al., 1997), à l'âge des animaux (Smith et al., 2007), de même qu'au mode de gestion des productions (Smith et al., 2007). Néanmoins, la plupart des études s'accordent sur une

augmentation de la RAM d'*E. coli*. Selon le statut sanitaire des animaux, Blanco et al., 1997 ont observé chez *E. coli* des variations importantes de prévalence de la résistance à l'ampicilline, des variations faibles de prévalence de la résistance à la triméthoprimine et à la triméthoprimine-sulfaméthoxazole, et une absence de variation de prévalence de la résistance à la tétracycline et à la streptomycine (Blanco et al., 1997). Même si ces variations sont les reflets de situations particulières, il est important de noter que plusieurs études s'accordent pour constater que le pourcentage des isolats d'*E.coli* résistants à la tétracycline et à la streptomycine est très élevé dans les élevages aviaires quelque soit le statut sanitaire des animaux et leur provenance. Ainsi, le niveau de résistance à la tétracycline et à la streptomycine des isolats d'*E. coli* s'établit très souvent au-delà des 50% parmi les APEC, et les *E.coli* provenant de volaille malades et en santé (Blanco et al ., 1997 ; Gyles, 2008). Pendant la dernière décennie, on a aussi remarqué l'émergence de certaines RAM comme celle à la quinolone et au ceftiofur (White et al., 2000 ; Blanco et al., 1997, McDonald et al., 2001 ; Dutil et al., 2010)

Tableau I : Classification des antimicrobiens selon leur importance en médecine humaine par la direction des médicaments du Canada

Catégories d'antimicrobiens	Classes d'antimicrobiens
<p>Catégorie I : Très haute importance</p> <p>Antimicrobiens de très haute importance en médecine humaine, ils sont essentiels dans le traitement d'infections graves et il n'y a que très peu ou pas d'antimicrobiens de remplacement en cas d'émergence d'une résistance à ces agents.</p>	<p>Carbapénèmes Céphalosporines - de troisième et quatrième générations Fluoroquinolones Glycopeptides Glycylcyclines Cétolides Lipopeptides Monobactames Nitroimidazoles (métronidazole) Oxazolidinones Pénicillines résistantes aux β-lactamases Polymyxines (colistine) Streptogramines Les antituberculeux (p. ex., éthambutol, isoniazide, pyrazinamide et rifampicine)</p>
<p>Catégorie II: Haute importance</p> <p>Antimicrobiens pouvant être utilisés pour traiter plusieurs types d'infections y compris des infections graves, des médicaments de remplacement sont généralement disponibles. Les bactéries résistantes aux médicaments de cette catégorie sont en général sensibles aux médicaments de la catégorie I</p>	<p>Aminoglycosides (sauf agents topiques) Céphalosporines première et deuxième générations (et céphamycines) Acide fusidique Lincosamides Macrolides Pénicillines Quinolones (sauf fluoroquinolones) Triméthoprim/sulfaméthoxazole</p>
<p>Catégorie III: Moyenne importance</p> <p>Antimicrobiens utilisés pour le traitement des infections pour lesquelles des médicaments de remplacement sont généralement disponibles. Les infections causées par des bactéries résistantes à ces médicaments peuvent, en général, être traitées à l'aide d'antimicrobiens de catégorie I ou II.</p>	<p>Aminocyclitols Aminoglycosides (agents topiques) Bacitracines Fosfomycine Nitrofuranes Phénicols Sulfonamide Tétracyclines Triméthoprim</p>
<p>Catégorie IV: Faible importance</p> <p>Antimicrobiens non-utilisés en médecine humaine</p>	<p>Flavophospholipols Ionophores</p>

4.1. Utilisation des antimicrobiens en production aviaire

On distingue 3 usages principaux des antimicrobiens dans la production aviaire. Les antimicrobiens sont utilisés comme agents thérapeutiques, prophylactiques et promoteurs de croissance. En tant que promoteurs de croissance les antimicrobiens sont incorporés directement dans les aliments pour animaux. Dans le rapport du Comité consultatif sur l'utilisation d'antimicrobiens chez les animaux et les conséquences pour la résistance et la santé humaine en 2002 au Canada, on distinguait plus d'une dizaine d'antimicrobiens utilisés dans les aliments pour animaux (chlortétracycline, bacitracine, lincomycine, novobiocine, spectinomycine, pénicilline, phosphate de tylosine, virginiamicine, érythromycine, bambermycine, oxytétracycline, néomycine, tiamuline tilmicosine, sulfadimidine)(<http://www.bape.gouv.qc.ca/sections/mandats/prod-porcine/documents/SANTE25-1.pdf>). Un certain nombre de ces antimicrobiens sont particulièrement utilisés chez la volaille (Tableau II). Jones and Rickes 2003 rapportèrent que 32 antimicrobiens étaient approuvés au États-Unis pour être utilisés dans l'alimentation du poulet à griller sans prescription médicale (Jones and Rickes, 2003). L'usage des antimicrobiens comme promoteurs de croissance et dans la prophylaxie sont les deux principales sources de controverse (Jones and Rickes, 2003; Castanon 2007; Dutil et al., 2010). L'effet des antimicrobiens sur la croissance des animaux a été découvert dans les années 40, depuis ce temps l'utilisation des antimicrobiens comme promoteurs de croissance a été admise aussi bien en Europe qu'en Amérique du Nord (Castanon 2007; Jones and Ricke, 2003; Bywater 2005). L'effet des antimicrobiens sur la croissance est liée à leur interaction avec la flore microbienne intestinale (Dibner and Richards, 2005; Niewold, 2007). La Suède a été pionnier dans le bannissement des antimicrobiens comme promoteurs de croissance ensuite plusieurs pays européens ont suivi. L'utilisation des antimicrobiens comme promoteurs de croissance a été banni définitivement en janvier 2006 dans l'Union européenne grâce une directive de 2003 (Catanon 2007; Bywater 2005). Le bannissement des antimicrobiens comme stimulateur de croissance a eu comme conséquence une diminution générale de l'utilisation des antimicrobiens en élevage aviaire mais une augmentation de l'usage thérapeutique (Bywater 2005; Castanon 2007; Miranda et al., 2008).

Tableau II : Antimicrobiens homologués aux fins d'utilisation chez la volaille au Canada

Catégories d'antimicrobiens et médicament antimicrobien	Homologués pour la volaille		
	Thérapie	Promoteur de croissance	Prophylaxie
Aminoglycosides			
Gentamicine			Pou, D (1 jours)
Néomycine			PG, PP, D
Spectinomycine			PG
Céphalosporine			
Ceftiofur			D (1 jour)
Lincosamides			
Chlorhydrate de lyncomycine			Ca, D
Macrolides			
Érythromycine		PG	Pou, D
Tylosine	Pou		Pou
Pénicilline			
Pénicilline G potassique		Pou, PG, D	D
Pénicilline G procaïne		Pou, D	D
Streptogramine			
Virginiamycine			PG
Tétracycline			
Chlortétracycline	Pou, D	Pou, D	Pou, D
Oxytétracycline	Pou, D	Pou, D	Pou, D
Chlorhydrate de tétracycline	Pou, D		Pou, D
Ionophores			
Lasalocide sodique			Pou (coccidiose)
Maduramicine			Pou, D (coccidiose)
Monensin			Pou, D (coccidiose)
Narasin			Pou (coccidiose)
Salinomycine sodique			Pou (coccidiose)
Médicaments divers			
Sulfaméthazine	Pou, Ca, D		
Acide arsanilique	PG, D		
Bacitracine	Pou, D	PG	
Bambermycine	PG, D		

Pou : Poulet, PG : Poulet à griller, PP : Poule pondeuse, D : Dindon, Ca : Canard

<http://www.bape.gouv.qc.ca/sections/mandats/prod-porcine/documents/SANTE25-1.pdf>

4.2. Résistance des souches d'*E. coli* aux antimicrobiens de catégorie I

4.2.1. Exemple du ceftiofur

La résistance au ceftiofur est une problématique importante en Amérique du nord depuis son émergence parmi les souches de *Salmonella* et d'*E. coli*. Cette problématique est d'autant plus inquiétante que le ceftiofur qui est une céphalosporine de troisième génération et apparentée aux céphalosporines utilisées dans des traitements de dernier recours chez les humains, a aussi été utilisée comme traitement prophylactique au Canada dans les couvoirs chez le poulet (Dutil et al., 2010). D'autre part, Donaldson et al., 2006 ; ont montré que tous les isolats d' *E. coli* résistants au ceftiofur étaient aussi résistants à l'ampicilline, et que plus de 90% des isolats résistants au ceftiofur sont aussi résistants à au moins un des antimicrobiens suivant: florfénicol, tétracycline, ticarcilline et ticarcilline-acide clavulanique, chloramphénicol (Donaldson et al., 2006).

Récemment, une diminution de la résistance au ceftiofur chez *Salmonella* Heidelberg et *E. coli* a été observée suite à l'abandon de son utilisation dans les couvoirs (Dutil et al 2010). Par contre, la réintroduction du ceftiofur a été suivie d'une nouvelle augmentation de la résistance au ceftiofur des bactéries de ces mêmes espèces. Cependant, très peu d'études ont évalué la présence des gènes de résistance au ceftiofur dans la microflore caecale de la volaille. En Amérique du Nord, le principal gène associé à la résistance du ceftiofur est *bla_{CMY-2}* (Donaldson et al., 2006), qui est souvent porté par un plasmide (Meunier et al., 2010, Fricke et al., 2009), expliquant en partie la multi-résistance des d'*E.coli* résistantes au ceftiofur.

4.2.2. Exemple des fluoroquinolones

La résistance aux fluoroquinolones est considérée comme émergente depuis les années 95, et des niveaux de prévalence inquiétants de la résistance aux quinolones ont été observés quasiment sur tous les continents (White et al., 2000 ; Blanco et al., 1997 ; McDonald et al 2001., Lautenbach et al., 2004). Le mécanisme de résistance aux quinolones chez les bactéries Gram-négatives s'explique d'une part par des mutations chromosomiques qui réduisent la perméabilité de la membrane et diminuent l'accumulation des quinolones dans la cellule bactérienne, et d'autre part par l'altération

de la topoisomérase. Cependant la résistance à la fluoroquinolone des souches d'*E. coli* est plus souvent associée à la mutation qui touche des acides aminés des sous-unité A B ((*gyrA*) (*gyrB*)) de l'ADN gyrase et de la sous-unité (*parC*) de la topoisomérase. La résistance à la quinolone est aussi expliquée par l'acquisition de plasmides de résistance appelés mediated quinolone resistance (PMQR). Ils qui portent un des gènes suivants: *qnr*, *qepA*, et *aac(6')-Ib-cr* (Poirel et al., 2008 ; Carottoli, 2009).

Malgré l'émergence de la résistance, les fluoroquinolones font partie des classes d'antibiotiques présentant une excellente activité contre les bacilles Gram-négatifs. Mais, leur utilisation en production aviaire est considérée par certains scientifiques comme inappropriée du fait des résistances croisées avec les fluoroquinolones utilisées en médecine humaine comme traitements de dernier recours (Talan et al., 2008). En effet, on observe une émergence de résistance aux fluoroquinolones qui concerne aussi bien les souches d'*E.coli* aviaires que les ExPEC humains (White et al., 2000 ; Lautenbach et al., 2004) et souvent plus que les autres entérobactéries (Lautenbach et al., 2004). La résistance à certaines fluoroquinolones peut être assez importante parmi les isolats d'*E. coli* associés à des cas cliniques, atteignant une prévalence de 30-40 % de souches résistantes (White et al., 2000).

4.3. Résistance des souches d'*Escherichia coli* aux antimicrobiens de catégorie II

4.3.1. Exemple des pénicillines

La résistance aux pénicillines est généralement assez élevée, aussi bien parmi les souches d'*E. coli* aviaires que parmi des souches non aviaires (Guerra et al., 2003; Smith et al., 2007; Kim et al., 2007; Bass et al., 1999). Chez la volaille, des variations de prévalence peuvent être assez importantes allant de 5% en Suède, à 71% en Iran (Gyles, 2008). Avant les années 80 la résistance associée aux β -lactamases chez les entérobactéries était expliquée surtout par la présence des gènes *bla*_{TEM-1}, *bla*_{TEM-2} et *bla*_{SVH-1}. L'introduction de nouvelles classes de β -lactames a été rapidement suivie par l'émergence de β -lactamases à large spectre (ESBLs). Depuis les années 90, un autre groupe de β -lactamases, Inhibitor-resistant TEMs (IRT) a été détecté chez les *E. coli*. En général, les enzymes de type TEM et OXA-1 sont les principales β -lactamases codées par des gènes

plasmidiques les plus fréquemment impliqués dans la résistance aux pénicillines. Le gène *bla*_{TEM} est étroitement associé à trois différents transposons (*tn1*, *tn2*, *tn3*) (Bailey et al., 2011 ; Hedges et al., 1974; Heffron et al., 1975; Kopecko et al., 1975). Les 2 derniers transposons codent de la même manière pour les protéines TEM-1 mais leurs séquences diffèrent de 3 nucléotides. TEM-2 diffère de TEM-1 par un seul acide aminé, et la variante de *bla*_{TEM-2} trouvée sur *tn1* diffère de *bla*_{TEM-1} par 5 ou 6 nucléotides (Bailey et al., 2011 ; Chen et al., 1987; Goussard et al., 1991).

4.3.2. Exemple du triméthoprim /sulfaméthoxazole (TMP-SMX)

Le TMP est un antimicrobien synthétique utilisé en médecine humaine et vétérinaire contre un large spectre de bactéries comprenant *E. coli* et les autres entérobactéries. De plus, la combinaison avec les sulfonamides augmente son efficacité. Une proportion assez importante d'*E. coli* intestinaux chez les animaux est naturellement susceptible aux triméthoprim-sulfonamides (TMP-S). Cependant, l'utilisation de l'antimicrobien dans l'alimentation animale de même que son utilisation de façon incontrôlée en médecine humaine pendant un temps prolongé peut entraîner le développement et la transmission de cette résistance. Uniquement chez les patients humains avec une pyélonéphrite sans complication, le taux d'*E. coli* résistants aux TMP-SMX peut atteindre 24% avec des variations importantes allant de 13- 45% selon les groupes de patients (Talan et al., 2008). En dépit des taux de résistance d'*E. coli* aux TMP-SMX parfois élevés et inquiétants, ces derniers continuent d'être utilisés plutôt de façon sélective en Amérique du Nord dans les traitements des cas de cystites sans complication chez des patients sans risques associés de résistance d'*E. coli* aux TMP-SMX (Wright et al., 1999 ; Talan et al., 2008).

Dans plusieurs régions des États-Unis, le taux de souches UPEC résistants aux TMP-SMX est supérieur à 20%, atteignant 50% dans certains endroits (Solberg et al., 2006 ; Karlowsky et al., 2003). Les *E. coli* résistants aux TMP-SMX sont plus souvent isolés dans des infections urinaires chez la femme. L'intégron de classe 1 est trouvé dans environ 70% des souches d'*E. coli* résistantes aux TMP-SMX (Solberg et al., 2006; Yu et al., 2001). De plus, les intégrons de classe 1 contiennent un gène indépendant *sul* qui code pour la résistance aux sulfonamides. Chez *E. coli*, la cassette qui code pour la résistance aux TMP-

SMX appartient à la famille d'enzyme des dihydrofolates réductase (*dfr*) possédant plus de 15 variantes alléliques dont *dfr17* est l'une des plus importantes. En effet, cette variante allélique serait associée à l'augmentation de la prévalence de la résistance des UPEC au TMP-SMX (Yu et al., 2004).

4.4. Résistance des souches d'*Escherichia coli* aux antimicrobiens de catégorie III

4.4.1. Exemple des tétracyclines

La tétracycline est un des antimicrobiens les plus largement utilisés en production animale. L'utilisation clinique de la tétracycline a débuté à la fin des années 40, et par la suite il a été découvert que cet agent antimicrobien favorisait aussi la croissance des poussins. Très rapidement, la résistance à la tétracycline de certaines bactéries a été constatée (Chopra and Robert, 2001). De très fortes prévalences de la résistance des souches d' *E. coli* vis-à-vis de la tétracycline sont rapportées chez la plupart des espèces d'élevage (Maynard et al., 2003 ; Boerlin et al., 2005 ; Blanco et al ., 1997 ; Gyles, 2008). La prévalence des souches résistantes à la tétracycline parmi les APEC dépasse parfois les 80% dans plusieurs études (Blanco et al ., 1997, Gyles, 2008). La résistance à la tétracycline est codée par plus d'une trentaine de gènes différents mais les plus courant sont compris entre *tetA*, *tetB*, *tetC*, *tetD* et *tetE* (Smith et al ., 2007)

4.4.2. Exemple de la streptomycine

Bien que la prévalence de la résistance à la streptomycine des souches d' *E coli* puisse être variable suivant les pays et les conditions d'élevage, les taux rapportées sont généralement très élevés quelles que soient les espèces animales (Maynard et al., 2003 Boerlin et al., 2005 ; Blanco et al ., 1997, Gyles, 2008). La prévalence des souches résistantes à la streptomycine est encore plus élevée quand il s'agit des souches APEC, dépassant les 80% (Blanco et al ., 1997, Gyles, 2008). Parmi les souches d'*E. coli*, les principaux gènes qui codent pour la résistance à la streptomycine sont *strA*, *strB* et *aadA*. Ces gènes codent aussi pour la résistance à la spectinomycine. En outre, une attention particulière est souvent accordée à la présence du gène *aadA* qui est associé à l'intégron 1 chez les souches d'*E. coli* (Boerlin et al.,2005 ; Barlow et al.,2004), et l'intégron 1 est

responsable en partie de la multi-résistance chez les *Escherichia coli* et les autres entérobactéries.

5. La multi-résistance aux antimicrobiens chez les *E. coli* et autres entérobactéries

5.1. Le rôle des principaux éléments génétiques impliqués dans la multi-résistance bactériennes aux antimicrobiens

Les plasmides, les transposons, et les intégrons sont les principaux supports génétiques qui expliquent la multi-résistance. Les plasmides autotransmissibles sont des éléments génétiques circulaires qui portent des gènes nécessaires pour le transfert de l'ADN par conjugaison, ainsi ils peuvent contribuer à la mobilisation d'autres éléments génétiques qui portent des gènes de résistance (Salyers and Amabile-Cuevas, 1997; Carottoli, 2009 ; Chopra and Roberts, 2001). Les plasmides de résistance aux antibiotiques des *E. coli* expliquent une grande partie des multi-résistances chez *E. coli*. Un nombre très élevé de plasmides codant pour des résistances multiples sont rencontrés chez les entérobactéries, et l'émergence de nouvelles multi-résistances est favorisée par la mobilité des plasmides entre les différentes espèces d'entérobactéries (Carottoli, 2009 ; Chopra and Roberts, 2001). Les plasmides peuvent être regroupés en familles, dont les principales rencontrées chez des entérobactéries sont: repF, rep11, repN, repHI2, repA/C, repL/M (Carottoli, 2009).

5.2. Multi-résistance associée à la production de β -lactamases ESBLs de type CTX-M

Les ESBLs sont des enzymes qui dégradent les oxyimino-cephalosporines tel que le cefotaxime et ceftazidime. Les entérobactéries, en particulier *E. coli* qui produisent des β -lactamases à large spectre (ESBLs) telles que CTX-M sont devenues un problème majeur à travers le monde, car elles sont associées à des épidémies et à des infections sévères (Carottoli, 2009 ; Warren et al., 2008). On distingue au moins 50 variants de CTX-M distribués à travers le monde. On rencontre plus fréquemment CTX-M2 en Amérique du Sud, en Israël et au Japon, CTX-M-14 en Chine et CTX-M-9/14 en Espagne. Depuis peu, on assiste à une dissémination pandémique de CTX-M-15 (Leflon-Guibout et al., 2008 ; Warren et al., 2008). Tous les isolats d'*E. coli* sérotype O25, du phylogroupe B2 isolés en

Angleterre ont été associés à la production de CTX-M-15, en plus d'être résistants aux quinolones (Warren et al., 2008). Le poulet serait un réservoir d'isolats d'*E. coli* multi-résistants ESBLs. En effet, 40% des carcasses de poulets provenant du Brésil portent des *E. coli* produisant le CTX-M-2, l'enzyme fréquemment associé aux *E. coli* dans les infections humaines en Amérique du Sud (Warren et al., 2008). Par contre, en Europe, CTX-M-15, l'enzyme le plus fréquemment rencontré chez les *E. coli* provenant des carcasses de poulet est peu associé aux souches d'*E. coli* provenant d'infections humaines. (Warren et al., 2008). Les ESBLs ont connu une dissémination entre les espèces bactériennes à partir des plasmides qui portent des gènes de résistance multiples. Par exemple, *bla*_{CTX-M-15} est souvent associé aux gènes de résistances *bla*_{TEM-1}, *bla*_{OXA-1} et *aac(6')-Ibr-cr* sur les plasmides IncF (Carottoli, 2009).

5.3. Multi-résistance associée à la production de β -lactamases de type AmpC

La famille des β -lactamases AmpC confère de la résistance aux, céphalosporines, pénicillines et monobactames. On les retrouve chez les *E. coli*, *Citrobacter* et autres *Enterobacteriaceae* (Mataseje et al; 2010; Carottoli, 2009). La dissémination de gènes qui codent pour CMY et AmpC provenant originairement du chromosome de *Citrobacter freundii* a été associée à des familles de plasmides spécifiques. Ces gènes sont récurrents chez des isolats de source animale. La majorité des plasmides qui possèdent le *bla*_{CMY-2} chez *E. coli* et *Salmonella spp* aux Etats Unis appartiennent au groupe IncA/C (Carottoli, 2009). Une comparaison des plasmides CMY-2, d'origine animale, environnementale et humaine provenant de différentes provinces canadiennes a montré une prédominance des plasmides de type rep11, K/B, et plus particulièrement des plasmides type A/C qui seraient les déterminants de multi-résistances antimicrobiennes les plus fréquents. Cette étude a également montré une grande similarité entre les plasmides CMY-2 provenant d'*E. coli* et *Salmonella* de différentes origines (Mataseje et al; 2010).

5.4. La multi-résistance associée à la production de carbapénemases

Les carbapénemases hydrolysent la plupart des β -lactames y compris les carbapénèmes et sont classées en 4 classes de molécules, les classes A et B étant les plus fréquentes. Les carbapénemases de la classe A sont chromosomiques à l'exception de l'enzyme KPC

retrouvée chez les *Enterobacteriaceae* et rarement chez *Pseudomonas aeruginosa* (Carottoli, 2009). Les carbapénémases de la classe B sont les plus prévalentes dans les cas cliniques. Ce sont des métallo- β -lactamases (MBLs), dont la majorité fait partie de la série des IMP (one of the metallo- β -lactamases) et des VIM (Verona integron-encoded metallo- β -lactamase). Ils ont été disséminés à travers le monde par des intégrons et des plasmides, et ils hydrolysent tous les β -lactames à l'exception de l'aztreonam (Poirel et al., 2007). Cependant, les gènes qui codent pour les MBLs ont rarement été identifiés chez les entérobactéries. Le *bla_{IMP-4}* a été identifié en Australie, où il a été associé aux plasmides IncL/M et IncA/C. L'enzyme VIM a été trouvée essentiellement chez des bactéries à Gram négatifs non fermentaires, et le nombre d'*Enterobacteriaceae* produisant cet enzyme est en augmentation, même si les isolats VIM-positifs ont été détectés souvent de façon sporadique et ne sont pas reliés entre eux de façon clonale. Le gène *bla_{VIM-1}* a été trouvé sur des plasmides des groupes IncI1 et IncH12 (Carottoli, 2009).

5.5. Multi-résistance aux quinolones et/ou aux aminoglycosides, associée à la présence des gènes *qnr* et des gènes des méthylases 16SrRNA.

La résistance aux quinolones chez les *Enterobacteriaceae* est en général le résultat d'une mutation chromosomique, entraînant une altération de l'enzyme cible ou une accumulation de l'antimicrobien. Cependant, il a été rapporté également une résistance aux quinolones d'origine plasmidique, ou «plasmid-mediated quinolone resistance» (PMQR), qui s'explique par une acquisition des gènes *qnr*, *qepA*, et *aac(6')-Ib-cr* (Poirel et al., 2008 ; Carottoli, 2009). Le PMQR est fréquemment associé à la présence des gènes de résistance aux ESBLs et/ou aux aminoglycosides sur le même plasmide. Une résistance aux aminoglycosides associée à la production de méthylase 16SrRNA est observée de plus en plus fréquemment chez les pathogènes Gram-négatifs (Carottoli, 2009).

6. Association entre la virulence et la résistance aux antimicrobiens des souches d'*E. coli*

6.1. Associations statistiques

De façon générale, les études précédentes rapportent une prévalence de souches d'*E. coli* résistants aux antimicrobiens moins importante parmi les souches virulentes que parmi

les souches commensales (Johnson et al., 1987; Johnson et al., 2002; Johnson et al., 2003; Boerlin et al., 2005; Moreno et al., 2006; Bonnet et al., 2009). Cependant très peu d'études concernant spécifiquement le degré d'association entre la présence des gènes de virulence et des gènes de résistance aux antimicrobiens chez les APEC. Parmi les souches intestinales d'*E. coli*, Johnson et al., 2003 ont rapporté une prévalence très élevée de résistance vis-à-vis des fluoroquinolones et de la cephamicine, respectivement 100% et 95%. Par contre, parmi les souches ExPEC, la prévalence de la résistance aux fluoroquinolones et à la cephamicine est plus faible (33%) et (27%). Ceci corrobore les études précédentes qui rapportent que les *E. coli* associés aux uropathésies sont en général pourvus du fimbriae P et plus susceptibles aux antimicrobiens (Johnson et al., 1987). Il a été rapporté d'autre part que les *E. coli* résistants aux quinolones, et aux TMP-SMX sont moins virulents (Moreno et al., 2006). En effet, ces auteurs démontrèrent que les facteurs de virulence ExPEC étaient moins fréquents parmi les souches résistantes aux fluoroquinolones (3.9 facteurs par souche), aux quinolones (5.2 facteurs par souche), et aux TMP-SMX (6.4 facteurs par souche) comparés à des souches susceptibles à ces antimicrobiens (7.9, 8.6 et 7.9 facteurs par souche respectivement) (Moreno et al., 2006). Les gènes de virulence des ExPEC (*papA*, *papEF*, *papG*, *sfa/focDE*, *focG*, *hlyD*, *cnf1*, *iroN*, *fyuA*, *ireA*, *iutA*, *ompT*, *malX*, *kpsM*) ont également été tous négativement associés à la résistance aux fluoroquinolones (Johnson et al., 2003). Cependant, il n'existe pas d'explication claire à ce phénomène, et la relation entre la résistance aux antimicrobiens et la virulence chez les *E. coli* est assez complexe et pourrait varier selon le groupe colonal (Manges et al., 2001). Une association négative entre la virulence et la résistance pourrait également être le résultat de la perte de plasmides de virulence au profit de plasmides de résistance aux antimicrobiens, ou par un phénomène de déplacement ou de pression sélective après des traitements antimicrobiens. En effet, l'utilisation d'antimicrobiens entraînerait l'élimination des bactéries susceptibles à ces antimicrobiens au niveau intestinal, mais considérant le nombre très élevé d'*E. coli* commensaux par rapport aux pathogènes dans le tube digestif, la probabilité d'une réémergence de souches résistantes parmi le reliquat de commensaux est plus élevée que celui des pathogènes qui sont naturellement moins nombreux dans l'intestin (Moreno et al., 2006).

6.2. Associations génétiques

L'association génétique entre les gènes de virulence et de résistance aux antimicrobiens et leur diffusion peut être assurée par la coexistence de différents éléments génétiques mobiles tels que les plasmides, les intégrons, les transposons (Saylers and Amabile-Cuevas ; 1997 ; Mellata et al., 2010 ; Fricke et al., 2009). Les plasmides jouent un rôle particulièrement important, comme les plasmides pTJ100 et pCVM29188-146 qui codent en même temps pour la résistance aux antimicrobiens et la virulence chez les APEC (Fricke et al., 2009 ; Johnson et al., 2004). L'analyse d'une région de 30kb du plasmide pTJ100 (Figure 3) révèle une mosaïque de gènes de virulence et une cassette de résistance aux antimicrobiens comprenant des désinfectants, des antibiotiques, et des métaux lourds. On trouve particulièrement les gènes de virulence *iss*, *tsh*, et *iucC*; aussi bien qu'un gène qui code pour les métaux lourds (*silP*), un gène de résistance à la tétracycline (*tetA*), un gène de résistance des β -lactames (*bla*), deux transposons *Tn21* et *Tn3*, une région *Tn21-like* qui comprend entre autre l'intégron de classe 1 (*In2*), et autres gènes de résistance aux antimicrobiens (*aadB*, *catB3*, *qacE Δ 1* et *sulI*)(Johnson et al., 2004). Au total on suspecte pTJ100 de coder pour la résistance à 8 antimicrobiens différents. De plus pTJ100 serait également la plus longue séquence contigüe au plasmide ColV (Johnson et al., 2004).

Le plasmide pCVM29188-146 (Figure 4) porte des gènes de virulence de même que les gènes de résistance aux antimicrobiens *strAB* et *tetAR*, qui codent respectivement pour les aminoglycosides et les tétracyclines. Ce plasmide a été isolé la première fois chez *Salmonella kentucky*, et est transférable chez *E. coli*. L'analyse comparative des plasmides montre que pCVM29188-146 possède 90% d'identité nucléotidique avec les plasmides pAPEC1, pAPEC-O1-ColBM et pAPEC-O2-ColV provenant de souches d'*E. coli* pathogènes chez le poulet (Figure 2). Ces 4 plasmides possèdent en commun des gènes de virulence tel que *iutA*, *iucABCD*, *iroBCDEN*, *etsABC*, *sitABCD*, et *OmpT'* (Figure 1, 4).

La coexistence de plusieurs plasmides chez une même souche APEC et la transférabilité conjointe de plusieurs plasmides chez les *E. coli*, ont été aussi rapportées (Mellata et al., 2010 ; Fricke et al., 2009). Ces phénomènes pourraient aussi expliquer en partie certaines associations entre gènes de résistance aux antimicrobiens et gènes de virulence.

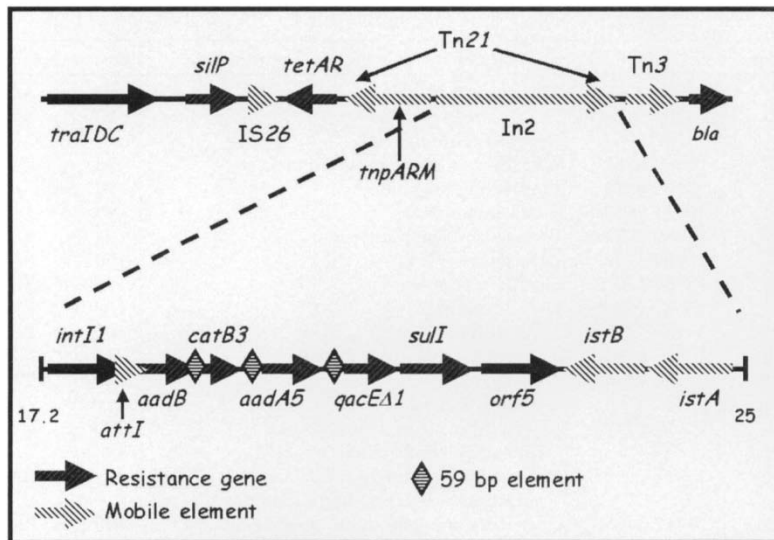


Figure 3 : ORFs majeurs dans une région de 30 kpb dans pTJ100, un plasmide putatif de virulence qui codent également pour la résistance à 8 antimicrobiens (Johnson et al; 2004)

aadA4: Résistance à la streptomycine / spectinomycine

aadB: Résistance aux aminoglycosides

bla: Résistance aux beta-lactames

catB3: Résistance au chloramphenicol

qacEΔ1: Résistance à l'ammonium quaternaire

silP: Résistance aux métaux lourds

sul: Résistance aux sulfonamides

tetA: Résistance aux tétracyclines

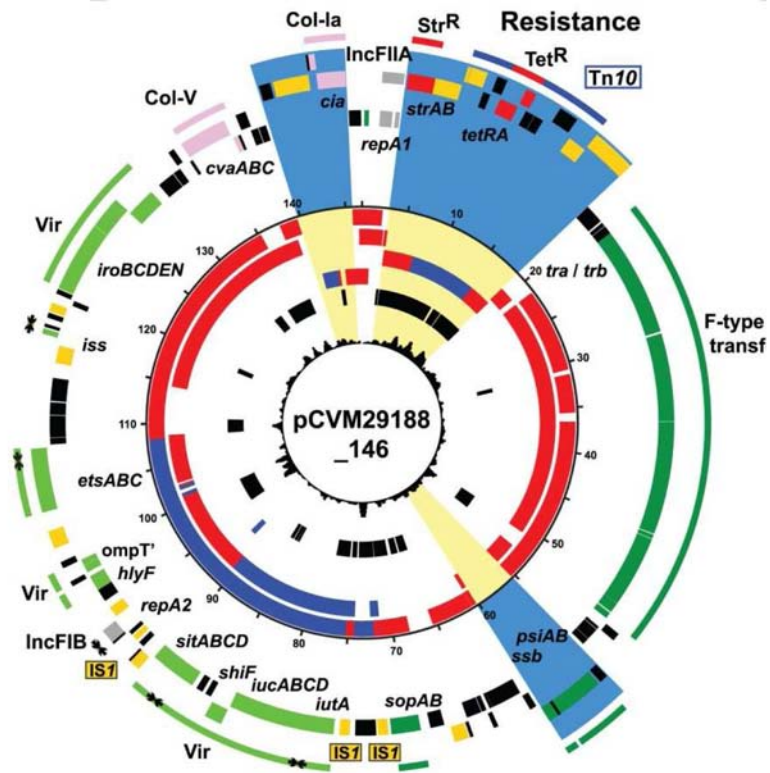


Figure 4 : Plasmide de virulence pCVM29188_146 provenant de *Salmonella*, portant des gènes de résistance aux antimicrobiens (*strAB*, *tetAR*) et génétiquement proche des plasmides de virulence pAPEC1, pAPEC-O1-ColBM et pAPEC-O2-ColV provenant de souches d'*E. coli* pathogènes chez le poulet. (Fricke et al ; 2009)

7. Effet des additifs alimentaires sur les pathogènes de l'intestin de la volaille

7.1. Généralités sur les additifs alimentaires

Les additifs alimentaires comme les prébiotiques, les probiotiques, les acides organiques sont de plus en plus utilisés dans la production animale, notamment dans les élevages porcins et aviaires. Un des objectifs de leur utilisation croissante est de pallier les restrictions d'utilisation des antibiotiques tout en maintenant un bon niveau de productivité. Cependant, on peut dire que l'utilisation des additifs alimentaires fait partie des pratiques d'élevage depuis longtemps. Les additifs alimentaires sont connus pour augmenter la digestibilité et la palatabilité des aliments, la conversion alimentaire, ainsi que la croissance des animaux comme le porc et le poulet. Certains additifs seraient également efficaces pour contrôler des pathogènes, et quelques études ont abordé ce sujet.

7.2. Effet des acides organiques

La première utilisation des acides organiques était basée tout d'abord sur leur activité antimicrobienne en dehors du tube digestif. En effet, les acides organiques ont parfois été utilisés comme additifs dans l'alimentation humaine et aussi pour la décontamination des carcasses (Cherrington et al., 1991; Patterson and Burkholder, 2003). Par la suite, les acides organiques, particulièrement ceux à courte chaîne (short chain fatty acids (SCFA)) et à chaîne moyenne (medium chain fatty acids (MCFA)) ont été incorporés dans l'alimentation animale, comme antifongique (Ricke, 2003), et pour leur potentiel bactéricide contre des pathogènes, en particulier *Salmonella spp.* (Humphrey and Lanning, 1988; Izat et al., 1990; Berchieri and Barrow, 1996; Thompson and Hinton, 1997). L'hypothèse la plus avancée pour expliquer l'inhibition de la croissance bactérienne par les acides est le passage des acides non dissociés à travers la membrane cellulaire et leur dissociation dans l'environnement plus alcalin du cytoplasme entraînant une acidification (Kashket et al., 1987 ; Van Immerseel et al., 2006). Le pH semble donc être l'élément déterminant et primaire des effets des acides organiques parce que, le pH affecte la concentration de l'acide non dissocié (Davidson, 2001). En effet, on considère que des bactéries comme *E. coli* maintiennent un environnement intracellulaire légèrement alcalin

(Padan et al., 1981). L'acide organique sous forme non dissociée peut facilement pénétrer la membrane lipidique des bactéries. Une fois internalisé, le pH neutre du cytoplasme cellulaire dissocie l'acide en anion et proton et l'exportation de l'excès de protons requiert une consommation d'adénosine triphosphate (ATP), provoquant ainsi une perte d'énergie cellulaire (Eklund, 1983 ; Salmond et al., 1984; Cherrington et al., 1990; Davidson, 2001). L'effet des acides organiques est cependant très variable sur différentes souches d'une même espèce bactérienne. Une étude montre qu'une culture continue d'*E. coli* K-12 et O157:H7 diffèrent quant à leur sensibilité à l'acetate à pH 5.9. D'autre part, la capacité d'*E. coli* O157:H7 à tolérer plus d'acide est corrélée avec la capacité à baisser le pH intracellulaire (Diez-Gonzalez and Russel, 1999). En ce qui concerne les bactéries fermentaires, elles possèdent la capacité de baisser le pH intracellulaire quand le pH extracellulaire devient très acide, ce qui permet à la bactérie de garder un gradient pH faible de part et d'autre de la membrane cellulaire qui la protège contre l'accumulation d'anions. Il a été également observé que l'augmentation de la concentration intracellulaire de l'acetate dans l'espace intracellulaire chez *E.coli* K-12, s'accompagne d'une augmentation équivalente de la concentration molaire du potassium intracellulaire, constituant un stress osmotique pour la bactérie.

Les acides organiques à courte chaîne et spécialement le butyrate, à faible dose suppriment l'expression des gènes associés au pouvoir invasif de *Salmonella*. De même les acides organiques de chaîne moyenne et le propionate, contrairement à l'acide acétique, diminue le pouvoir d'invasion des cellules épithéliales de *Salmonella* (Van Immerseel et al., 2006; Durant et al., 2000; Van Immerseel et al., 2004). Les effets des acides organiques sur l'invasion des cellules peuvent être expliqués par des changements concernant l'expression du SPI-1. Durant et al., 2000 ont mesuré l'expression de *hilA* et *invF* (activateurs majeurs de SPI-1) chez *Salmonella* Typhimurium après exposition à l'acetate, au butyrate et au propionate à pH=6. Ils observèrent une augmentation de l'expression des gènes *hilA* et *invF* en présence de l'acetate mais pas en présence du butyrate et du propionate (Van Immerseel et al., 2006; Durant et al., 2000)

D'autres mécanismes comme une activité moins directement antibactérienne ont été également attribués aux acides organiques. Il s'agit de mécanismes d'interférence avec le

transport des nutriments, de dommage de la membrane cytoplasmique, de perte de perméabilité de la membrane externe, et d'influence sur la synthèse des macromolécules (Cherrington et al., 1991; Davidson, 2001). Ainsi, le mécanisme antibactérien des acides organiques pourrait consister en un mécanisme bactériostatique ou bactéricide, en fonction du stade physiologique des bactéries et des caractéristiques physico chimique externe.

L'activité antibactérienne des acides organiques serait très variable en fonction de leur type ou composé chimique. Le MIC de l'acide acétique, butyrique, lactique, et caprylique sur *E. coli* est moins de 4g/l, mais la même bactérie est 10 fois plus résistante à l'acide malique, tartarique et citrique (Van Immerseel et al., 2006., Hsiao and Siebert, 1999). D'autre part les acides organiques à chaîne moyenne (C6-C12) comme l'acide caproïque, l'acide caprylique, l'acide caprique et l'acide laurique ont plus d'effet sur *Salmonella* comparativement aux acides à courte chaîne (acide formique, acide acétique, acide propionique et acide butyrique)(Van Immerseel et al., 2006). Les acides C6-C10, à faible concentration (25mM) ont un effet bactériostatique sur *Salmonella Enteritidis*. Cependant la même souche tolère des concentrations de 100mM des acides à courte chaîne. De plus, Sprong et al., 2001 rapportent que l'acide caprylique et l'acide caprique sont bactéricide alors que C14 :0, C18 :1 et C18 :2 ne le sont pas (Sprong et al, 2001). Ceci suppose que des facteurs comme la longueur des chaînes, la composition des extrémités des chaînes, le pKa, l'hydrophobicité pourraient affecter l'activité antimicrobienne. Toutefois, plusieurs phénomènes pourraient être impliqués en même temps.

7.3. Effet des prébiotiques

Les prébiotiques sont définis comme des substances alimentaires non digestibles par l'hôte qui lui procurent des effets bénéfiques par une stimulation sélective de la croissance et de l'activité d'un nombre limité d'espèces bactériennes dans le colon (Gibson et Roberfroid, 1995). Cette définition est donc fondée sur le fait que certaines bactéries comme *Bifidobacterium* et *Lactobacillus* ont des effets bénéfiques sur la santé de l'hôte. Les bactéries de ces espèces, quand elles sont administrées directement dans l'alimentation, sont considérées comme des probiotiques. Les prébiotiques sont, en général, des carbohydrates qui sont classés en mono, di, oligo et polysaccharides (Tableau

III). Certains monosaccharides comme le glucose et le fructose, sont digestibles et ne sont pas considérés comme des prébiotiques. La production des prébiotiques se fait de différentes manières, principalement par hydrolyse acide ou enzymatique des polysaccharides ; par synthèse, en utilisant des réactions de transglycosylation ; par extraction à partir des plantes ; par fermentation bactérienne (*Leuconostoc*, *Streptococcus*); et par restriction de la taille du polymère suite à l'addition de maltose (Chung et Day, 2002 ; Guo et al., 2004; Cummings and Macfarlane, 2002). Des prébiotiques de différents sources ont souvent été utilisés comme additifs alimentaires chez des animaux et ont été associés à une activité antiparasitaire, antimicrobienne, antivirale, à une stimulation de l'immunité et une réduction du stress (Yuan et al., 1993 ; Guo et al., 2004). De même, une modification de la flore du colon, chez plusieurs espèces animales et spécifiquement au niveau du caecum du poulet, a été associée à l'utilisation des prébiotiques (Bailey et al. 1991). Cette modification de la flore est rapportée particulièrement comme étant une augmentation de la croissance des bactéries lactiques, qui ont un effet sur la capacité de résistance aux infections de l'hôte (Kim et al., 2011 ; Iji and Tivey , 1999 ; Terada et al ., 1994 ; Chung and Day , 2002 ; Chung and Day , 2004). La modification de la flore du caecum concerne également *Salmonella* et *E. coli* qui sont des agents pathogènes pouvant être portés de façon asymptomatiquement chez les animaux. Une diminution de la croissance de *Salmonella* est largement rapportée dans la littérature, et quelques études mentionnent aussi une diminution de la croissance d'*E. coli* dans la flore caecale des poulets qui reçoivent des prébiotiques (Kim et al ., 2011; Iji and Tivey , 1999 ; Terada et al ., 1994 ; Chung and Day , 2002 ; Chung and Day , 2004). Par exemple, en présence d'isomaltooligosaccharides (IMO) et de fructooligosaccharides (FOS), la croissance in vitro de *S. Typhimurium* et *E. coli* est diminuée de 37% et 35% respectivement par rapport à un milieu témoin contenant du glucose (Chung and Day , 2004). Un des principaux avantages des prébiotiques est en effet en une augmentation simultanée des bactéries bénéfiques et une diminution des pathogènes particulièrement *Salmonella* (Corrier et al., 1993 ; Iji and Tivey , 1999 ; Terada et al ., 1994 ; Chung et Day , 2004 ; Roberfroid et al., 1998, Bailey et al 1991 ; Fukata et al 1999 ; Chung and Day , 2004). Ce phénomène de modification de la flore caecale est expliqué par le fait que

certaines prébiotiques comme le lactose et l'IMO sont utilisés par certaines bactéries bénéfiques comme *Bifidobacterium* et *Lactobacillus* contrairement aux pathogènes tels que *Salmonella* ou *E. coli* (Chung and Day, 2004 ; Chung and Day, 2002).

Tableau III : Principaux prébiotiques utilisés en production aviaires

Groupes d'oligosaccharides	Description et effets du prébiotique	Référence bibliographique
Monosaccharide	Le mannose est le monosaccharide le plus utilisé comme additif alimentaire. Le mannose est un ligand du fimbriae de type 1, communément trouvé chez des bactéries pathogènes comme <i>Salmonella</i> et les APEC. Un supplément de 1 à 2 % de mannose dans l'alimentation réduirait la colonisation de <i>Salmonella</i> , en bloquant l'adhésion de la bactérie aux cellules épithéliales.	Allen et al., 1997 ; Doyle and Erickson,2006
Disaccharides	Le Lactose : Glucide du lait, procure une protection contre <i>Salmonella</i> chez le poulet qui ne dispose pas d'enzyme pour la digestion du lactose. Une inclusion de lactose dans l'alimentation du poulet entraîne une réduction de la colonisation par <i>S.Typhimurium</i> expliqué par une incapacité du pathogène à fermenter le lactose.	Corrier et al., 1993 ; Doyle and Erickson.,2006; Terada et al., 1994 ; Ziprin et al.,1991
	Le lactulose : Diholoside formé d'un galactose et d'un fructose liés par une liaison osidique du type O β (1 \rightarrow 4)., procure comme le lactose une protection contre <i>Salmonella</i> .	Corrier et al., 1993 ; Terada et al., 1994 ; Patterson and Burkholder, 2003
Oligosaccharides	Le fructo-oligosaccharide (FOS) : Polymère de courte chaîne, produit à partir de l'hydrolyse de l'inuline, il a pour effet, une réduction de la colonisation de <i>Salmonella</i> , <i>Clostridium spp</i> , et stimule sélectivement <i>Bifidobacterium</i> à l'intérieur du microbiote.	Xu et al ., 2003 ; Kim et al., 2011 ; Roberfroid et al., 1998 ; Bailey et al., 1991 ; Fukata et al., 1999
	Le galacto-oligosaccharide (GOS) : Il est produit de façon synthétique à partir du sirop de lactose, il possède une activité sélective sur les bifidobactéries.	Jung et al., 2008
	L'isomaltooligosaccharides (IMO) : Il est produit par restriction du sucrose pendant la fermentation grâce à la dextranucrase, une enzyme produite en général par les espèces <i>Leuconostoc</i> et <i>Streptococcus</i> qui catalyse la synthèse des glucans à poids moléculaire élevé (dextrans), et qui en présence d'une forte concentration de maltose ou d'isomaltose, favorise la formation du glucooligosaccharide qui est l'isomaltooligosaccharides (IMO). L'IMO favorise la croissance de <i>Bifidobacterium</i> et réduit la croissance de <i>Salmonella</i> .	Chung and Day, 2004
	Le mannan-oligosaccharide (MOS) : Il est dérivé de la paroi cellulaire de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> . Il a comme effet une réduction de <i>Salmonella Typhimurium</i> et <i>Salmonella Enteritidis</i> chez la volaille.	Spring et al., 2000 ; Fernandez et al., 2000
Polysaccharides	La gomme du guar, et la gomme de guar partiellement hydrolysée , sont des extraits des graines de <i>Cyamopsis tetragonobus</i> . Ce sont les polysaccharides les plus utilisés comme prébiotique dans l'alimentation de la volaille et ont un rôle protecteur contre la colonisation par <i>Salmonella</i> .	Fernandez et al., 2002
	Les Extraits de <i>Lentinus edodes</i> (LenE) , stimulent la croissance des bactéries bénéfiques (<i>Bifidobacterium</i> , <i>Lactobacillus</i>) et réduisent la colonisation par <i>Bacteroides</i> . et <i>E. coli</i>	Guo et al., 2004
	Les Extraits de <i>Tremella fuciformis</i> (TreE) , ont des effets similaires à <i>LenE</i>	Guo et al., 2004
	Les Extraits d'<i>Astragalus membranaceus Radix</i> (AstE) , ont aussi des effets similaires à <i>LenE</i>	Guo et al ., 2004

8. Utilisations des membranes filtrantes hydrophobes quadrillées: Hydrophobic–Grid Membrane Filters (HGMFs)

8.1. Généralités sur la technique HGMF

Les filtres HGMF résultent de la modification des membranes conventionnelles MF (Membrane Filter) afin de les rendre plus hydrophobes. La technique de filtration par HGMF a été décrite pour la première fois en 1974 (Sharpe and Michaud, 1974). Les HGMF sont des filtres de 6 cm de côté et formés de polysulfone. Chaque filtre comporte 1600 cellules qui sont séparées par des grilles de cire qui permettent de limiter la croissance des colonies bactériennes à l'intérieur de la cellule, un phénomène qui est aussi favorisée par l'hydrophobicité des filtres.

8.2. Technique de culture bactérienne et dénombrement des colonies sur filtre HGMF

L'obtention des colonies bactériennes sur filtre HGMF se fait après filtration de la suspension d'un enrichissement de culture bactérienne diluée dans de l'eau peptonée contenant 1% de tween 80. On peut filtrer jusqu' à 10 ml de la suspension finale, mais cette quantité à filtrer dépendra de la dilution finale et de la concentration bactérienne dans la suspension (Sharpe et al.,1983 ; Sharpe and Peterkin, 1988; Mc Daniels et al.,1987). Les filtres HGMFs sont ensuite déposés sur une gélose, les conditions d'incubation et le type de gélose étant fonction du type de micro-organisme recherché (NG et al., 1997; Heikinheimo et al., 2004; Todd et al., 1999; Tournas, 2009). Le dénombrement des colonies peut se faire de manière électronique ou visuellement. Dans le dénombrement électronique chaque cellule est considérée comme une unité de croissance ou growth unit (GU), ce qui veut dire que chaque GU comporte après filtration, zéro, un ou plusieurs colonies bactériennes. Indépendamment du nombre de colonies qui poussent dans une grille, chaque grille HGMF avec une croissance bactérienne est considérée comme une cellule positive, ou positive grid cell (PGC) et est comptée comme une seule colonie (Mc Daniels et al., 1987). Le PGC est utilisé pour déterminer un index MPN (Most Probable Number). C'est une méthode qui permet de calculer un estimé corrigé du nombre de colonies dans un échantillon (Sharpe et al., 1983). La technique

HGMF permet de compter théoriquement jusqu'à 200 colonies par filtre avec 93% des chances que chaque colonie soit une colonie pure et individuelle (Sharpe and Peterkin, 1988). Les filtres HGMF ont été utilisés principalement pour le dénombrement des coliformes et en particulier d'*E. coli* (Todd et al., 1988 ; Todd et al., 1999 ; Dunlop et al., 1998 ; Barlow et al., 2004), mais aussi d'autres bactéries comme *Listeria* (Peterkin et al 1991., Yan et al 1996), *Campylobacter jejuni* (NG et al., 1997), *Staphylococcus aureus* (Peterkin and Sharpe, 1984), *Clostridium perfringens* (Heikinheimo et al., 2004), aussi bien que des levures et des champignons (Tournas , 2009).

8.3. Utilisation des filtres HGMF dans le dénombrement d'*E. coli* et des autres entérobactéries.

La technique HGMF a été utilisée dans les analyses alimentaires pour la première fois en 1979. Par la suite, elle a été approuvée en 1983 par le «Association Of Official Analytical Chemists» pour analyser les coliformes totaux et les coliformes fécaux (Mc Daniels et al., 1987). La croissance des coliformes fécaux et totaux sur filtre HGMF est comparable à celle obtenue par la technique de membrane filter (MF). De plus il a été montré que les résultats de dénombrement des coliformes totaux sur filtres HGMF sont plus précis comparativement à la technique MF quand il s'agit d'échantillons d'eaux de surfaces polluées et dans les cas où les filtres HGMF comptent un nombre de colonies positives supérieur à 100 (Mc Daniels et al., 1987). L' usage courant de la technique HGMF consiste au dénombrement des coliformes dans les analyses microbiologiques des aliments par des agences gouvernementales comme Santé Canada, mais également dans un certain nombre de travaux de recherche pour le dénombrement et la détection des *E. coli* pathogènes ou résistants aux antimicrobiens dans des aliments et les fèces animales (Todd et al., 1988 ; Todd et al., 199 ; Dunlop et al., 1998 ; Barlow et al., 2004). Quand des milieux de culture spécifiques pour *E. coli* sont utilisés avec les filtres HGMFs, plus de 95% des isolats provenant d'échantillons individuels de fèces de porcs sont confirmés comme *E. coli* et d'autres entérobactéries comme *Escherichia hermannii* et *Yersinia enterocolitica* sont aussi dénombrés mais de façon marginale (Dunlop et al., 1998). En dehors d'*E. coli*, d'autres espèces bactériennes comme *Aeromonas*, *Proteus*, *Morganella morganii*,

Shewanella et *Providencia* ont été trouvés dans des échantillons de fèces bovines cultivés sur filtres HGMF en utilisant le milieu modified hemorrhagic colitis (mHC) (Barlow et al., 2004). La confirmation des profils des colonies bactériennes qui poussent sur HGMF à partir des milieux utilisés traditionnellement pour la culture d'*E. coli*, montre que la majorité des isolats sont des *E. coli*, certains des échantillons peuvent rarement présenter jusqu' à 50% des colonies qui appartiennent à *Enterococcus* spp (Dunlop et al., 1998).

8.4. Utilisation des filtres HGMF dans la détection de l'ADN bactérien par hybridation

Les filtres HGMFs ont été utilisés dans différents travaux de recherche pour effectuer une hybridation de l'ADN bactérien. Dans tous les cas, un prétraitement des filtres est faite pour lyser les cellules bactériennes et fixer l'ADN sur les filtres (Todd et al., 1999 , Peterkin et al., 1991, Yan et al., 1996 ; Barlow et al ., 2004). Les techniques de marquage des sondes à la peroxydase HRP et la révélation par chemiluminescence ainsi que le marquage des sondes à l'adigoxigénine (DIG) et la révélation colorimétrique ont été principalement utilisées (Todd et al.. 1999 ; Peterkin et al., 1991 ; Yan et al., 1996 ; Heikinheimo et al., 2004 ; Barlow et al ., 2004). L'hybridation de l'ADN sur filtre HGMF a été utilisée pour la première fois par Datta et al., en 1987 pour détecter *Listeria monocytogenes*, en utilisant une sonde consistant d'un fragment de 500 bp du gène codant pour la β -hémolysine marqué à la radioactivité (Datta et al., en 1987). Par la suite, Peterkin et al., 1991 ont utilisé l'hybridation de l'ADN sur filtre HGMF pour détecter *L. monocytogenes* grâce à des sondes spécifiques isolées à partir de clones β -hémolytiques et marquées à la peroxydase (Peterkin et al., 1991). Le marquage à la DIG pour détecter *L. monocytogenes* sur les filtre HGMF fut utilisé par la suite (Yan et al., 1996), la même technique ayant été adaptée par Todd et al., 1999 pour détecter *E.coli* produisant de la shiga-toxine. Dans cette dernière étude, une limite de détection de 0.1 CFU par gramme a été observée dans les échantillons de viandes hachées de bœuf inoculées par des souches VTEC en utilisant l'hybridation sur HGMF et la détection colorimétrique (Todd et al., 1999). L'hybridation de l'ADN sur filtre HGMF a aussi été utilisée pour étudier la présence de *Campylobacter jejuni* (Ng et al., 1997), *Clostridium perfringens* porteur du gène *cpe* (

Heikinheimo et al., 2004), et la présence des intégrons de class 1 et 2 chez *E. coli* et autres entérobactéries (Barlow et al., 2004).

8.5. Autres applications des filtres HGMF

Les filtres HGMF peuvent également être utilisés pour l'identification de certaines bactéries par réaction immuno-enzymatique. En effet, la technique de marquage des anticorps mono- et polyclonaux a été utilisée pour détecter sur filtre HGMFs des bactéries comme *Salmonella* (Cerqueira-Campos et al., 1986), *Staphylococcus aureus* et ETEC (Peterkin and Sharpe, 1984) et *Escherichia coli* O157 (Todd et al., 1988). La peroxydase est souvent utilisée comme enzyme dans ces réactions et les colonies positives sur HGMFs apparaissent sous forme de taches pourpres. L'identification des colonies présomptives peut se faire en 24h, la limite de détection d'*E. coli* O157 en utilisant cette technique étant de 10 bactéries par gramme d'aliment. D'autre part, *E. coli* O157 a été détecté dans plus de 95% des cas où les aliments ont été inoculés, démontrant la sensibilité de la méthode (Todd et al., 1988). Après identification d'*E. coli* O157, l'identification de H7 et autres sérotypes peut se faire à partir des colonies sur les filtres répliqués (Todd et al., 1988). Finalement, la technique HGMF a été aussi utilisée pour étudier la résistance phénotypique d'*E. coli* aux antimicrobiens (Dunlop et al., 1998).

8.6. Avantages comparatifs de la technique HGMF

L'utilisation de la technique HGMF offre plusieurs avantages comparativement aux techniques traditionnelles de sélection de 5 colonies d'un même échantillon pour étudier leur profil de virulence ou de RAM. En effet la technique HGMF permet d'étudier le profil de 200 colonies en même et offre ainsi une meilleur représentativité du profil d'une population bactérienne dans un échantillon. Les filtres HGMF sont adaptés pour l'hybridation de l'ADN et offre l'avantage de pouvoir être utilisés avec différentes méthodes de détection : radioactivité, chemiluminescence, et colorimétrie (Datta et al., 1987; Todd et al., 1999; Peterkin et al., 1991; Yan et al., 1996; Heikinheimo et al., 2004; Barlow et al., 2004). L'utilisation de la détection colorimétrie offre particulièrement un avantage du fait qu'elle évite l'utilisation de la radioactivité qui présente plus de dangers pour les utilisateurs et dont l'usage nécessite des autorisations

spéciales. De plus la détection colorimétrique sur les filtres HGMF donne une très bonne limite de détection (Todd et al., 1999). D'autre part Yan et al., 1996 a démontré que l'hybridation de l'ADN pour la détection de *L. monocytogenes* est très spécifique et discriminante. Ils rapportèrent dans leur étude une sensibilité de 94% et une spécificité de 100%. Les résultats ont été confirmés par la suite par d'autres auteurs qui ont montré que la technique de l'hybridation de l'ADN sur filtres HGMF est une technique qui donne une haute sensibilité et spécificité (Ng et al., 1997 ; Heikinheimo et al., 2004).

L'utilisation de la technique HGMF pour la détection des gènes chez *E. coli* peut être comparée au PCR et la technique microarray. Le principal avantage de la technique HGMF par rapport à ces techniques c'est de pouvoir cibler un grand nombre de colonies provenant d'un même échantillon alors que les techniques PCR, RT-PCR et microarray sont utilisées sur quelques des colonies individuelles sélectionnées ou sur un enrichissement de l'échantillon total (Boerlin et al., 2005 ; Bekal et al., 2003 ; Bruant et al ., 2006). La technique HGMF offre ainsi un avantage en ce qui concerne la représentativité du profil de la population d'*E.coli* dans un échantillon et apporte une information quantitative sur la proportion d'isolats positifs pour les gènes recherchés. De plus, grâce à la technique de réplique sur d'autres filtres HGMF, on peut rechercher différents gènes sur des centaines de colonies et également sauvegarder un filtre maître à partir duquel on peut faire des tests complémentaires (Todd et al., 1999 ; Barlow et al ., 2004). Il faut noter cependant que la technique microarray présente aussi un avantage comparatif par rapport à la technique HGMF car elle permet de cibler en même temps de plusieurs dizaines de gènes et constitue une technique assez rapide (Bekal et al., 2003 ; Bruant et al ., 2006). À ce titre la technique microarray peut constituer un test complémentaire intéressant pour compléter l'étude de certaines colonies d'*E.coli* dont les profils de virulence ou de résistance aux antimicrobiens ont été partiellement déterminés.

9. Problématique et objectifs de l'étude

Plusieurs études montrent qu'il y'a une tendance générale d'augmentation de la prévalence de la RAM des souches d'*E. coli* et que la résistance d'*E. coli* est plus élevée parmi les non pathogènes. Cependant plusieurs études montrent également que les gènes de RAM et de virulence sont parfois portés par les mêmes éléments génétiques, ce qui suggère qu'une augmentation conjointe de la prévalence des souches résistantes et virulentes est possible dans le futur. D'autre part les agences gouvernementales recommandent de plus en plus la limitation de l'utilisation de certains antimicrobiens en élevage pour éviter le développement de certaines résistances aux antimicrobiens. Dans ce contexte de limitation de l'utilisation des antimicrobiens dans l'élevage, les ingrédients alimentaires comme les prébiotique et les acides organiques constituent une alternative intéressante pour permettre non seulement de garder une bonne rentabilité en élevage mais aussi pour maîtriser certains pathogènes comme *Salmonella*, *Clostridium* et *E. coli*. Les études précédentes montrent également une faible prévalence des gènes de virulence des ExPEC dans les populations d'*E. coli* de la volaille en santé. Il est donc important dans le cadre d'une étude évaluant la présence de ces gènes, d'utiliser des outils performants comme les filtres HGMF pour accroître les chances de détection des souches qui possèdent des gènes de virulence.

Les objectifs de cette étude sont ainsi:

- La mise en place de la technique d'hybridation de l'ADN sur des filtres HGMFs, pour détecter les gènes de RAM et les gènes de virulence des populations d'*E. coli* de la flore caecale de la volaille en santé.
- L'étude de la prévalence des gènes de RAM et de virulence d'*E. coli* de la flore caecale de la volaille en santé.
- L'évaluation des différentes associations entre gènes de RAM et de virulence d'*E. coli* de la flore caecale de la volaille en santé.

- L'évaluation des effets des ingrédients alimentaires (ProfeedTM et Galliacid STM) sur la prévalence des gènes de RAM et de virulence des populations d' *E. coli* de la flore caecale de la volaille en santé.

MÉTHODOLOGIE ET RÉSULTATS

Ma contribution aux travaux

Mise au point de la technique d'hybridation de l'ADN et de détection des gènes d'*E. coli* à partir d'échantillons de fèces de porc en utilisant les filtres HGMF (Annexes 1).

Analyse HGMF, et PCR des échantillons de contenus caeaux de poulets sains pour la détection des gènes de virulence et résistance aux antimicrobiens d'*E. coli* (article en préparation).

Analyses statistiques des résultats par XLSTAT pour l'étude de la prévalence et des associations des gènes de virulence et résistance aux antimicrobiens d'*E. coli* des échantillons de contenus caeaux de poulet sains.

Rédaction de l'article: Prevalence, distribution and associations of virulence and antimicrobial resistance genes, among *E. coli* in the caecum of healthy growing chickens receiving various feed ingredients.

Rédaction du résumé, poster et article pour le congrès Safepork (annexe 1)

Rédaction du résumé, poster, et communication orale: 2nd ASM conference on antimicrobial resistance in zoonotic bacteria and foodborne pathogens in animals, humans and the environment (annexe 2)

Rédaction de l'étude bibliographique et discussion des résultats de l'article en français

ARTICLE EN PREPARATION

Prevalence, distribution and associations of virulence and antimicrobial resistance genes, among *E. coli* in the caecum of healthy growing chickens receiving various feed ingredients.

Paul K. Kaboré¹; Ann Letellier², Ludovic Lahaye³; John M. Fairbrother ^{*1}

⁽¹⁾Reference Laboratory for *Escherichia coli* (ECL) of the Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal, 3200, rue Sicotte Saint-Hyacinthe (Québec) J2S 2M2

⁽²⁾Chaire de recherche en salubrité des viandes of Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal, 3200, rue Sicotte Saint-Hyacinthe (Québec) J2S 2M2

⁽³⁾Jefo Nutrition Inc, 5020, Av Jefo, St-Hyacinthe, QC, CANADA, Saint-Hyacinthe, Québec.

Running title: Broilers' *E. coli* virotypes and antibiotic resistance pattern

Key words: Antimicrobial resistance genes, virulence genes, healthy chickens, caecal *E. coli*, feed ingredients, prebiotic, organic acid, ExPEC, APEC, HGMF, PCR.

*Corresponding author address: John M. Fairbrother, Faculté de médecine vétérinaire, 3200, rue Sicotte St-Hyacinthe (Québec) J2S 2M2 . Tel. 450-773-8521, ext. 8234

ABSTRACT

Avian Pathogenic *E. coli* (APEC) belong to the extra-intestinal pathogenic *E. coli* (ExPEC) pathotype, and may be a virulence and antimicrobial resistance gene reservoir for ExPEC in humans. The aim of this study was to evaluate the effect of addition to the feed of a prebiotic or an encapsulated blend of organic acids and essential oils on the prevalence of ExPEC-associated virulence genes and antimicrobial resistance (AMR) genes and the association between these genes in *E. coli* of the intestinal microflora of healthy chickens. Caecal contents from 29-day-old chickens having received one of these feed ingredients in comparison to a control group were examined for the presence of virulence genes *iucD*,

tsh, and *papC* and AMR genes *bla_{TEM}*, *bla_{SHV}*, *tetA*, *tetC*, *bla_{CMY-2}*, *aadA1*, and *aac3* by PCR. The prevalence of *iucD* was significantly higher in the control group than in the prebiotic and organic acid essential oil groups and prevalence of *papC* was affected by the use of the organic acid and essential oils. The prevalence of *bla_{CMY-2}*-positive *E. coli* isolates was higher in the control group than the prebiotic or organic acid essential oil groups, as demonstrated by hydrophobic-grid membrane filter (HGMF) DNA probe colony hybridization. In addition, the prevalence of *E. coli* isolates positive for *tetA*, *bla_{TEM}*, *aadA1* or *tsh* was affected by the use of these feed ingredients. Overall, statistical associations between the presence of *iucD* and *tsh*, *bla_{TEM}* and *aadA1*, and *iucD* and *bla_{CMY-2}* were observed. Further characterization of 88 isolates by PCR showed that non-ExPEC isolates were positively associated to *bla_{TEM}* gene and negatively associated to *tetA* gene. This study demonstrates that the use of certain feed ingredients could reduce the risk of exposure in a public health perspective.

INTRODUCTION

Escherichia coli are common bacteria in the intestinal microflora of poultry, including a broad variety of different clones, ranging from highly pathogenic strains causing severe disease in poultry to non-pathogenic commensal strains (11, 34). Pathogenicity is characterized by the presence of certain combinations of specific virulence factors that cause avian airsacculitis, coliseptisemia, omphalitis, peritonitis, pericarditis, perihepatitis salpingitis and synovitis (11, 31, 32). Diseases caused by Avian Pathogenic *E. coli* (APEC) are responsible for major economic losses. APEC are a subset of extra-intestinal pathogenic *Escherichia coli* (ExPEC), showing genotypical similarity with other ExPEC such as uropathogenic *E. coli* (UPEC) and *E. coli* causing neonatal meningitis or septicaemia (13, 22, 24, 29, 33, 37). The same virulence genes present in APEC may be found in the other ExPEC groups. The common virulence factors associated with APEC are: type 1 and P fimbriae, curli, aerobactin, K1 capsule, and temperature-sensitive hemagglutinin (Tsh), serum resistance, capsules, lipopolysaccharide (LPS), and outer membrane proteins (OMPs) (11, 31, 32). Some of these virulence factors are encoded by genes on large

plasmids which may also carry some antimicrobial resistance (AMR) genes (24, 25). In addition, a high prevalence of AMR has been found in generic *E. coli* in avian production and in poultry products (12, 38, 40), underlining their possible role as a reservoir for human infection. *E. coli* are also considered as an important source of AMR determinants for other pathogens. Interestingly, the addition of certain ingredients such as organic acids to the feed may differentially affect some subsets of *E. coli* in the intestinal microflora of cattle (3, 9). Hence, the aim of this study was to evaluate the effect of addition to the feed of a prebiotic made of specific short chain fructo-oligosaccharides (scFOS, Profeed™) or a patented microencapsulated blend of organic acids and essential oils (Galliacid S™) on the prevalence of APEC-associated virulence genes and AMR genes and the association between these genes in *E. coli* of the intestinal microflora of healthy chickens.

MATERIALS AND METHODS

Experimental conditions and sample collection and preparation

A total of 115 chickens (male Ross X Ross) were distributed on the day of hatch in replicates (n= 7 or 8) of 5 birds (reared in a same cage). Birds were vaccinated in the hatchery against Marek's disease and Infectious Bronchitis, and via the feed against coccidia (Coccivac B™) on the day after they arrived in the experimental facilities. Chickens were provided with water and feed *ad libitum*. Three groups were constituted based on diet: control feed, feed with 1.5g/kg of Profeed™ (95% of scFOS with a degree of polymerization between 3 and 5, Beghin-Meiji, Marckolsheim, France), or feed with 0.3 g/kg of Galliacid S™, which were given to the birds from the first day of the experiment to the 29th day of age. All experimental procedures were performed following the principles described by Canadian Council on Animal Care. At day 29, the birds were slaughtered and individual digestive tracts were collected. Caeca and ilea were separately pooled to constitute samples per cage (control n=8; Profeed™ n=7; Galliacid S™ n=8). The same quantity of caecal sample was taken from each individual caecum to make the pool. Each pool of caecal samples was diluted to 1/10 (weight-to-weight) in tryptone salt broth containing 25% of glycerol and conserved at -25°C until processing.

Sample processing

Following thawing, 100µl of each sample was inoculated into 5 ml Luria Bertani (LB) broth and enriched overnight at 37°C. DNA templates were prepared from the resulting enrichments by boiled cell lysis. Briefly, 1 ml of each overnight enrichment was pelleted by centrifugation, resuspended in 0.5 ml of sterile deionized water and boiled for 10 minutes. The boiled cell suspensions were centrifuged and the resulting lysates were used for PCR.

PCR for detection of virulence and antimicrobial resistance genes

Boiled cell lysates were tested by PCR to detect the presence of the virulence genes *papC*, *iucD*, and *tsh* commonly associated with APEC isolates (35) and the antimicrobial resistance genes *tetA*, *tetC*, *bla_{TEM}*, *bla_{SHV}*, *ant(3)Ia (aadA1)*, and *aac(3)-IV* associated with antimicrobials for which a high prevalence of resistance has been observed in *E. coli* isolates from healthy chickens in Canada (15) using specific primers for the respective genes (Table 1).

Each virulence and antimicrobial resistance gene was detected separately. The PCRs were performed in 25 µl reaction mixtures containing 5 µl of DNA template, 1.0 µM each oligonucleotide primer, 200 µM concentrations of each of the four deoxynucleoside triphosphates (GE Healthcare UK Limited-Buckinghamshire HP7 9NA Uk), 10 mM Tris-HCl, pH 9.0, 50 mM KCl, 2.0 mM MgCl₂ (BioTools, B & M Labs,S.A-Madrid-Spain), and 1 U of Taq polymerase (BioTools, B & M Labs,S.A-Madrid-Spain). PCR was performed for 30 cycles of denaturation at 94°C for 30 s, annealing at 50°C, 55°C, or 60°C depending on the primer (Tables I and II) for 30 s, and extension at 72°C for 45 s. The PCR products were visualized by ethidium bromide staining after agarose gel electrophoresis. All PCRs were carried out using negative control (ECL3463), positive control strains (Table I and Table II) and following ECL laboratory procedures (http://www.apzec.ca/en/APZEC/Protocols/APZEC_PCR_en.aspx).

Isolation of bacteria positive for virulence and antimicrobial resistance genes

Enrichments positive for virulence or antimicrobial resistance genes were serially diluted in peptone water to 10⁻⁵ dilution, from which a last dilution was made in peptone water containing 1% of tween 80 to get 10⁻⁷ diluted subsample. A volume of 3 ml of this final dilution was filtered through a hydrophobic grid membrane filter (HGMF) using a

Spreadfilter (Filtaflex, Almonte, Ontario, Canada). Filters were placed onto MacConkey agar plates and incubated overnight at 37°C to obtain HGMF master filters bearing predominantly *E. coli* lactose-positive colonies. A HGMF Interpreter (Filtaflex, Almonte, Ontario, Canada) was used to count typical *E. coli* colonies on master filters, which were then replicated using a HGMF Replicator (Filtaflex, Almonte, Ontario, Canada) and placed onto MacConkey agar plates, and incubated overnight at 37°C to obtain HGMF replicates. The positive control strains (Table I) and negative control strain ECL 3463 used in the hybridization process were also filtered and replicated as described above.

To generate DNA hybridization probes to detect each of the virulence or antimicrobial resistance genes, templates were prepared from an overnight LB culture of the appropriate control strains (Table I). Digoxigenin (DIG) alkaline phosphatase labelled probes were generated using the specific primers (Table I). The DNA templates were labelled according to DIG labelling kit (Roche Diagnostics) instructions. The bacterial colonies on the HGMF replicates were pretreated as described by Todd and al 1999, (39). The HGMFs were incubated in pretreatment solution. Then in 3 ml of lysis solution (150 mM NaOH in 70% ethanol) at 37°C during 30 min. HGMFs were then heated in a microwave for 30 s. and agitated for 60 min at 37°C in 0.01% proteinase K (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo.) The DNA was cross-linked to the HGMFs by exposure to UV light. HGMFs containing cross-linked DNA were hybridized with DIG-labeled probes for the detection of the appropriate virulence or antimicrobial resistance genes. The procedure was carried out at 68°C using 20 ng /ml of denatured specific probe according to the instructions for the DIG Nucleic Acid Detection Kit (Roche Diagnostics). The presence of specific genes was revealed colorimetrically with the alkaline phosphatase substrate, 5-bromo-chloro-3-indolyl phosphate (BCIP), and nitroblue tetrazolium salt (NBT).

Characterization of isolates

Presumptive virulence or antimicrobial resistance gene-positive colonies were picked from replicate HGMFs and confirmed to be *E. coli* by biochemical tests (Simmons Citrate Agar, mobility and indole). Isolates were selected from the HGMFs randomly or according to their presumptive virulence and antimicrobial resistances gene profiles. The gene profiles

were confirmed by PCR using a multiplex to detect the four virulence genes (*iucD*, *tsh*, *papC*, *CNF*), and using single PCR to detect each antimicrobial resistance gene.

Statistical analysis

Chi-square test (95% confidence intervals) performed with XLSTAT was used to compare the effect of feed ingredients, on the prevalence of virulence and antimicrobial resistance genes between the 3 groups. In the case of a significant difference, Fisher's exact test (95% confidence intervals) was performed using XLSTAT to compare the control group with each group receiving a feed ingredient. Odds ratios (OR) (95% confidence intervals) based on HGMPF results and calculated with XLSTAT were used to evaluate the associations between genes.

RESULTS

The prevalence of *iucD* and *papC* virulence genes is affected by different feed ingredients whereas the AMR genes *tetA*, *bla_{TEM}*, *bla_{CMY-2}* and *aadA1* are highly represented but not impacted by the feed ingredient in caecal samples from growing chickens.

Although more than half of the samples (5/8) of the control group were positive for the presence of *iucD* gene, this gene was not detected in any sample of the ProfeedTM and Galliacid STM groups (Table III). The Fisher's exact test showed that the prevalence of the *iucD* gene was significantly higher (P=0.03) in the control group than in the ProfeedTM and Galliacid STM groups. The *papC* gene was predominant in Galliacid STM group, but was absent in the control group. The prevalence of *papC* was significantly higher (P=0.007) in the Galliacid STM group than in the control group although there was no significant difference between the Galliacid STM and ProfeedTM groups. The *tsh* gene was found in all groups, the difference between groups not being significant. A high prevalence for the *tetA*, *bla_{TEM}*, *bla_{CMY-2}* and *aadA1* AMR genes was observed in the caecal samples. The majority of the samples were positive for *bla_{TEM}*, *bla_{CMY-2}* and *aadA1* regardless of the group. On the other hand, the AMR genes *tetC*, *bla_{SHV}*, and *aac(3)-IV* were absent in all samples. For all AMR genes tested, no significant difference was observed between groups

receiving different feed ingredients. Thus, the comparison of prevalence of genes in the caecal samples clearly showed an impact of feed ingredients on the prevalence of *iucD* and *papC* genes.

Prevalence of *tetA*, *bla_{TEM}*, *bla_{CMY-2}* and *aadA1* AMR genes and *tsh* virulence gene; among isolates in caecal samples from growing chickens was affected by feed ingredients.

To further investigate the impact of feed ingredients on the *E. coli* population in the intestinal microflora of growing chickens, we examined the prevalence of the genes *iucD*, *papC*, *tsh*, *tetA*, *bla_{TEM}*, *bla_{CMY-2}* and *aadA1* among isolates from PCR-positive samples from chickens of the different groups.

In the control group, the prevalence of the virulence genes *iucD* and *tsh* was 19.4% and 13%, among 948 and 618 tested isolates, respectively. The prevalence of *tsh* gene was significantly lower in the Profeed™ group (0.8%, $P < 0.0001$) and Galliacid S™ group (0%; $P < 0.0001$). The prevalence of *iucD* and *papC* among isolates was not further compared between groups due to the high number of PCR-negative samples.

For the AMR genes, the prevalences of streptomycin resistance gene (*aadA1*) and ampicillin resistance gene (*bla_{TEM}*) were highest, being 39.1% and 35.4% respectively (Table IV). The prevalences of tetracycline resistance gene *tetA* and ceftiofur resistance gene *bla_{CMY-2}* were only 19.1% and 14.6% respectively (Table IV).

The impact of feed ingredients on the prevalence of these genes among isolates from PCR-positive samples was examined. The prevalence of *bla_{CMY-2}* was significantly higher in the control group compared to the Profeed™ group (1.8 %; $p < 0.0001$) and Galliacid S™ group (3.3% ; $p < 0.001$) (Table IV). Also, the prevalence of *tetA* was significantly higher in the control group compared to the Galliacid S™ group (5.7%; $P < 0.001$); but not significantly different when compared to the Profeed™ group (18.9%). On the other hand, the prevalence of *bla_{TEM}* was significantly higher in the control group compared to Profeed™ group (25.7% $P < 0.0001$), but significantly lower when compared to the Galliacid S™ group (54%; $P < 0.0001$) (Table IV). Similarly, the prevalence of *aadA1* was lower in the control group compared to Galliacid S™ group (51.5% $P < 0.0001$); although not significantly different compared to the Profeed™ group (36.9%)(Table IV).

The effect of the feed ingredients on the proportion of isolates with various AMR gene combinations in the caecal samples was also evaluated. The proportion of isolates positive for *bla*_{TEM} and *aadA1*, among those tested for both genes, was more than 30% in the Galliacid STM group, whereas the proportion of isolates positive for both genes in ProfeedTM and control group were only 6.3% and 13.8%, respectively (Table V). Few of the isolates possessed any other combination of two resistance genes, being generally 7% or less regardless the combination and no significant differences were observed between the groups.

Taken together, our results showed that the highest prevalence of *bla*_{TEM}, *aadA1*, or both genes in combination among *E. coli* isolates was found in the Galliacid STM group. In contrast, the prevalence of *bla*_{TEM} gene in combination with the *tetA* or *bla*_{CMY-2} genes was lower in the Galliacid STM group compared to control group (1.6% vs 6.2% for *bla*_{TEM}:*tetA*: and 0.2% vs 1.9% for *bla*_{TEM}:*bla*_{CMY-2}), the same tendency being observed when *aadA1* was in combination with *tetA* or *bla*_{CMY-2} (3.5% vs 6.5% for *aadA1*: *tetA* and 0% vs 4.4% for *aadA1*: *bla*_{CMY-2}).

In isolates tested for the aerobactin gene *iucD*, in the control group, the proportion of isolates bearing *iucD* gene in combination with *tsh* gene was high (17.6%). The proportion of isolates demonstrating a combination of *iucD* gene and an AMR gene varied from 2.7% (*iucD*:*tetA*) to 9.2% (*iucD*:*aadA1*)(Data non shown).

Association between virulence and AMR genes

An association between the presence of genes *iucD* and *tsh* and *bla*_{TEM} and *aadA1* was observed, whereas the pattern for *bla*_{CMY-2} positive isolates was quite different. In addition, more than 20% of the 1947 isolates tested for *bla*_{TEM} and *aadA1*; and more than 17% of isolates tested for *iucD* and *tsh* were positive for both genes in each case. The calculation of the OR using the data of HGMF DNA probe hybridization confirmed the hypothesis of a positive association between *bla*_{TEM} and *aadA1* (OR=3.1; p<0.0001), and *iucD* and *tsh* (OR= 14.7; p<0.0001). We also found positive associations between *iucD* and *bla*_{CMY-2} (OR=1.7; p=0.012) and *iucD* and *aadA1* (OR= 1.7; P= 0.004) and negative associations between *iucD* and *bla*_{TEM}, *tsh* and *bla*_{TEM}, *aadA1* and *bla*_{CMY-2}, *bla*_{TEM} and *tetA*, and *bla*_{TEM} and *bla*_{CMY-2} (Table VI).

Non-ExPEC isolates are more likely to bear *bla*_{TEM} resistance gene whereas isolates of *iucD* and *iucD:tsh* virotypes are more likely to bear *tetA* and *bla*_{CMY-2} resistance genes.

The 88 representative *E. coli* isolates were tested by PCR for the presence of the four most predominant AMR genes found in the caecal samples and the four ExPEC virulence genes. These results confirmed 90 % of the profiles of the isolates observed on HGMFs. All isolates were negative for the virulence gene *cnf* and 51% of the isolates were positive for one or more of the three other virulence genes tested. Forty nine % of the isolates were negative for all tested virulence genes and were classified as non-ExPEC isolates in this study. The non-ExPEC and *iucD:tsh* were the most predominant virotypes among the isolates. A high proportion of non-ExPEC isolates (75%) were positive for *bla*_{TEM} gene (Table VII), and the latter was positively associated with non-ExPEC (OR=6.4; P< 0.0001)(Table VIII). In contrast, only 24% of the isolates of *iucD:tsh* virotype were positive for *bla*_{TEM}. A low proportion of *tetA* and *bla*_{CMY-2} AMR genes were found among non-ExPEC isolates, a higher proportion of isolates of the *iucD* and *iucD:tsh* virotypes being positive for these AMR genes (Table VII). In addition, the OR showed that non-ExPEC isolates were negatively associated with the *tetA* resistance gene (OR=0.03; P= 0.038) (Table VIII). Except for the *bla*_{TEM}:*aadA1* multiresistance gene pattern, that was more predominant among non-ExPEC isolates; multiresistance gene patterns were more frequently observed in the *iucD* and *iucD:tsh* virotypes (Table VII).

DISCUSSION

The results of this study confirm the high prevalence of some AMR genes among avian *E. coli*. The prevalence of the *cnf*, *tsh* and *papC* virulence genes in *E.coli* isolates from healthy chickens is low, although about 20% of the isolates possess the *iucD* gene. Prevalences of *papC* and *tsh* agree with the previous findings in *E. coli* isolates from healthy chickens, of 6% and 4% respectively (7). A similar prevalence range for *papC* gene (2.3%) was found by Diarra et al 2009 (8), whereas *tsh* prevalence was 30.9% among healthy chickens APEC strains.

Gyles 2008, reported high resistance in *E. coli* isolates from broilers to ampicillin, tetracycline, and streptomycin ranging respectively from 5% in Sweden to 67% in Iran ; 7%

in Sweden to 85% in France; 7% in Sweden to 48% in USA (17). In addition, he reported high resistance of APEC isolates to tetracycline (87-100%) and streptomycin (80%-86%) and low resistance of the isolates to ceftiofur (0% -13%). In addition, Guerra et al 2003, found that *bla*_{TEM1}, *tetA* and *aadA1* were the most predominant genetic resistance elements respectively for ampicillin, tetracycline and streptomycin, among *E. coli* isolates from cattle, swine, and poultry (17). We found that the prevalences of *aadA1* and *bla*_{TEM}, were high in caecal samples and *E. coli* isolates, agreeing with previous studies (2, 27, 38), whereas *bla*_{SHV}, another ampicillin resistance gene, was absent in the caecal samples. Interestingly, we found that the prevalence of *tetA* in the caecal samples and among the *E. coli* isolates was relatively low compared to results of other studies (27, 38), *tetC* resistance gene of tetracycline being absent in all samples. Even if tetracycline resistance is mostly encoded by *tetA* to *tetE* genes in *E. coli* isolates, it is important to note that such resistance is mediated by at least 36 genetic elements (38).

Our results showed also a lower prevalence of *bla*_{CMY-2}, one of the most predominant genes encoding for ceftiofur resistance among *E. coli* and *Salmonella* strains in North America (6, 10). Few studies have evaluated the prevalence of *bla*_{CMY-2} in chicken caecal microflora, and the use of HGMF DNA probe hybridization targeting high numbers of isolates, has permitted the detection of low numbers of *bla*_{CMY-2} positive isolates in certain samples. Despite the lower prevalence of *bla*_{CMY-2} gene among the *E. coli* isolates, it is important to note the high prevalence (96%) of positive caecal samples, demonstrating the widespread presence of the gene among birds on a farm and confirming the emergence of *bla*_{CMY-2} in North America (6, 10). Thus, ceftiofur resistance in the Canadian poultry industry has become a concern for public health, ceftiofur being used in Canada for disease prophylaxis in hatcheries. Recently, Dutil et al 2010 showed that the decrease of ceftiofur resistance in chickens *Salmonella* Heidelberg and *E. coli* is related to the withdrawal of ceftiofur in hatcheries, and ceftiofur-resistance increases after the reintroduction of the antibiotic (12).

Our findings that the *iucD* virulence gene and *bla*_{CMY-2} gene are positively associated underlines the need for the surveillance of ceftiofur resistance. Indeed, previous studies

demonstrated that some *Salmonella* and *E. coli* strains carry the promiscuous *bla*_{CMY-2} resistance plasmids (6). It has been demonstrated that *bla*_{CMY-2} was found on pCVM29188_101 plasmid isolated from *S. Kentucky* (14). The latter plasmid coexists with pCV M29188_146 plasmid that carries the *iucD* gene in *Salmonella* isolates and both plasmids were transferable by conjugation, alone or in combination, to *E. coli* recipients. Also pCVM29188_146 shares a highly conserved plasmid backbone with pAPEC-O1-ColBM and pAPEC-O2-ColV virulence plasmids that also contain *iucD* gene (14). The association between *iucD* and *bla*_{CMY-2} found in this study suggests that pCVM29188_101, the *bla*_{CMY-2} plasmid, may coexist with pAPEC-O1-ColBM and pAPEC-O2-ColV that carry *iucD* gene or pCVM29188_146 that carries *iucD* gene among the isolates. Interestingly, our results showed that ProfeedTM and Galliacid STM decrease drastically the prevalence of *bla*_{CMY-2} among *E. coli* isolates (Table IV), *iucD* also being absent in samples from chickens receiving Galliacid STM or ProfeedTM (Table III). Taken together, we can then imply that both ProfeedTM and Galliacid STM inhibit the growth of some particular *E. coli* strains, including those that carry *bla*_{CMY-2} genes and *iucD* gene.

The results of this study showed also a strong positive association between *iucD* and *tsh* virulence genes, confirming previous findings and suggesting the presence of plasmids carrying both virulence genes, such as pAPEC-O1-ColBM and pAPEC-O2-ColV that are common among APEC isolates. It is known that the latter plasmids as well as pCVM29188_146 plasmid, carry *iucD* and the *tetA* resistance genes (14, 22, 24, 25), although our results did not show any association between these two genes. Indeed, *tetA* has various origins, including pAPEC-O2-R plasmid which does not carry *iucD* (23). Nevertheless, our results showed that it is more likely to find the *tetA* gene among ExPEC isolates than non-ExPEC isolates (Table VII), and the OR confirmed a negative association between *tetA* gene and non-ExPEC isolates (Table VIII). Similarly, it has been shown that *tetA* was more closely related to ETEC isolates than to non-ETEC isolates (4). With respect to the impact of the feed ingredients, the results showed that prevalence of *tetA* gene decreased significantly in Galliacid STM group compared to the control group, however the decrease of *tetA* gene in the ProfeedTM group was not significant.

The positive association between the presence of *aadA1* and *bla*_{TEM} (Table VI), supports the possibility that both genes are carried by the same genetic element such as the pAPECO2-R plasmid, as demonstrated previously (23). This hypothesis is reinforced by the finding that the prevalence of both *bla*_{TEM} and *aadA1* were increased significantly under the effect of Galliacid STM, and was decreased under the effect of ProfeedTM. In addition the OR analysis showed that non-ExPEC isolates are statistically associated with *bla*_{TEM} gene (Table VIII). Indeed, 75% of non-ExPEC isolates beared *bla*_{TEM} (Table VII). Taken together, our results suggest that Galliacid STM might have a selective effect on *bla*_{TEM} resistant isolates that are more likely to be non-ExPEC isolates.

It is not well known how such feed ingredients as Galliacid STM and ProfeedTM could differently affect the prevalence of certain genes among *E. coli* strains. It is possible that these ingredients may have a growth inhibitory or selective effect on particular strains of *E. coli* by making them more vulnerable to the modified intestinal environment, but they also may induce plasmid losses in *E. coli* strains.

It has been shown that the supplementation of healthy chickens with scFOS resulted in a decrease of the intestinal colonization by *E.coli* (26, 43). ScFOS are selectively fermented by some strains of *Bifidobacteria* and *Lactobacilli* in the gut of chickens and other animal species such as pigs (21), resulting in production of lactic acid and thus a slight decrease of the intestinal pH. Possibly linked to these acidic conditions, scFOS may inhibit the growth of certain strains of *E.coli*. In other studies, it has been demonstrated that the effect of organic acids on different *E. coli* strains could differ greatly. Indeed, the sensitivity of various *E. coli* strains to acetate at pH 5.9 is different, as *E. coli* O157:H7 may tolerate more acidic environment than *E.coli* K-12 (9). The growth inhibitory effect of Galliacid STM and ProfeedTM may explain the lower mean count of *E. coli* isolates on the HGMFs in the ProfeedTM and Galliacid STM groups compared to the control group. It has been also demonstrated that a low concentration (5 mM) of fully protonated acetic, malic, or L-lactic acid has a protective effect on *E. coli* O157: H7 (3). Therefore, it is understandable that different strains of *E. coli* might be affected differently by Galliacid STM and Profeed. The mechanism of *E. coli* growth inhibition by organic acids has been explained by the passage

of the acid in the cytoplasm causing a decrease of the pH. The effects of scFOS may also be explained by the stimulation of some specific strains of bacteria such as *Lactobacillus reuteri*, one of the most abundant *Lactobacillus* strains in the chickens crop (1), that can use scFOS as carbon source and produce antimicrobial compounds active against *E.coli* HE 320, as shown in an in-vitro study (41). The selective effect of feed ingredients is known, but their mechanism is still unclear. The most plausible explanation is an inhibition of pathogens involving mechanisms such as competition for colonization sites, competition for nutrients, production of toxic compounds, or stimulation of the immune system (36). A selective effect could explain the increase of the prevalence of *aadA1* and *bla_{TEM}* positive isolates in the Gallacid STM group as the results demonstrated above (Table IV).

The selective action and the inhibitory effect on *E. coli* strains in the caecal environment may also be due to presence of certain plasmids among *E. coli* isolates. Indeed, Helling et al 1981 showed that the presence of plasmids lowered the growth of *E. coli* in carbon-limited continuous culture, and the proportion of the plasmid containing bacteria in the total population decreased initially. However they observed periodically adaptive changes in plasmid-containing bacteria, leading to an increase in their growth rate (19). The hypothesis of a regulatory action of the plasmids on the growth of *E. coli* strains has also been advanced by Mellata et al., 2010 (30), who showed that pAPEC-1 and pAPEC-2 plasmids regulate the growth of *E. coli* strains differently in different media. The latter study demonstrated a growth defect for a wild type *E. coli* carrying three large plasmids and for its plasmid-containing derivatives, as compared to the plasmidless strains under the same specific environmental conditions. Plasmid losses could explain the decrease in the prevalence of certain virulence and resistance genes that are carried by the latter plasmids. This hypothesis could explain the decrease of *bla_{CMY-2}*, *iucD*, *tetA*, and *tsh* genes in the ProfeedTM and Gallicid STM groups compared to the control group.

In conclusion, although the prevalence of ExPEC genes is not very high among intestinal isolates, their presence in healthy chicken microflora, and the association between the virulence and AMR genes, is a public health concern. In addition, feed ingredients may influence the prevalence of certain specific genes of *E. coli* strains in the intestinal

microflora, although the mechanisms for this effect are not well known. The use of such feed ingredients may help to control fecal excretion of some antimicrobial resistance genes and thus reduce the public health risk.

REFERENCES

1. Abbas Hilmi, H. T., A. Surakka, J. Apajalahti, and P. E. Saris. 2007. Identification of the most abundant lactobacillus species in the crop of 1- and 5-week-old broiler chickens. *Appl Environ Microbiol* 73:7867-73.
2. Bass, L., C. A. Liebert, M. D. Lee, A. O. Summers, D. G. White, S. G. Thayer, and J. J. Maurer. 1999. Incidence and characterization of integrons, genetic elements mediating multiple-drug resistance, in avian *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43:2925-2929.
3. Bjornsdottir, K., F. Breidt, and R. F. Mc Feeters. 2006. Protective effects of organic acids on survival of *Escherichia coli* O157: H7 in acidic environments. *Appl. Environ. Microbiol.* 72:660-664.
4. Boerlin, P., R. Travis, C. L. Gyles, R. Reid-Smith, N. Janecko, H. Lim, V. Nicholson, S. A. McEwen, R. Friendship, and M. Archambault. 2005. Antimicrobial resistance and virulence genes of *Escherichia coli* isolates from swine in Ontario. *Appl. Environ. Microbiol.* 71:6753-6761.
5. Daigle, F., J. Harel, J. M. Fairbrother, and P. Lebel. 1994. Expression and detection of Pap-encoded, Sfa-encoded, and Afa-encoded Fimbrial Adhesin Systems among uropathogenic *Escherichia coli*. *Can. J. Microbiol.* 40:286-291.
6. Daniels, J. B., D. R. Call, D. Hancock, W. M. Sisco, K. Baker, and T. E. Besser. 2009. Role of ceftiofur in selection and dissemination of blaCMY-2-mediated cephalosporin resistance in *Salmonella enterica* and commensal *Escherichia coli* isolates from cattle. *Appl. Environ. Microbiol.* 75:3648-3655.
7. Delicato, E. R., B. G. de Brito, L. C. Gaziri, and M. C. Vidotto. 2003. Virulence-associated genes in *Escherichia coli* isolates from poultry with colibacillosis. *Vet. Microbiol.* 94:97-103.
8. Diarra, M. S., F. G. Silversides, F. Diarrassouba, J. Pritchard, L. Masson, R. Brousseau, C. Bonnet, P. Delaquis, S. Bach, B. J. Skura, and E. Topp. 2007. Impact of

feed supplementation with antimicrobial agents on growth performance of broiler chickens, *Clostridium perfringens* and *Enterococcus* counts, and antibiotic resistance phenotypes and distribution of antimicrobial resistance determinants in *Escherichia coli* isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* 73:6566-6576.

9. Diez-Gonzalez, F., and J. B. Russell. 1999. Factors affecting the extreme acid resistance of *Escherichia coli* O157: H7. *Food Microbiol.* 16:367-374.
10. Donaldson, S. C., B. A. Straley, N. V. Hegde, A. A. Sawant, C. DebRoy, and B. M. Jayarao. 2006. Molecular epidemiology of ceftiofur-resistant *Escherichia coli* isolates from dairy calves. *Appl. Environ. Microbiol.* 72:3940–3948.
11. Dozois, C. M., M. Dho-Moulin, A. Bree, J. M. Fairbrother, C. Desautels, and R. Curtiss. 2000. Relationship between the Tsh autotransporter and pathogenicity of avian *Escherichia coli* and localization and analysis of the tsh genetic region. *Infect. Immun.* 68:4145-4154.
12. Dutil, L., R. Irwin, R. Finley, L. K. Ng, B. Avery, P. Boerlin, A. M. Bourgault, L. Cole, D. Daignault, A. Desruisseau, W. Demczuk, L. Hoang, G. B. Horsman, J. Ismail, F. Jamieson, A. Maki, A. Pacagnella, and D. R. Pillai. 2010. Ceftiofur resistance in *Salmonella enterica* serovar Heidelberg from chicken meat and humans, Canada. *Emerg. Infect. Dis.* 16:48-54.
13. Ewers, C., G. W. Li, H. Wilking, S. Kiessling, K. Alt, E. M. Antao, C. Laturnus, I. Diehl, S. Glodde, T. Homeier, U. Bohnke, H. Steinruck, H. C. Philipp, and L. H. Wieler. 2007. Avian pathogenic, uropathogenic, and newborn meningitis-causing *Escherichia coli*: How closely related are they? *Int. J. Med. Microbiol.* 297:163-176.
14. Fricke, W. F., P. F. McDermott, M. K. Mammel, S. H. Zhao, T. J. Johnson, D. A. Rasko, P. J. Fedorka-Cray, A. Pedroso, J. M. Whichard, J. E. LeClerc, D. G. White, T. A. Cebula, and J. Ravel. 2009. Antimicrobial Resistance-Confering Plasmids with Similarity to Virulence Plasmids from Avian Pathogenic *Escherichia coli* Strains in *Salmonella enterica* Serovar Kentucky Isolates from Poultry. *Appl. Environ. Microbiol.* 75:5963-5971.
15. Government of Canada. Canadian Integrated Program for Antimicrobial Resistance Surveillance (CIPARS) 2007, Guelph, ON: Public Health Agency of Canada, 2010.

16. Gow, S. P., C. L. Waldner, J. Harel, and P. Boerlin. 2008. Associations between antimicrobial resistance genes in fecal generic *Escherichia coli* isolates from cow-calf herds in western Canada. *Appl. Environ. Microbiol.* 74:3658-3666.
17. Guerra, B., E. Junker, A. Schroeter, B. Malorny, S. Lehmann, and R. Helmuth. 2003. Phenotypic and genotypic characterization of antimicrobial resistance in German *Escherichia coli* isolates from cattle, swine and poultry. *J. Antimicrob. Chemother.* 52:489-492.
18. Gyles, C. L. 2008. Antimicrobial resistance in selected bacteria from poultry. *Anim. Health Res. Rev.* 9:149-158.
19. Helling, R. B., T. Kinney, and J. Adams. 1981. The maintenance of Plasmid-containing organisms in populations of *Escherichia coli*. *J. Gen. Microbiol.* 123:129-141.
20. Herrero, M., V. Delorenzo, and J. B. Neilands. 1988. Nucleotide-Sequence of the *lucd* Gene of the Pcolv-K30 Aerobactin Operon and Topology of Its Product Studied with Phoa and Lacz Gene Fusions. *J. Bacteriol.* 170:56-64.
21. Howard, M. D., D. T. Gordon, L. W. Pace, K. A. Garleb, and M. S. Kerley. 1995. Effects of dietary supplementation with fructooligosaccharides on colonic microbiota populations and epithelial cell proliferation in neonatal pigs. *J. Pediatr. Gastroenterol Nutr* 21:297-303.
22. Johnson, T. J., and L. K. Nolan. 2009. Pathogenomics of the virulence plasmids of *Escherichia coli*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 73:750-774.
23. Johnson, T. J., K. E. Siek, S. J. Johnson, and L. K. Nolan. 2005. DNA sequence and comparative genomics of pAPEC-O2-R, an avian pathogenic *Escherichia coli* transmissible R plasmid. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49:4681-4688.
24. Johnson, T. J., K. E. Siek, S. J. Johnson, and L. K. Nolan. 2006. DNA sequence of a ColV plasmid and prevalence of selected plasmid-encoded virulence genes among avian *Escherichia coli* strains. *J. Bacteriol.* 188:745-758.
25. Johnson, T. J., S. J. Johnson, and L. K. Nolan. 2006. Complete DNA sequence of a ColBM plasmid from avian pathogenic *Escherichia coli* suggests that it evolved from closely related ColV virulence plasmids. *J. Bacteriol.* 188:5975-5983.

26. Kim, G. B., Y. M. Seo, C. H. Kim, and I. K. Paik. 2011. Effect of dietary prebiotic supplementation on the performance, intestinal microflora, and immune response of broilers. *Poult Sci* 90:75-82.
27. Kim, T. E., Y. W. Jeong, S. H. Cho, S. J. Kim, and H. J. Kwon. 2007. Chronological study of antibiotic resistances and their relevant genes in Korean avian pathogenic *Escherichia coli* isolates. *J. Clin. Microbiol.* 45:3309-3315.
28. Maynard, C., J. M. Fairbrother, S. Bekal, F. Sanschagrín, R. C. Levesque, R. Brousseau, L. Masson, S. Larivière, and J. Harel. 2003. Antimicrobial resistance genes in enterotoxigenic *Escherichia coli* O149:K91 isolates obtained over a 23-year period from pigs. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47:3214-3221.
29. Mellata, M., J. W. Touchman, and R. Curtiss. 2009. Full Sequence and Comparative Analysis of the Plasmid pAPEC-1 of Avian Pathogenic *E-coli* chi 7122 (O78:K80:H9). *PLoS One* 4:e4232.
30. Mellata, M., K. Ameiss, H. Mo, and R. Curtiss. 2010. Characterization of the Contribution to Virulence of Three Large Plasmids of Avian Pathogenic *Escherichia coli* chi 7122 (O78:K80:H9). *Infect. Immun.* 78:1528-1541.
31. Mellata, M., M. Dho-Moulin, C. M. Dozois, R. Curtiss, B. Lehoux, and J. M. Fairbrother. 2003a. Role of avian pathogenic *Escherichia coli* virulence factors in bacterial interaction with chicken heterophils and macrophages. *Infect. Immun.* 71:494-503.
32. Mellata, M., M. Dho-Moulin, C. M. Dozois, R. Curtiss, P. K. Brown, P. Arne, A. Bree, C. Desautels, and J. M. Fairbrother. 2003b. Role of virulence factors in resistance of avian pathogenic *Escherichia coli* to serum and in pathogenicity. *Infect. Immun.* 71:536-540.
33. Moulin-Schouleur, M., M. Reperant, S. Laurent, A. Bree, S. Mignon-Grasteau, P. Gennon, D. Rasschaert, and C. Schouler. 2007. Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strains of avian and human origin: Link between phylogenetic relationships and common virulence patterns. *J. Clin. Microbiol.* 45:3366-3376.
34. Mühldorfer, I., G. Blum, A. Donohue-Rolfe, H. Heier, T. Olschlager, H. Tschape, U. Wallner, and J. Hacker. 1996. Characterization of *Escherichia coli* strains isolated

- from environmental water habitats and from stool samples of healthy volunteers. *Res. Microbiol.* 147:625-635.
35. Ngeleka, M, L Brereton, G Brown and JM Fairbrother. 2002. Pathotypes of Avian *Escherichia coli* as related to *tsh-*, *pap-*, *pil-* and *iuc-*DNA sequences, and antibiotic sensitivity of isolates from internal tissues and the cloacae of broilers. *Avian Diseases* **46**: 143-152
 36. Patterson, J. A., and K. M. Burkholder. 2003. Application of prebiotics and probiotics in poultry production. *Poult. Sci.* 82:627-631.
 37. Skyberg, J. A., T. J. Johnson, J. R. Johnson, C. Clabots, C. A. Logue, and L. K. Nolan. 2006. Acquisition of avian pathogenic *Escherichia coli* plasmids by a commensal *E. coli* isolate enhances its abilities to kill chicken embryos, grow in human urine, and colonize the murine kidney. *Infect. Immun.* 74:6287-6292.
 38. Smith, J. L., D. J. Drum, Y. Dai, J. M. Kim, S. Sanchez, J. J. Maurer, C. L. Hofacre, and M. D. Lee. 2007. Impact of antimicrobial usage on antimicrobial resistance in commensal *Escherichia coli* strains colonizing broiler chickens. *Appl. Environ. Microbiol.* 73:1404-1414.
 39. Todd, E. C., R. A. Szabo, J. M. MacKenzie, A. Martin, K. Rahn, C. Gyles, A. Gao, D. Alves, and A. J. Yee. 1999. Application of a DNA hybridization-hydrophobic-grid membrane filter method for detection and isolation of verotoxigenic *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 65 (11):4775-4780.
 40. Toth, I., F. Herault, L. Beutin, and E. Oswald. 2003. Production of cytolethal distending toxins by pathogenic *Escherichia coli* strains isolated from human and animal sources: Establishment of the existence of a new *cdt* variant (type IV). *J. Clin. Microbiol.* 41:4285-4291.
 41. Tzortzis, G., M. L. Baillon, G. R. Gibson, and R. A. Rastall. 2004. Modulation of anti-pathogenic activity in canine-derived *Lactobacillus* species by carbohydrate growth substrate. *J Appl Microbiol* 96:552-9.
 42. Van den Bogaard, A. E., N. London, C. Driessen, and E. E. Stobberingh. 2001. Antibiotic resistance of faecal *Escherichia coli* in poultry, poultry farmers and poultry slaughterers. *J. Antimicrob. Chemother.* 47:763-771.

43. Xu, Z. R., C. H. Hu, M. S. Xia, X. A. Zhan, and M. Q. Wang. 2003. Effects of dietary fructooligosaccharides on digestive enzyme activities, intestinal microflora and morphology of male broilers. *Poult. Sci.* 82:1030-1036.
44. Zhao, S., D. G. White, P. F. McDermott, S. Friedman, L. English, S. Ayers, J. Meng, J. J. Maurer, R. Holland, and R. D. Walker. 2001. Identification and expression of cephamycinase bla_(CMY) genes in *Escherichia coli* and *Salmonella* isolates from food animals and ground meat. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45:3647-50.

TABLES

Table I: List of primers used in the PCR and HGMF DNA probe hybridization, single PCR conditions, and control strains.

Virulence factor or antimicrobial	Gene	Primer	Amplicon size(bp)	Annealing T_M	Control strain	Reference
P (PapC)	<i>papC</i>	for 5' GACGGCTGACTGCAGGGTGTGGCG rev 5' ATATCCTTCTGCAGGGATGCAATA	328	60 ⁰ C	ECL 13421	5
Aerobactin	<i>iucD</i>	for 5' AAGTGTCGATTTTATTGGTGTA rev 5' CCATCCGATGTCAGTTTTCTG	778	60 ⁰ C	ECL 3110	20
Tsh	<i>tsh</i>	for 5' GGTGGTGCCTGGAGTGG rev 5' AGTCCAGCGTGATAGTGG	640	55 ⁰ C	ECL 3110	11
Tetracycline	<i>tetA</i>	for 5'GTGAAACCCAACATACCCC rev5'GAAGGCAAGCAGGATGTAG	888	55 ⁰ C	ECL3482	28
Tetracycline	<i>tetC</i>	for 5'GCTGTAGGCATAGGCTTGGT rev5'GCCGGAAGCGAGAAGAATCA	888	60 ⁰ C	PBR322	4
Ampicillin	<i>bla_{TEM}</i>	for 5' GAGTATTCAACATTTTCGT rev 5'ACCAATGCTTAATCAGTGA	857	55 ⁰ C	ECL3482	28
Ampicillin	<i>bla_{SHV}</i>	for 5'TCGCCTGTGTATTATCTCCC rev5'CGCAGATAAATCACCAATG	768	50 ⁰ C	PMON38	28
Ceftiofur	<i>bla_{CMY-2}</i>	for 5' GACAGCCTCTTCTCCACA rev 5' TGGAACGAAGGCTACGTA	1000	50 ⁰ C	ECL3482	44
Streptomycin-spectinomycin	<i>ant(3)Ia (aadA1)</i>	for 5' CATCATGAGGGAAGCGGTG rev 5' GACTACCTTGGTGATCTCG	786	50 ⁰ C	ECL3482	16
Gentamicine	<i>aac(3)-IV</i>	for 5' GTGTGCTGCTGGTCCACAGC rev 5' AGTTGACCCAGGGCTGTCGC	627	55 ⁰ C	ECL3482	28

Table II: List of primers used in the multiplex PCR, PCR conditions and control strains

Virulence factor	Genes	Primer	Amplicon size(bp)	Annealing TM	Control strain	Reference
CNF (multiplex)	<i>cnf</i>	for 5'TTATATAGTCGTC AAGATGGA rev 5'CACTAAGCTTTACAATATTGAC	634	60 ⁰ C	ECL 13421	40
P (PapC)	<i>papC</i>	for 5' GACGGCTGTACTGCAGGGTGTGGCG rev 5' ATATCCTTTCTGCAG GGATGCAATA	328	60 ⁰ C	ECL 13421	5
Aerobactin	<i>iucD</i>	for 5'AAGTGTCGATTTTATTGGTGTA rev 5'CCA TCCGATGTCAGTTTTCTG	778	60 ⁰ C	ECL 3110	20
Tsh	<i>tsh</i>	for 5' GGTGGTGC ACTGGAGTGG rev 5'AGTCCAGCGTGATAGTGG	640	55 ⁰ C	ECL 3110	11

Table III: Prevalence of virulence and AMR genes in caecal samples from growing chickens receiving different feed ingredients, as detected by PCR

Feed ingredient ^a	Number of positive samples (%) for antimicrobial resistance gene ^b :				Number of positive samples (%) for virulence gene ^b :		
	<i>tetA</i> ^c	<i>bla</i> _{TEM} ^c	<i>bla</i> _{CMY-2} ^c	<i>aadA1</i> ^c	<i>iucD</i> ^d	<i>papC</i> ^e	<i>Tsh</i> ^c
Control (n=8)	7 (87)	8 (100)	7 (87)	7 (87)	5 (62)	0 (0)	4 (50)
Profeed TM (n=7)	3 (43)	5 (71)	7 (100)	5 (71)	0 (0)	2 (29)	4 (57)
Galliacid S TM (n=8)	4 (50)	8 (100)	8 (100)	8 (100)	0 (0)	6 (75)	2 (25)
Total (n=23)	14 (61)	21 (91)	22 (96)	20 (87)	5 (22)	8 (35)	10 (44)

^aPrebiotic consisting of specific short chain fructo-oligosaccharides (ProfeedTM) or a patented microencapsulated blend of organic acids and essential oils (Galliacid STM) in poultry feed.

^bGenes detected by single PCR in caecal sample from growing chickens receiving different feed ingredients.

^cThere is no significant difference of prevalence between groups receiving different feed ingredients (Khi2 test)

^dThere is a significant difference of prevalence between groups receiving different feed ingredients (Khi2 test) and the prevalence of the *iucD* positive isolates is significantly higher in the control group than in the ProfeedTM and Galliacid STM groups (P=0.03 in each case) (Fisher exact test).

^eThere is a significant difference of prevalence between groups receiving different feed ingredients (Khi2 test) Prevalence of *papC* positive isolates is significantly lower (P=0.007) in the control group compared to Galliacid STM group. However, there is no significant difference between the Galliacid STM and ProfeedTM groups (Fisher exact test).

Table IV: Prevalence of AMR genes in *E. coli* isolates from the caeca of growing chickens receiving different feed ingredients

Feed ingredient ^c	<i>tetA</i>		<i>bla_{CMY2}</i>		<i>bla_{TEM}</i>		<i>aadA1</i>	
	No isolates		No isolates		No isolates		No isolates	
	Tested ^d	Positive(%)	Tested ^d	Positive(%)	Tested ^d	Positive(%)	Tested ^d	Positive(%)
Control	1170	223(19,1)	1170	171(14,6)	1339	474(35,4)	1072	419(39,1)
Profeed TM	350	66(18,9)	894	16(1,8) ^b	606	156(25,7) ^b	485	179(36,9)
Galliacid S TM	508	29(5,7) ^b	1013	33(3,3) ^b	1013	547(54) ^a	763	393(51,5) ^a
Total	2028	318 (15.7)	3077	220(7.1)	2958	1177(53.4)	2320	991(42.7)

^a Prevalence is significantly higher (P< 0.05) compared to control group

^b Prevalence is significantly lower (P<0.05) compared to the control group

^c Prebiotic consisting of specific short chain fructo-oligosaccharides (ProfeedTM) or a patented microencapsulated blend of organic acids and essential oils (Galliacid STM) in poultry feed

^d Tested by HGMF DNA probe hybridization. The number of isolates tested for each gene depended on the number of positive samples as detected by PCR

NC: Percentage of positive isolated non calculated (isolates of the group have not been tested for the targeted gene)

Table V: Prevalence of AMR gene combinations in *E. coli* isolates from the caeca of growing chickens receiving different feed ingredients.

Feed ingredient ^a	<i>tetA-bla_{TEM}</i>		<i>tetA-aadA1</i>		<i>tetA-bla_{CMY-2}</i>		<i>bla_{TEM}-aadA1</i>		<i>bla_{TEM}-bla_{CMY-2}</i>		<i>aadA1-bla_{CMY-2}</i>	
	No isolates		No isolates		No isolates		No isolates		No isolates		No isolates	
	Tested ^b	Positive (%)	Tested ^b	Positive (%)	Tested ^b	Positive (%)	Tested ^b	Positive (%)	Tested ^b	Positive (%)	Tested ^b	Positive (%)
Control	1170	73 (6.2)	744	48 (6.5)	1170	3 (0.3)	1072	148 (13.8)	1339	26(1.9)	1072	47(4.4)
Profeed TM	199	14 (7)	151	6(4)	253	4(1.6)	112	7 (6.3)	509	0 (0)	548	3(0.6)
Galliacid S TM	508	8(1.6)	508	18(3.5)	508	4(0.8)	763	242(31.7)	1013	2 (0.2)	763	4(0.5)
Total	1877	95(5.1)	1403	72(5.1)	1931	11(0.6)	1947	397 (20.4)	2861	28(1)	2383	54(2.3)

^a Prebiotic consisting of specific short chain fructo-oligosaccharides (ProfeedTM) or a patented microencapsulated blend of organic acids and essential oils (Galliacid STM) in poultry feed.

^bTested by HGMF DNA probe hybridization. The number of isolates tested for each gene combination depended on the number of positive samples as detected by PCR. Only isolates tested for both genes were considered.

Table VI: Association between presence of virulence and AMR genes among *E.coli* isolates from the caeca of growing chickens.

Virulence or AMR gene	Associated virulence or AMR gene	OR ^c	95% CI	P value ^d
<i>iucD</i>	<i>Tsh</i>	14.7 ^a	6.7-31.2	<0.0001
	<i>tetA</i>	1	0.6-1.6	1
	<i>aadA1</i>	1.7 ^a	1.2-2.4	0.004
	<i>bla_{TEM}</i>	0.5 ^b	0.4-0.8	0.001
	<i>bla_{CMY-2}</i>	1.7 ^a	1.1-2.4	0.012
<i>Tsh</i>	<i>tetA</i>	0.6	0.4-1	0.07
	<i>aadA1</i>	0.7	0.4-1.1	0.127
	<i>bla_{TEM}</i>	0.2 ^b	0.1-0.4	<0.0001
	<i>bla_{CMY-2}</i>	2.4	0.9-3.9	0.1
<i>aadA1</i>	<i>tetA</i>	0.7 ^b	0.5-0.9	0.02
	<i>bla_{TEM}</i>	3.1 ^a	2.5-3.8	<0.0001
	<i>bla_{CMY-2}</i>	0.4 ^b	0.3-0.6	<0.0001
<i>bla_{TEM}</i>	<i>tetA</i>	0.6 ^b	0.5-0.8	0.001
	<i>bla_{CMY-2}</i>	0.2 ^b	0.1-0.3	<0.0001

^a Positive association between genes

^b Negative association between genes

^c Odds ratio calculated based on data of gene detection by HGMF DNA probe hybridization, and using XLSTAT 2009 software.

^d P value of Fischer exact test associated to OR calculated using XLSTAT 2009 software. (P < 0.05) is considered statistically significant.

Table VII: Relationship between virotype and presence of AMR gene among 88 *E. coli* isolates from the caeca of growing chickens

Virotype ^b	Total	No of isolates with AMR gene pattern ^a (%)							
		<i>bla</i> _{TEM}	<i>aadA1</i>	<i>tetA</i>	<i>bla</i> _{CMY-2}	<i>tetA:aadA1</i>	<i>bla</i> _{TEM} : <i>aadA1</i>	<i>bla</i> _{TEM} : <i>aadA1</i> : <i>tetA</i>	<i>bla</i> _{TEM} : <i>aadA1</i> : <i>bla</i> _{CMY-2}
<i>iucD</i>	9	6 (67)	7(78)	4(44)	3(33)	2(22)	5(56)	2(22)	1(11)
<i>iucD:tsh</i>	21	5(24)	9(33)	4(19)	2(14)	3(10)	5(24)	1(10)	2(5)
<i>Tsh</i>	3	1(33)	2(67)	1(33)	0(0)	1(33)	1(33)	0(0)	0(0)
<i>iucD:papC</i>	3	0(0)	3(100)	3(100)	0(0)	3(100)	0(0)	0(0)	0(0)
<i>papC</i>	9	3(33)	5(56)	2(22)	0(0)	2(22)	3(33)	1(11)	0(0)
<i>Non-ExPEC</i> ^c	43	32(75)	27(63)	5(12)	5(12)	1(2)	24(56)	0(0)	2(5)
Total	88	47(54)	53(60)	19(22)	10(11)	12(14)	38(43)	4(5)	5(6)

^aResistance gene combination as demonstrated by uniplex PCR. *E. coli* isolates are representative of virulence gene profiles found in caecal samples by HGMF DNA probe hybridization.

^bBased on the presence of ExPEC genes *iucD*, *tsh*, *papC*, and *CNF* as determined by multiplex PCR

^cNegative for ExPEC genes *iucD*, *tsh*, *papC*, and *CNF* as determined by multiplex PCR

Table VIII: Association of AMR to the non-ExPEC isolates from the caeca of growing chickens

	Predictor (Virulence or antimicrobial gene)	OR ^a	95% CI	P value ^b
<i>Non-ExPEC isolate^c</i>	<i>tetA</i>	0.03 ^d	0.1-0.8	0.038
	<i>aadA1</i>	1.23	0.5-2.9	0.668
	<i>bla_{TEM}</i>	6.4 ^e	2.5-16.2	<0.0001
	<i>bla_{CMY-2}</i>	1.05	0.3-3.7	0.795

^a Odds ratio calculated on the basis of data of gene detection by the multiplex PCR on the 88 selected isolates, and using XLSTAT 2009 software.

^b P value of Fischer exact test associated to OR calculated using XLSTAT 2009 software . P < 0.05 is considered statistically significant.

^c Negative for ExPEC genes *iucD*, *tsh*, *papC*, and *CNF* as determined by multiplex PCR

^d Negative association between presence of genes.

^e Positive association between presence of genes.

DISCUSSION

Mise en garde : La notion de prévalence utilisée dans cette étude correspond à la proportion d'échantillons ou d'isolats positifs pour un ou plusieurs gènes de RAM ou de virulence. Il est donc important de prendre en compte le contexte de pression sélective quand il s'agit des groupes ayant reçu des ingrédients alimentaires de même que lorsqu'il s'agit de la prévalence pour la totalité des échantillons. Il est à noter également que les étapes d'enrichissement pourraient également influencer les différentes prévalences.

1. Prévalence des gènes de virulence dans les échantillons des contenus caecaux de volaille en santé, et parmi les isolats d'*E.coli*.

Les résultats de notre étude ont porté d'abord sur la prévalence des gènes de virulence dans les contenus caecaux, plus particulièrement *iucD*, *papC*, et *tsh*. La prévalence des différents gènes de virulence dans les échantillons variait entre 20 et 45%. Ces résultats sont difficilement comparables à ceux des études antérieures puisque la plupart de ces études ont consisté à évaluer la prévalence des gènes dans les isolats d'*E. coli* provenant de volailles en santé ou malades (Delicato et al., 2003 ; Ghanbarpour et al., 2010 , Knöbl et al., 2004; Ewers et al. 2004; Kawano et al., 2006; Rodriguez-Siek et al., 2005). En effet, certains gènes de virulence étant faiblement présents dans les échantillons provenant d'animaux en santé, l'étude de prévalence des gènes de virulence dans les échantillons est d'une grande importance puisqu'elle permet de cibler les échantillons positifs pour ensuite rechercher des isolats d'*E. coli* porteurs de ces gènes (Delicato et al., 2003 ; Bonnet et al 2009 ; McPeake et al., 2005). D'autre part, l'étude de prévalence des gènes dans les échantillons caecaux a permis de montrer clairement l'impact des ingrédients alimentaires sur *papC* et *iucD*.

La détection des gènes de virulence dans les isolats d' *E. coli* a montré qu'environ 20% des isolats provenant des échantillons positifs du caecum du poulet possédaient le gène *iucD*, ce qui est relativement inférieur à la prévalence de 32% rapportée par Bonnet et al., 2009; cependant la même étude a démontré que la prévalence du gène codant pour l'aérobactine est d'environ 10 % parmi les souches commensales d' *E. coli* alors qu' elle est proche de 100% chez les APEC et les ExPEC (Bonnet et al., 2009). Les gènes *papC* et *tsh* ont été trouvés dans des proportions semblables à celles trouvées dans des études précédentes sur des échantillons provenant des volailles en santé (Delicato et al., 2003;

Bonnet et al., 2009). Par contre, dans l'étude de Bonnet et al., 2009; la prévalence de *tsh* était environ 30%, nettement supérieure à celle que nous avons rapportée.

Parmi les isolats testés par PCR pour la détection des 4 gènes de virulence des ExPEC (*CNF*, *iucD*, *papC*, *tsh*), 49% des isolats ne possédaient aucun des gènes de virulence testés, aucun isolat n'était positif à *cnf*, et 51% des isolats possédaient au moins un des 3 gènes de virulence (*iucD*, *papC*, *tsh*). Plus de 2/3 des isolats possédant le gène *iucD* étaient aussi positifs pour *tsh*, ceci s'explique par une association génétique entre ces deux gènes de virulence sur différents plasmides comme le rapporte les études précédentes (Johnson et al., 2006a; Johnson et al., 2006b; Mellata et al., 2009). Cette association et la prévalence de ces plasmides de virulence expliquent également que le virotype *iucD:tsh* était le plus représenté parmi les souches potentiellement virulentes.

2. Prévalence des gènes de résistance aux antimicrobiens dans les échantillons des contenus caecaux de volaille en santé, et parmi les isolats d'*E. coli*

2.1. Prévalence du gène de résistance au ceftiofur (*bla_{CMY-2}*)

Nos résultats montrent que moins de 8% des isolats d'*E. coli* de la flore caecale du poulet étaient porteurs du gène *bla_{CMY-2}*. En effet très peu d'études ont évalué la prévalence de *bla_{CMY-2}* parmi les *E. coli* de la volaille. Cependant, on peut comparer nos résultats à ceux portant sur la prévalence de la résistance au ceftiofur dans les échantillons de volaille, et qui montrent également de faibles prévalences de souches résistantes (Gyles, 2008; Zhao et al., 2005). D'autres études rapportent parmi les souches d'*E. coli* provenant de la volaille en santé, 100% de susceptibilité au ceftiofur (Gyles, 2008; Yang et al 2004; Smith et al., 2007). L'étude de Smith et al., 2007 montre que les traitements antimicrobiens, de même que l'âge des poulets n'affectaient pas la prévalence d'*E. coli* susceptibles au ceftiofur (Smith et al., 2007). Cependant nous avons observé que les ingrédients alimentaires avaient un effet sur la prévalence du gène *bla_{CMY-2}* et que le Profeed™ et le Galliacid S™ ont affecté négativement la présence du gène. Nos résultats se basent sur l'analyse d'un minimum de minimum de 800 isolats dans chaque groupe grâce à l'utilisation de la technique HGMF qui a permis de mettre en évidence les différences.

Même si la prévalence de *bla_{CMY-2}* est assez faible parmi les isolats d'*E. coli*, nos résultats montrent que 96% des échantillons de contenus caecaux sont positifs pour la présence du gène *bla_{CMY-2}*, confirmant l'émergence de la résistance au ceftiofur parmi les souches d'*E. coli* en Amérique du Nord (Dutil et al., 2010; Donaldson et al., 2006). En effet, la résistance au ceftiofur constitue une problématique importante au Canada, cette problématique est d'autant plus inquiétante que le ceftiofur, qui est une céphalosporine de 3^{ème} génération et apparentée aux céphalosporines utilisées dans des traitements de dernier recours chez les humains (http://www.hc-sc.gc.ca/dhp-mps/consultation/vet/consultations/amr_ram_hum-med-fra.php), est aussi utilisée comme traitement prophylactique au Canada dans les couvoirs (Dutil et al., 2010). D'autre part, les études précédentes rapportent une émergence de la résistance au ceftiofur parmi les isolats de *Salmonella*. La proportion des souches résistantes au ceftiofur est souvent plus élevée chez les isolats de *Salmonella* que chez les isolats d'*E. coli* (Dutil et al., 2010; Gyles, 2008). Ceci pourrait expliquer en partie pourquoi le gène *bla_{CMY-2}* a été détecté dans 96% des échantillons, comparativement à la faible prévalence trouvée parmi les isolats d'*E. coli*. De plus aucun isolat positif n'a été détecté dans 3 des 22 échantillons positifs, malgré l'utilisation de la technique HGMF qui permet de cibler jusqu'à 200 isolats par échantillon.

2.2. Prévalence des gènes de résistance à l'ampicilline (*bla_{TEM}*, *bla_{SHV}*)

Le gène *bla_{TEM}* a été détecté dans 91% des échantillons de contenus caecaux analysés, alors le gène *bla_{SHV}* n'a été détecté dans aucun des échantillons. En effet le gène *bla_{TEM}* est le plus représentatif de la résistance à l'ampicilline, et la prévalence est importante parmi les isolats d'*E. coli* (Guerra et al., 2003; Kim et al., 2007; Maynard et al., 2003; Bonnet et al., 2009). La détection du gène *bla_{TEM}* parmi les isolats d'*E. coli* a montré qu'environ 50% des isolats étaient porteurs du gène, ce qui représente une forte prévalence comparativement aux résultats rapportés par Bonnet et al., 2009 (Bonnet et al., 2009) et relativement proche des niveaux de prévalence du gène parmi les APEC (Kim et al., 2007). Des niveaux de prévalence beaucoup plus élevés ont été rapportés également parmi les ETEC du porc (Maynard et al., 2003) et parmi des isolats d'*E. coli* provenant du poulet, du porc et des bovins laitiers (Guerra et al., 2003). Les résultats de 50% de prévalence du gène *bla_{TEM}* parmi les isolats suppose cependant une prévalence de souches résistantes à

l'ampicilline encore plus forte, en effet Rosengren et al., 2009 a démontré que seulement 60% des souches d' *E. coli* résistants à l' ampicilline sont porteurs du gène *bla_{TEM}* (Rosengren et al., 2009). D'autre part, on peut remarquer que les prévalences rapportées par les différentes études sont très variables selon les pays et sont parfois le reflet de situations particulières (Gyles, 2008).

Nos résultats montrent également un impact des ingrédients alimentaires sur la prévalence du gène *bla_{TEM}*. En effet, la prévalence du gène est plus faible dans le groupe recevant le Profeed comparativement au groupe témoin, mais plus élevé dans le groupe Galliacid comparativement au groupe contrôle, ce qui suppose un effet inhibiteur du Profeed et un effet sélectif du Galliacid sur des clones particuliers porteurs de ce gène.

2.3. Prévalence des gènes de résistance de la streptomycine et de la spectinomycine (*aadA1*)

Nos résultats montrent que le gène *aadA1* est présent dans plus de 80% des échantillons de contenus caecaux, mais également dans plus de 40% des isolats d'*E. coli*. Ces niveaux de prévalence confirment la forte proportion des souches d'*E. coli* résistantes à la streptomycine et à la spectinomycine (Maynard et al., 2003 Boerlin et al., 2005 ; Blanco et al ., 1997, Gyles, 2008). Des niveaux de prévalence d'*E. coli* résistants à la streptomycine sont encore plus élevés quand il s'agit des souches APEC, dépassant les 80% (Blanco et al ., 1997, Gyles, 2008). La proportion de 40% des isolats porteurs du gène suppose une prévalence bien supérieure des souches résistantes puisque le gène *aadA1* n'est responsable que d'une partie de la résistance à la streptomycine et la spectinomycine. En effet les principaux gènes de résistance qui codent pour la streptomycine et la spectinomycine sont *strA*, *strB* et *aadA1*, (Boerlin et al.,2005 ; Barlow et al.,2004). En outre la présence des gènes *aadA1* est souvent associé à l'intégron 1 qui code pour la résistance de plusieurs antimicrobiens chez les souches d'*E.coli* (Boerlin et al., 2005 ; Barlow et al.,2004).

Nos résultats montrent qu'il n'y a pas de différence significative entre la prévalence du gène *aadA1* dans le groupe contrôle comparativement au groupe Profeed. Cependant, la

prévalence du gène *aadA1* est significativement supérieure dans le groupe Galliacid comparativement au contrôle, ce qui suppose un effet sélectif du Galliacid sur des clones particuliers porteurs de ce gène. Une étude précédente de Smith et al., 2007 montre également que la prévalence de souches résistantes à la streptomycine peut varier sensiblement en fonction des traitements antimicrobiens reçus par la volaille (Smith et al., 2007).

2.4. Prévalence des gènes de résistance à la tétracycline (*tetA*, *tetC*) parmi les isolats d'*E. coli* du caecum du poulet

Nos résultats montrent que le gène *tetA* est présent dans 60% des échantillons de contenus caecaux alors que *tetC* n'a été détecté dans aucun des échantillons. La résistance à la tétracycline est codée par plus d'une trentaine de gènes différents mais les plus courant sont *tetA* et *tetB* (Smith et al., 2007; Rosengren et al., 2009). Suivant les études, la prévalence de *tetC* dans les isolats d'*E.coli* est généralement assez faible, mais dans certains cas peut atteindre les 25% (Rosengren et al., 2009; Maynard et al., 2003; Bonnet et al., 2009). Nos résultats montrent une prévalence de *tetA* parmi les isolats d'*E. coli* relativement faible comparativement aux résultats d'études précédentes. La tétracycline est un des antimicrobiens les plus largement utilisés en production animale, et de fortes proportions de souches d'*E. coli* résistantes à la tétracycline sont observées chez la plus part des espèces d'élevage (Maynard et al., 2003 ; Boerlin et al., 2005 ; Blanco et al., 1997; Gyles, 2008). La prévalence des souches résistantes à la tétracycline parmi les APEC, dépassent parfois les 80% dans plusieurs études (Blanco et al., 1997; Gyles, 2008)

En effet Gyles, 2008 rapporte que dans plusieurs pays comprenant le Canada et les États - Unis la proportion des souches résistantes à la tétracycline est supérieure à 50%. Mais il est important de relativiser le faible niveau de prévalence de la prévalence de *tetA* puisque la résistance à la tétracycline est codée par plus d'une trentaine de gènes différents (Smith et al., 2007). De plus, la prévalence du gène *tetA* avoisine les 20% dans les groupes contrôle et Profeed.

3. Association entre gènes de virulence ou gènes de résistance aux antimicrobiens des populations d'*E. coli* du caecum du poulet

Nos résultats démontrent une association positive entre le gène de virulence *iucD* et le gène *bla_{CMY-2}* ce qui suggère que la problématique de la résistance au ceftiofur est d'une importance capitale, et confirme le besoin de surveillance de la résistance au ceftiofur. En effet, les études précédentes ont démontré que certaines souches de *Salmonella* et d'*E. coli* possèdent un plasmide similaire porteur du gène *bla_{CMY-2}* (Daniels et al., 2009). Il a été démontré que *bla_{CMY-2}* est porté par le plasmide pCVM29188_101 isolé chez *Salmonella kentucky* (Fricke et al., 2009). Ce dernier plasmide coexiste avec le plasmide pCV M29188_146 porteur du gène *iucD*, et les deux plasmides sont transférables par conjugaison, seuls ou ensemble, chez *E. coli*. Il faut noter également que pCVM29188_146 présente une grande similitude avec pAPEC-O1-ColBM et pAPEC-O2-ColV et ces deux derniers plasmides sont aussi porteurs du gène *iucD* (Fricke et al., 2009; Johnson et al., 2006a; Johnson et al., 2006b). L'association entre *iucD* et *bla_{CMY-2}* dans les isolats d'*E. coli* suggère une possible coexistence du plasmide pCVM29188_101 porteur du gène *bla_{CMY-2}* avec les plasmides pAPEC-O1-ColBM, pAPEC-O2-ColV ou encore pCVM29188_146, porteurs du gène *iucD*.

Les résultats montrent aussi une forte association entre les gènes *iucD* et *tsh* confirmant les études précédentes et suggérant la présence des plasmides portant ces deux gènes de virulence comme pAPEC-O1-ColBM, pAPEC-O2-ColV ou pAPEC-1 qui sont très communs aux APEC (Johnson et al., 2006a; Johnson et al., 2006b; Mellata et al., 2009).

Nos résultats montrent que la proportion des isolats qui portent le gène *tetA* est plus importante parmi les isolats ExPEC comparativement aux isolats non-ExPEC (confère article, Tableau VII) et le calcul des OR a confirmé une association négative entre le gène *tetA* et les isolats non-ExPEC (confère article, Tableau VIII). Des études similaires sur les

EPEC ont démontré que *tetA* était plus souvent associé aux isolats EPEC comparativement aux isolats non-EPEC.

Les résultats montrent que *aadA1* et *bla_{TEM}* sont statistiquement associés, il est donc possible que les deux gènes soient portés par le même support génétique comme le plasmide de résistance associé pAPECO2-R (Johnson et al., 2005).

4. Impact des ingrédients alimentaires sur les populations d'*E. coli* dans le caecum du poulet

Nos études de prévalence montrent qu'il existe des différences significatives entre les différents groupes. Nous suspectons donc que le Profeed™ et le Galliacid S™ ont des effets inhibiteurs ou sélectifs sur des clones particuliers d'*E. coli* comme ceux rapportés par des études précédentes (Bjornsdottir et al., 2006; Diez-Gonzalez and Russell., 1999). Nos résultats montrent que le Profeed et le Galliacid font baisser de façon drastique la prévalence de *bla_{CMY-2}* parmi les isolats d'*E. coli* (réfère à l'article, Tableau IV) et que le gène *iucD* est absent dans les groupes Galliacid et Profeed (réfère à l'article, Tableau III). Ces résultats suggèrent que les deux ingrédients alimentaires inhibent la croissance de clones particuliers dont ceux porteurs des gènes *bla_{CMY-2}* et *iucD*. D'autre part, les prévalences des deux gènes *bla_{TEM}* et *aadA1* ont augmenté ensemble sous l'effet du Galliacid comparativement au groupe témoin, et ont diminué ensemble sous l'effet du Profeed. Ce qui implique que *bla_{TEM}* et *aadA1* augmentent et diminuent ensemble sous les mêmes conditions. En outre, le calcul des OR montre que les isolats non-ExPEC sont statistiquement associés à *bla_{TEM}* et 75% des isolats non-ExPEC portent le gène *bla_{TEM}* (réfère à l'article, Tableaux VII et VIII). Il semble donc que le Galliacid a une action sélective sur les clones non-ExPEC dont une proportion importante porte les gènes de résistance *bla_{TEM}* et *aadA1*.

Les études précédentes ont démontré que les effets des acides organiques sur les souches d'*E. coli* peuvent varier de façon importante. En effet, il a été démontré que des souches d'*E. coli* O157:H7 tolèrent plus l'acétate au pH 5.9 que la souche d'*E. coli* K-12 (Diez-

Gonzalez and Russell., 1999. Il a été également démontré qu'une faible concentration (5 mM) d'acide acétique, malique ou d'acide L-lactique a un effet protecteur pour *E. coli* O157:H7 (Bjornsdottir et al., 2006). Par conséquent, on peut suggérer l'hypothèse que différentes souches d'*E. coli* sont affectées différemment par le Galliacid STM. Le mécanisme d'inhibition par les acides organiques a été expliqué par le passage de l'acide dans le cytoplasme entraînant une baisse du pH. L'effet sélectif des ingrédients alimentaires est connu, mais les mécanismes ne sont pas complètement élucidés

Plusieurs hypothèses sont avancées mais la plus plausible c'est l'inhibition des pathogènes par des mécanismes de compétition des sites de colonisation, et pour les nutriments, la production de composantes toxiques ou encore la stimulation du système immunitaire (Patterson and Burkholder, 2003)

Un effet, sélectif peut donc expliquer l'augmentation de la prévalence des isolats positifs à *aadA1* et *bla_{TEM}* dans le groupe Galliacid comme le démontre les résultats (confère article, Tableau IV). La sélectivité et l'inhibition vis-à-vis de certaines souches d'*E. coli* dans le caecum pourraient également être dues à la présence de plasmides spécifiques parmi les isolats d'*E. coli*. En effet Helling et al., 1981 a montré que la présence de certains plasmides pouvait limiter la croissance d'*E. coli* en culture continue dans un environnement limité en carbone, et que la proportion des bactéries possédant ces plasmides diminuait initialement. Cependant, ils ont observé de façon périodique des changements adaptatifs, avec une augmentation du rythme de croissance des bactéries contenant des plasmides (Helling et al., 1981). L'hypothèse d'une régulation de la croissance par les plasmides a été aussi évoqué par Mellata et al., 2010, montrant que les plasmides pAPEC-1 et pAPEC-2 régulent la croissance d'*E. coli* différemment selon les milieux. Cette étude a également démontré que dans certaines conditions environnementales, on observe une inhibition de la croissance des souches d'*E. coli* possédant 3 plasmides comparativement aux souches possédant aucun plasmide (Mellata et al., 2010).

La perte de certains plasmides est aussi une hypothèse pouvant expliquer la diminution de prévalence de certains gènes de virulence et de résistance portée par ces mêmes

plasmides. Cette hypothèse pourrait donc expliquer une diminution de gènes *bla_{CMY-2}*, *iucD*, *tetA*, et *tsh* dans les groupes Profeed et Galliacid comparativement au groupe contrôle.

CONCLUSION

Nos résultats confirment ceux de plusieurs autres études qui rapportent de façon générale des prévalences élevées de la RAM d'*E. coli*. Cette étude montre également que les prévalences des gènes ExPEC sont relativement faibles comparés aux prévalences des gènes de résistance aux antimicrobiens dans les échantillons de contenus caecaux et dans les isolats d'*E. coli* de la volaille en santé. D'autre part cette étude montre que la technique HGMF constitue un excellent outil de recherche. Elle présente l'avantage de donner un reflet plus fidèle de la représentativité des différentes souches d'*E. coli* dans un même échantillon. Elle est particulièrement recommandée dans la recherche des souches qui sont sous représentées dans une population comme celles portant des gènes de virulence d'échantillons d'animaux en santé. En ciblant un grand nombre d'isolats d'*E. coli* dans un échantillon, cette technique permet de mettre en évidence les associations qui auraient été difficilement détectées en utilisant les méthodes traditionnelles basées sur la sélection de cinq isolats par échantillon.

Même si la prévalence des gènes ExPEC n'est pas très élevée dans les échantillons de contenus caecaux et dans les isolats d'*E. coli*, leur présence dans la microflore de la volaille en santé et l'association entre certains gènes de virulence et les gènes de RAM est un problème important de santé publique. Les résultats de prévalence du gène de virulence *iucD* et son association avec *bla_{CMY-2}* dans les isolats constitue un des principaux un sujet d'inquiétude en considérant la probabilité que ces deux gènes soient sur le même plasmide. En outre cette étude a démontré que les ingrédients alimentaires peuvent influencer la prévalence de certains gènes d'*E. coli* dans la flore intestinale. L'interprétation des résultats de prévalence dans cette étude doit donc tenir compte de la pression sélective des ingrédients alimentaires. Différentes hypothèses ont été avancées pour expliquer comment les ingrédients alimentaires peuvent affecter la prévalence des gènes spécifiques d'*E. coli* dans la flore intestinale. Cependant nos résultats apportent une explication partielle à la diminution de la prévalence des isolats porteurs de ces gènes sous l'effet des ingrédients alimentaires. Par conséquent les perspectives pour compléter cette étude nécessitent une étude plus poussée du profil génomique des différentes souches d'*E. coli* et la recherche des différents plasmides parmi ces souches, de même que le comportement physiologique des différentes souches sous l'effet du Profeed™ et du

Galliacid STM. L'effet de ces deux ingrédients alimentaires sur les isolats porteurs de gènes de RAM et de virulence qui a été démontré dans cette étude laissent envisager la possibilité de substituer certains antimicrobiens utilisés comme promoteurs de croissance ou comme agents prophylactiques par des ingrédients alimentaires dans un contexte réduction de l'utilisation des antimicrobiens dans les élevages.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Achtman, M., A. Mercer, B. Kusecek, A. Pohl, M. Heuzenroeder, W. Aaronson, A. Sutton, and R. P. Silver. 1983. Six widespread bacterial clones among *Escherichia coli* K1 isolates. *Infect Immun* 39:315-335.

Allan, B. J., J. V. van den Hurk, and A. A. Potter. 1993. Characterization of *Escherichia coli* isolated from cases of avian colibacillosis. *Can J Vet Res* 57:146-151.

Allen, V. M., F. Fernandez, and M. H. Hinton. 1997. Evaluation of the influence of supplementing the diet with mannose or palm kernel meal on *Salmonella* colonisation in poultry. *Br Poult Sci* 38:485-488.

Amabile de Campos, T., E. G. Stehling, A. Ferreira, A. F. Pestana de Castro, M. Brocchi, and W. Dias da Silveira. 2005. Adhesion properties, fimbrial expression and PCR detection of adhesin-related genes of avian *Escherichia coli* strains. *Vet Microbiol* 106:275-285.

Arp L.H. and A.E. Jensen. 1980. Piliation, hemagglutination, motility, and generation time of *Escherichia coli* that are virulent or avirulent of turkeys. *Avian Dis* 24:153-161.

Bailey, J. K., J. L. Pinyon, S. Anantham, and R. M. Hall. 2011. Distribution of the blaTEM gene and blaTEM-containing transposons in commensal *Escherichia coli*. *J Antimicrob Chemother* 66:745-751.

Bailey, J. S., L. C. Blankenship, and N. A. Cox. 1991. Effect of fructooligosaccharide on *Salmonella* colonization of the chicken intestine. *Poult Sci* 70:2433-2438.

Barlow, R. S., J. M. Pemberton, P. M. Desmarchelier, and K. S. Gobius. 2004. Isolation and characterization of integron-containing bacteria without antibiotic selection. *Antimicrob. Agents Chemother* 48:838-842.

Barondess, J. J., and J. Beckwith. 1990. A bacterial virulence determinant encoded by lysogenic coliphage lambda. *Nature* 346:871-874.

Bass, L., C. A. Liebert, M. D. Lee, A. O. Summers, D. G. White, S. G. Thayer, and J. J. Maurer. 1999. Incidence and characterization of integrons, genetic elements mediating multiple-drug resistance, in avian *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother* 43:2925-2929.

Bäumler, A. J., T. L. Norris, T. Lasco, W. Voight, R. Reissbrodt, W. Rabsch, and F. Heffron. 1998. IroN, a novel outer membrane siderophore receptor characteristic of *Salmonella enterica*. *J Bacteriol* 180:1446-1453.

Bekal, S., R. Brousseau, L. Masson, G. Prefontaine, J. Fairbrother, and J. Harel. 2003. Rapid identification of *Escherichia coli* pathotypes by virulence gene detection with DNA microarrays. *J Clin Microbiol* 41:2113-2125.

Berchieri, A., Jr., and P. A. Barrow. 1996. Reduction in incidence of experimental fowl typhoid by incorporation of a commercial formic acid preparation (Bio-Add) into poultry feed. *Poult Sci* 75:339-341.

Beutin, L. 1999. *Escherichia coli* as a pathogen in dogs and cats. *Vet Res* 30:285-298.

Binns, M. M., D. L. Davies, and K. G. Hardy. 1979. Cloned fragments of the plasmid ColV, I-K94 specifying virulence and serum resistance. *Nature* 279:778-781.

Bjornsdottir, K., F. Breidt, and R. F. Mc Feeters. 2006. Protective effects of organic acids on survival of *Escherichia coli* O157: H7 in acidic environments. *Appl. Environ. Microbiol* 72:660-664.

Bjurstrom, L. 1993. Aerobic bacteria occurring in the vagina of bitches with reproductive disorders. *Acta Vet. Scand* 34:29-34.

Blanco, J. E., M. Blanco, A. Mora, and J. Blanco. 1997. Production of toxins (enterotoxins, verotoxins, and necrotoxins) and colicins by *Escherichia coli* strains isolated from septicemic and healthy chickens: relationship with in vivo pathogenicity. *J Clin Microbiol* 35:2953-2957.

Blanco, J. E., M. Blanco, A. Mora, W. H. Jansen, V. Garcia, M. L. Vazquez, and J. Blanco. 1998. Serotypes of *Escherichia coli* isolated from septicaemic chickens in Galicia (northwest Spain). *Vet Microbiol* 61:229-235

Blum, G., V. Falbo, A. Caprioli, and J. Hacker. 1995. Gene clusters encoding the cytotoxic necrotizing factor type 1, Prs-fimbriae and alpha-hemolysin form the pathogenicity island II of the uropathogenic *Escherichia coli* strain J96. *FEMS Microbiol Lett* 126:189-195.

Boerlin, P., R. Travis, C. L. Gyles, R. Reid-Smith, N. Janecko, H. Lim, V. Nicholson, S. A. McEwen, R. Friendship, and M. Archambault. 2005. Antimicrobial resistance and virulence genes of *Escherichia coli* isolates from swine in Ontario. *Appl Environ Microbiol* 71:6753-6761.

Bonnet, C., F. Diarrassouba, R. Brousseau, L. Masson, E. Topp, and M. S. Diarra. 2009. Pathotype and antibiotic resistance gene distributions of *Escherichia coli* isolates from broiler chickens raised on antimicrobial-supplemented diets. *Appl Environ Microbiol* 75:6955-6962.

Bruant, G., C. Maynard, S. Bekal, I. Gaucher, L. Masson, R. Brousseau, and J. Harel. 2006. Development and validation of an oligonucleotide microarray for detection of multiple virulence and antimicrobial resistance genes in *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* 72:3780-3784.

Bywater, R. J. 2005. Identification and surveillance of antimicrobial resistance dissemination in animal production. *Poult Sci* 84:644-648.

Carattoli, A. 2009. Resistance plasmid families in Enterobacteriaceae. *Antimicrob Agents Chemother* 53:2227-2238.

Carbonetti, N. H., and P. H. Williams. 1984. A cluster of five genes specifying the aerobactin iron uptake system of plasmid ColV-K30. *Infect Immun* 46:7-12.

Caza, M., F. Lepine, S. Milot, and C. M. Dozois. 2008. Specific roles of the iroBCDEN genes in virulence of an avian pathogenic *Escherichia coli* O78 strain and in production of salmochelins. *Infect Immun* 76:3539-3549.

Cerqueira-Campos, M. L., P. I. Peterkin, and A. N. Sharpe. 1986. Improved immunological membrane filter method for detection of food-borne *Salmonella* strains. *Appl Environ Microbiol* 52:124-127.

- Chen, S. T., and R. C. Clowes. 1987. Variations between the nucleotide sequences of Tn1, Tn2, and Tn3 and expression of beta-lactamase in *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 169:913-916.
- Cherrington, C. A., M. Hinton, and I. Chopra. 1990. Effect of short-chain organic acids on macromolecular synthesis in *Escherichia coli*. *J Appl Bacteriol* 68:69-74.
- Cherrington, C. A., M. Hinton, G. C. Mead, and I. Chopra. 1991. Organic acids: chemistry, antibacterial activity and practical applications. *Adv Microb Physiol* 32:87-108.
- Chopra, I., and M. Roberts. 2001. Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiol Mol Biol Rev* 65:232-260
- Chuba, P.J., Palchadhuri, S. and Leon, M.A. 1986. Contributions of *traT* and *iss* genes to the serum resistance phenotype of plasmid ColV2-K94. *FEMS Microbiol Lett* 37:135–140.
- Chung, C. H., and D. F. Day. 2002. Glucooligosaccharides from *Leuconostoc mesenteroides* B-742 (ATCC 13146): a potential prebiotic. *J Ind Microbiol Biotechnol* 29:196-199.
- Chung, C. H., and D. F. Day. 2004. Efficacy of *Leuconostoc mesenteroides* (ATCC 13146) isomaltooligosaccharides as a poultry prebiotic. *Poult Sci* 83:1302-1306.
- Cloud, S. S., J. K. Rosenberger, P. A. Fries, R. A. Wilson, and E. M. Odor. 1985. In vitro and in vivo characterization of avian *Escherichia coli*. I. Serotypes, metabolic activity, and antibiotic sensitivity. *Avian Dis* 29:1084-1093.
- Corrier, D. E., B. M. Hargis, A. Hinton, Jr., and J. R. DeLoach. 1993. Protective effect of used poultry litter and lactose in the feed ration on *Salmonella* Enteritidis colonization of leghorn chicks and hens. *Avian Dis* 37:47-52.
- Cummings, J. H., and G. T. Macfarlane. 2002. Gastrointestinal effects of prebiotics. *Br J Nutr* 87 Suppl 2:S145-151.
- Datta, A. R., B. A. Wentz, and W. E. Hill. 1987. Detection of hemolytic *Listeria monocytogenes* by using DNA colony hybridization. *Appl Environ Microbiol* 53:2256-2259.

- Davidson, P. M. 2001. Chap. 29. Chemical preservatives and natural antimicrobial compounds. Pages 593–627 in *Food Microbiology-Fundamentals and Frontiers*. 2nd ed. M. P. Doyle, L. R. Beuchat, and T. J. Montville, ed. American Society for Microbiology, Washington, DC.
- De Brito, B. G., L. C. Gaziri, and M. C. Vidotto. 2003. Virulence factors and clonal relationships among *Escherichia coli* strains isolated from broiler chickens with cellulitis. *Infect Immun* 71:4175-4177.
- De Lorenzo, V., A. Bindereif, B. H. Paw, and J. B. Neilands. 1986. Aerobactin biosynthesis and transport genes of plasmid ColV-K30 in *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* 165:570-578.
- Delicato, E. R., B. G. de Brito, L. C. Gaziri, and M. C. Vidotto. 2003. Virulence-associated genes in *Escherichia coli* isolates from poultry with colibacillosis. *Vet Microbiol* 94:97-103.
- Dho-Moulin, M., and J.M. Fairbrother. 1999. Avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC). *Vet. Res* 30:299-316.
- Dibner, J. J., and J. D. Richards. 2005. Antibiotic growth promoters in agriculture: History and mode of action. *Poult. Sci.*84:634–643.
- Diez-Gonzalez, F., and J. B. Russell. 1999. Factors affecting the extreme acid resistance of *Escherichia coli* O157: H7. *Food Microbiol* 16:367-374.
- Donaldson, S. C., B. A. Straley, N. V. Hegde, A. A. Sawant, C. DebRoy, and B. M. Jayarao. 2006. Molecular epidemiology of ceftiofur-resistant *Escherichia coli* isolates from dairy calves. *Appl. Environ. Microbiol* 72:3940–3948.
- Doyle, M. P., and M. C. Erickson. 2006. Reducing the carriage of foodborne pathogens in livestock and poultry. *Poult Sci* 85:960-973.
- Dozois, C. M., J. M. Fairbrother, J. Harel, and M. Bosse. 1992. pap-and pil-related DNA sequences and other virulence determinants associated with *Escherichia coli* isolated from septicemic chickens and turkeys. *Infect Immun* 60:2648-2656.

Dozois, C. M., M. Dho-Moulin, A. Bree, J. M. Fairbrother, C. Desautels, and R. Curtiss, 3rd. 2000. Relationship between the Tsh autotransporter and pathogenicity of avian *Escherichia coli* and localization and analysis of the Tsh genetic region. *Infect Immun* 68:4145-4154.

Duguid, J. P. and D. C. Old. 1980. Adhesive properties of Enterobacteriaceae. *In* Bacterial adherence, (Receptors and recognition, series B, vol. 6), edited by E. H. Beachey, Chapman and Hall, London.

Dunlop, R. H., S. A. McEwen, A. H. Meek, R. C. Clarke, R. M. Friendship, W. D. Black, and A. N. Sharpe. 1998. Measurement of antimicrobial-resistant *Escherichia coli* in pig feces with a hydrophobic grid membrane filter interpreter system. *Appl Environ Microbiol* 64:366-369.

Durant, J.A., Corrier, D.E. and Ricke, S.C. 2000. Short-chain volatile fatty modulate the expression of the hilA and invF genes of *Salmonella* Typhimurium. *J Food Prot* 63:573-578.

Dutil, L., R. Irwin, R. Finley, L. K. Ng, B. Avery, P. Boerlin, A. M. Bourgault, L. Cole, D. Daignault, A. Desruisseau, W. Demczuk, L. Hoang, G. B. Horsman, J. Ismail, F. Jamieson, A. Maki, A. Pacagnella, and D. R. Pillai. 2010. Ceftiofur resistance in *Salmonella enterica* serovar Heidelberg from chicken meat and humans, Canada. *Emerg. Infect. Dis.* 16:48-54.

Edelman, S., S. Leskela, E. Ron, J. Apajalahti, and T. K. Korhonen. 2003. In vitro adhesion of an avian pathogenic *Escherichia coli* O78 strain to surfaces of the chicken intestinal tract and to ileal mucus. *Vet Microbiol* 91:41-56.

Eklund, T. 1983. The antimicrobial effect of dissociated and undissociated sorbic acid at different pH levels. *J Appl Bacteriol* 54:383-389.

Emery, D. A., K. V. Nagaraja, D. P. Shaw, J. A. Newman, and D. G. White. 1992. Virulence factors of *Escherichia coli* associated with colisepticemia in chickens and turkeys. *Avian Dis* 36:504-511.

Ewers, C., G. Li, H. Wilking, S. Kiessling, K. Alt, E. M. Antao, C. Laternus, I. Diehl, S. Glodde, T. Homeier, U. Bohnke, H. Steinruck, H. C. Philipp, and L. H. Wieler. 2007. Avian

pathogenic, uropathogenic, and newborn meningitis-causing *Escherichia coli*: how closely related are they? *Int J Med Microbiol* 297:163-176.

Ewers, C., T. Janssen, S. Kiessling, H. C. Philipp, and L. H. Wieler. 2004. Molecular epidemiology of avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) isolated from colisepticemia in poultry. *Vet Microbiol* 104:91-101.

Fairbrother, J.M. 1993. Les colibacillooses du porc .*Ann. Méd.Vét* 137:369-375.

Fernandez, F., M. Hinton, and B. Van Gils. 2000. Evaluation of the effect of mannan-oligosaccharides on the competitive exclusion of *Salmonella* EEnteritidis colonization in broiler chicks. *Avian Pathol* 29:575-581.

Fernandez, F., M. Hinton, and B. Van Gils. 2002. Dietary mannan-oligosaccharides and their effect on chicken caecal microflora in relation to *Salmonella* Enteritidis colonization. *Avian Pathol* 31:49-58.

Foster, J. W., and H. K. Hall. 1992. Effect of *Salmonella* Ttyphimurium ferric uptake regulator (fur) mutations on iron- and pH-regulated protein synthesis. *J Bacteriol* 174:4317-4323.

Foster, J. W., Y. K. Park, I. S. Bang, K. Karem, H. Betts, H. K. Hall, and E. Shaw. 1994. Regulatory circuits involved with pH-regulated gene expression in *Salmonella* Ttyphimurium. *Microbiology* 140:341-352.

Fricke, W. F., P. F. McDermott, M. K. Mammel, S. Zhao, T. J. Johnson, D. A. Rasko, P. J. Fedorka-Cray, A. Pedroso, J. M. Whichard, J. E. Leclerc, D. G. White, T. A. Cebula, and J. Ravel. 2009. Antimicrobial resistance-conferring plasmids with similarity to virulence plasmids from avian pathogenic *Escherichia coli* strains in *Salmonella enterica* serovar Kentucky isolates from poultry. *Appl Environ Microbiol* 75:5963-5971.

Fukata, T., K. Sasai, T. Miyamoto, and E. Baba. 1999. Inhibitory effects of competitive exclusion and fructooligosaccharide, singly and in combination, on *Salmonella* colonization of chicks. *J Food Prot* 62:229-233.

Ghanbarpour, R., M. Sami, M. Salehi, and M. Ouromiei. 2011. Phylogenetic background and virulence genes of *Escherichia coli* isolates from colisepticemic and healthy broiler chickens in Iran. *Trop Anim Health Prod* 43:153-157.

Gibson, G. R., and M. B. Roberfroid. 1995. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *J Nutr* 125:1401-1412.

Goussard, S., W. Sougakoff, C. Mabilat, A. Bauernfeind, and P. Courvalin. 1991. An IS1-like element is responsible for high-level synthesis of extended-spectrum beta-lactamase TEM-6 in Enterobacteriaceae. *J Gen Microbiol* 137:2681-2687.

Gross W.B. 1991. Colibacillosis, p.138-144. In: Calnek B.W., Barnes H.J., Beard C.W., Reid W.M. & Yoder J.H.W. (Eds), Disease of Poultry. 9th ed. Iowa State University Press, Ames.

Gross, W. B. 1994. Diseases due to *Escherichia coli* in poultry, p. 237–259. In C. L. Gyles (ed.), *Escherichia coli* in domestic animals and man. CAB International, Wallingford, United Kingdom.

Guban,J., D. R. Korver, G. E. Allison, and G. W. Tannock. 2007. Relationship of Dietary Antimicrobial Drug Administration with Broiler Performance, Decreased Population Levels of *Lactobacillus salivarius*, and Reduced Bile Salt Deconjugation in the Ileum of Broiler Chickens *Poult Sci* 86:2466–2471

Guerra, B., E. Junker, A. Schroeter, B. Malorny, S. Lehmann, and R. Helmuth. 2003. Phenotypic and genotypic characterization of antimicrobial resistance in German *Escherichia coli* isolates from cattle, swine and poultry. *J. Antimicrob. Chemother* 52:489-492.

Guo, F. C., B. A. Williams, R. P. Kwakkel, H. S. Li, X. P. Li, J. Y. Luo, W. K. Li, and M. W. Verstegen. 2004. Effects of mushroom and herb polysaccharides, as alternatives for an antibiotic, on the cecal microbial ecosystem in broiler chickens. *Poult Sci* 83:175-182.

Gyimah, J. E., and B. Panigrahy. 1988. Adhesin-receptor interactions mediating the attachment of pathogenic *Escherichia coli* to chicken tracheal epithelium. *Avian Dis* 32:74-78.

Gyles, C. L. 2008. Antimicrobial resistance in selected bacteria from poultry. *Anim. Health Res. Rev* 9:149-158.

Gyles, C.L. 1994. *Escherichia coli* entérottoxines. *Escherichia coli* in Domestic Animals and humans. C. L. Gyles (ed.). Wallingford, CAB International:337-364

Hacker, J., L. Bender, M. Ott, J. Wingender, B. Lund, R. Marre, and W. Goebel. 1990. Deletions of chromosomal regions coding for fimbriae and hemolysins occur in vitro and in vivo in various extraintestinal *Escherichia coli* isolates. *Microb Pathog* 8:213-225.

Hammar, M., A. Arnqvist, Z. Bian, A. Olsen, and S. Normark. 1995. Expression of two csg operons is required for production of fibronectin- and congo red-binding curli polymers in *Escherichia coli* K-12. *Mol Microbiol* 18:661-670.

Hammar, M., Z. Bian, and S. Normark. 1996. Nucleator-dependent intercellular assembly of adhesive curli organelles in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:6562-6566.

Hedges, R. W., and A. E. Jacob. 1974. Transposition of ampicillin resistance from RP4 to other replicons. *Mol Gen Genet* 132:31-40.

Heffron, F., R. Sublett, R. W. Hedges, A. Jacob, and S. Falkow. 1975. Origin of the TEM-beta-lactamase gene found on plasmids. *J Bacteriol* 122:250-256.

Heijnen, L., and G. Medema. 2006. Quantitative detection of *E. coli*, *E. coli* O157 and other shiga toxin producing *E. coli* in water samples using a culture method combined with real-time PCR. *J Water Health* 4:487-498.

Heikinheimo, A., M. Lindstrom, and H. Korkeala. 2004. Enumeration and isolation of cpe-positive *Clostridium perfringens* spores from feces. *J Clin Microbiol* 42:3992-3997.

Helling, R. B., T. Kinney, and J. Adams. 1981. The maintenance of Plasmid-containing organisms in populations of *Escherichia coli*. *J. Gen. Microbiol.* 123:129-141.

Howard, C. J., and A. A. Glynn. 1971. The virulence for mice of strains of *Escherichia coli* related to the effects of K antigens on their resistance to phagocytosis and killing by complement. *Immunology* 20:767-777.

Hsiao, C. P., and K. J. Siebert. 1999. Modeling the inhibitory effects of organic acids on bacteria. *Int J Food Microbiol* 47:189-201.

Humphrey, T. J., and D. G. Lanning. 1988. The vertical transmission of *salmonellas* and formic acid treatment of chicken feed. A possible strategy for control. *Epidemiol Infect* 100:43-49.

Ike, K., K. Kume, K. Kawahara, and H. Danbara. 1990. Serotyping of O and pilus antigens of *Escherichia coli* strains isolated from chickens with coli-septicemia. *Jpn. J. Vet. Sci.*52:1023-1027.

Izat, A. L., N. M. Tidwell, R. A. Thomas, M. A. Reiber, M. H. Adams, M. Colberg, and P. W. Waldroup. 1990. Effects of a buffered propionic acid in diets on the performance of broiler chickens and on microflora of the intestine and carcass. *Poult Sci* 69:818-826.

Janben, T., C. Schwarz, P. Preikschat, M. Voss, H. C. Philipp, and L. H. Wieler. 2001. Virulence-associated genes in avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) isolated from internal organs of poultry having died from colibacillosis. *Int J Med Microbiol* 291:371-378.

Janben, T., C. Schwarz, P. Preikschat, M. Voss, H. C. Philipp, and L. H. Wieler. 2001. Virulence-associated genes in avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) isolated from internal organs of poultry having died from colibacillosis. *Int J Med Microbiol* 291:371-378.

Johnson, J. R., and T. A. Russo. 2002. Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: "the other bad *E coli*". *J Lab Clin Med* 139:155-162.

Johnson, J. R., and T. A. Russo. 2002. Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: "the other bad *E coli*". *J Lab Clin Med* 139:155-162.

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

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

Johnson, J. R., P. L. Roberts, and W. E. Stamm. 1987. P fimbriae and other virulence factors in *Escherichia coli* urosepsis: association with patients' characteristics. *J Infect Dis* 156:225-229.

Johnson, J. R., P. L. Roberts, and W. E. Stamm. 1987. P fimbriae and other virulence factors in *Escherichia coli* urosepsis: association with patients' characteristics. *J Infect Dis* 156:225-229.

Johnson, T. J., and L. K. Nolan. 2009. Pathogenomics of the virulence plasmids of *Escherichia coli*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 73:750-774.

Johnson, T. J., C. W. Giddings, S. M. Horne, P. S. Gibbs, R. E. Wooley, J. Skyberg, P. Olah, R. Kercher, J. S. Sherwood, S. L. Foley, and L. K. Nolan. 2002. Location of increased serum survival gene and selected virulence traits on a conjugative R plasmid in an avian *Escherichia coli* isolate. *Avian Dis* 46:342-352.

Johnson, T. J., J. Skyberg, and L. K. Nolan. 2004. Multiple antimicrobial resistance region of a putative virulence plasmid from an *Escherichia coli* isolate incriminated in avian colibacillosis. *Avian Dis* 48:351-360.

Johnson, T. J., K. E. Siek, S. J. Johnson, and L. K. Nolan. 2005. DNA sequence and comparative genomics of pAPEC-O2-R, an avian pathogenic *Escherichia coli* transmissible R plasmid. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49:4681-4688.

Johnson, T. J., K. E. Siek, S. J. Johnson, and L. K. Nolan. 2006a. DNA sequence of a ColV plasmid and prevalence of selected plasmid-encoded virulence genes among avian *Escherichia coli* strains. *J Bacteriol* 188:745-758.

Johnson, T. J., S. J. Johnson, and L. K. Nolan. 2006b. Complete DNA sequence of a ColBM plasmid from avian pathogenic *Escherichia coli* suggests that it evolved from closely related ColV virulence plasmids. *J Bacteriol* 188:5975-5983.

Jones, F. T., and S. C. Ricke. 2003. Observations on the history of the development of antimicrobials and their use in poultry feeds. *Poult Sci* 82:613-617

Jung, S. J., R. Houde, B. Baurhoo, X. Zhao, and B. H. Lee. 2008. Effects of galacto-oligosaccharides and a Bifidobacteria lactis-based probiotic strain on the growth performance and fecal microflora of broiler chickens. *Poult Sci* 87:1694-1699.

Kallenius, G., R. Mollby, S. B. Svenson, J. Winberg, and H. Hultberg. 1980. Identification of a carbohydrate receptor recognized by uropathogenic *Escherichia coli*. *Infection* 8 Suppl 3:288-293.

Kariyawasam, S., T. J. Johnson, and L. K. Nolan. 2006. The pap operon of avian pathogenic *Escherichia coli* strain O1:K1 is located on a novel pathogenicity island. *Infect Immun* 74:744-749.

Karlowisky, J. A., C. Thornsberry, M. E. Jones, and D. F. Sahn. 2003. Susceptibility of antimicrobial-resistant urinary *Escherichia coli* isolates to fluoroquinolones and nitrofurantoin. *Clin Infect Dis* 36:183-187.

Kashket, E. R. 1987. Bioenergetics of lactic bacteria : Cytoplasmic pH and osmotolerance. *FEMS Microbiology Reviews* 46:233-244

Kawano, M., K. Yaguchi, and R. Osawa. 2006. Genotypic analyses of *Escherichia coli* isolated from chickens with colibacillosis and apparently healthy chickens in Japan. *Microbiol Immunol* 50:961-966.

Kim, G. B., Y. M. Seo, C. H. Kim, and I. K. Paik. 2011. Effect of dietary prebiotic supplementation on the performance, intestinal microflora, and immune response of broilers. *Poult Sci* 90:75-82.

- Kim, T. E., Y. W. Jeong, S. H. Cho, S. J. Kim, and H. J. Kwon. 2007. Chronological study of antibiotic resistances and their relevant genes in Korean avian pathogenic *Escherichia coli* isolates. *J. Clin. Microbiol* 45:3309-3315.
- Klemm, P. and Krogfelt, K. A. (1994). Type 1 fimbriae of *Escherichiacoli*. In *Fimbriae, Adhesion, Genetics, Biogenesis and Vaccines*, pp. 9-26. Edited by P. Klemm. Boca Raton, FL: CRC Press.
- Knöbl, T., A.T.G. Tania, M.A.V. Midolli, J.A. Bottinoa and A.J.P. Ferreira. 2004. Detection of *pap*, *sfa*, *afa* and *fim* adhesin-encoding operons in avian pathogenic *Escherichia coli*. *Intern. J. Applied Res. Vet. Med* 2:135-141.
- Knöbl, T., M. R. Baccaro, A. M. Moreno, T. A. Gomes, M. A. Vieira, C. S. Ferreira, and A. J. Ferreira. 2001. Virulence properties of *Escherichia coli* isolated from ostriches with respiratory disease. *Vet Microbiol* 83:71-80.
- Knutton, S., M. M. Baldini, J. B. Kaper, and A. S. McNeish. 1987. Role of plasmid-encoded adherence factors in adhesion of enteropathogenic *Escherichia coli* to HEp-2 cells. *Infect Immun* 55:78-85.
- Knutton, S., T. Baldwin, P. H. Williams, and A. S. McNeish. 1989. Actin accumulation at sites of bacterial adhesion to tissue culture cells: basis of a new diagnostic test for enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Infect Immun* 57:1290-1298.
- Kopecko, D. J., and S. N. Cohen. 1975. Site specific *recA*-independent recombination between bacterial plasmids: involvement of palindromes at the recombinational loci. *Proc Natl Acad Sci U S A* 72:1373-1377.
- Kostakioti, M., and C. Stathopoulos. 2004. Functional analysis of the Tsh autotransporter from an avian pathogenic *Escherichia coli* strain. *Infect Immun* 72:5548-5554.
- La Ragione, R. M., R. J. Collighan, and M. J. Woodward. 1999. Non-curliation of *Escherichia coli* O78:K80 isolates associated with IS1 insertion in *csgB* and reduced persistence in poultry infection. *FEMS Microbiol Lett* 175:247-253.

La Ragione, R.M., and M.J. Woodward. 2002. Virulence factor of *Escherichia coli* serotypes associated with avian colisiticaemia. *Res. Vet. Sci* 73:27-35.

Lautenbach, E., B. L. Strom, I. Nachamkin, W. B. Bilker, A. M. Marr, L. A. Larosa, and N. O. Fishman. 2004. Longitudinal trends in fluoroquinolone resistance among Enterobacteriaceae isolates from inpatients and outpatients. 1989-2000. differences in the emergence and epidemiology of resistance across organisms. *Clin Infect Dis* 38:655-662.

Le Bouguenec, C., M. Archambaud, and A. Labigne. 1992. Rapid and specific detection of the pap, afa, and sfa adhesin-encoding operons in uropathogenic *Escherichia coli* strains by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 30:1189-93.

Leflon-Guibout, V., J. Blanco, K. Amaqdouf, A. Mora, L. Guize, and M. H. Nicolas-Chanoine. 2008. Absence of CTX-M enzymes but high prevalence of clones, including clone ST131, among fecal *Escherichia coli* isolates from healthy subjects living in the area of Paris, France. *J Clin Microbiol* 46:3900-3905.

Lior, H. 1994. Classification of *Escherichia coli*. *Escherichia coli* in domestic animals and humans. C.L. Gyles (Ed.) Guildfort, Uk, CAB International: 31-72.

Mainil, J. G., E. Jacquemin, and E. Oswald. 2003. Prevalence and identity of cdt-related sequences in necrotoxicogenic *Escherichia coli*. *Vet Microbiol* 94:159-165.

Mainil, J. G., E. Jacquemin, P. Pohl, A. Kaeckenbeeck, and I. Benz. 2002. DNA sequences coding for the F18 fimbriae and AIDA adhesin are localised on the same plasmid in *Escherichia coli* isolates from piglets. *Vet Microbiol* 86:303-311.

Manges, A. R., J. R. Johnson, B. Foxman, T. T. O'Bryan, K. E. Fullerton, and L. W. Riley. 2001. Widespread distribution of urinary tract infections caused by a multidrug-resistant *Escherichia coli* clonal group. *N Engl J Med* 345:1007-1013.

Marc, D., P. Arne, A. Bree, and M. Dho-Moulin. 1998. Colonization ability and pathogenic properties of a fim- mutant of an avian strain of *Escherichia coli*. *Res Microbiol* 149:473-485.

Mataseje, L. F., P. J. Baudry, G. G. Zhanel, D. W. Morck, R. R. Read, M. Louie, and M. R. Mulvey. 2010. Comparison of CMY-2 plasmids isolated from human, animal, and environmental *Escherichia coli* and *Salmonella spp.* from Canada. *Diagn Microbiol Infect Dis* 67:387-391.

Maurer, J. J., T. P. Brown, W. L. Steffens, and S. G. Thayer. 1998. The occurrence of ambient temperature-regulated adhesins, curli, and the temperature-sensitive hemagglutinin tsh among avian *Escherichia coli*. *Avian Dis* 42:106-118.

Maynard, C., J. M. Fairbrother, S. Bekal, F. Sanschagrin, R. C. Levesque, R. Brousseau, L. Masson, S. Lariviere, and J. Harel. 2003. Antimicrobial resistance genes in enterotoxigenic *Escherichia coli* O149:K91 isolates obtained over a 23-year period from pigs. *Antimicrob. Agents Chemother* 47:3214-3221.

McDaniels, A. E., R. H. Bordner, J. R. Menkedick, and C. I. Weber. 1987. Comparison of the hydrophobic-grid membrane filter procedure and standard methods for coliform analysis of water. *Appl Environ Microbiol* 53:1003-1009.

McDonald, L. C., F. J. Chen, H. J. Lo, H. C. Yin, P. L. Lu, C. H. Huang, P. Chen, T. L. Lauderdale, and M. Ho. 2001. Emergence of reduced susceptibility and resistance to fluoroquinolones in *Escherichia coli* in Taiwan and contributions of distinct selective pressures. *Antimicrob Agents Chemother* 45:3084-3091.

McPeake, S. J., J. A. Smyth, and H. J. Ball. 2005. Characterisation of avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) associated with colisepticaemia compared to faecal isolates from healthy birds. *Vet Microbiol* 110:245-253.

Mellata, M., J. W. Touchman, and R. Curtiss. 2009. Full Sequence and Comparative Analysis of the Plasmid pAPEC-1 of Avian Pathogenic *E-coli* chi 7122 (O78:K80:H9). *PLoS One* 4:e4232.

Mellata, M., K. Ameiss, H. Mo, and R. Curtiss. 2010. Characterization of the Contribution to Virulence of Three Large Plasmids of Avian Pathogenic *Escherichia coli* chi 7122 (O78:K80:H9). *Infect. Immun* 78:1528-1541.

- Mellata, M., M. Dho-Moulin, C. M. Dozois, R. Curtiss, B. Lehoux, and J. M. Fairbrother. 2003a. Role of avian pathogenic *Escherichia coli* virulence factors in bacterial interaction with chicken heterophils and macrophages. *Infect. Immun* 71:494-503.
- Mellata, M., M. Dho-Moulin, C. M. Dozois, R. Curtiss, P. K. Brown, P. Arne, A. Bree, C. Desautels, and J. M. Fairbrother. 2003b. Role of virulence factors in resistance of avian pathogenic *Escherichia coli* to serum and in pathogenicity. *Infect. Immun* 71:536-540.
- Meunier, D., E. Jouy, C. Lazizzera, B. Doublet, M. Kobisch, A. Cloeckaert, and J. Y. Madec. 2010. 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* 59:467-471.
- Milon, A., E. Oswald, and J. De Rycke. 1999. Rabbit EPEC: a model for the study of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Vet Res* 30:203-219.
- Miranda, J. M., B. I. Vazquez, C. A. Fente, J. Barros-Velazquez, A. Cepeda, and C. M. Franco. 2008. Evolution of resistance in poultry intestinal *Escherichia coli* during three commonly used antimicrobial therapeutic treatments in poultry. *Poult Sci* 87:1643-1648.
- Mokady, D., U. Gophna, and E. Z. Ron. 2005. Virulence factors of septicemic *Escherichia coli* strains. *Int J Med Microbiol* 295:455-462.
- Mol, O., and B. Oudega. 1996. Molecular and structural aspects of fimbriae biosynthesis and assembly in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Rev* 19:25-52.
- Moon, H. W. 1990. Colonization factor antigens of enterotoxigenic *Escherichia coli* in animals. *Curr Top Microbiol Immunol* 151:147-165.
- Moreno, E., G. Prats, M. Sabate, T. Perez, J. R. Johnson, and A. Andreu. 2006. Quinolone, fluoroquinolone and trimethoprim/sulfamethoxazole resistance in relation to virulence determinants and phylogenetic background among uropathogenic *Escherichia coli*. *J Antimicrob Chemother* 57:204-211.

Moulin-Schouleur, M., M. Reperant, S. Laurent, A. Bree, S. Mignon-Grasteau, P. Gennon, D. Rasschaert, and C. Schouler. 2007. Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strains of avian and human origin: Link between phylogenetic relationships and common virulence patterns. *J. Clin. Microbiol* 45:3366-3376.

Mühldorfer, I., G. Blum, A. Donohue-Rolfe, H. Heier, T. Olschlager, H. Tschape, U. Wallner, and J. Hacker. 1996. Characterization of *Escherichia coli* strains isolated from environmental water habitats and from stool samples of healthy volunteers. *Res. Microbiol.*147:625-635.

Nagy, B., and P. Z. Fekete. 1999. Enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) in farm animals. *Vet Res* 30:259-284.

Nakazato, G., T. Amabile de Campos, E. Guedes Stehling, M. Brocchi, and W. Dias da Silveira . 2009. Virulence factors of avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC). *Pesq. Vet. Bras.* 29 :479-486.

Nataro, J. P., and J. B. Kaper. 1998. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev* 11:142-201.

Ng, L. K., C. I. Kingombe, W. Yan, D. E. Taylor, K. Hiratsuka, N. Malik, and M. M. Garcia. 1997. Specific detection and confirmation of *Campylobacter jejuni* by DNA hybridization and PCR. *Appl Environ Microbiol* 63:4558-4563.

Ngeleka, M., J. K. Kwaga, D. G. White, T. S. Whittam, C. Riddell, R. Goodhope, A. A. Potter, and B. Allan. 1996. *Escherichia coli* cellulitis in broiler chickens: clonal relationships among strains and analysis of virulence-associated factors of isolates from diseased birds. *Infect Immun* 64:3118-3126.

Niewold, T. A. 2007. The nonantibiotic anti-inflammatory effect of antimicrobial growth promoters, the real mode of action? A hypothesis. *Poult. Sci.* 86:605–609.

Nowak, R. 1994. Hungary sees an improvement in penicillin resistance. *Science* 264:364.

- Okeke, I. N., I. C. Scaletsky, E. H. Soars, L. R. Macfarlane, and A. G. Torres. 2004. Molecular epidemiology of the iron utilization genes of enteroaggregative *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol* 42:36-44.
- Olsen, A., A. Arnqvist, M. Hammar, S. Sukupolvi, and S. Normark. 1993. The RpoS sigma factor relieves H-NS-mediated transcriptional repression of *csgA*, the subunit gene of fibronectin-binding curli in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 7:523-536.
- Olsen, A., A. Jonsson, and S. Normark. 1989. Fibronectin binding mediated by a novel class of surface organelles on *Escherichia coli*. *Nature* 338:652-655.
- Orndorff, P.E. 1994. *Escherichia coli* type1 pili. Molecular genetics of bacterial pathogenesis. V.L. Miller, J.B. kaper, D.A. Portnoy and R.R,Isberg (eds).Washington, DC,ASM: 91-111.
- Orskov, F., and I. Orskov. 1992. *Escherichia coli* serotyping and disease in man and animals. *Can J Microbiol* 38:699-704.
- Orskov, I., and F. Orskov. 1985. *Escherichia coli* in extra-intestinal infections. *J Hyg (Lond)* 95:551-575.
- Orskov, I., and F. Orskov. 1990. Serologic classification of fimbriae. *Curr Top Microbiol Immunol* 151:71-90.
- Overall, J. C., Jr. 1970. Neonatal bacterial meningitis. Analysis of predisposing factors and outcome compared with matched control subjects. *J Pediatr* 76:499-511.
- Padan, E., D. Zilberstein, and S. Schuldiner. 1981. pH homeostasis in bacteria. *Biochim Biophys Acta* 650:151-166.
- Peighambari, S. M., R. J. Julian, J. P. Vaillancourt, and C. L. Gyles. 1995. *Escherichia coli* cellulitis: experimental infections in broiler chickens. *Avian Dis* 39:125-134.
- Persson, K., W. Russell, M. Morgelin, and H. Herwald. 2003. The conversion of fibrinogen to fibrin at the surface of curliated *Escherichia coli* bacteria leads to the generation of proinflammatory fibrinopeptides. *J Biol Chem* 278:31884-31890.

Peterkin, P. I., and A. N. Sharpe. 1984. Rapid enumeration of *Staphylococcus aureus* in foods by direct demonstration of enterotoxigenic colonies on membrane filters by enzyme immunoassay. *Appl Environ Microbiol* 47:1047-1053.

Peterkin, P. I., E. S. Idziak, and A. N. Sharpe. 1991. Detection of *Listeria monocytogenes* by direct colony hybridization on hydrophobic grid-membrane filters by using a chromogen-labeled DNA probe. *Appl Environ Microbiol* 57:586-591.

Poirel, L., L. Villa, A. Bertini, J. D. Pitout, P. Nordmann, and A. Carattoli. 2007. Expanded-spectrum beta-lactamase and plasmid-mediated quinolone resistance. *Emerg Infect Dis* 13:803-805.

Pourbakhsh, S. A., M. Boulianne, B. Martineau-Doize, and J. M. Fairbrother. 1997. Virulence mechanisms of avian fimbriated *Escherichia coli* in experimentally inoculated chickens. *Vet Microbiol* 58:195-213.

Pourbakhsh, S. A., M. Dho-Moulin, A. Bree, C. Desautels, B. Martineau-Doize, and J. M. Fairbrother. 1997. Localization of the in vivo expression of P and F1 fimbriae in chickens experimentally inoculated with pathogenic *Escherichia coli*. *Microb Pathog* 22:331-341.

Provence, D. L., and R. Curtiss, 3rd. 1994. Isolation and characterization of a gene involved in hemagglutination by an avian pathogenic *Escherichia coli* strain. *Infect Immun* 62:1369-1380.

Ricke, S. C. 2003. Perspectives on the use of organic acids and short chain fatty acids as antimicrobials. *Poult Sci* 82:632-639.

Roberfroid, M. B., J. A. Van Loo, and G. R. Gibson. 1998. The bifidogenic nature of chicory inulin and its hydrolysis products. *J Nutr* 128:11-19.

Rodriguez-Siek, K. E., C. W. Giddings, C. Doetkott, T. J. Johnson, and L. K. Nolan. 2005. Characterizing the APEC pathotype. *Vet Res* 36:241-256.

Ron, E. Z. 2006. Host specificity of septicemic *Escherichia coli*: human and avian pathogens. *Curr Opin Microbiol* 9:28-32.

- Rosengren, L. B., C. L. Waldner, and R. J. Reid-Smith. 2009. Associations between antimicrobial resistance phenotypes, antimicrobial resistance genes, and virulence genes of fecal *Escherichia coli* isolates from healthy grow-finish pigs. *Appl Environ Microbiol* 75:1373-1380.
- Sabri, M., M. Caza, J. Proulx, M. H. Lymberopoulos, A. Bree, M. Moulin-Schouleur, R. Curtiss, 3rd, and C. M. Dozois. 2008. Contribution of the SitABCD, MntH, and FeoB metal transporters to the virulence of avian pathogenic *Escherichia coli* O78 strain chi7122. *Infect Immun* 76:601-611.
- Sabri, M., S. Leveille, and C. M. Dozois. 2006. A SitABCD homologue from an avian pathogenic *Escherichia coli* strain mediates transport of iron and manganese and resistance to hydrogen peroxide. *Microbiology* 152:745-758.
- Salmond, C. V., R. G. Kroll, and I. R. Booth. 1984. The effect of food preservatives on pH homeostasis in *Escherichia coli*. *J Gen Microbiol* 130:2845-2850.
- Salyers, A. A., and C. F. Amabile-Cuevas. 1997. Why are antibiotic resistance genes so resistant to elimination? *Antimicrob Agents Chemother* 41:2321-2325.
- Sharpe, A. N., and G. L. Michaud. 1974. Hydrophobic grid-membrane filters: new approach to microbiological enumeration. *Appl Microbiol* 28 :223-225.
- Sharpe, A. N., M. K. Rayman, D. M. Burgener, D. Conley, A. Loit, M. Milling, P. I. Peterkin, U. Purvis, and S. Malcolm. 1983. Collaborative study of the MPN, Anderson-Baird-Parker direct plating, and hydrophobic grid-membrane filter methods for the enumeration of *Escherichia coli* biotype I in foods. *Can J Microbiol* 29:1247-1252.
- Skyberg, J. A., T. J. Johnson, J. R. Johnson, C. Clabots, C. A. Logue, and L. K. Nolan. 2006. Acquisition of avian pathogenic *Escherichia coli* plasmids by a commensal E coli isolate enhances its abilities to kill chicken embryos, grow in human urine, and colonize the murine kidney. *Infect. Immun* 74:6287-6292.

Smith, J. L., D. J. Drum, Y. Dai, J. M. Kim, S. Sanchez, J. J. Maurer, C. L. Hofacre, and M. D. Lee. 2007. Impact of antimicrobial usage on antimicrobial resistance in commensal *Escherichia coli* strains colonizing broiler chickens. *Appl. Environ. Microbiol* 73:1404-1414.

Solberg, O. D., R. M. Ajiboye, and L. W. Riley. 2006. Origin of class 1 and 2 integrons and gene cassettes in a population-based sample of uropathogenic *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol* 44:1347-1351.

Spring, P., C. Wenk, K. A. Dawson, and K. E. Newman. 2000. The effects of dietary mannaoligosaccharides on cecal parameters and the concentrations of enteric bacteria in the ceca of *Salmonella*-challenged broiler chicks. *Poult Sci* 79:205-211.

Sprong, R. C., M. F. Hulstein, and R. Van der Meer. 2001. Bactericidal activities of milk lipids. *Antimicrob Agents Chemother* 45:1298-1301.

Stathopoulos, C., D. L. Provence, and R. Curtiss, 3rd. 1999. Characterization of the avian pathogenic *Escherichia coli* hemagglutinin Tsh, a member of the immunoglobulin A protease-type family of autotransporters. *Infect Immun* 67:772-781.

Stordeur, P., D. Marlier, J. Blanco, E. Oswald, F. Biet, M. Dho-Moulin, and J. Mainil. 2002. Examination of *Escherichia coli* from poultry for selected adhesin genes important in disease caused by mammalian pathogenic *E. coli*. *Vet Microbiol* 84:231-241.

Talan, D. A., A. Krishnadasan, F. M. Abrahamian, W. E. Stamm, and G. J. Moran. 2008. Prevalence and risk factor analysis of trimethoprim-sulfamethoxazole- and fluoroquinolone-resistant *Escherichia coli* infection among emergency department patients with pyelonephritis. *Clin Infect Dis* 47:1150-1158.

Terada, A., H. Hara, J. Sakamoto, N. Sato, S. Takagi, T. Mitsuoka, R. Mino, K. Hara, I. Fujimori, and T. Yamada. 1994. Effects of dietary supplementation with lactosucrose (4G-beta-D-galactosylsucrose) on cecal flora, cecal metabolites, and performance in broiler chickens. *Poult Sci* 73:1663-1672.

Thompson, J. L., and M. Hinton. 1997. Antibacterial activity of formic and propionic acids in the diet of hens on *Salmonellas* in the crop. *Br Poult Sci* 38:59-65.

Todd, E. C., R. A. Szabo, J. M. MacKenzie, A. Martin, K. Rahn, C. Gyles, A. Gao, D. Alves, and A. J. Yee. 1999. Application of a DNA hybridization-hydrophobic-grid membrane filter method for detection and isolation of verotoxigenic *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:4775-4780.

Todd, E. C., R. A. Szabo, P. Peterkin, A. N. Sharpe, L. Parrington, D. Bundle, M. A. Gidney, and M. B. Perry. 1988. Rapid hydrophobic grid membrane filter-enzyme-labeled antibody procedure for identification and enumeration of *Escherichia coli* O157 in foods. *Appl Environ Microbiol* 54:2536-2540.

Touchon, M., C. Hoede, O. Tenaillon, V. Barbe, S. Baeriswyl, P. Bidet, E. Bingen, S. Bonacorsi, C. Bouchier, O. Bouvet, A. Calteau, H. Chiapello, O. Clermont, S. Cruveiller, A. Danchin, M. Diard, C. Dossat, M. E. Karoui, E. Frapy, L. Garry, J. M. Ghigo, A. M. Gilles, J. Johnson, C. Le Bouguenec, M. Lescat, S. Mangenot, V. Martinez-Jehanne, I. Matic, X. Nassif, S. Oztas, M. A. Petit, C. Pichon, Z. Rouy, C. S. Ruf, D. Schneider, J. Tourret, B. Vacherie, D. Vallenet, C. Medigue, E. P. Rocha, and E. Denamur. 2009. Organised genome dynamics in the *Escherichia coli* species results in highly diverse adaptive paths. *PLoS Genet* 5:e1000344.

Tournas, V.H. 2009. Evaluation of the Hydrophobic Grid Membrane Filter for the Enumeration of Moulds and Yeasts in Naturally-Contaminated. *Foods Microbiology Insights*:31–37

Van Immerseel, F., De Buck, J., De Smet, I., Pasmans, F., Haesebrouck, F. and Ducatelle, R. 2004. Interactions of butyric acid and acetic acid-treated *Salmonella* with chicken primary cecal epithelial cells in vitro. *Avian Dis* 48:384-391.

Van Immerseel, F., J. B. Russell, M. D. Flythe, I. Gantois, L. Timbermont, F. Pasmans, F. Haesebrouck and R. Ducatelle. 2006. The use of organic acids to combat *Salmonella* in poultry: a mechanistic explanation of the efficacy. *Avian Pathol* 35:182-188.

Vandekerchove, D., F. Vandemaele, C. Adriaensen, M. Zaleska, J. P. Hernalsteens, L. De Baets, P. Butaye, F. Van Immerseel, P. Wattiau, H. Laevens, J. Mast, B. Goddeeris, and F. Pasmans. 2005. Virulence-associated traits in avian *Escherichia coli*: comparison between

isolates from colibacillosis-affected and clinically healthy layer flocks. *Vet Microbiol* 108:75-87.

Verweyen, H. M., H. Karch, M. Brandis, and L. B. Zimmerhackl. 2000. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* infections: following transmission routes. *Pediatr Nephrol* 14:73-83.

Warren, R. E., V. M. Ensor, P. O'Neill, V. Butler, J. Taylor, K. Nye, M. Harvey, D. M. Livermore, N. Woodford, and P. M. Hawkey. 2008. Imported chicken meat as a potential source of quinolone-resistant *Escherichia coli* producing extended-spectrum beta-lactamases in the UK. *J Antimicrob Chemother* 61:504-508.

White, R. L., L. V. Friedrich, L. B. Mihm, and J. A. Bosso. 2000. Assessment of the relationship between antimicrobial usage and susceptibility: differences between the hospital and specific patient-care areas. *Clin Infect Dis* 31:16-23.

Wooley, R. E., and J. L. Blue. 1976. Bacterial isolations from canine and feline urine. *Mod Vet Pract* 57:535-538.

Wooley, R. E., P. S. Gibbs, T. P. Brown, J. R. Glisson, W. L. Steffens, and J. J. Maurer. 1998. Colonization of the chicken trachea by an avirulent avian *Escherichia coli* transformed with plasmid pHK11. *Avian Dis* 42:194-198.

Wright, S. W., K. D. Wrenn, and M. L. Haynes. 1999. Trimethoprim-sulfamethoxazole resistance among urinary coliform isolates. *J Gen Intern Med* 14:606-609.

Xu, Z. R., C. H. Hu, M. S. Xia, X. A. Zhan, and M. Q. Wang. 2003. Effects of Dietary Fructooligosaccharide on Digestive Enzyme Activities, Intestinal Microflora and Morphology of Male Broilers *Poult. Sci* 82:1030-1036.

Yan, W., M. N. Malik, P. I. Peterkin, and A. N. Sharpe. 1996. Comparison of the hydrophobic grid-membrane filter DNA probe method and the Health Protection Branch standard method for the detection of *Listeria monocytogenes* in foods. *Int J Food Microbiol* 30:379-384.

- Yan, W., M. N. Malik, P. I. Peterkin, and A. N. Sharpe. 1996. Comparison of the hydrophobic grid-membrane filter DNA probe method and the Health Protection Branch standard method for the detection of *Listeria monocytogenes* in foods. *Int J Food Microbiol* 30:379-384.
- Yang, H., S. Chen, D. G. White, S. Zhao, P. McDermott, R. Walker, and J. Meng. 2004. Characterization of multiple-antimicrobial-resistant *Escherichia coli* isolates from diseased chickens and swine in China. *J Clin Microbiol* 42:3483-3489.
- Yu, H. S., J. C. Lee, H. Y. Kang, Y. S. Jeong, E. Y. Lee, C. H. Choi, S. H. Tae, Y. C. Lee, S. Y. Seol, and D. T. Cho. 2004. Prevalence of *dfr* genes associated with integrons and dissemination of *dfrA17* among urinary isolates of *Escherichia coli* in Korea. *J Antimicrob Chemother* 53:445-450.
- Yu, J. L., S. X. Wu, and H. Q. Jia. 2001. Study on antimicrobial susceptibility of bacteria causing neonatal infections: a 12 year study (1987-1998). *Singapore Med J* 42:107-110.
- Ziprin, R. L., M. H. Elissalde, A. Hinton, Jr., R. C. Beier, G. E. Spates, D. E. Corrier, T. G. Benoit, and J. R. DeLoach. 1991. Colonization control of lactose-fermenting *Salmonella* Typhimurium in young broiler chickens by use of dietary lactose. *Am J Vet Res* 52:833-837.

ANNEXES

ABSTRACT 1: SYMPOSIUM SAFEPORK 2009

Development of a DNA hybridization technique for detection of *Escherichia coli* carrying virulence and antimicrobial resistance genes in the pig intestinal microflora.

Paul K.Kaboré*¹; Ann Letellier¹; Philippe Fravalo^{1, 2}; Clarisse Desautels; John M. Fairbrother¹

(1) Faculty of Veterinary Medicine, Université de Montréal, campus de St-Hyacinthe, 3200, rue Sicotte St-Hyacinthe (Québec) J2S 2M2

(2) French Agency for Food Safety (AFSSA), BP 53, 22440 Ploufragan, France.

Abstract

We report the development of a DNA probe hybridization procedure using hydrophobic-grid membrane filters (HGMFs). For this purpose, we use digoxigenin-labelled probes, and the detection of genes is achieved colorimetrically with an alkaline-phosphatase substrate. This paper shows the results of the hybridization and detection of STb, F4, and LT genes. 9 trials (3 trials for each virulence gene) were made using the *Escherichia coli* strain ECL7805, carrying all these targeted genes. In the same way, 9 trials were also made using *Escherichia coli* strain ECL3462 which does not host the targeted virulence genes. We also report the results of the hybridization and detection of F4, LT and STb genes from 11 rectal swabs of one pig rearing. The goal of both trials with pure cultures and rectal swabs was to set up the DNA probe hybridization procedure which constitutes the first step to study the dynamics of *Escherichia coli* virulence and antimicrobial resistance genes among swine population and other species. The qualitative evaluation of these preliminary results suggests that this method is highly sensitive, specific, and easily accessible for any laboratory. This method is also convenient for screening rare virulence genes in feces of pigs since we can target about 200 colonies at the same time.

Introduction

Escherichia coli represent a dominant part of the non-anaerobic intestinal bacterial population in swine. They include a broad variety of different clones, ranging from highly pathogenic strains causing severe disease in the swine population to nonpathogenic commensal *E. coli* (3, 4, 7). Pathogenicity is characterized by specific virulence factors, and diseases caused by pathogenic *E. coli* are responsible for major economic losses. In addition, shiga toxin-producing *E. coli* O157:H7, an important cause of foodborne illness in humans, has been recovered from feces and carcasses of healthy pigs (3, 7), and cases of human illness have been traced back to pig products. High occurrences of antimicrobial resistance genes in generic *E. coli* have been found in many studies in production pigs (2, 3). *E. coli* are also considered as an important source of antimicrobial resistance determinants for other pathogens (6). Thus, the detection and monitoring of virulence and antimicrobial genes in the pig intestinal *E. coli* population is very important.

PCR colony hybridization and radioactively labeled probes are both routinely used in detection of virulent *E. coli*. Although PCR methods can detect the presence of virulence and antimicrobial resistance genes in mixed cultures, confirmation of virulence and antimicrobial profiles of individual strains in the population is arduous and time-consuming. The development of a DNA probe hybridization procedure using hydrophobic-grid membrane filters (HGMFs) is an alternative for the traditional methods. The main objective of this research activity is the monitoring and management of *E. coli* virulent and antimicrobial resistant strains among swine population and other species. Special attention is given to the monitoring of foodborne *E. coli*. In the first phase of this approach we are using pure cultures of *E. coli*, and pigs' rectal swabs. This phase concerns a limited number of virulence genes. The goal of this step is to evaluate the sensibility, the specificity and the detection limit of the DNA probe hybridization procedure using HGMFs before sampling and screening a large number of virulence and resistance genes in swine population.

Materials and methods

Bacterial strains

Pure cultures were used to set up the DNA probe hybridization procedure. The strain ECL3463 which does not host any of the targeted virulence gene were provided by the *Escherichia coli* Laboratory (ECL) of the Faculté de Médecine Vétérinaire of the Université de Montréal.

Samples

11 rectal swabs were taken from different pigs of the same rearing. These samples represent different lots, pools, and periods. 10 of the 11 samples were tested positive by PCR for STb, F4, and LT genes. One sample was negative for all these genes.

Filtration and replication

Pure cultures were incubated overnight in tryptic soy broth and serially diluted in TSB to 10^{-7} . Then 2ml of this dilution were mixed in 3ml of 1% tween80 solution, 5 ml of bacteria culture obtained by mixing final dilution and 1% tween 80 were filtrated through a hydrophobic grid membrane filter. HGMFs were placed onto MacConkey agar and incubated overnight at 37°C. HGMFs showing about 200 bacterial growths were considered as masters and were replicated using a microbial colony replicator, placed onto MacConkey agar and incubated overnight at 37°C. The rectal swabs were enriched overnight, after the PCR test, the enrichment cultures were serially dilute in TSB to 10^{-7} ; the following steps are identical to those described above to get HGMFs' masters and copies.

Preparation of DNA probes

The DNA templates were prepared from overnight LB culture of ECL7805 strain and were used as probes for the detection of the following virulence genes: *STb*, *F4*, and *LT*. Each DIG labeled probe was generated using specific primer. The DNA templates were labeled according to DIG labeling kit (Roche Diagnostics).

Pretreatment, hybridization, and colorimetric detection

HGMFs copies were pretreated in order to lyse and to fix the colonies on the grid cell before prehybridization. The pretreatment was realized according the method described by Todd et al (9). the prehybridization and hybridization were carried out at 68°C in 6 X SSC (20 X SSC is 0.3M sodium citrate plus 3M sodium chloride) containing 0.5% SDS; 1% of blocking reagent and 100µg of salmon sperm per ml. The hybridization solution contains also 15ng /ml of denatured probe. The detection of genes is achieved colorimetrically with an alkaline-phosphatase substrate which reacts after the dephosphorylation, showing a dark –blue indigo dye as an oxidation product. The colorimetrically detection has been done following the procedure described by DIG Nucleic Acid Detection Kit.

Results

On each HGMF, about 100 to 200 colonies were isolated from the filtration of the pure cultures and rectal swabs enrichment, and these colonies were considered as single CFU colonies (8). From rectal swabs, at least 3 types of colonies grew on the HGMFs. The dominant type of colonies is intensely purple and fills the HGMFs grid cell. This type of colonies is identical to those we have observed after the filtration of *Escherichia coli* pure cultures as illustrated (figure 1). These colonies were considered as presumptive *Escherichia coli* colonies that could include some other enterobacteria.

All of the 9 HGMFs from the ECL7805 strain filtration were positive for *STb*, *F4*, and *LT* genes, by DNA probe hybridization method, and showed a dark-blue indigo dye (figure 2). Almost 100% of the colonies of the every HGMF were positive suggesting a very high sensibility of the method. All colonies from the 9 HGMFs obtained by ECL3463 strain filtration were negative for, *STb*, *F4*, and *LT* genes by DNA probe hybridization method, suggesting also that the method is highly specific.

11 rectal swabs were analyzed by PCR and were screened by HGMFs DNA probe hybridization. More than the half of the PCR positive sample did not show positive

colonies by the DNA probe hybridization (table I). We detected colonies harboring *STb* genes in 3 different samples, *F4* and *LT* genes were detected from one sample and two colonies were positive for both *genes*. In all cases we did not find more than 5 positive colonies among 100 or more colonies that grew on the same HGMFs.

Table I: PCR and HGMFs probe hybridization from 11 rectal swabs from pigs

Sample identification	PCR Results	STb (number of positive colonies)	LT (number of positive colonies)	F4 (number of positive colonies)
L2P5T2 (5)	STb, LT, F4	-	-	-
L2P8T3 (11)	STb, LT, F4	-	-	-
L2P14T3 (17)	STb, LT, F4	+ (5 colonies)	+ (2 colonies)	+ (2 colonies)
L3P5T3 (5)	STb, LT, F4	-	-	-
L3P5T3 (6)	STb, LT, F4	+ (3 colonies)	-	-
L3P5T3 (7)	STb, LT, F4	+ (3 colonies)	-	-
L3P5T3 (8)	STb, LT, F4	-	-	-
L3P8T2 (9)	-	-	-	-
L3P17T3 (21)	STb, LT, F4	-	-	-
L3P17T3 (24)	STb, LT, F4	-	-	-
L3P20T3 (25)	STb, LT, F4	-	-	-

Figure 1: HGMFs bearing *Escherichia coli* colonies after overnight incubation at 37°C onto MacConkey agar



Figure 2: HGMF Positive control after hybridization and colorimetrically detection



Discussion

As MacConkey agar incubated at 37 °C does not specifically select *Escherichia coli*, the colonies for which we detected virulence genes, will follow identification process to be confirmed as *Escherichia coli*. Some previous studies used different agar and 44.5 °C incubation temperature to limit the growth of other enterobacteria; but we fixed the incubation temperature at 37°C because we are interested in some genes that could be repressed in certain particular conditions. We evaluated the HGMFs DNA probe hybridization as sensitive and specific as reported by Yan et al (10). The detection limit has not been measured but we consider that this method is interesting comparatively to the traditional method which picks randomly 5 colonies for the detection of the genes, since we can target about 200 colonies at the same time. The detection limit has been quantified by Todd et al. They reported a limit of 0.1 CFU/ g of ground beef inoculated artificially (9). However we found a low number of positive colonies. It suggests that may be some colonies carrying virulence genes are represented in very low proportion in the feces of healthy pigs, despite the PCR positive test. The low number of the positive colonies we have detected by HGMFs DNA probe hybridization explains why it is arduous to find the positive colonies when only 5 colonies were selected for detection. However quantitative evaluation of the detection limit in feces should be done in the future.

Conclusion

The colorimetric detection of HGMFs DNA probe hybridization gives a satisfactory result and is accessible by many laboratories. It provides an effective method and complementary to PCR method. Although the latter method is very sensitive and the detection limit is lower, screening the positive colonies by HGMFs DNA hybridization give the mean to follow the dynamic of virulent and antimicrobial resistant *E coli* population.

References

1. DUNLOP R H., MCEWEN S A., MEEK A H., CLARKE R C., FRIENDSHIP R M., BLACK W D., AND SHARPE A N. (1998) Measurement of Antimicrobial-Resistant *Escherichia coli* in Pig Feces with a Hydrophobic Grid Membrane Filter Interpreter System. *Appl. Environ. Microbiol* **6**, 366–369
2. DUNLOP R H., MCEWEN S A., MEEK A H., CLARKE R C., FRIENDSHIP R M., BLACK W D., AND SHARPE A N (1998) Prevalence of resistance to seven antimicrobials among fecal *Escherichia coli* of swine on thirty-four farrow –to-finish farms in Ontario , Canada, *Prev. vet. Med*, **34**, 265-282
3. FAIRBROTHER J M and NADEAU E (2006). *Escherichia coli*: On-farm contamination of animals. *Revue scientifique et technique de l’Office International des Epizooties*, **25**, 555-569.
4. MÜHLDORFER I, BLUM G, DONOHUE-ROLFE A, HEIER H, ÖLSCHLÄGER T, TSCHÄPE H, WALLNER U, and HACKER J. (1996) Characterization of *Escherichia coli* strains isolated from environmental water habitats and from stool samples of healthy volunteers, *Res. Microbiol*, **147**, 625–635.
5. NATARO J P and KAPER J B (1998). Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin. Microbiol. Rev*, **11**, 142-201
6. NEU, H C. (1992) The crisis in antibiotic resistance, *Science* **257**,1064–1073.
7. SAMADPOUR M, ONGERTH J E, LISTON J, TRAN N, NGUYEN D, WHITTAM T S, WILSON R A, and TARR P I.(1994). Occurrence of Shiga-like toxin producing

- Escherichia coli* in retail fresh seafood, beef, lamb, pork, and poultry from grocery stores in Seattle, Washington, *Appl. Environ. Microbiol*, **60**, 1038–1040.
8. SHARPE A N and PETERKIN P I. (1988) *Membrane filter food microbiology*, Research Studies Press Ltd., Taunton, United Kingdom.
 9. TODD E C D., SZABO R A., MACKENZIE J M., MARTIN A., RAHN K., GYLES C., GAO A., ALVES D., and YEE A J. (1999) Application of a DNA Hybridization–Hydrophobic-Grid Membrane Filter Method for Detection and Isolation of Verotoxigenic *Escherichia coli* *Appl. Environ. Microbiol*, **65**, 4775–4780
 10. YAN W, MALIK M N, PETERKIN P I AND SHARPE A N. (1996) Comparison of the hydrophobic grid-membrane filter DNA probe method and the Health Protection Branch standard method for the detection of *Listeria monocytogenes* in foods, **30** , 379-384.

**ABSTRACT 2: 2ND ASM CONFERENCE ON ANTIMICROBIAL
RESISTANCE IN ZOO NOTIC BACTERIA AND FOODBORNE
PATHOGENS IN ANIMALS, HUMANS AND THE ENVIRONMENT**

Prevalence and association of virulence and antimicrobial resistance genes of avian pathogenic *E. coli* from the intestinal microflora of healthy chickens.

Paul K.Kaboré¹; Philippe Fravalo^{1,2}; Ann Letellier¹; Ludovic Lahaye³; John M. Fairbrother¹

(1) Faculty of Veterinary Medicine, Université de Montréal, campus de St-Hyacinthe, 3200, rue Sicotte, St-Hyacinthe (Québec) J2S 2M2

(2) French Agency for Food Safety (AFSSA), BP 53, 22440 Ploufragan, France.

(3) Jefe Nutrition Inc, 5020, Av Jefe, St Hyacinthe (Québec) J2R 2E7

Avian Pathogenic *E. coli* (APEC) is characterized by the presence of certain combinations of specific virulence factors such as the aerobactin system and Temperature sensitive hemagglutinin (Tsh). APEC share several of these virulence factors with extraintestinal pathogenic *E. coli* associated with disease in humans, and chickens may be a reservoir for the latter. In addition, high prevalence of resistance to certain antimicrobials has been found in generic *E. coli* in chickens. This study investigated the prevalence of APEC-associated virulence genes and antimicrobial resistance (AMR) genes and the association between the presence of these genes in *E. coli* of the intestinal microflora of healthy chickens. A total of 23 samples of caecal contents were collected following necropsy of 29-day-old healthy chickens in high production performance conditions. Each sample represented a pool of the individual caecal contents of 5 chickens housed in the same cage. Samples were examined for the presence of virulence genes *iucD* (aerobactin), *tsh*, and *papC* (P fimbriae) and AMR genes *bla_{TEM}* and *bla_{SHV}* (ampicillin), *tetA* (tetracycline), *bla_{CMY}* (ceftiofur), *aadA1* (streptomycin) and *aac3* (gentamicin) by polymerase chain reaction (PCR). The number of positive samples for each gene were: 10 (*tsh*), 5 (*iucD*), 6 (*papC*), 14 (*tetA*), 20 (*aadA1*), 21 (*bla_{TEM}*), 22 (*bla_{CMY}*), 0 (*bla_{SHV}*), and 0 (*aac3*). Positive samples were filtered using hydrophobic-grid membrane filters (HGMFs) and colonies positive for the appropriate genes identified by DNA probe colony hybridization. Among 948 to 2958 tested colonies depending on the gene, the prevalence of virulence and AMR genes were respectively: 7% (*tsh*), 19.4% (*iucD*), 2.8% (*papC*), 15.7% (*tetA*), 42.7% (*aadA1*), 53.4% (*bla_{TEM}*), and 7.1% (*bla_{CMY}*). Further characterization of 88 isolates by PCR

confirmed 90 % of the profiles of the isolates selected on HGMFs, demonstrating the capacity of the HGMF method to target and quantify large numbers of colonies for virulence and AMR genes. Odds ratio calculation confirmed associations between the presence of certain virulence and AMR genes such as *iucD* and *tsh*, and *iucD* and *bla_{TEM}*, often encoded by the same large plasmids. In addition, a novel association was observed between the presence of *iucD* and *bla_{CMY}* genes. Therefore, surveillance of virulence and AMR genes has a public health significance for certain possibly zoonotic APEC strains.