

Université de Montréal

CARACTÉRISATION PHÉNOTYPIQUE ET GÉNOTYPIQUE
D'ISOLATS DE *SALMONELLA* PROVENANT DE CAECA DE
POULETS DE CHAIR DANS QUATRE ABATTOIRS SOUS
INSPECTION FÉDÉRALE AU QUÉBEC

Par

MARIE-LOU GAUCHER

Département de pathologie et microbiologie
Faculté de médecine vétérinaire

Mémoire présenté à la faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de
Maître ès Sciences (M.Sc.)
en sciences vétérinaires
option microbiologie

Avril 2007

© Marie-Lou Gaucher, 2007



SF

607

US4

2007

v.01b

AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé

CARACTÉRISATION PHÉNOTYPIQUE ET GÉNOTYPIQUE
D'ISOLATS DE *SALMONELLA* PROVENANT DE CAECA DE
POULETS DE CHAIR DANS QUATRE ABATTOIRS SOUS
INSPECTION FÉDÉRALE AU QUÉBEC

Présenté par

MARIE-LOU GAUCHER

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes

Dre Marie Archambault, présidente-rapporteuse

Dr Sylvain Quessy, directeur de recherche

Dre Ann Letellier, codirectrice de recherche

Dre Martine Boulianne, codirectrice de recherche

Dr Daniel Perron, membre du jury

Mémoire accepté le

SOMMAIRE

Les infections d'origine alimentaire causées par les *Salmonella* non-typhoïdes représentent un des principaux problèmes de santé publique à travers le monde. *Salmonella enterica* ssp. *enterica* arrive au deuxième rang des agents responsables d'infections gastro-intestinales dans les pays industrialisés. La viande de volaille contaminée et ses sous-produits sont reconnus comme étant d'importants vecteurs pour la transmission d'agents pathogènes. La présence de *Salmonella* chez le poulet de chair au niveau des caeca ou sur les carcasses après éviscération est une réalité bien connue. Au cours des dernières années, une augmentation du nombre de souches résistantes aux antibiotiques a été notée pour différents pays. Plusieurs auteurs ont émis l'hypothèse que l'utilisation des antibiotiques dans l'industrie avicole était en partie responsable de l'émergence et de la dissémination de souches de *Salmonella* résistantes aux antibiotiques. Les hypothèses de ce projet étaient que l'utilisation des antibiotiques et des désinfectants dans les élevages de poulets de chair au Québec peut influencer la prévalence de souches de *Salmonella* multi-résistantes aux antibiotiques et que les souches présentant des résistances envers plusieurs antibiotiques seraient génétiquement reliées.

Entre avril 2003 et février 2004, quatre-vingt-deux lots de poulets de chair provenant de 104 éleveurs différents ont été échantillonnés dans les quatre principaux abattoirs sous inspection fédérale au Québec. De ce nombre, cinquante et un lots ont été utilisés pour l'isolement de *Salmonella*. Un total de 123 isolats a été obtenu et a été phénotypiquement et génétiquement caractérisé.

Vingt-cinq pourcents (13/51) des lots analysés se sont avérés positifs pour la présence de *Salmonella* au niveau des caeca. Les 123 isolats retrouvés ont été sérotypés. Six différents sérotypes ont été identifiés et le sérovar Heidelberg fut le plus souvent rencontré avec près de 62% des échantillons appartenant à ce sérotype. Vingt-trois antibiotiques différents ont été testés afin de déterminer les profils de résistance et les isolats se sont avérés sensibles à 11 d'entre eux. Plus de dix profils de résistance ont été identifiés. La multi-résistance des souches de *Salmonella* a été associée aux souches résistantes à cinq antibiotiques et plus (pentarésistance), ce qui a représenté 36% des

isolats. Pour certaines de ces souches, la résistance s'étendait à plus de sept antibiotiques. Il n'a pas été possible d'établir un lien statistiquement significatif entre l'utilisation d'antibiotiques en élevage et la prévalence de souches pentarésistantes. Par contre, un lien a pu être établi entre la présence de souches résistantes en élevage et l'approvisionnement à un même couvoir et /ou une même meunerie.

Parmi les 13 lots positifs analysés, 14 profils génétiques différents ont été identifiés parmi les isolats prélevés au niveau des ceca. Pour certains de ces lots, jusqu'à quatre profils distincts ont été retrouvés, tandis que pour 55% d'entre eux (6/11), un seul génotype était rencontré. Il a été possible de démontrer qu'une relation existait entre le pourcentage de souches pentarésistantes et l'appartenance à une même famille génétique. Ainsi, le pourcentage de souches pentarésistantes aux antibiotiques était aussi élevé que 100% pour la famille génétique 13 tandis que les souches pentarésistantes aux antibiotiques étaient absentes pour la famille génétique un. Certains sérotypes tels que Typhimurium, Agona et Thompson ont aussi été identifiés comme appartenant à une seule lignée génétique.

Mots clés : *Salmonella*, poulet de chair, antibiotiques, résistance, profil génétique, sérotype, abattoir.

SUMMARY

Across the world, non-typhoidal *Salmonella* represents one of the major causes of foodborne diseases. In industrialized countries, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* along with *Campylobacter* are the most important foodborne pathogens. Contaminated poultry meat and poultry products are well recognized vectors for *Salmonella* transmission. Presence of *Salmonella* in poultry ceca and contamination of chicken carcasses during slaughtering and evisceration have both clearly been identified and documented. During the past years, an increasing number of resistant *Salmonella* strains in poultry has been reported in many countries. Antimicrobial use in the poultry industry has been pointed out by many authors for being partly responsible of the emergence and dissemination of these resistant strains. The hypotheses of this study were that antibiotic and disinfectant use in commercial broiler chicken flocks in the province of Quebec can influence multidrug resistant strains prevalence, and that these resistant strains would be genetically linked.

Between April 2003 and February 2004, 82 broiler chicken flocks were sampled at the four major federally inspected abattoirs in the province of Quebec. Among these flocks, 51 were retained for *Salmonella* isolation and characterization. A total of 123 *Salmonella* isolates were obtained and used for phenotypic and genotypic characterization.

Twenty-five percents (13/51) of analyzed flocks (nearly 30 birds per sampled flock) were positive for *Salmonella* at ceca level. The 123 obtained isolates were sent for serotyping. Six different serotypes were identified, Heidelberg being the more frequent serotype with 62% of the isolates belonging to this serogroup. Twenty-three distinct antibiotics were used for antimicrobial susceptibility testing. All strain were found to be susceptible to 11 of the 23 antibiotics tested. However, more than ten resistance profiles were identified. Strains were considered multi-drug resistant when they were showing resistance to five or more antibiotics (pentaresistance). Therefore, 36% of the isolates were considered multidrug resistant. For some of them, resistance was observed to

seven of the tested antibiotics. Using statistical analysis, no relationship could be established between antimicrobial use in a certain flock and the prevalence of pentaresistant strains. Further analysis identified some hatcheries and/or feedmills as being possibly related to higher prevalence of pentaresistant strains.

Isolates from thirteen positive flocks were used for further genetic characterization of isolates. From these positive flocks, 14 different genetic profiles were identified. For some of these flocks, more than 4 different profiles were observed while in 55% (6/11) of them only one genotype was identified. An association was established between genetic fingerprinting and antimicrobial susceptibility. Percentage of pentaresistant strains was as high as 100% for cluster 13 and as low as 0% for cluster one. Certain serotypes such as Typhimurium, Agona and Thompson were associated with only one specific genetic cluster.

Key words : *Salmonella*, broiler chicken, antibiotics, multidrug, resistance, genetic profile, serotype, abattoir.

TABLE DES MATIÈRES

IDENTIFICATION DU JURY.....	ii
SOMMAIRE.....	iii
TABLE DES MATIÈRES.....	vii
LISTE DES TABLEAUX.....	x
LISTE DES FIGURES.....	xi
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	xii
DÉDICACE.....	xiv
REMERCIEMENTS.....	xv
Chapitre 1. INTRODUCTION.....	1
Chapitre 2. RECENSION DE LA LITTÉRATURE.....	4
2.1 Historique et caractéristiques générales.....	5
2.2 Classification et identification.....	5
2.3 Épidémiologie de la bactérie.....	8
2.3.1 Distribution et sources de contamination.....	8
2.3.2 Modes de transmission.....	9
2.3.3 Spécificité d'hôte.....	9
2.3.4 Prévalence et maladie chez l'humain.....	12
2.4 Facteurs de virulence.....	13
2.4.1 Îlots de pathogénicité.....	14
2.4.2 Toxines.....	15
2.4.3 Plasmides.....	15
2.4.4 Système d'acquisition du fer.....	16
2.4.5 Survie dans le sérum.....	16
2.4.6 Fimbriae.....	17
2.4.7 Expression de protéines flagellaires par inversion de phase.....	17

2.5	Résistance aux antibiotiques.....	18
2.5.1	Historique.....	18
2.5.2	Les principes de l'antibiorésistance.....	18
2.5.3	Les liens entre l'utilisation des antibiotiques et le développement de résistance.....	20
2.5.4	Les gènes de résistance et leur transfert.....	22
2.5.5	Mécanismes de la résistance aux antibiotiques et antibiorésistance chez <i>Salmonella</i>	27
2.5.5.1	Résistance aux quinolones.....	33
2.5.5.2	Résistance aux macrolides-lincosamides-streptogramines de groupe A et B.....	34
2.5.5.3	Résistance aux β -lactames et aux céphalosporines (pénicillines, céphalosporines, monobactams, carbapenem).....	35
2.5.5.4	Résistance au chloramphénicol.....	36
2.5.5.5	Résistance aux aminoglycosides.....	37
2.5.5.6	Résistance aux tétracyclines.....	38
2.5.5.7	Résistance au triméthoprim-sulfaméthoxazole.....	39
2.5.6	Méthodes de détection de la résistance.....	40
2.5.7	Contrôle et surveillance.....	40
2.5.8	Antibiorésistance chez l'humain.....	42
2.6	Caractérisation génétique de <i>Salmonella</i>	46
2.7	L'industrie avicole québécoise et canadienne.....	52
2.8	L'utilisation des antibiotiques chez la volaille.....	53
Chapitre 3.	Use of antimicrobial susceptibility patterns and pulsed-field gel electrophoresis to characterize <i>Salmonella</i> strains isolated from broiler chicken ceca at slaughterhouse.....	55
Chapitre 4.	DISCUSSION GÉNÉRALE	
4.1	Isolement de <i>Salmonella</i> à partir de caeca de poulets de chair à l'abattoir.....	85
4.1.1	Prévalence de <i>Salmonella</i> dans les caeca de poulets de chair à l'abattoir.....	85
4.2	Résistance aux antibiotiques en lien avec leur utilisation en élevages.....	86

4.2.1	Résistance aux antibiotiques retrouvée chez les souches de <i>Salmonella</i> isolées de caeca de poulets de chair à l'abattoir.....	87
4.2.2	Évaluation du lien entre la présence de résistance aux antibiotiques chez les souches de <i>Salmonella</i> isolées de poulets de chair à l'abattoir et l'utilisation d'agents antimicrobiens dans les élevages correspondants.....	89
4.2.3	Existence possible d'un lien entre la présence de résistance aux antibiotiques chez les souches de <i>Salmonella</i> isolées de poulets de chair à l'abattoir et l'utilisation d'agents anticoccidiens dans les élevages correspondants.....	90
4.2.4	Résistance aux désinfectants retrouvée chez les souches de <i>Salmonella</i> isolées de caeca de poulets de chair à l'abattoir.....	91
4.2.5	Évaluation du lien entre la présence de souches de <i>Salmonella</i> multi-résistantes en élevages et l'approvisionnement à un couvoir et une meunerie spécifiques.....	93
4.3	Caractérisation génétique des isolats de <i>Salmonella</i> ...	94
4.3.1	Étude de la diversité génétique des isolats de <i>Salmonella</i> au niveau des caeca de poulets de chair.....	95
4.4	Existence possible d'un lien entre un profil de résistance aux antibiotiques et l'appartenance à une famille génétique particulière.....	97
Chapitre 5.	Conclusions.....	98
5.1	Perspectives.....	100
Chapitre 6.	Références.....	102

LISTE DES TABLEAUX

Chapitre 2

- I. Mécanismes de résistance aux antibiotiques.....32
- II. Critères de Tenover utilisés pour la comparaison des patrons de bandes d'isolats bactériens analysés par PFGE.....50

Chapitre 3

- I. Percentages of antimicrobial resistance for the six *Salmonella* serovars isolated from poultry ceca in four Quebec slaughterhouses.....79
- II. Use of antibiotics as growth promoters in broiler flocks sampled between July 2003 and February 2004 and the corresponding antimicrobial resistance profiles.....80
- III. Number of MDR strains vs total number of isolated strains related to hatcheries and feedmills ($p < 0,0001$).....81
- IV. Genotypes of *Salmonella* isolates recovered from broiler chicken ceca for different broiler flocks and slaughter days in Quebec, using *SpeI* digestion and PFGE.....82

V. LISTE DES FIGURES

1. Dendogram showing the cluster analysis of the different PFGE *SpeI* patterns generated by Bionumerics software using the unweighted pair group with arithmetic mean (UPGMA).....83

LISTE DES ABRÉVIATIONS

- AAC** : Aminoglycoside acetyltransferase
- AFLP** : Amplified Fragment Length Polymorphism
- AME** : Aminoglycoside-modifying enzyme
- ANT** : Aminoglycoside nucleotidyltransferase
- APH** : Aminoglycoside phosphotransferases
- CATs**: Chloramphénicol acétyltransférases
- CDC**: Center for Disease Control
- CLSI**: Clinical Laboratory Standard Institute (anciennement NCCLS: National Committee for Clinical Laboratory Standards)
- CMI**: Concentration minimale inhibitrice
- DHFR** : Dihydrofolate reductase
- DHPS** : Dihydropteroic acid synthase
- LPS**: Lipopolysaccharide
- ml** : Millilitre
- MLEE**: Multilocus Enzyme Electrophoresis
- MLST** : Multilocus Sequence Typing
- NPIP**: National Poultry Improvement Plan
- OMS**: Organisation Mondiale de la Santé
- PBPs**: Penicillin Binding Proteins
- PCR**: Polymerase Chain Reaction

PFGE: Pulsed-field Gel Electrophoresis

QACs: Quaternary ammonium compounds

QRDR: Quinolone Resistance Determining Region

RAPD: Random Amplified Polymorphic DNA Analysis

SPIs: *Salmonella* Pathogenicity Islands, îlots de pathogénicité de *Salmonella*

THF : Tetrahydrofolate

µg: Microgramme

µl : Microliter

UPGMA : Unweighted-Pair Group Method using Arithmetic Averages

USDA: United States Department of Agriculture

À Élisabeth, ma raison de continuer...

À Patrick, ma raison d'aimer...

REMERCIEMENTS

La rédaction de ce mémoire représente l'étape finale d'une longue démarche à laquelle différentes personnes ont collaboré tant au niveau scientifique que personnel. Je veux donc remercier les personnes suivantes :

Mon directeur de recherche, le Dr Sylvain Quessy, pour m'avoir fait découvrir la recherche, pour la confiance qu'il m'a toujours témoignée, et pour son apport inestimable à ma vie professionnelle

Mes codirectrices, la Dre Ann Letellier et la Dre Martine Boulianne pour leur soutien, leur écoute ainsi que pour les moments agréables à jaser bébé,

Valérie Normand, pour sa présence tout au long de mon projet, pour son amitié et pour les nombreuses heures à discuter de tout et de rien,

Louise Lessard, pour ses conseils en laboratoire, pour ses grandes qualités humaines et pour avoir été une inspiration,

Guy Beauchamp, pour son aide et sa disponibilité,

Mes parents, pour m'avoir toujours encouragée à réaliser mes rêves, pour leur soutien et leurs encouragements constants ainsi que pour leur amour,

Patrick, pour sa présence et son amour inconditionnel.

CHAPITRE 1. INTRODUCTION

Salmonella est un pathogène dont l'importance est mondiale pour la santé publique. Il est retrouvé chez une variété d'espèces animales telles que les mammifères, les volailles et les reptiles qui le transportent généralement de manière asymptomatique, assurant ainsi généralement sa survie à l'intérieur du tractus digestif des animaux porteurs (140, 226). La volaille figure parmi les espèces pouvant être porteur sain et est reconnue pour être la principale responsable d'infections sporadiques chez l'humain (229). Celui-ci s'infecte lors de la manipulation ou de l'ingestion de viande de volaille elle-même contaminée. *Salmonella* est en fait la cause numéro un, devant *Campylobacter*, de gastro-entérites d'origine bactérienne selon le programme de surveillance des pathogènes alimentaires FoodNet du Center for Diseases Control and Prevention des États-Unis (56).

L'industrie avicole fait depuis plusieurs années appel à l'utilisation des antibiotiques dans le traitement et la prévention de conditions pathologiques, mais aussi en tant que promoteurs de croissance. Il a été démontré que l'ajout de certains antibiotiques à des doses réduites dans la ration des animaux assurait une meilleure croissance et réduisait les taux de mortalité et de maladies (41). Ces dernières années, plusieurs programmes de surveillance et études scientifiques ont rapporté une augmentation marquée du nombre de souches de *Salmonella* affichant de la résistance et même une multi-résistance aux antibiotiques, chez plusieurs espèces animales dont la volaille (59, 78, 245). Il a été démontré que plusieurs gènes de résistance aux antibiotiques chez des bactéries à gram-négatif étaient localisés sur des éléments génétiques appelés intégrons (100). Récemment, les intégrons de classe 1, communément associés à la résistance aux antibiotiques chez les membres de la famille des *Enterobacteriaceae*, ont été identifiées comme porteurs du gène *qacEΔ1* relié à la résistance aux ammoniums quaternaires. Ces études ont donc laissé supposer que l'utilisation de biocides pouvait mener non seulement à une diminution de susceptibilité à ces désinfectants, mais aussi à une réduction de sensibilité aux antibiotiques (223, 232). Cette inefficacité des antibiotiques devient préoccupante si l'on considère que les cas de salmonellose humaine avec complications nécessitent une antibiothérapie efficace. Ainsi, l'émergence de résistance aux fluoroquinolones, la production de β -lactamases à spectre de plus en plus large par *Salmonella* et l'augmentation du nombre de souches multi-résistantes justifient les efforts déployés afin de mieux comprendre et contrôler la dissémination de ces souches (242).

Les hypothèses de ce projet étaient donc que l'utilisation des antibiotiques et désinfectants dans un élevage de poulets de chair influence la prévalence de souches multi-résistantes, que ces souches multi-résistantes sont plus susceptibles d'être porteuses du gène de résistance aux ammoniums quaternaires *qacEΔ1*, et que ces souches multi-résistantes présenteraient des profils génétiques similaires et seraient donc associées à la dissémination d'une même lignée clonale. Ce projet portant sur l'étude d'isolats de *Salmonella* avait donc comme objectifs d'évaluer la prévalence de *Salmonella* à l'intérieur de lots de poulets de chair, de déterminer les profils de résistance aux antibiotiques pour les souches isolées des caeca de ces poulets, d'établir un lien entre la présence de résistance aux antibiotiques et l'utilisation d'antimicrobiens sous forme de promoteurs de croissance à la ferme, puis finalement de caractériser génétiquement ces souches afin de mettre en évidence un possible lien clonal entre les isolats multi-résistants.

CHAPITRE 2. RECENSION DE LA LITTÉRATURE

2.1 Historique et caractéristiques générales

L'importance clinique de *Salmonella* fut reconnue bien avant la venue des techniques modernes d'identification des espèces bactériennes basées sur l'homologie de l'ADN ou les séquences d'ARNr 16S. *Salmonella* est un agent infectieux capable de coloniser la plupart des vertébrés. C'est un des agents de zoonose les plus étudiés et surveillés à travers le monde. L'infection par ce microorganisme se traduit par des signes cliniques allant d'un portage asymptomatique jusqu'à une mortalité. Chez les animaux, l'infection par *Salmonella* justifie les efforts de plusieurs chercheurs si l'on considère les pertes économiques importantes associées à la présence du pathogène dans les élevages, mais également les risques que cette bactérie engendre pour la santé humaine (227). *Salmonella enterica* est responsable de plus de 1.4 millions de cas de gastro-entérites chaque année aux États-Unis (102). Malgré le fait que les infections entériques à *Salmonella* ne requièrent habituellement pas de traitement, l'utilisation d'antibiotiques demeure nécessaire lors de complications. La surveillance effectuée dans plusieurs pays tend à démontrer que la prévalence de souches de *Salmonella* résistantes ne cesse d'augmenter avec les années. Ainsi, depuis 1979-1980, le CDC a mené des études à 5 ans d'intervalle afin de vérifier l'évolution de la résistance du pathogène à divers agents antimicrobiens. Les résultats de cette étude ont permis de démontrer que la prévalence de résistance était passée de 16% en 1979-1980 à plus de 29% pendant les années 1989-1990. De plus, les données obtenues par le biais d'une étude menée en 1996 ont révélé que plus de 37% des souches de *Salmonella* isolées dans cette étude avaient une résistance envers au moins un agent antimicrobien. Ce qui inquiète encore plus les scientifiques est l'augmentation en parallèle des souches de *Salmonella* Typhimurium DT104 pour lesquelles la prévalence est passée de moins de 1% en 1980 à plus de 7% en 1990. Ces souches démontrent une pentarésistance, c'est-à-dire une résistance à l'ampicilline, au chloramphénicol, à la streptomycine, aux sulfamides ainsi qu'aux tétracyclines (80).

2.2 Classification et identification

La sérotypie, développée par Rebecca Lancefield au début des années 30, est une des techniques sérologiques utilisées pour distinguer différentes souches en utilisant la composition antigénique de ce microorganisme (211). Avec l'avènement du sérotypage comme moyen de caractérisation bactérienne, la communauté scientifique a assisté à la multiplication du nombre de sérogroupes de *Salmonella*. L'apparition de tous ces sérogroupes a par le fait même provoqué la confusion totale quant à une façon logique de les nommer. Certains grands principes demeurent quand même acceptés et utilisés. Depuis plusieurs années, un sous-comité du International Committee on Systematic Bacteriology a été formé avec pour mandat d'émettre des recommandations relativement à la classification et à la nomenclature des *Enterobacteriaceae*. *Salmonella* fait partie de la famille des *Enterobacteriaceae* qui caractérise des bâtonnets à Gram négatif d'une taille d'environ 0,7-1,5 x 2,0-5,0 μm , ne formant pas de spores, non-motiles comme c'est le cas pour les sérotypes Pullorum et Gallinarum, ou motiles lorsque munis d'un flagelle péritriche (134). Les membres de cette famille peuvent être cultivés autant dans des conditions d'anaérobiose que d'aérobiose, produisent généralement du gaz et ont la capacité de croître sur des milieux peptonés. Les colonies présentant une croissance sur milieux solides ont une taille variant entre 2 et 4 mm de diamètre.

Après plusieurs études et discussions, il semble y avoir consensus sur la façon de nommer et de classer les membres du genre *Salmonella*. Jusqu'aux années 70, les espèces du genre *Salmonella* étaient nommées sur la base de leur épidémiologie, de leur spécificité d'hôte, de leurs réactions biochimiques ainsi que de leur structure antigénique. Ce n'est qu'en 1973 qu'on a eu recours à l'hybridation ADN-ADN permettant alors la division du genre *Salmonella* en cinq groupes évolutifs. Deux espèces sont reconnues pour le genre *Salmonella* soit *Salmonella enterica* et *Salmonella bongori*. Six sous-espèces appartiennent à l'espèce *enterica* : *Salmonella enterica* subsp *enterica* (sous-espèce I), *Salmonella enterica* subsp *salamae* (sous-espèce II), *Salmonella enterica* subsp *arizonae* (sous-espèce IIIa), *Salmonella enterica* subsp *diarizonae* (sous-espèce IIIb), *Salmonella enterica* subsp *hontenae* (sous-espèce IV), puis *Salmonella enterica* subsp *indica* (sous-espèce VI). La sous-espèce V était autrefois attribuée à *Salmonella bongori*. (174). Des 2463 sérotypes identifiés pour le genre *Salmonella*, à peu près tous sauf 20 d'entre eux appartiennent à l'espèce *enterica*. De plus, 60% des sérotypes de *Salmonella enterica* font partie de la sous-espèce *enterica* et sont hébergés par des hôtes mammifères et aviaires (227). L'attribution d'un nom pour chaque nouveau sérotype identifié se fait en

fonction du lieu géographique où ce sérotype a été isolé pour la première fois. Cette façon de procéder est utilisée par « l'OMS Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella* » situé à l'Institut Pasteur de Paris en France pour les sérotypes appartenant à *Salmonella enterica* subsp *enterica* seulement. Le nom du sérotype est écrit en lettres romaines puis débute toujours par une majuscule. Pour tous les sérotypes appartenant aux autres sous-espèces, ils sont identifiés, en plus de la sous-espèce à laquelle ils appartiennent, par la formule antigénique les caractérisant. Cette formule est établie en fonction des antigènes somatiques (O), capsulaires (Vi), flagellaires (H) et est représentée par le schéma de Kauffman-White, outil de référence pour cette nomenclature (134). Ce sont les propriétés des antigènes O qui ont formé la base de la classification sérologique des *Salmonella* (5). C'est aussi la responsabilité de « l'OMS Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella* » d'assurer la mise à jour annuelle de ce schéma afin d'y incorporer les nouveaux sérotypes identifiés. Une révision complète est aussi effectuée tous les cinq ans (174).

L'isolement de *Salmonella* n'est pas une technique ardue. Quoique la bactérie puisse être facilement cultivée sur divers milieux, l'utilisation de milieux sélectifs facilite les procédures d'identification par la suite. Un enrichissement en bouillons sélectifs tels que le tétrathionate, le tétrathionate avec vert brillant (TBG ou tetrathionate brilliant green), un bouillon à base de sélénite (SEL ou selenite broth), ou même un milieu semi-solide en tube comme le Rappaport-Vassiliadis modifié sont parmi les plus efficaces (247, 246, 267, 270). Un passage sur milieu gélosé permet par la suite d'éliminer d'autres contaminants. On parle des milieux MAC (MacConkey) et EMB (eosin methylene blue) pour les moins sélectifs, de XLD (xylose lysine desoxycholate), DCA (desoxycholate citrate), SS (*Salmonella-Shigella* agar) et HE (Hektoen enteric) pour leur pouvoir sélectif intermédiaire, puis finalement de BS (bismuth sulfate agar) et de BGS avec novobiocine pour leur grande sélectivité (151, 174, 184). Les colonies alors suspectes peuvent être soumises à une panoplie de tests biochimiques permettant de distinguer *Salmonella* des autres membres de la famille des *Enterobacteriaceae*. La sérotypie se basant sur le schéma de Kauffman-White, diverses méthodes phénotypiques de typage telles que le typage phagique, le biotypage, et l'identification du profil de résistance aux agents antimicrobiens peuvent ensuite être utilisés. De nouvelles techniques génétiques peuvent maintenant permettre une caractérisation plus spécifique

pour un même sérotype. On parle alors d'empreintes plasmidiques, de MLEE, de PFGE, d'IS200, de PCR et de RAPD (174).

2.3 Épidémiologie de la bactérie

2.3.1 Distribution et sources de contamination

Salmonella est un pathogène ayant une distribution mondiale. Il peut vivre à l'intérieur du tractus gastro-intestinal d'une grande variété de vertébrés, sans que sa présence ne provoque de signes de maladie (227). Ces animaux sont alors définis comme des porteurs sains, c'est-à-dire que la bactérie est présente dans leur organisme sans provoquer de manifestation clinique (8, 227). Ce sont ces animaux qui sont en grande partie responsables du maintien de l'infection dans un milieu donné. Les rongeurs, oiseaux et mammifères domestiques ou sauvages peuvent agir de cette façon et ainsi faciliter la transmission de la bactérie en passant de l'état de porteur à celui d'excréteur en excréant le pathogène lors d'épisodes de stress, ces périodes de stress pouvant affecter l'efficacité du système immunitaire, tels que le transport, le surpeuplement, la mise-bas, l'administration de drogues immuno-suppressives, la maladie et même l'administration d'antibiotiques altérant la composition de la flore intestinale (140). De cette façon, ces hôtes assurent une contamination de leur environnement, contaminant par le fait même l'eau et la nourriture consommées par les autres animaux. Ces animaux s'infectent alors par ingestion ou inhalation du microorganisme. La conjonctive a même été rapportée comme possible voie d'entrée pour la bactérie (140). Cette transmission est facilitée par le fait que *Salmonella* possède la capacité de survivre plusieurs mois dans l'environnement, le sol et les déjections animales (72, , 120). Chez l'humain, les aliments d'origine animale représentent la source principale de toxi-infections alimentaires à *Salmonella* (229). Chez les volailles, les infections par les bactéries du genre *Salmonella* sont responsables d'une variété de manifestations cliniques, aiguës comme chroniques. Ces infections sont d'autant plus importantes qu'elles sont, à travers la chaîne alimentaire, la principale source de contamination pour l'humain (86).

2.3.2 Modes de transmission

L'élimination de *Salmonella* dans un environnement donné doit être faite de façon rigoureuse puisque la transmission de la bactérie se fait facilement à partir d'un environnement contaminé. Cette transmission peut être horizontale, c'est-à-dire que les animaux porteurs vont, lors de situations de stress, excréter, de manière constante ou intermittente, la bactérie dans leurs fèces (8). La dose excrétée varie entre 10 et 10⁶ microorganismes par gramme de fèces contaminées. Les bactéries se retrouvent alors dans l'environnement, devenant disponibles pour infecter d'autres individus (61). La transmission horizontale s'effectue donc d'un individu à un autre ou par l'intermédiaire des aliments, de l'eau, de la poussière, etc... Les vecteurs biologiques tels que les insectes et les rongeurs peuvent répandre, mais aussi augmenter la prévalence du microorganisme à l'intérieur d'un même environnement. Chez les espèces aviaires, *Salmonella* peut se transmettre de manière verticale (86). Cette transmission peut se produire lorsque la bactérie est présente à l'intérieur de l'ovaire de la poule et ainsi se transmet à l'œuf. *Salmonella Enteritidis* est la plus étudiée pour cette transmission transovarienne. Malgré l'élimination des infections par les sérovars Pullorum et Gallinarum dans plusieurs régions industrialisées du monde, la volaille demeure une source majeure de contamination par *Salmonella* chez l'homme via la consommation d'œufs, de viande et de produits de volaille transformés (8, 86, 140).

2.3.3 Spécificité d'hôte

La presque totalité des sérotypes de *Salmonella enterica* ne se sont pas adaptés à un hôte spécifique. Les sérotypes Typhimurium et Enteritidis peuvent affecter une variété de vertébrés présentant ou non des signes cliniques. Certains autres sérotypes se sont par contre adaptés à une espèce spécifique. Ce lien a clairement été démontré chez l'humain avec *Salmonella enterica* pour les sérovars Typhi, Paratyphi A et Sendai, pour le sérovar Dublin chez les bovins, Choleraesuis chez l'espèce porcine, Abortusequi chez les équins, Abortusovis chez les ovins, Arizona pour les reptiles, puis finalement Pullorum et Gallinarum chez les volailles (140). L'isolement de la bactérie chez l'espèce aviaire est plus fréquent que chez toutes les autres espèces animales. On peut distinguer deux catégories d'infections chez la volaille. Les infections typhoïdes causées par des

sérotypes non-motiles, *Salmonella Pullorum* et *Salmonella Gallinarum*, sont généralement spécifiques à l'espèce. Viennent ensuite les infections causées par les salmonelles paratyphoïdes, impliquant une variété de sérotypes motiles. Ce sont ces sérotypes qui retiennent l'attention d'un point de vue de santé publique puisqu'on les relie aux cas de toxi-infections alimentaires chez l'humain (8, 237). Les sérovars présentant une spécificité d'hôte causent une maladie systémique sévère autant chez les adultes que chez les plus jeunes. La pullorose (*Salmonella Pullorum*) et la typhose (*Salmonella Gallinarum*) aviaires sont les deux maladies septicémiques qui affectent principalement les poulets et les dindes. Elles représentent un très faible danger pour la santé publique (86, 237). En effet, selon un rapport des « Centers for Disease Control and Prevention » (CDC), parmi 458 081 isolats de *Salmonella* provenant de cas humains entre 1982 et 1992, 18 étaient du sérovar Pullorum et 8 du sérovar Gallinarum (237). Les deux maladies chez la volaille sont très similaires en terme d'historique, de manifestations cliniques, d'épidémiologie, de lésions pathologiques, ainsi que de mesures de contrôle et d'éradication. Ces deux maladies ont été identifiées vers la fin des années 1800 et représentaient un danger important pour l'industrie avicole. Pour cette raison, le National Poultry Improvement Plan (NPIP), formé en 1935 et administré par des agences collaborant avec le USDA, a été mandaté pour la gestion et l'application du programme de contrôle et d'éradication de la pullorose-typhose. Ces deux maladies, responsables de pertes économiques considérables, ont donc été éradiquées vers le milieu des années 1900 et ne se manifestent plus que lors de rares épisodes ponctuels et isolés. Lorsque c'est le cas, les pertes sont importantes, variant de 0 à 100% pour la pullorose et entre 10 et 93% pour la typhose. Lors de transmission transovarienne, les oiseaux peuvent mourir avant l'éclosion ou présenter divers signes cliniques tels que de la somnolence, de la faiblesse, une mauvaise croissance, une lassitude, des difficultés respiratoires, de la cécité et même une mortalité embryonnaire. Les oiseaux en croissance et les sujets matures peuvent aussi ne présenter aucun signe clinique suite à l'infection, spécialement dans les cas de pullorose. Lorsqu'il y a présence de manifestations cliniques, on remarque une diminution de la consommation alimentaire, une mauvaise apparence physique, une baisse de fertilité, de ponte et d'éclosion. Dans certains épisodes, des signes digestifs comme l'anorexie, la diarrhée et la déshydratation ont surtout été remarqués (237).

Les sérotypes non-adaptés à une espèce particulière sont plutôt associés à une maladie entérique primaire chez les plus jeunes sujets d'une espèce (140). Selon une étude menée par Rabsch et al. en 2002 (212), l'adaptation d'un sérovar particulier pour une espèce animale est reliée au transfert de gènes de virulence par l'intermédiaire de phages. De plus, Liu et al, dans une étude comparant les génomes de *Salmonella* Typhimurium et *Salmonella* Pullorum, ont obtenu des résultats démontrant que la spécificité d'hôte pour *Salmonella* est reliée à l'absence de certains gènes retrouvés chez les *Salmonella* qui ne sont pas associées à une espèce hôte particulière. Rapportées pour la première fois en 1895 chez la volaille lors d'un épisode d'entérite infectieuse chez des pigeons, les *Salmonella* paratyphoïdes ont longtemps été reconnues comme étant responsables de pertes significatives chez de jeunes poulets. Puisqu'elles ont la capacité de coloniser de façon asymptomatique le tractus intestinal des poulets et des dindes, ces sérovares assurent souvent une contamination des carcasses au moment de l'abattage et de l'éviscération (86). Beal et al. (25) ont démontré que l'infection du poulet de chair à n'importe quel moment pendant l'élevage résultait en la présence de la bactérie au niveau intestinal lors de l'éviscération, augmentant ainsi le risque de contamination des carcasses. De nombreux auteurs se sont intéressés à la présence de *Salmonella* dans les caeca de poulets de chair et par conséquent à la contamination de la viande de volaille à l'abattoir lors du processus d'éviscération (15, 47, 85, 117, 121, 255). Chaque année aux États-Unis, ce sont 3.5 milliards de dollars de pertes qui sont reliés aux toxi-infections alimentaires provenant principalement de la consommation de viande de volailles et d'œufs contaminés (86). La prévalence des salmonelles paratyphoïdes varie énormément d'un élevage à un autre même si l'incidence de maladie chez les oiseaux demeure relativement faible (30). Différentes études ont rapporté des prévalences variant de 94% à partir de matières fécales pour des troupeaux d'élevage de poulets de chair aux Pays-Bas (261), 87% à partir d'échantillons de l'environnement de troupeaux de dindes au Canada (114), 87% chez des troupeaux de pondeuses en Thaïlande (230), à moins de 14% dans des échantillons de caeca au Japon (144). Dans une étude réalisée au Canada par Poppe et al. (203), un nombre aussi élevé que 77% des troupeaux de poulets de chair ont été trouvés positifs pour la présence de *Salmonella*. Les plus faibles prévalences pour *Salmonella* sont retrouvées dans les troupeaux de volailles en Suède, ces prévalences se situant sous le 1% (278, 279). Parmi les quelques 2400 sérotypes identifiés à ce jour, environ 10% seulement ont été retrouvés chez la volaille (86). La distribution des divers sérotypes varie en fonction de la région géographique et du temps. Selon les échantillons

soumis pour analyses au « USDA National Veterinary Service Laboratory » entre juillet 1998 et juin 1999, les sérotypes les plus communément retrouvés chez la volaille étaient *S. Heidelberg*, *S. Kentucky*, *S. Senftenberg*, *S. Enteritidis* et *S. Thompson* (86). De plus, des dix sérotypes les plus rapportés lors d'infections chez l'humain au « Center for Disease Control and Prevention » aux Etats-Unis en 1998, sept étaient aussi identifiés chez le poulet et la dinde pour les mêmes périodes. Au Canada, Chambers et al. (57) sont arrivés à des résultats proposant *Salmonella* Hadar et Heidelberg comme sérotypes les plus communément rencontrés dans les élevages de poulets de chair. La maladie se manifeste cliniquement seulement chez les très jeunes oiseaux. Lorsque la bactérie est transmise dans l'œuf, la mortalité embryonnaire ou la mort de l'oiseau rapidement après l'éclosion sont les seuls signes cliniques observés. Les oiseaux de plus de deux semaines sont rarement malades lors d'entrée en contact avec la bactérie. S'ils le sont, les signes cliniques sont souvent de faible intensité et très brefs. Par contre, lors d'infection aiguës chez de jeunes oiseaux, le cours clinique peut être aussi fulgurant que celui observé avec les infections par *Salmonella Pullorum*, *Gallinarum*, ou toute autre bactérie responsable de septicémie aiguë. La présentation clinique typique inclut la somnolence avec fermeture des paupières, des plumes ébouriffées avec les ailes tombantes, de l'anorexie suivie d'émaciation. Une diarrhée aqueuse profuse causant de la déshydratation est aussi fréquemment observée (86). On rapporte que moins de dix bactéries peuvent infecter pratiquement 100% des oiseaux d'un jour d'âge tandis qu'un nombre aussi élevé que 10^6 bactéries n'entraînera de manifestations cliniques que chez moins de 25% des oiseaux âgés de huit semaines. La septicémie peut aussi être observée chez de jeunes pondeuses infectées par *Salmonella Enteritidis* (205). Selon Beal et al., la différence de présentation clinique en fonction de l'âge d'infection serait liée à la capacité de l'oiseau de développer une réponse immunitaire efficace (25).

2.3.4 Prévalence et maladie chez l'humain

Malgré le fait que plusieurs pathogènes représentent un intérêt grandissant pour les responsables de la santé publique, *Salmonella* demeure en tête de liste en ce qui a trait aux infections d'origine alimentaire à travers le monde (229). La grande majorité des cas provient de la consommation de viande de volaille et d'œufs contaminés, les sérovars *Enteritidis* et *Typhimurium* étant les plus fréquemment incriminés (25). *Campylobacter* et

Salmonella sont les deux principales causes de toxi-infections alimentaires pour l'humain aux États-Unis (159). Selon le CDC, les salmonelles sont pointées du doigt dans plus de 1.34 millions de cas de maladie, plus de 16 430 hospitalisations et près de 582 décès chaque année (86). Les cas de salmonellose sont donc très fréquents chez l'homme, se présentant de manière sporadique ou plutôt sous forme d'épisodes. L'incidence réelle de la maladie demeure tout de même difficile à évaluer compte tenu du fait que plusieurs pays ne possèdent pas de système d'épidémiologie efficace, mais aussi que plusieurs cas sporadiques d'infection ne sont pas rapportés. Selon l'estimation de divers auteurs, le nombre de cas humains de salmonellose se situe entre 740 000 et 5 300 000 chaque année au Canada (8). Les sérotypes les plus souvent incriminés sont Enteritidis et Typhimurium, avec des fréquences relatives variant selon la période d'observation (86, 140). Ces deux sérotypes présentent une distribution mondiale tandis que d'autres sont confinés à certaines régions du monde comme c'est le cas pour l'Asie avec *Salmonella* Weltevreden (195). La salmonellose fait partie des zoonoses les plus répandues à travers le monde (8, 86). Les salmonelles d'origine animale provoquent chez l'homme une infection intestinale caractérisée par une période d'incubation variant de 6 à 72 heures suivant l'ingestion du pathogène. Cette incubation est accompagnée de symptômes tels fièvre, myalgies, céphalée et malaise. Ce sont la douleur abdominale, les nausées et vomissements ainsi que la diarrhée qui deviennent les principaux symptômes de la maladie pour une période de deux à quatre jours. La personne infectée peut continuer à excréter la bactérie pour quelques semaines ou quelques mois dans de rares cas. Les salmonelloses guérissent habituellement sans complication ni traitement. Chez les patients affaiblis par d'autres maladies, des complications peuvent survenir. Un traitement avec antibiotiques devient alors nécessaire (227).

2.4 Facteurs de virulence

Jusqu'à aujourd'hui, plusieurs facteurs de virulence ont été identifiés pour *Salmonella*. Parmi ceux-ci, on retrouve les facteurs situés sur des îlots de pathogénicité, les toxines, les plasmides de virulence, le système d'acquisition du fer, la survie dans le sérum, la présence de fimbriae et l'expression des protéines flagellaires par inversion d'ADN. Les recherches effectuées relativement à ces facteurs ont démontré, pour certains, leur importance dans la pathogénie des infections à *Salmonella*.

2.4.1 Îlots de pathogénicité

Par la présence de grands regroupements de certains gènes de virulence au niveau de son chromosome bactérien, *Salmonella* s'est génétiquement distancé de son plus proche semblable, *Escherichia coli*, il y a environ 100 millions d'années. On qualifie ces régions d'ADN chromosomique d'îlots de pathogénicité (SPIs), îlots sur lesquels on retrouve les facteurs de virulence (140). Ces groupes de gènes de virulence sont acquis par transfert horizontal, sont présents chez les organismes pathogènes mais absents des bactéries non-pathogènes apparentées (94, 97). Pour *Salmonella* Typhimurium et *Salmonella* Typhi, cinq îlots de pathogénicité (SPI-1 à SPI-5) assurant chacun des fonctions spécifiques ont été identifiés. SPI-1 comprend une région d'ADN de 40-kb codant pour des régulateurs de transcription, un appareil sécrétoire et des protéines sécrétrices d'agents effecteurs. Cet îlot est retrouvé chez toutes les bactéries du genre *Salmonella* et renferme le regroupement de gènes *inv/spa*. Des infections expérimentales ont mis en évidence le rôle essentiel de SPI-1 pour l'invasion intestinale, un facteur déterminant dans la phase intestinale de l'infection et par le fait même, dans la production de l'entérite (36). Par contre, SPI-1 n'est pas nécessaire à la phase systémique de la maladie (196). D'une taille de 40-kb également, SPI-2 renferme des gènes nécessaires à la virulence du pathogène et essentiels à la survie de la bactérie à l'intérieur du système phagocytes-macrophages et il intervient dans la réplication du pathogène à l'intérieur des macrophages. Ainsi, son rôle au niveau intestinal serait négligeable comparativement à SPI-1 (36). Ces mêmes rôles ont été attribués aux îlots de pathogénicité 3 et 4 lors d'études réalisées à partir d'un modèle murin. Les îlots de pathogénicité 2 et 3 sont tous les deux impliqués dans la survie et la réplication intracellulaire. L'îlot SPI-4 est quant à lui relié uniquement à la survie intracellulaire (190). La présence de SPI-4 était associée à une plus grande facilité à envahir les cellules épithéliales en culture (140). Finalement, SPI-5 est associé à la synthèse de facteurs impliqués dans la sécrétion de fluides et dans la réaction inflammatoire de la muqueuse intestinale (190).

2.4.2 Toxines

Parmi les toxines retrouvées chez *Salmonella*, le LPS représente sans doute la plus importante. Ce composant de la membrane externe de la bactérie, appelé aussi endotoxine, interagit avec le système immunitaire de l'hôte afin d'induire le processus inflammatoire, le choc septique, la fièvre et même la mort (140). C'est le LPS de *Salmonella* Typhimurium qui a été le plus étudié. Les LPS sont des molécules complexes formées de lipides et de glucides. Trois parties distinctes les composent, soit le lipide A, le polysaccharide central et la chaîne latérale O hautement antigénique (99). La réponse inflammatoire induite par le LPS est le fruit de son interaction avec les macrophages (140). *Salmonella* étant responsable de maladies entériques, cette bactérie est capable lors de sa croissance dans un milieu favorable, de sécréter aussi des entérotoxines responsables des symptômes caractérisant la maladie entérique. Finalement, *Salmonella* Typhimurium a été identifiée comme pouvant sécréter des exotoxines ayant la capacité de s'attaquer à des types cellulaires spécifiques, les cytotoxines (225).

2.4.3 Plasmides

Parmi les sérotypes de *Salmonella* présentant une spécificité d'hôte, plusieurs sont porteurs de plasmides de virulence contenant les gènes nécessaires pour causer les infections systémiques auxquelles ces sérotypes sont associés. Génétiquement, les plasmides de virulence semblent dériver d'un ancêtre commun possédant des gènes associés à la virulence (54). Les sérovars Dublin, Pullorum, Gallinarum, Choleraesuis, Abortusovis et quelques souches de Typhimurium et d'Enteritidis sont reconnus pour transporter ce genre de plasmides (140). Des expérimentations menées sur différentes espèces animales ont démontré que les plasmides de virulence augmentaient la capacité de la bactérie à se répliquer à l'intérieur d'organes autres que l'intestin, causant ainsi plus rapidement et plus fréquemment la mort de son hôte (22). Ces plasmides de virulence sont d'une taille non négligeable, variant entre 50 et 90 kb (96). Chez *Salmonella* Typhimurium, un plasmide de virulence de 90-kb renferme les gènes *spv* (*spvR* et *spvABCD*) intervenant dans la croissance de la bactérie à l'intérieur des macrophages lors de la phase systémique d'infection (224). Ces gènes ne sont exprimés qu'une fois la bactérie se retrouvant à un stade intracellulaire et sont responsables d'une multiplication de la virulence par un facteur de 10 à 10 000 (140). Un second groupe de plasmides

correspond aux plasmides associés à la résistance aux antibiotiques. Ces plasmides contribuent à la dispersion des gènes de résistance à l'intérieur des populations de bactéries. L'acquisition de plasmides par une bactérie lui permet de mieux s'adapter à un environnement changeant. Le meilleur exemple pour ceci est l'acquisition récente de plasmides renfermant les gènes *spv* et *rck* permettant l'évolution de *Salmonella* vers une espèce bactérienne plus virulente et plus résistante aux antibiotiques (224).

2.4.4 Système d'acquisition du fer

À partir du moment où un microorganisme adhère à un site permettant de causer l'infection chez son hôte, il se voit dans l'obligation d'accéder rapidement à une source de fer afin d'assurer sa croissance et sa multiplication. Même si les mammifères renferment du fer en quantités importantes, celui-ci ne peut voyager librement dans l'organisme et est lié à des protéines transporteuses telles que la lactoferrine, la transferrine, la ferritine et l'hème. Les bactéries ont été obligées de développer des mécanismes leur permettant d'acquérir le fer présent dans leur environnement. Pour ce faire, les microorganismes produisent des sidérophores capables de compétitionner efficacement avec les molécules transporteuses. Certaines bactéries en sont même venues à pouvoir utiliser le fer à partir de complexes formés par leur hôte sans avoir recours aux sidérophores. Finalement, la synthèse d'hémolysines permet à des bactéries pathogènes de libérer le fer contenu dans les complexes fer-hèmes et fer-hémoglobine (92).

2.4.5 Survie dans le sérum

Pour les bactéries traversant les premières barrières de défense de l'hôte que sont la peau ou les muqueuses, la résistance face aux effets lytiques du complément devient un élément essentiel de survie pour tous ces pathogènes (92). La capacité de survivre à l'attaque par le système du complément est donc un facteur de virulence important. Un élément majeur contribuant à cette résistance est la longueur des chaînes de l'antigène O. Plus elles sont longues, meilleures sont-elles pour entraîner la formation du complément à une distance permettant d'éviter son interaction avec la membrane externe de la bactérie (225). D'autres mécanismes de défense incluent la non-liaison et

l'absence d'activation du complément, la libération de molécules de surface qui activent le système du complément, l'interruption de la cascade du complément avant la formation des complexes C5b-C9 et l'augmentation de synthèse de complexe non-lytiques. La survie dans le sérum est un trait caractéristique de presque tous les microorganismes capables de causer des infections systémiques (92).

2.4.6 Fimbriae

Les fimbriae sont des structures de surface filamenteuses de 2 à 8 nm de largeur par 0,5 à 10 µm de longueur. Même si leur rôle a clairement été établi pour l'adhérence et la colonisation de cellules cibles, la fonction des fimbriae dans la pathogénie des infections à *Salmonella* n'est pas encore bien comprise (260). Par contre, le grand nombre d'opérons fimbrial suggère l'existence d'une variété de mécanismes d'adhérence chez une variété tout aussi grande d'hôtes (140). L'attachement à l'aide de fimbriae semble assurer différentes fonctions dans la phase intestinale de l'infection par *Salmonella*. Lors d'expériences in vitro, les fimbriae étaient impliqués dans l'attachement de *Salmonella* Typhimurium à diverses lignées de cellules épithéliales. Lors d'infections, les fimbriae semblent permettre l'attachement à une lignée cellulaire cible. Les fimbriae permettraient donc à la bactérie de différencier diverses lignées épithéliales (112).

2.4.7 Expression de protéines flagellaires par inversion de phase

De la même façon, l'implication des flagelles dans la virulence de *Salmonella* n'est pas claire. La plupart des *Salmonella* pathogènes sont biphasiques et capables de produire deux types de flagellines antigéniquement distinctes (140). Chez *Salmonella enterica* sérovar Typhimurium, l'expression des flagelles est assurée par un processus que l'on nomme variation de phase (113). Le passage d'une phase à l'autre se fait grâce à l'inversion d'un élément génétique permettant à la cellule bactérienne de modifier spontanément l'expression de sa protéine flagellaire d'une variété à une autre. Cette variation de phase permet donc à la cellule bactérienne d'échapper à la réponse immunitaire (140). Une étude menée en 1999 par Isaacson et al. (115) a permis de démontrer que la même souche de *Salmonella* Typhimurium (souche 798), souche reconnue pour causer des infections asymptomatiques persistentes chez le porc, se présentait sous deux phénotypes distincts. Les bactéries associées au premier phénotype

adhéraient aux entérocytes, étaient productrices de pili, étaient facilement phagocytées et pouvaient survivre à l'intérieur des phagocytes. À l'inverse, les bactéries associées au second phénotype présentaient des caractéristiques phénotypiques opposées. Les auteurs ont aussi remarqué que les bactéries pouvaient passer d'un profil phénotypique à un autre par le biais de l'inversion de phase. Ainsi, en modulant la fraction de cellules bactériennes propres à chaque phase, l'infection persistente pouvait être maintenue (115).

2.5 Résistance aux antibiotiques

2.5.1 Historique

Avec l'identification de bactéries résistantes aux antibiotiques, la question que les scientifiques se posaient a longtemps été de savoir si les gènes de résistance avaient fait leur apparition suite à l'utilisation des antimicrobiens (111). Ils ont rapidement constaté la grande diversité génétique de la résistance pour certaines classes d'antibiotiques et ont alors conclu que ces gènes évoluaient depuis beaucoup plus longtemps (225). Ainsi, certaines bactéries sont depuis longtemps reconnues pour produire de façon naturelle des antibiotiques tout en étant porteuses de gènes de résistance, gènes dont le transfert entre les bactéries n'est pas toujours relié à l'utilisation des antimicrobiens. L'évolution a permis aux bactéries de s'adapter à divers milieux, et ainsi de devenir présentes dans presque tous les environnements existants. L'humain et l'animal se sont habitués à cohabiter avec ces microorganismes au fil des années. Par contre, certains d'entre eux demeurent un danger pour la santé et on cherche encore à les éliminer. Pour cette raison, l'homme a travaillé au développement de substances pouvant contrôler ou détruire ces microorganismes parfois nuisibles. Les agents antimicrobiens ont donc fait leur apparition il y a de ça près de 70 ans.

2.5.2 Les principes de l'antibiorésistance

Depuis la découverte de la pénicilline vers la fin des années 1920, des centaines d'agents antimicrobiens ont été développés afin de parvenir à contrôler les infections bactériennes. Ces agents ont été non seulement employés dans un but thérapeutique autant chez l'homme que chez les animaux, mais ont aussi servi dans des intérêts

prophylactique et économique. Malgré que plusieurs, au cours des années, en aient parfois fait un usage inapproprié voire même exagéré, plusieurs de ces drogues restent tout de même encore efficaces contre une majorité d'agents bactériens (160). On a rapporté que des bactéries isolées de patients il y a plus de 60 ans ne possédaient virtuellement aucune résistance face aux antibiotiques (111). Cependant, les scientifiques soutiennent que des bactéries résistantes aux antimicrobiens existaient déjà peu de temps après l'utilisation à grande échelle des antimicrobiens. Le transfert de gènes reliés à la multi-résistance a d'ailleurs été décrit dès les années soixante (160). Aujourd'hui, le problème de la résistance bactérienne aux antibiotiques est plus que jamais un problème d'actualité, concernant non seulement le domaine médical humain, mais affectant de plus en plus la pratique vétérinaire. Jusqu'à présent, plus d'une centaine de gènes, exprimant chacun une résistance envers un ou des types d'antimicrobiens, ont été décrits (185). La résistance envers les agents antimicrobiens pourrait être transmise d'une population bactérienne à une autre grâce à divers mécanismes d'acquisition, d'échange, et de dissémination de matériel génétique (226). L'émergence de ces gènes au sein des populations bactériennes demeure encore difficile à expliquer. Les avancées récentes en ce qui a trait à la biologie moléculaire pour caractériser les mécanismes de résistance ont permis de mettre en évidence la présence de structures génétiques responsables de l'acquisition de certains gènes de résistance telles que les plasmides (185, 188). Ceux-ci possèdent la capacité de passer d'une bactérie ou même d'une espèce bactérienne à une autre. Les gènes de résistance aux antibiotiques sont retrouvés à l'intérieur de transposons qui peuvent alors passer du plasmide au chromosome bactérien et vice versa. Les plasmides jouent un rôle important dans la dissémination de l'information génétique reliée à la résistance aux antibiotiques (185, 224). L'évolution de la résistance aux antibiotiques s'est faite non seulement par la présence de gènes associés au chromosome bactérien, mais beaucoup par l'apparition de nouveaux gènes d'origine inconnue situés sur des plasmides (185). Plusieurs des nouveaux gènes de résistance ont procédé de cette façon. C'est le cas notamment pour les gènes de résistance aux β -lactamines, aux tétracyclines, au chloramphénicol, aux sulfamides, au triméthoprim et aux aminoglycosides. Ces gènes sont apparus en premier lieu sur un plasmide adjacent à d'autres gènes de résistance situés à l'intérieur d'une section précise d'un transposon, section que l'on nomme intégron (37). Les gènes de résistance peuvent donc aussi être retrouvés sous forme de cassette comprise à l'intérieur d'un intégron (99). Les plasmides, les transposons et les intégrons sont des éléments pouvant se combiner.

Ainsi, un intégrom peut faire partie d'un transposon, ce transposon étant situé sur un plasmide. De cette façon, l'intégrom peut acquérir de nouveaux gènes de résistance (cassette) et transférer ces nouveaux gènes à un nouvel hôte par l'intermédiaire d'un plasmide. Ce même intégrom peut tout simplement être inséré au chromosome de son hôte par transposition (224). Les intégroms ont fréquemment été observés dans des souches multi-résistantes aux antibiotiques. Ils étaient localisés soit sur le chromosome bactérien, soit sur des plasmides. La propagation et l'échange de gènes de résistance aux antibiotiques entre plasmides et chromosomes bactériens sont facilités par l'intégration des intégroms dans des éléments transposables (44). Chez *Salmonella* Typhimurium, Llanes et al. en 1999 (149) ont démontré que des gènes de résistance et de virulence pouvaient être retrouvés sur le même plasmide. Ce plasmide renfermait les déterminants génétiques codant pour le phénotype de pentarésistance (ACSSuT : ampicilline, chloramphénicol, streptomycine, sulfamides et tétracycline) ainsi que pour des gènes associés à la virulence du microorganisme (*spvCD*).

2.5.3 Les liens entre l'utilisation des antibiotiques et le développement de résistance

L'apparition de la résistance est actuellement la plus grande menace à l'utilisation des antibiotiques. Les plasmides de résistance aux antibiotiques demeuraient pratiquement absents d'organismes bactériens isolés de patients avant que les antibiotiques ne soient utilisés cliniquement. Peu de temps après l'arrivée de la pénicilline, des microorganismes résistants à cet antibiotique ont été observés (21, 183). Par la suite, chaque nouvelle mise en marché d'un agent antimicrobien par les compagnies pharmaceutiques était suivie, à plus ou moins long terme, de l'apparition de souches bactériennes résistantes à cet antibiotique (83, 138, 163, 167). Certaines études ont permis de prouver que les taux de développement de résistance étaient étroitement corrélés avec les quantités d'antibiotiques utilisées (118, 126, 167). Malgré les efforts déployés afin de limiter la dispersion de ces gènes de résistance, les scientifiques ont assisté, depuis les dernières années, à l'apparition de nouvelles souches bactériennes résistantes à plusieurs antimicrobiens à la fois (3). Ce qui inquiète le plus actuellement est que les antibiotiques utilisés chez les animaux d'élevage, que ce soit dans des objectifs thérapeutiques, prophylactiques ou afin de promouvoir la croissance, exposent

les bactéries présentes chez ces espèces à une pression de sélection importante. Ceci entraîne alors la sélection de résistance chez les bactéries pathogènes pour ces espèces, ce qui risque, à plus ou moins longue échéance, de limiter l'action des antibiotiques dans le traitement de conditions pathologiques affectant ces animaux. La résistance aux antibiotiques est régulièrement attribuable à la présence d'éléments de résistance transportant l'information génétique nécessaire à l'expression de cette résistance. Ainsi, l'utilisation d'un antimicrobien spécifique peut alors sélectionner pour des bactéries résistantes à cet antimicrobien et à tous les antimicrobiens dont la résistance est codée par cet élément génétique. L'utilisation d'un antimicrobien peut aussi sélectionner pour des gènes associés à des mécanismes plus généraux de résistance tels que des pompes à efflux et la réduction de perméabilité membranaire, notamment pour *Salmonella* (75, 252). La sélection exercée sur ces bactéries non-pathogènes pour l'humain peut en plus contribuer à l'apparition de nouveaux gènes de résistance chez ces bactéries, gènes qui peuvent éventuellement être transmis à des agents pathogènes humains. Certains peuvent être porteurs de bactéries pathogènes pour l'homme et responsables d'importantes zoonoses (*Salmonella*, *Listeria*, *Escherichia coli*, *Campylobacter*, *Yersinia*) (3).

Plusieurs études ont tenté de démontrer le rôle que pouvait avoir l'utilisation de promoteurs de croissance sur l'apparition de gènes de résistance chez des bactéries (10, 104, 180, 265, 283). La fréquence d'apparition de ces gènes dépendait non seulement de l'espèce bactérienne en cause, mais aussi de l'agent antimicrobien utilisé ainsi que de la dose et du temps d'administration. Certaines de ces études ont entre autre démontré que l'usage de l'enrofloxacin, de la tylosine et de la tétracycline à diverses concentrations sous formes de suppléments alimentaires fournis à des animaux étaient capables de sélectionner pour la résistance chez les bactéries du contenu intestinal et de la peau (3, 49, 60, 108, 240). Les profils de résistance dépendaient entre autre des voies d'administration utilisées puisque les traitements de groupes semblaient favoriser l'apparition de plus de résistance que les traitements individuels. Très peu d'information demeure disponible sur l'impact qu'a l'utilisation des antimicrobiens sur l'arrangement des populations bactériennes chez un même animal. Dans une étude réalisée par Hinton et al. (107), il a été possible de démontrer que suite à l'administration de tétracycline à doses thérapeutiques à de jeunes poulets, le pourcentage de *E. coli* résistants au niveau de la flore intestinale était passé de 50% à 100%. L'administration d'antibiotiques à des animaux peut avoir pour effet d'augmenter la charge bactérienne au sein de la chaîne

alimentaire en exerçant une sélection pour des organismes résistants. Les antibiotiques peuvent aussi augmenter la susceptibilité des animaux face à l'infection par des bactéries résistantes en supprimant la flore normale, laissant toute la place à la colonisation par des bactéries pathogènes résistantes (107).

2.5.4 Les gènes de résistance et leur transfert

L'usage des antibiotiques est aujourd'hui considéré comme étant le facteur le plus important ayant contribué à l'émergence, la sélection et la dissémination de micro-organismes résistants aux antibiotiques (2, 4, 78). Cette résistance se retrouverait non seulement chez des bactéries pathogènes, mais aussi chez les bactéries qui composent les flores commensales des individus recevant ces substances chimiques. Les antibiotiques sont utilisés chez les animaux afin de traiter des conditions pathologiques, mais sont aussi employés à l'intérieur des élevages commerciaux en tant que promoteurs de croissance. De cette façon, ils sont administrés en continu à tout le troupeau par le biais de l'alimentation. Dans ces conditions, les bactéries formant les flores bactériennes de ces animaux sont perpétuellement exposées à une pression de sélection pour la résistance (264). Les scientifiques demeurent encore incertains quant à la proportion pour laquelle l'usage des antimicrobiens en médecine vétérinaire a contribué à l'émergence de souches de *Salmonella* multi-résistantes. Des chercheurs ont rapporté qu'avant l'utilisation à grande échelle des antibiotiques, les isolats de *Salmonella* et d'autres membres de la famille des *Enterobacteriaceae* étaient susceptibles à la plupart des antibiotiques malgré la présence de plasmides (69, 152, 105). Les antibiotiques favoriseraient la sélection des microorganismes résistants, facilitant ainsi leur transfert. Cette résistance pourrait se propager soit par l'intermédiaire de déterminants chromosomiques ou par le transfert de gènes de manière horizontale à l'aide de plasmides ou de transposons portant ou non des intégrons (266). Par contre, les antimicrobiens ne sont pas les seuls responsables de cette résistance grandissante puisque les résistances face à certaines drogues ont augmenté de façon significative en l'absence d'une pression de sélection. Au cours de la dernière décennie, une lignée clonale du type phagique DT104 de *Salmonella* Typhimurium s'est répandue à travers le monde entier (3, 11, 78, 89, 125). En l'espace de seulement quelques années, ce type phagique est devenu une des causes majeures de salmonellose humaine. Ce que les

scientifiques ignorent toujours est le facteur déterminant dans cette dispersion : la pression sélective exercée par une utilisation massive des antibiotiques ou simplement une capacité marquée de ce clone de se multiplier et aussi de transmettre ces gènes de résistance (3). L'origine des gènes de résistance pour ces clones multi-résistants est encore difficile à définir, mais les observations des scientifiques à cet égard laissent croire à la présence d'un réservoir de gènes de résistance à partir duquel les gènes peuvent se transmettre et se disperser chez diverses souches bactériennes (70). Des mécanismes de dispersion de la résistance des animaux aux humains via la consommation de viande animale sont rapportés, mais ne sont pas nécessairement acceptés de tous. La colonisation du tractus intestinal d'humains par des souches de *E. coli* provenant de poulets a été démontrée comme étant possible, de même que le transfert, à des humains, de plasmides de résistance de carcasses de poulets infectées (146). En effet, cinq personnes volontaires n'ayant pas reçu d'antibiotiques pour une période d'au moins un an ont été suivies lorsqu'elles manipulaient, préparaient et mangeaient de la viande de volaille sur une période de trois mois. Les volailles utilisées ont été échantillonnées pour la présence et la caractérisation de *E. coli*. Les souches isolées ont été caractérisées en déterminant leur patron de résistance aux antibiotiques, leur sérotype ainsi que leur contenu plasmidique. De façon similaire, les sérotypes les plus prévalents de la flore intestinale des volontaires ont été identifiés sur cette même période de trois mois. Des cinq participants, un a vu sa flore intestinale colonisée par au moins cinq des quatorze souches résistantes de *E. coli* isolées à partir des carcasses de volailles. Linton et al. conclut par ceci qu'une souche résistante présente dans la flore normale d'un animal peut avoir un impact sur la composition de la flore normale d'un humain consommant la viande provenant de cet animal. Les scientifiques ne s'entendent cependant pas totalement quant à la transmission de transposons responsables de la multi-résistance. Guerra et al. (95) ont réussi à mettre en évidence la distribution des intégrons sur les plasmides de résistance à partir de souches de *E. coli* isolées notamment de volailles, ce qui les laisse croire au fort potentiel des intégrons dans la dispersion de la résistance aux antibiotiques. Récemment, Bass et al. (23) ont décrit la dispersion du transposon Tn21 codant pour la résistance aux antibiotiques ainsi qu'aux métaux lourds (mercure) chez des souches de *E. coli* pathogènes pour la volaille. Cette possibilité a donc laissé croire aux scientifiques que ce même phénomène pourrait alors se produire pour des souches humaines. Smith et al. (239) en sont par contre venu à la conclusion que les souches résistantes de *E. coli* appartenaient à deux groupes de pathogènes distincts et

que la colonisation du tractus intestinal humain par des pathogènes animaux était beaucoup moins fréquente que les croyances le laissent sous-entendre. Cette impossibilité proviendrait du fait que les sérotypes de *E.coli* humains et animaux seraient différents. De plus, une analyse génomique de ces plasmides provenant d'isolats humains a démontré qu'aucun de ces plasmides ne semblait être relié génétiquement à ceux des isolats humains (199). Caya et al. (50) ont eux aussi conclu que les souches de *E. coli* provenant de lésions de cellulite et d'aérosacculite chez des poulets de chair étaient génétiquement différentes des souches isolées chez des humains malades, tout ceci à l'intérieur d'une même période de temps ainsi qu'une même région géographique. Van den Bogaard et al. (264) ont tenté d'identifier des profils similaires entre diverses fermes d'éleveurs de volailles (dindes, poulets de chair et poules pondeuses). Ils ont débuté par l'identification des profils de résistance. Les prévalences et les degrés de résistance les plus importants ont été retrouvés chez les troupeaux de dindes, suivis de près par les échantillons en provenance des troupeaux de poulets à griller, où la résistance envers cinq antibiotiques ou plus était commune. Les plus faibles niveaux étaient attribués aux élevages de poules pondeuses. Lors de comparaison avec les échantillons humains, la même tendance a été observée, c'est-à-dire que les éleveurs de dindes ont été trouvés porteurs des souches présentant les plus fortes prévalences de résistance aux antibiotiques. Les humains travaillant dans les élevages de poules pondeuses, où l'usage des antibiotiques est beaucoup moins fréquent, ont démontré les plus faibles taux de résistance. L'électrophorèse à champs pulsés a par la suite servi à caractériser les souches. De tous les isolats provenant des dindes et d'éleveurs de dindes, 27 profils ont pu être établis, et 5 de ces profils ont été retrouvés à la fois chez les animaux et les humains (éleveurs et travailleurs d'abattoir), laissant croire à la présence de lignées clonales communes chez les animaux et les humains en même temps. Ce même patron a aussi été retrouvé pour les poulets de chair, les éleveurs et les travailleurs d'abattoir. Les chercheurs de cette étude parviennent donc à la conclusion que la dissémination de bactéries résistantes ou de plasmides de résistance des dindes et des poulets de chair aux éleveurs respectifs semble être la meilleure explication à la présence de souches de *E. coli* fortement résistantes aux antibiotiques chez ces personnes. Cette étude suggère donc fortement que le transfert de souches de *E. coli* résistants aux antibiotiques des animaux aux humains est possible. L'utilisation d'antibiotiques spécifiques pourrait alors promouvoir la dissémination de clones résistants. De nouvelles stratégies de prévention et des études épidémiologiques portant

sur la propagation des souches résistantes sont essentielles afin de limiter cette émergence de résistance (185). Encore aujourd'hui, les scientifiques en savent très peu sur la manière dont les gènes de résistance ont émergé et pourquoi divers gènes ont nécessité des périodes de temps différentes avant de se manifester. Certains gènes peuvent avoir déjà existé, mais avaient besoin de temps afin d'être mobilisés et transférés à des espèces bactériennes couramment isolées, tandis que quelques uns ont peut-être tout simplement eu besoin d'évoluer et de se mobiliser afin qu'on puisse remarquer leur action. Diverses situations viennent corroborer ces affirmations. Par exemple, la gentamicine a été utilisée pendant plus de cinq années avant que des bactéries résistantes commencent à se manifester. C'est alors que des gènes de résistance à la gentamicine portés par un plasmide ont été identifiés chez plusieurs espèces de bactéries isolées dans plusieurs hôpitaux (185, 189). Des études ont alors démontré qu'un de ces plasmides, un plasmide de 56,5 mégadaltons était responsable du transport de ce gène de résistance dans au moins huit hôpitaux différents des Etats-Unis (189). Le même phénomène s'est produit pour la vancomycine (168). Celle-ci a été utilisée pendant plus d'une vingtaine d'années avant que des bactéries ne démontrent quelque résistance que ce soit. Suite à l'apparition de la résistance, seulement quelques années ont suffi pour que les gènes de résistance se disséminent entre les différentes souches d'entérocoques (168). Les chercheurs ont plus tard découvert qu'un transposon (Tn1546) composé de neuf gènes (dont *van A*, *van H*, *van R*, *van S*, *van X*, *van Y*, *van Z*) était en fait responsable de l'apparition de cette résistance (12). La résistance ne se manifeste par contre pas toujours de la même façon. La résistance aux quinolones s'est manifestée par des mutations ponctuelles du gène codant pour une gyrase, celui-ci étant situé sur le chromosome bactérien. Les gènes de résistance ne parviennent pas toujours à survivre suffisamment longtemps pour se disperser. Ainsi, un gène de résistance localisé sur le chromosome d'une souche bactérienne ne parvient alors à se disséminer qu'à l'intérieur de la niche (écosystème) à laquelle appartient la souche bactérienne. À l'inverse, un gène de résistance situé sur un plasmide ou un transposon peut quant à lui être transféré à d'autres souches bactériennes de la même espèce et même à d'autres espèces bactériennes, assurant ainsi sa dissémination par l'occupation de niches autres que celle de son origine. Un gène contenu dans un transposon pourrait alors se déplacer vers un plasmide qui agirait comme moyen de transfert afin que ce gène puisse accéder à des niches formées de d'autres espèces bactériennes qui n'auraient peut-être pas acceptées le plasmide d'origine (224). Une fois transféré dans une nouvelle cellule, un

gène peut subir des influences génétiques favorisant sa dissémination ultérieure. Le fait de mettre en contact un antibiotique et une cellule bactérienne résistante à cet agent ainsi qu'un million supplémentaire de bactéries n'exprimant pas de gènes de résistance face à cet antibiotique aura pour effet de détruire complètement les bactéries susceptibles, laissant ainsi toute la place à la croissance de la souche résistante. Les antimicrobiens peuvent alors sélectionner pour une souche résistante tout en favorisant la dispersion de gènes de résistance, en permettant aux souches résistantes de dominer et ainsi d'augmenter leur chances d'être transmises (269). Plus le nombre de bactéries arborant un gène de résistance augmente, plus les chances sont grandes de voir ce matériel subir un événement génétique tel que la liaison à d'autres gènes de résistance ou même le transfert à un plasmide d'une espèce bactérienne autre. Ceci donne alors une nouvelle avenue de dissémination pour ces éléments génétiques, en plus de permettre l'apparition de profils de résistance supplémentaires (185). Lorsqu'une bactérie ne peut muter afin d'assurer sa survie, elle se doit de trouver une solution dans son propre environnement. Puisque la plupart des agents antimicrobiens sont d'origine naturelle ou dérivés de produits naturels (93), les gènes de résistance envers ces mêmes composés sont présents soit chez les microorganismes synthétisant ces agents, soit chez les microorganismes vivant à l'intérieur de la même niche écologique. Afin d'échanger du matériel génétique, les bactéries utilisent diverses techniques telles que la transformation naturelle ainsi que l'utilisation de bactériophages, moyens généralement utilisés par des bactéries d'une même espèce, puis le transfert de plasmides ou de transposons, des éléments de conjugaison assurant le transfert de résistance entre différentes espèces ou genres bactériens (225). Jusqu'à la fin des années 1970, on croyait que seuls les plasmides étaient impliqués dans le transfert de gènes. Des recherches plus poussées ont permis aux scientifiques de découvrir que les transposons étaient alors capables de transférer du matériel génétique d'une bactérie à une autre, mais aussi de faire de la transposition intracellulaire. Pour cette raison, ils ont nommé ce nouvel élément génétique transposon conjugatif (170). Les conséquences de la dissémination de matériel génétique peuvent être soit une dispersion rapide des gènes de résistance affectant une vaste majorité des bactéries, soit une progression si rapide des gènes à travers les divers stades de résistance amenant une résistance à plusieurs agents à l'intérieur de plusieurs niches favorisant ainsi la persistance d'un gène qui, en temps normal, n'aurait probablement pas pu persister. Chaque stade de dissémination permet à un gène de résistance de se présenter sous un nouveau concept génétique, lui conférant un nouveau

potentiel de dispersion (185). Ainsi, l'utilisation d'un antimicrobien spécifique ne favorisera pas la dispersion d'une souche bactérienne normalement susceptible sauf dans le cas où cette souche viendrait à acquérir un gène de résistance face à cet antibiotique. Suite à cet événement, l'usage de ce même antibiotique favoriserait alors la persistance ainsi que la dissémination de cette souche maintenant devenue résistante (3, 44, 185, 227). Pour contrer l'apparition de toutes ces résistances, beaucoup d'effort ont été déployés pour synthétiser de nouveaux antibiotiques capables de détruire les microorganismes résistants.

2.5.5 Mécanismes de la résistance aux antibiotiques et antibiorésistance chez *Salmonella*

Salmonella représente un des pathogènes les plus incriminés lors d'infections reliées à la consommation de nourriture. Les produits de volailles sont les véhicules de transmission d'origine animale les plus importants comme source d'infection. Chaque année, ce sont plus ou moins 1,4 millions de cas qui sont rapportés aux Etats-Unis (86, 158). De plus, quatre des sérotypes les plus souvent isolés dans les pays industrialisés sont à l'origine de zoonoses. C'est le cas pour *Salmonella typhimurium* DT104 qui représente un pathogène d'importance majeure chez l'humain et le bovin et dont l'isolement est de plus en plus fréquent chez les espèces aviaire et porcine. Ce type phagique présente une résistance à l'ampicilline, à la tétracycline, à la streptomycine, au chloramphénicol et aux sulfas (ACSSuT) (89). L'apparition de cette forme de résistance est d'autant plus inquiétante que le fait de retirer la pression de sélection engendrée par l'utilisation des antimicrobiens risque de ne pas renverser ce phénomène contrairement à ce qui est le cas pour les résistances d'origine extra-chromosomique. Pour cette raison, plusieurs chercheurs se sont intéressés, au cours des dernières années, au rôle des denrées alimentaires d'origine animale (volaille, porc, bœuf et leurs sous-produits) dans l'apparition de résistance chez les organismes pathogènes responsables de maladies chez l'humain, ainsi que la possibilité de transfert de cette résistance à la flore bactérienne chez ces humains. L'utilisation massive d'antimicrobiens autant en médecine vétérinaire qu'en médecine humaine a été considérée comme un facteur contribuant à l'apparition de ces pathogènes présentant des profils de résistance, et même au développement de multi-résistance chez ces mêmes pathogènes (3, 18, 76, 93). C'est l'identification de ces

bactéries résistantes à l'intérieur de la chaîne alimentaire qui a soulevé la problématique potentielle qui pourrait être reliée à l'utilisation des antimicrobiens chez les animaux d'élevage servant à l'alimentation humaine (18, 67, 130, 150, 155, 162, 206). Les études démontrent que l'utilisation à longue échéance des antibiotiques à doses sub-thérapeutiques en élevages pourrait entretenir un réservoir de bactéries résistantes ou de gènes de résistance pouvant, avec le temps, se répandre jusqu'aux souches retrouvées chez l'humain (150). L'acquisition de résistance envers les antimicrobiens par les bactéries résulte de l'action de différents processus biochimiques codés par des gènes bactériens (226). Les mécanismes biochimiques de cette résistance proviennent soit de la mutation des gènes de la cellule bactérienne ou de l'acquisition de nouveaux gènes de résistance. Par l'entremise de la génétique, les microorganismes parviennent à changer leur comportement biochimique envers l'action des antibiotiques. Ainsi, ils peuvent modifier l'antibiotique par l'entremise d'enzymes, altérer le site d'action de l'antibiotique ou même en restreindre l'accès, puis finalement utiliser une pompe à efflux pour expulser l'antibiotique. Chez certains microorganismes, plus d'un mécanisme peut intervenir pour la résistance aux antibiotiques, assurant ainsi de hauts niveaux de résistance (217).

Plusieurs chercheurs ont étudié la théorie selon laquelle la résistance pouvait survenir sur des fermes spécifiques et se transmettre par la suite à d'autres animaux d'élevages subséquents ou aux humains via la chaîne alimentaire. Il a été rapporté que des souches résistantes pouvaient être retrouvées chez des animaux comme faisant partie de leur flore, conséquence de l'utilisation à long terme des antibiotiques (3). Hatha et Lakshmanaperumalasamy (104) ont rapporté que les souches résistantes à plus de deux antimicrobiens avaient tendance à tirer leur origine de souches hautement résistantes présentes dans des élevages où l'utilisation des antibiotiques était commune. Des études réalisées chez la volaille, supposent que la contamination par *Salmonella* se produit fréquemment au niveau de la ferme (nourriture, eau, régie) et qu'elle est favorisée par de hauts niveaux de stress au sein d'un élevage (transport, maladie, etc...), ce qui aide à l'excrétion de la bactérie. Poppe et al. (203), ainsi que Irwin et al. (114) ont démontré que 53%, 77% et 87% des troupeaux de poules pondeuse, de poulets de chair et de dindes étaient respectivement trouvés positifs. C'est à partir des caeca que la bactérie est la plus souvent isolée. Dans une seconde étude réalisée par Poppe et al. (204), les profils de résistance aux antibiotiques ont été établis pour des isolats

provenant de troupeaux de poules pondeuses au Canada. Des 457 souches identifiées, 12,9% ont démontré une quelconque résistance envers tout antibiotique autre que la spectinomycine. La résistance envers l'ampicilline était présente chez 2,8% des souches. Cette étude a aussi tenté de démontrer une association entre l'expression de résistance face à divers antimicrobiens et la présence de plasmides. Les auteurs sont parvenus à démontrer que les sérovars arborant de gros plasmides démontrent une résistance beaucoup plus marquée que les sérovars ne possédant que de petits plasmides ou même dépourvus de ces éléments. Par exemple, 31% des souches de *Salmonella* Hadar ne contenaient aucun plasmide et ne présentaient une résistance envers les antibiotiques que dans 16% des cas. À l'opposé, 64% des souches de ce même sérotype arboraient des plasmides de petite taille et étaient résistantes aux antibiotiques dans une proportion de 26%. Le résultat le plus convaincant est celui concernant les souches de *Salmonella* Hadar portant des plasmides de grande taille. De tous les isolats, 5% correspondaient à cette description, et 100% de ceux-ci présentaient une résistance envers au moins un antibiotique. De toutes les souches porteuses de plasmides, 34% renfermaient un plasmide ayant la capacité de transmettre une résistance simple ou multiple aux antibiotiques de façon autonome lors de la conjugaison de la souche de *Salmonella* avec une souche de *E. coli* résistant à l'acide nalidixique. Cette situation a démontré que les bactéries résistantes étaient capables d'assurer leur survie face à de nouveaux agents chimiques en présentant de nouvelles mutations sur des gènes de résistance acquis auparavant. C'est le cas avec l'ampicilline, la première pénicilline développée pour son activité contre les bacilles à gram négatif. En l'espace de quelques années seulement, des résistances cliniques ont été rapportées (225). Une β -lactamase portée par un plasmide conférait cette résistance. L'industrie pharmaceutique concentra donc ses efforts afin de développer de nouveaux agents antimicrobiens capables de résister à cette β -lactamase. Les céphalosporines ont donc fait leur apparition sous différentes générations, leur conférant un spectre d'activité plus ou moins large. Compte tenu de leur grande utilisation clinique, des résistances sont de nouveau rencontrées face aux céphalosporines de la toute dernière génération. Des analyses moléculaires ont réussi à démontrer que ces nouvelles résistances étaient reliées à la β -lactamase d'origine, mais originaient de nouvelles mutations du gène bla_{TEM} de cette même enzyme (103).

Logue et al. (150) ont procédé, en 2003, à l'échantillonnage de deux abattoirs de dindes sur une période d'une année, chacune des visites était espacée d'un mois. Ce sont

au total 2411 échantillons qui ont été recueillis. Parmi ceux-ci, 16.7% ont été trouvés positifs à *Salmonella*. Plus de 15 sérotypes ont été identifiés, parmi ceux-ci les plus fréquents ont été Agona, Hadar, Heidelberg, Senftenberg. Toutes les souches isolées ont alors été testées pour la résistance envers divers agents antimicrobiens. La plupart des souches ont démontré de la résistance face à au moins quatre antimicrobiens différents. Environ 35% des isolats ont démontré de la résistance face à la streptomycine, tandis que 50% d'entre eux étaient résistants à l'action des tétracyclines. Les résultats de cette étude laissent entendre que plusieurs facteurs contribuent à la contamination des carcasses de volailles et le rôle des facteurs de virulence ou autres caractéristiques propres à *Salmonella* ne doit pas être négligé quant à leur contribution au développement de résistance. Au Danemark, des études menées suite à l'arrêt de l'utilisation des antibiotiques en tant que promoteurs de croissance chez les élevages de volailles ont permis de démontrer que la prévalence de la résistance pouvait être diminuée, établissant ainsi le rôle des facteurs environnementaux dans le développement et le maintien de cette résistance (161). Une étude menée en 1994 et 1997 par Breuil et al. (34) en France a permis d'isoler 25 526 souches de *Salmonella* à partir d'échantillons humains (5086) et animaux (20 440). De tous ces isolats, Typhimurium et Enteritidis représentaient 80% des sérotypes, suivis par *Salmonella* Hadar en troisième position. L'analyse de la susceptibilité de ces isolats à divers antimicrobiens a démontré que Typhimurium était le sérotype possédant les plus hauts taux de résistance, soit à l'ampicilline (12%), à l'acide clavulanique (18%), à la tétracycline (17%) et au chloramphénicol (19%). Les résistances à l'amikacine et à la gentamicine étaient quant à elles négligeables. Dans cette étude, 24 phénotypes de résistance ont été observés dont le principal regroupait des résistances à l'ampicilline, à la streptomycine/spectinomycine, aux sulfamides, à la tétracycline ainsi qu'au chloramphénicol. Le gène codant pour PSE-1 était prédominant et présent comme unique gène de résistance β -lactamase chez plus de 79% des isolats. Il a de plus été identifié comme unique gène de résistance chez plus de 98% des isolats présentant le phénotype de multi-résistance AmSm/SpSuTeCm. La présence d'intégrons de classe 1 a aussi été rapportée pour 80 isolats. L'incidence de résistance et de multi-résistance était d'ailleurs plus élevée chez les souches de *Salmonella* d'origine animale. Leurs résultats démontrent donc la dispersion de clones résistants possédant un plus grand potentiel pour causer des infections et même pour acquérir des résistances envers d'autres antimicrobiens. Lee et al. (133) ont tenté de vérifier cette hypothèse en réalisant une étude entre 1995 et 2001, permettant de recueillir 258 isolats de *Salmonella* Gallinarum à

partir de volailles. Des tests par diffusion sur disques et par calcul des concentrations minimales inhibitrices (CMI) ont permis de conclure qu'au fil de ces sept années, les profils de résistance avaient évolués en même temps que les souches. Sur les 258 souches, 138 ont démontré de la résistance envers un ou plusieurs antibiotiques et l'incidence de cette résistance a augmenté significativement de 1995 à 2001, passant de 0% à 93.5%. Les CMI de l'étude réalisée par Lee et al. (131) ont aussi augmenté graduellement pour chacune des drogues. Dans une étude réalisée au Canada par Larkin et al. en 2004 (130), on rapporte des taux de résistance à la gentamicine relativement élevés chez des isolats aviaires. La multi-résistance était estimée à 42% (méthode de dilution) et 33% (microdilution) pour ces mêmes isolats. En 2005, une étude menée en Alberta par Johnson et al. a démontré que 16,3% des isolats de *Salmonella* d'origines porcine, bovine et aviaire étaient résistants à 6 antibiotiques ou plus (119).

L'émergence de souches de *Salmonella* multi-résistantes est d'autant plus préoccupante du fait que la grande majorité de ces souches sont porteuses d'intégrons reliés à cette résistance. Ces intégrons peuvent être retrouvés chez des sérotypes beaucoup moins prévalents, mais étant retrouvés dans des réservoirs aussi importants que les animaux ou même l'environnement. Les chercheurs ont de plus démontré que les sites d'insertion de ces gènes étaient très efficaces dans l'acquisition et la conservation de résistance au sein d'une souche (49). D'autres patrons de résistance, similaires à celui observé chez les souches typiques de type phagique DT104, ont été remarqués en proportion importante chez des sérotypes beaucoup moins prévalents (176). Cette constatation est inquiétante puisqu'elle laisse croire à une possible émergence de patrons de résistance similaire à celui de DT104 chez des sérotypes subissant une pression de sélection consécutive à l'utilisation à grande échelle des antimicrobiens. La présence d'intégrons chez des sérotypes associés à des zoonoses est de plus en plus reliée aux pratiques d'élevage et rend encore plus d'actualité le besoin de contrôler le problème de la propagation de la résistance au sein des populations bactériennes (176). L'épidémiosurveillance des souches de *Salmonella* multi-résistantes est devenue nécessaire afin de pouvoir mieux suivre l'évolution des patrons de résistance.

Certains gènes bactériens sont responsables de l'expression de protéines impliquées dans la croissance et le maintien cellulaire. Ces protéines sont aussi la cible d'antibiotiques, qui par leur fixation à des sites spécifiques, peuvent exercer leur pouvoir

antimicrobien. L'interaction des antibiotiques avec ces sites demeure spécifique au produit chimique et la protéine. Pour cette raison, la modification d'un seul acide aminé, souvent le résultat du changement d'une seule base au niveau du gène, peut être suffisante pour altérer la capacité de liaison de l'antibiotique à son site d'action sur la bactérie. Un exemple pour ce type de résistance est celle rencontrée pour le rifampin suite à une mutation du gène *rpoB* codant pour l'ARN polymérase (169, 225). Un autre exemple inclut la résistance aux fluoroquinolones par mutations de la topoisomérase cellulaire (202). D'autres mutations peuvent être en cause lors de résistance, si on pense à des mutations au niveau de gènes impliqués dans des processus cellulaires.

Tableau I. Mécanismes de résistance aux antibiotiques (226, 227)

Antibiotiques	Mécanismes de résistance
Aminoglycosides Gentamicine Streptomycine Kanamycine	Enzymes, perméabilité réduite, résistance ciblée (ribosomes), pompe à efflux
β-lactamines Céphalothine Céfoxitine Ceftiofur	Perméabilité réduite, altération des protéines "penicillin-binding", β -lactamases, cephalosporinases, pompes à efflux
Inhibiteurs de la voie de l'acide folique Sulfamides	Perméabilité réduite, production d'enzymes
Macrolides-lincosamides-streptogramines B Érythromycine Lincomycine Virginiamycine	Diminution de l'attachement ribosomal, perméabilité réduite, enzymes, pompes à efflux
Phénicols Chloramphénicol Florfénicol	Diminution d'attachement ribosomal, perméabilité réduite, enzymes, pompes à efflux
Quinolones et fluoroquinolones Acide nalidixique Ciprofloxacine Enrofloxacine	Résistance ciblée (ADN gyrase, topoisomérase IV), perméabilité réduite, pompes à efflux
Tétracyclines Chlortétracycline Tétracycline	Résistance ciblée (ribosomes), action détoxifiante, pompes à efflux

2.5.5.1 Résistance aux quinolones

Les fluoroquinolones sont parmi les antibiotiques les plus fréquemment utilisés, notamment en médecine humaine. Tous les membres de cette famille traversent la paroi cellulaire bactérienne et agissent directement sur la synthèse d'ADN en exerçant un effet inhibiteur. Leurs sites de liaison sont l'ADN gyrase principalement pour les bactéries à Gram négatif et la topoisomérase IV, surtout pour les bactéries à Gram positif, qui subissent un changement de conformation lors de la liaison (229). Ces deux enzymes sont structurellement semblables du fait qu'elles sont toutes les deux formées de deux sous-unités soit la GyrA et la GyrB pour l'ADN gyrase, puis la ParC et la ParE pour la topoisomérase IV. Les fluoroquinolones, en se liant à ces complexes ADN-topoisomérase agissent sur les processus cellulaires impliquant l'ADN (217). Le pouvoir antimicrobien des quinolones dépend de leur capacité à se lier au complexe ADN gyrase et d'induire un changement de conformation de l'enzyme. La résistance bactérienne envers les fluoroquinolones provient essentiellement de l'action de deux mécanismes, soit des mutations ponctuelles entre les acides aminés 67 et 106 de la région QRDR du gène *gyrA*, altérant le site de liaison à l'ADN gyrase et des changements structuraux des porines de la paroi externe des bactéries à gram-négatif, produisant une altération de la perméabilité de la bactérie à l'agent antimicrobien. Les sites particulièrement étudiés pour ces mutations sont les sérines 83 et aspartates 87 pour la *gyrA* et les sérines 79 et aspartates 83 pour la ParC (229). C'est la présence des deux mutations pour la *gyrA* (sérine 83 et aspartate 87) qui confère la résistance au ciprofloxacine chez *Salmonella*, tandis qu'une mutation simple est quant à elle reliée à la résistance à l'acide nalidixique. Dans cette même étude, 90% des isolats de *Salmonella* résistants aux quinolones présentaient des mutations de la région QRDR du gène *gyrA*. Ces mêmes mutations étaient par contre absentes chez trois isolats possédant le même profil phénotypique de résistance, laissant ainsi croire à l'implication de d'autres mécanismes moléculaires de résistance (229). Les mutations de la GyrB et de la ParE sont beaucoup moins fréquemment observées. Parmi les microorganismes les plus résistants aux fluoroquinolones, plusieurs mutations ont été observées autant pour la GyrA que la ParC. De plus, la résistance clinique à un antibiotique est souvent associée à une augmentation de la CMI pour un second composé de la même famille. Chez les bactéries à gram-négatif comme celles à gram-positif, l'existence de pompes à efflux est reliée à des résistances multiples aux antibiotiques. Les résistances sont secondaires à des

mutations au niveau des gènes régulant l'expression de ces pompes, ces mutations favorisant une surexpression de ces pompes et ainsi une baisse de l'accumulation intracellulaire de l'antibiotique (217). Les quinolones sont largement utilisées en production animale, particulièrement en aviculture. Récemment, des résistances à l'acide nalidixique et au ciprofloxacine ont été identifiées chez des souches de *Salmonella* Typhimurium DT104, déjà associée à la pentarésistance ACSSuT (202, 284, 287).

2.5.5.2 Résistance aux macrolides-lincosamides-streptogramines de groupes A et B

Parmi les macrolides, on reconnaît trois composés communément utilisés, soit l'érythromycine, la clarithromycine et l'azithromycine. La clindamycine est bien connue pour représenter le groupe des lincosamides, tandis que la virginiamycine est une streptogramine largement utilisée en tant que promoteur de croissance. Les macrolides exercent leur action en inhibant la synthèse protéique suite à la liaison à la région peptidyl-ARNt retrouvée au niveau de la sous-unité ribosomale 50S du microorganisme susceptible. Cette liaison bloque donc la translocation de la molécule peptidyl-ARNt à son site de liaison. Toutes les bactéries à Gram négatif sont résistantes à l'érythromycine, celle-ci étant incapable de pénétrer la paroi cellulaire. Les bactéries à gram-positif peuvent elles aussi devenir insensibles à l'action des macrolides grâce à divers mécanismes de résistance. Entre autre, le processus de méthylation du ribosome secondaire à l'action des gènes *erm* (erythromycin ribosomal methylase) empêche la liaison de l'érythromycine à son site récepteur (274). Plusieurs gènes *erm* ont été décrits (*erm*(A) et le gène relié *erm*(TR), *erm*(B) et le gène relié *erm*(AM), *erm*(C), et plusieurs autres) (221). Tous les macrolides à l'exception de la clindamycine sont en mesure d'induire le développement de résistance. Chez certaines souches bactériennes, l'expression de résistance aux macrolides de type *erm* se fait de manière constitutive (cMLS_B) et inclut alors la résistance à la clindamycine. Comme pour les microorganismes résistants à la plupart des antibiotiques, les microorganismes résistants aux macrolides (excluant une fois de plus la clindamycine) font aussi appel à l'utilisation de pompes à efflux. Des résistances sont aussi rapportées pour les composés faisant partie des streptogramines de groupes A et B. Ces résistances sont attribuées aux gènes codant pour des acétyltransférases des streptogramines du groupe A (*vat*(A), *vat*(B) et *vat*(C)), ou à des gènes responsables de l'expression de pompes à efflux (*vga*(A) et *vga*(B)). Un nouveau composé semi-synthétique de streptogramines A et B, la quinupristine-

dalfopristine possédant des homologues avec la virginiamycine a récemment été approuvé pour utilisation en Europe et aux États-Unis. Déjà des résistances dues à la présence de gènes codant pour des acétyltransférases ont été rapportées notamment chez *Enterococcus faecium* (241). Ces gènes sont fréquemment retrouvés avec des gènes de résistance *erm* (217).

2.5.5.3 Résistance aux β -Lactamines et aux céphalosporines (pénicilline, céphalosporines, monobactams, carbapenem)

Les β -lactamines sont parmi les antibiotiques les plus utilisés et les plus sécuritaires. Ils sont utilisés pour le traitement des infections à *Salmonella* autant chez l'humain que chez les animaux (103). Ce sont des composés formés de la fusion d'un anneau β -lactam et d'un anneau thiazolidine formant ainsi le noyau chimique 6-amino-pénicilline. Ils agissent en inhibant les « Penicillin binding-proteins » (PBPs), les transpeptidases, les transglycosylases et les carboxypeptidases qui sont responsables de la synthèse du peptidoglycan (174).

Les céphalosporines sont des produits dérivés de la fermentation d'un champignon qui est *Cephalosporium acremonium*. Ils sont constitués de deux anneaux reliés entre eux, un anneau β -lactam et un anneau dihydrothiazine formant ainsi le noyau 7-amino céphalosporine. De façon similaire aux pénicillines, les céphalosporines agissent en interférant avec la synthèse du peptidoglycan en plus d'avoir recours à l'action d'enzymes autolytiques. Ainsi, la résistance aux céphalosporines serait due à une diminution de la capacité de l'antibiotique à se lier à son site d'action, le plus souvent jumelée aussi à une réduction de la perméabilité de la cellule bactérienne au composé chimique (174). La résistance de *Salmonella* aux β -lactamines se fait principalement par l'action de β -lactamases. Au total, plus de 340 β -lactamases ont été identifiées chez *Salmonella*. La résistance des salmonelles aux céphalosporines à spectre étendu est de plus en plus rapportée, et plusieurs gènes ont été identifiés comme éléments codant pour cette résistance : *bla_{SHV}*, *bla_{TEM}*, *bla_{CTX}*, *bla_{CMY}* figurent parmi ces gènes (103). Poppe et al. ont vérifié la résistance de souches de *Salmonella* animales sur une période allant de 1994 à 1999 (206). Parmi les isolats présentant une résistance ou une perte de sensibilité, les composés qui étaient impliqués étaient l'acide clavulanique et le céfoxitin. Tous les isolats résistants produisaient une β -lactamase et étaient porteurs du gène *bla_{Amp^r}*.

retrouvé sur des plasmides dont les tailles étaient similaires. La cause de l'émergence de résistance aux céphalosporines à spectre étendu médiée par le gène bla_{CMY-2} n'est pas encore clairement identifiée. Une étude a démontré que 6% de tous les organismes d'origine vétérinaire étaient résistants au ceftriaxone, laissant croire que l'utilisation du ceftiofur pouvait sélectionner et favoriser le maintien d'organismes porteurs du gène bla_{CMY-2} (281).

2.5.5.4 Résistance au chloramphénicol

Malgré qu'il ne soit plus utilisé chez les animaux de rente depuis le milieu des années '90 dû à sa toxicité (anémie aplasique idiosyncrasique) bien identifiée, plusieurs bactéries démontrent encore de la résistance envers le chloramphénicol. De plus, peu de temps après l'homologation du florfénicol, déjà des souches de *Salmonella* Typhimurium affichaient une résistance croisée pour ces deux phénicol (217). Dans une étude utilisant des souches de *Salmonella* isolées de troupeaux de poulets de chair du Canada, 77% des troupeaux se sont avérés positifs à l'isolement de salmonelles. Sur les quelques 1159 souches, 2% présentaient une résistance au chloramphénicol (205). Le principal mécanisme de résistance associé au chloramphénicol est la synthèse d'acétyltransférases (CATs). Des mécanismes non-enzymatiques ont aussi été décrits tels que les pompes à efflux, des changements de perméabilité ainsi que des modifications ribosomales (11). Plusieurs gènes codant pour les acétyltransférases ont été répertoriés et confèrent généralement de hauts niveaux de résistance aux microorganismes qui les expriment. Trois types d'acétyltransférases (I, II, et III) sont identifiés chez les bactéries à gram-négatif. Les acétyltransférases de type I sont parmi les plus répandues. Au cours de la dernière décennie, une autre classe d'enzymes pouvant acétyler le chloramphénicol a été décrite, les acétyltransférases xénobiotiques. Ces enzymes ayant une capacité limitée à acétyler l'antibiotique, elles confèrent alors de faibles niveaux de résistance au chloramphénicol (173). Le chloramphénicol est aussi reconnu pour interagir avec les pompes à efflux impliquées dans la résistance multiple aux antibiotiques chez les bactéries à Gram négatif. Le premier gène décrit pour ce type de pompe fut pour le chloramphénicol, *cmf-1*. Puis plus récemment, des souches de *Salmonella* et d'*Escherichia coli* ont été identifiées comme porteuses de gènes codant pour ces pompes à efflux, *flo_{np}* et *flo_{sa}*, leur assurant une résistance autant au chloramphénicol qu'au florfénicol (217). Tous ces gènes ont été associés à des éléments génétiques de la résistance que sont les

transposons et les plasmides (11). L'émergence de souches de *Salmonella* Typhimurium DT104 démontrant une résistance au chloramphénicol et au florfénicol encodée par le gène *flo_{sr}*, vient renforcer le fait que l'utilisation d'antibiotiques similaires chez les humains et les animaux peut potentiellement avoir un impact sur l'apparition de souches multi-résistantes (217). Selon l'étude menée par Arcangioli et al. (11), tous les gènes codant pour la résistance croisée chloramphénicol/florfénicol identifiés chez une souche de *Salmonella* Typhimurium DT104 phénotypiquement résistante étaient associés à deux intégrons retrouvés dans un même locus de multi-résistance d'origine chromosomique.

2.5.5.5 Résistance aux aminoglycosides

Les aminoglycosides sont des antibiotiques ayant une action bactéricide concentration-dépendante. Les membres de cette classe, la streptomycine, la néomycine, l'amikacine, la gentamicine, la tobramycine, la paromomycine, la kanamicine et la nétilmicine, sont tous formés d'un anneau aminocyclitol (la streptidine ou la 2-déoxystreptamine) et de deux ou plusieurs sucres amino reliés par des ponts glycosodiques. Ce groupe d'antibiotiques est effectif contre les entérobactéries, à l'exception de *Salmonella* et de *Shigella*, celles-ci possédant des mécanismes de résistance bien identifiés. Parmi ces mécanismes, on retrouve des enzymes pouvant acétyler les acétyltransférases des aminoglycosides (AAC) ainsi que des enzymes capables d'adényler les nucleotidyltransférases des aminoglycosides (ANT) (194). Dans une étude menée par Over et al. en 2001, six mécanismes de résistance aux aminoglycosides ont été identifiés pour *Salmonella* et *Shigella* (194). Les mêmes mécanismes avaient aussi été décrits par Shimizu et al. quelques années auparavant (236). Le pouvoir bactéricide des aminoglycosides dépend de plusieurs facteurs. Le principal site d'attachement pour ces antibiotiques est la sous-unité ribosomale 30S, laquelle une fois liée ne peut plus poursuivre l'élongation de la chaîne peptidique soit par un défaut de lecture, soit par une synthèse peptidique prématurément arrêtée. Des protéines aberrantes sont ainsi synthétisées et insérées à l'intérieur de la paroi cellulaire bactérienne, augmentant la perméabilité de la cellule à l'antimicrobien et engendrant par le fait même la mort cellulaire. Quatre mécanismes de résistance sont identifiés pour cette classe d'antimicrobiens. L'inactivation enzymatique de l'antibiotique (aminoglycoside-modifying enzymes, AMEs) est le mécanisme le plus fréquemment rencontré et celui

procurant les plus hauts niveaux de résistance. Des études ont rapporté que les gènes codant pour ces enzymes peuvent être transmis d'une bactérie à une autre par l'intermédiaire de transposons, de plasmides et même d'intégrons (98, 235, 276). Parmi ces AMEs on retrouve les phosphotransférases (APHs), les nucléotidyltransférases (ANTs), et les acétyltransférases (AACs). Plusieurs AMEs ont été décrites et chacune des classes possède un mécanisme unique d'action. Les autres mécanismes de résistance sont les altérations du site de liaison ribosomal, la perte de perméabilité cellulaire, et l'utilisation de pompes à efflux. Les mutations chromosomiques peuvent aussi être responsables de résistance soit par modification du site ribosomal intracytoplasmique de liaison, soit par activation de gènes de ménage chromosomiques ayant la capacité de modifier les molécules d'aminoglycosides. Les résistances intrinsèques ou acquises secondaires à une diminution de l'assimilation de l'antibiotique par la bactérie confèrent généralement de faibles niveaux de résistance (217).

2.5.5.6 Résistance aux tétracyclines

Les tétracyclines sont des agents antimicrobiens démontrant une grande efficacité et possédant un large spectre d'action. Depuis quelques décennies, leur utilisation répandue pour le traitement des infections ainsi qu'en tant que promoteurs de croissance a été associée à l'émergence et la dissémination d'une variété de déterminants de résistance. Les résistances associées aux tétracyclines peuvent être regroupées en deux catégories : les pompes à efflux qui confèrent généralement la résistance à la tétracycline mais non à la minocycline, et les protéines ribosomales de protection. Seule la protéine Tet(B) assure aux bactéries à gram-négatif la résistance autant à la tétracycline qu'à la minocycline. Les protéines ribosomales de protection présentent quant à elles plusieurs points d'homologie avec les facteurs d'élongation EF-Tu, EF-G et présentent une activité GTPase ribosome-dépendante. Ces protéines agissent en se liant au ribosome, changeant sa conformation et inhibant ainsi la capacité à se lier à l'antibiotique. Pour les pompes à efflux comme pour les protéines ribosomales, elles sont exprimées positivement en présence des tétracyclines. Toutes les résistances associées à cet antibiotique sont identifiées par les préfixes *tet* ou *otr* suivis d'une lettre ou d'un chiffre. Pour exercer leur effet bactériostatique, les tétracyclines entrent dans l'espace périplasmique à travers des porines (OmpC et OmpF) de la membrane externe de la bactérie. Une fois à l'intérieur, elles bloquent l'attachement à haute affinité du

groupement aminoacyl-ARNt à la sous-unité 30S du site accepteur ribosomique prévenant ainsi l'élongation de la chaîne peptidique des protéines en formation. Des mécanismes intrinsèques de résistance aux tétracyclines existent chez presque toutes les bactéries à gram-négatif. Parmi ceux-ci, l'opéron *mar* est bien caractérisé. L'expression de MarR résulte en une diminution d'expression de OmpF, la porine permettant l'entrée de tétracyclines dans l'espace périplasmique ainsi qu'une expression augmentée de la pompe à efflux AcrAB responsable de la multi-résistance incluant les tétracyclines. La résistance envers les tétracyclines est répandue à travers une variété d'espèces bactériennes suggérant l'implication d'éléments génétiques capables de transférer cette résistance. Ceux-ci incluent les plasmides à l'intérieur desquels les gènes *tet* peuvent être retrouvés dans des intégrons ou des transposons (217).

2.5.5.7 Résistance au triméthoprim-sulfaméthoxazole

Les bactéries sont incapables d'utiliser l'acide folique présent dans leur milieu. Elles doivent donc synthétiser cet acide elles-mêmes, le tétrahydrofolate (THF) étant essentiel à la biosynthèse de plusieurs acides aminés et purines. La production du THF requiert l'intervention de deux enzymes, la dihydropteroic acide synthase (DHPS) et la dihydrofolate réductase (DHFR), chacune inhibée respectivement par le sulfaméthoxazole et le triméthoprim. Ces deux composés agiraient en synergie afin d'arrêter la synthèse de folate. La résistance intrinsèque au triméthoprim-sulfaméthoxazole est rarement rencontrée, mais elle se manifeste lors d'une diminution de l'accès de l'antibiotique à son enzyme spécifique. À l'inverse, les résistances acquises sont fréquentes et impliquent divers mécanismes tels que des mutations impliquant le promoteur et conduisant à la surproduction de DHFR, et/ou des mutations ponctuelles à l'intérieur du gène *dhfr*. L'expression des gènes *dhfr*I et de variants de *dhfr*II chez les bactéries à gram-négatif sont communément rencontrés sur des plasmides de résistance et confèrent généralement des niveaux de résistance dépassant largement les concentrations cliniques atteignables. Pour plusieurs espèces bactériennes, une résistance aux sulfamides originant de mutations ponctuelles des gènes chromosomiques *dhps* a été rapportée (87, 110, 123, 244, 268). La résistance médiée par les plasmides de transfert a quant à elle été décrite chez les bactéries à Gram négatif il y a de ça plusieurs années. Le plus souvent, les gènes de résistance aux sulfamides sont incorporés dans des

intégrons associés à la multi-résistance et transportés par ces plasmides. Malgré la diversité des gènes *dhfr*, seulement deux, *dhfr*I et *dhfr*II ont été décrits (217).

2.5.6 Méthodes de détection de la résistance

Même si de plus en plus d'efforts sont déployés par les autorités afin d'assurer une meilleure surveillance de la résistance retrouvée chez les principaux microorganismes pathogènes, il faut se rappeler que la résistance des bactéries aux antimicrobiens n'est pas un phénomène nouveau, particulièrement dans des conditions d'élevage où l'utilisation des antibiotiques est chose courante. Souvent, la résistance est dépistée lorsqu'un nouvel antibiotique est testé pour des fins de développement (258). Chez les antimicrobiens déjà utilisés, certaines résistances sont clairement identifiées, tandis que l'inquiétude provient principalement de l'émergence de la résistance envers des antimicrobiens jadis efficaces contre des pathogènes spécifiques. Par exemple, il est clairement reconnu et accepté que *Escherichia coli* ne fait pas partie du spectre d'action de la vancomycine. Par contre, la perte d'efficacité du ciprofloxacine face à cette même bactérie vient réalimenter tout le débat relatif à l'utilisation des antibiotiques et à la surveillance du développement de résistance. Pour des fins de surveillance, le CLSI (anciennement le NCCLS) établit des standards permettant d'identifier les microorganismes comme étant résistants, intermédiaires ou sensibles face à un antimicrobien quelconque. Différentes méthodes peuvent être utilisées afin de déterminer le niveau de résistance d'un microorganisme. Les méthodes les plus couramment utilisées sont la microdilution en bouillon, la diffusion de disques d'antibiotiques, par gradient d'antibiotique, et par méthodes automatisées (258).

2.5.7 Contrôle et surveillance

L'accroissement rapide du commerce international en matière d'agriculture, d'aquaculture et de produits manufacturiers a grandement facilité la dispersion des divers sérovars de *Salmonella* à l'extérieur des frontières de plusieurs pays. La création et le maintien de réservoirs de gènes de résistance pour les animaux et les humains est un phénomène qui mérite une meilleure compréhension. La façon la plus efficace d'assurer

le contrôle des infections causées par les *E.coli* pathogènes chez l'espèce aviaire demeure encore aujourd'hui l'utilisation des antibiotiques. Par contre, avec la présence de la résistance aux antibiotiques toujours grandissante, les intervenants sont de plus en plus sensibilisés à l'impact qu'aura cette résistance lors d'infection chez l'humain, ce qui rend le traitement des volailles à l'aide des antibiotiques une pratique de moins en moins utilisée (263). Pour cette raison, la réalisation d'études expérimentales et épidémiologiques à grande échelle concernant l'utilisation des agents antimicrobiens serait essentielle, tout comme le fait de suivre le développement de résistance et la dispersion de ces gènes au sein des populations bactériennes.

Le transfert de gènes de résistance entre les bactéries d'origine animale peut se produire via la chaîne alimentaire (3, 71, 155, 238). Une surveillance de la présence de bactéries pathogènes pour l'homme tout le long de cette chaîne demeure donc essentielle (155). Les scientifiques ne parviennent pas, la plupart du temps, à établir les causes de l'émergence de nouveaux gènes de résistance. L'hypothèse la plus souvent avancée demeure celle voulant que l'usage des antibiotiques diminue la diversité au sein des populations bactériennes conduisant à la persistance d'une souche présentant déjà une résistance ou possédant la capacité d'évoluer vers un état de résistance. Les scientifiques croient alors qu'en réduisant l'utilisation des antimicrobiens il serait possible de retarder l'émergence d'un gène résistant, et que cette approche serait la plus efficace (3, 185). En évitant d'exposer les bactéries aux agents antimicrobiens, on évite de sélectionner des souches résistantes capables d'interagir avec d'autres souches bactériennes afin de favoriser le transfert de gènes (3, 185, 269). Un bon contrôle de la dissémination des gènes de résistance passe inévitablement par une connaissance de la diversité de ces gènes, leurs rapports les uns avec les autres, la complexité du réseau permettant leur dissémination ainsi que le rôle spécifique des antimicrobiens dans cette dispersion. La résistance aux antimicrobiens est un phénomène qui doit être suivi au niveau mondial, mais aussi au niveau local puisque chaque pays est distinct quant à ses pratiques, politiques et problèmes. Déjà plusieurs pays ont adopté ce genre de programmes. Au Canada, le Programme intégré canadien de surveillance de la résistance aux antimicrobiens (PICRA) assure cette fonction. Ce programme a été élaboré par l'Agence de santé publique du Canada, par Santé Canada, par l'Agence canadienne d'inspection des aliments (ACIA), ainsi que par des partenaires provinciaux. Ce programme canadien de surveillance de la résistance aux antimicrobiens s'inspire

d'autres programmes déjà établis tels que le Système national de surveillance de la résistance aux antimicrobiens (National Antimicrobial Resistance Monitoring System ou NARMS) des États-Unis, le Programme intégré de recherche et de surveillance de la résistance aux antimicrobiens du Danemark (DANMAP), ainsi que le programme européen de surveillance de la résistance aux antimicrobiens (European antimicrobial resistance surveillance system ou EARSS). Tous ces programmes poursuivent le même objectif qui est celui de surveiller les tendances du développement de la résistance aux antimicrobiens tout en fournissant un système d'information offrant des données valides relatives à la prévalence et à la dispersion de bactéries cliniquement et épidémiologiquement significatives (291, 292, 293).

2.5.8 Antibiorésistance chez l'humain

L'utilisation des antibiotiques chez les animaux de consommation, aussi variée et abondante soit-elle, a servi des objectifs thérapeutiques, de prévention et de maximisation de la performance, ce qui a ainsi contribué à la disponibilité de ressources abondantes et sécuritaires depuis plus de cinquante ans. Les pratiques alimentaires, sanitaires, l'utilisation judicieuse de l'espace d'élevage ainsi que le contrôle des conditions environnementales ont par contre tous permis de réduire l'utilisation des antimicrobiens. Malgré l'application d'une bonne régie, l'augmentation des densités animales dans les élevages intensifs a nécessité l'utilisation d'une approche plus agressive afin de limiter l'émergence de maladies, une approche nécessitant souvent l'utilisation d'une plus grande quantité d'antibiotiques, autant en prophylaxie que pour la thérapie. L'utilisation de ces substances a soulevé beaucoup de questionnements. Les inquiétudes des scientifiques sont actuellement à un seuil jamais atteint, puisque ceux-ci sont conscients de la présence en nombre de plus en plus impressionnant de souches de bactéries affichant des profils de multi-résistance, et ce, autant chez les animaux que les humains (3, 155, 157, 89, 132) . Le CDC (Center for Disease Control) soutient quant à lui que la résistance aux antibiotiques est un facteur important en lien avec l'émergence de conditions infectieuses. La pression sélective originant de l'utilisation des antibiotiques est selon les scientifiques, l'élément responsable du développement de la résistance (26). Plusieurs facteurs tels que la mauvaise ou la surutilisation des antimicrobiens en médecine humaine ainsi que l'usage des antibiotiques en médecine vétérinaire sont responsables du développement de cette résistance (62). Des études ont

démontré le lien entre l'utilisation des antibiotiques et le développement de résistance avec l'apparition d'infections nosocomiales (256). Il est rapporté que 20% à 50% de l'utilisation d'antibiotiques en médecine humaine et 40% à 80% de l'utilisation d'antibiotiques en médecine vétérinaire est inutile ou largement questionnable (282). Depuis l'apparition de la pénicilline, chaque nouvel antibiotique mis sur le marché a été accompagné par l'apparition plus ou moins rapprochée dans le temps, de souches bactériennes démontrant de la résistance face à cet antibiotique. Plusieurs efforts ont été mis en œuvre afin de limiter ou de renverser l'apparition de souches résistantes aux antibiotiques. Ces efforts incluent une meilleure éducation des médecins et pharmaciens, l'entretien de meilleurs contacts entre les médecins et les gens des compagnies pharmaceutiques, un suivi en laboratoire de la sensibilité des souches, etc... Dans certaines études, on rapporte une augmentation de la susceptibilité des souches bactériennes aux antibiotiques parallèlement à la diminution de l'utilisation des antimicrobiens (277). Parmi les sources les plus communes d'infection à *Salmonella* chez l'humain, on retrouve sans aucun doute les denrées alimentaires d'origine animale (174). Même si l'usage des antibiotiques en médecine humaine a sans aucun doute entraîné, à travers le monde, cette épidémie de souches bactériennes résistantes aux antibiotiques, il a tout de même été démontré que pour les pathogènes d'origine alimentaire, la cause numéro un d'apparition de résistance est l'usage d'antimicrobiens chez les animaux d'élevage (3, 26, 155, 238). Les infections d'origine alimentaire ont un impact public majeur dans notre société industrialisée. Des études récentes estiment qu'aux États-Unis, ce sont 5000 décès et 76 millions de dollars qui sont dépensés annuellement (256). Un total de 22 551 souches de *Salmonella* isolées d'humains ont été sérotypées au Canada entre 1983 et 1992. Un nombre aussi impressionnant que 10 065 cas ont été associés à ces divers sérotypes pendant cette période de dix ans. Les sérovars les plus souvent incriminés ont été Typhimurium et Hadar, suivis de près par Enteritidis, Infantis et Heidelberg. Les animaux ont toujours été considérés comme un réservoir important pour l'apparition de la maladie chez l'humain. Le fait qu'un nombre important de sérovars identiques soient retrouvés chez des souches humaines et animales à la fois laisse croire à la transmission possible de ces souches des animaux jusqu'à l'humain (84). Des 2400 sérovars identifiés pour *Salmonella enterica*, Typhimurium continue d'être le sérovar le plus fréquemment isolé chez les animaux de consommation ainsi que chez l'humain (51, 82). Près de 28% de tous les isolats de *Salmonella* Typhimurium présentent le profil de résistance ACSSuT (ampicilline, chloramphénicol, streptomycine, sulfamides

et tétracycline) (125). Des évidences épidémiologiques suggèrent que la résistance face aux antibiotiques serait transférable aux bactéries de la flore intestinale des humains à partir de la chaîne alimentaire et que les bactéries ayant acquis cette résistance aurait la capacité de devenir prédominantes même en l'absence de toute pression de sélection (219). Puisque les cas de salmonellose chez l'humain nécessitent rarement l'usage d'antibiotiques (17, 53) les intervenants considèrent que l'utilisation des antibiotiques chez l'humain n'est pas la cause principale de l'émergence de souches résistantes chez cette espèce bactérienne, laissant croire à l'influence de l'usage des antibiotiques chez les animaux de rente (3, 43, 155, 206, 238). Des études comparatives entre des troupeaux de volailles conventionnels (où les antibiotiques sont utilisés en tant que promoteurs de croissance) et des troupeaux dits plus « organiques » (aucun promoteur de croissance n'est utilisé) ont réussi à démontrer que les entérocoques résistants à la vancomycine étaient absents des élevages organiques tandis que les élevages conventionnels utilisant l'avoparcine comme promoteur de croissance étaient pour la majorité d'entre eux source de ces entérocoques. C'est par le biais de ces études que les scientifiques ont pu établir une relation statistiquement significative entre l'utilisation de l'avoparcine comme promoteur de croissance et la présence d'entérocoques résistants à la vancomycine (256). Certains scientifiques vont jusqu'à avancer que chez un individu, la présence d'une flore normale ne démontrant aucun facteur de résistance envers les antibiotiques et une très faible capacité de ces bactéries d'acquérir des gènes de résistance pourrait avoir des conséquences dramatiques sur la santé de cet individu. En effet, une flore de ce genre ne pourrait survivre lors de traitement avec des antibiotiques puisqu'elle se verrait complètement détruite lors du traitement de toute condition infectieuse même bénigne. Les déséquilibres alors occasionnés entraîneraient des infections secondaires, exigeant alors l'utilisation d'une plus grande quantité d'antibiotiques. La présence de bactéries capables de développer une réaction de résistance face à l'utilisation d'antibiotiques assure alors le maintien de l'état de santé d'un individu. Se fiant à ces hypothèses, le transfert de gènes de résistance entre les bactéries de la flore normale et les bactéries pathogènes pourrait alors être considéré seulement comme un effet secondaire à l'utilisation des antibiotiques. En médecine humaine, les intervenant s'entendent pour dire que l'utilisation des agents antimicrobiens représente le facteur prédominant dans la sélection de la résistance bactérienne, et qu'il existe en général un lien entre la vitesse à laquelle se développe cette résistance et la quantité d'antibiotiques utilisée (3). La problématique du risque de sélection de bactéries résistantes au sein de

populations animales par l'utilisation des antibiotiques a été soulevée pour la première fois en 1955 (3, 6). Suite à une épidémie causée par *Salmonella* Typhimurium DT29 au Royaume-Uni entre 1963 et 1965, il a été recommandé de limiter l'usage des antibiotiques en tant que promoteurs de croissance aux agents reconnus comme peu importants dans le traitement de conditions infectieuses autant chez les humains que chez les animaux (3, 243). Le non-suivi de ces recommandations a fait qu'aujourd'hui, on assiste à une dispersion de la résistance à travers une vaste majorité des souches bactériennes responsables d'infections.

Puisque les facteurs influençant la sélection de la résistance n'ont pas tous été élucidés, les programmes ayant pour but de limiter le développement et la dispersion de bactéries résistantes et de gènes de résistance ne sont pas toujours couronnés de succès. Plusieurs études ont tenté d'établir un lien de cause à effet entre l'utilisation à grande échelle des antibiotiques chez les animaux d'élevage et les échecs thérapeutiques lorsqu'il s'agit de traiter des conditions infectieuses chez les humains (3, 43, 155, 238). Les scientifiques tentent d'établir la nature et la solidité des données et arguments disponibles pour expliquer le possible lien entre l'usage d'antibiotiques à grande échelle et le nombre augmentant d'échecs thérapeutiques chez l'humain. De nombreuses études tentent présentement de mettre en lumière quelques uns de ces facteurs tels que la capacité des gènes de résistance de se propager à travers les différentes étapes de la chaîne alimentaire en passant par l'abattage, la transformation, la distribution au détail, la préparation domestique de ces aliments, leur consommation par les humains, terminant par l'apparition d'épisodes d'infections et finalement d'échecs lors du traitement médical de ces conditions pathologiques. La stratégie que les chercheurs tentent d'utiliser en est une ressemblant à l'approche HACCP où ils tentent d'identifier tous les facteurs contribuant au maintien et au transfert des bactéries jusqu'à l'humain (et par le fait même des gènes de résistance), tout au long de la chaîne alimentaire (238). Une approche adoptant la combinaison de diverses stratégies telles que l'élimination de la surutilisation des antibiotiques, l'adhésion universelle à l'utilisation judicieuse de ces substances, la collection et l'analyse de données relatives à l'utilisation des antimicrobiens, la surveillance du développement de résistance et la mise en place de mécanismes permettant une identification rapide de l'apparition de cette surveillance serait intéressante. Cette approche encouragerait aussi les projets de recherche sur l'antibiorésistance et le développement de nouveaux antibiotiques (16). Malgré le fait

que l'organisation mondiale de la santé recommande aux pays d'établir des programmes de surveillance pour la résistance aux antibiotiques chez les animaux et dans les denrées alimentaires d'origine animale, peu de pays assurent le suivi des divers pathogènes impliqués, et leurs systèmes de surveillance n'en sont encore qu'à leurs débuts. Ces programmes doivent miser sur le recueil de données quant à la susceptibilité aux antimicrobiens des divers pathogènes entériques dans le but de fournir une information toujours d'actualité aux vétérinaires, médecins et autres autorités de santé publique (256).

2.6 Caractérisation génétique de *Salmonella*

Les bactéries ont traditionnellement été classifiées selon des caractéristiques phénotypiques telles que leurs exigences pour croître, la morphologie de leurs colonies, leurs caractéristiques biochimiques (5). Les méthodes phénotypiques de caractérisation incluent entre autre l'identification du type phagique, le biotypage, le sérotypage, et la détermination de profils de résistance aux antibiotiques. Ces méthodes, bien que largement utilisées encore comportent des lacunes importantes, dont pour certaines, des problèmes de reproductibilité ou même un pouvoir discriminant sub-optimal. Ces dernières années, suite à l'apparition de souches de plus en plus résistantes aux antibiotiques, à l'augmentation d'épisodes de toxi-infections alimentaires, à la transmission d'infections nosocomiales, au besoin d'identifier des sources d'infection, l'identification et la comparaison de souches à l'aide d'analyses génotypiques sont donc devenues une nécessité (192). Plusieurs techniques sont décrites et présentent des avantages distincts par rapport aux autres. Parmi celles-ci, le Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE), le Multilocus Sequence Typing (MLST), le Random Amplification of Polymorphic DNA (RAPD) et l'Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) sont les plus couramment utilisées.

Le PFGE est une méthode de caractérisation génétique de microorganismes permettant la séparation du génome bactérien en fragments d'ADN obtenus suite au clivage par des enzymes de restriction. Cette technique consiste à enrober les cellules bactériennes dans des moules d'agarose, de lyser ces cellules afin d'en libérer l'ADN afin de digérer cet ADN au moyen d'endonucléases. Les fragments d'ADN contenus dans des blocs d'agarose coupé en tranches sont alors déposés dans les puits d'un gel

d'agarose puis migrés sous l'influence d'un champ électrique pulsé et alterné permettant la séparation des fragments d'ADN obtenus selon leur taille. Plusieurs enzymes de restriction peuvent être utilisées, les plus courantes pour *Salmonella* (234) étant *XbaI* (77, 79, 102), *SpeI* (31, 45), et *NotI* (248). Ces enzymes peuvent donc être utilisées seules ou en combinaison afin d'obtenir des profils génétiques différents qui sont ensuite comparés à l'aide de logiciels informatiques. Tenover et al. ont établi des critères spécifiques utilisés ensuite par plusieurs auteurs afin de mieux déterminer si un lien clonal existe entre des échantillons analysés par PFGE. Ainsi, ces critères peuvent servir de référence lorsque chacune des souches échantillonnées présente un minimum de dix fragments distincts après migration sur gel d'agarose. Malgré tout, l'interprétation et la comparaison de profils génétiques demeurent un processus subjectif qui ne peut se résumer seulement à l'application d'algorithmes rigides. Les lignes directrices que l'on peut retenir des propos tenus par Tenover (248) sont que l'interprétation de résultats de caractérisation génétique par PFGE prend tout son sens seulement si l'analyse se fait dans un contexte populationnel et avec un certain nombre de souches possiblement reliées entre elles. En gardant cette idée en tête, les critères d'interprétation de relation génétique entre différents patrons de migration peuvent se résumer à considérer les organismes comme étant « étroitement liés » (deux à trois bandes de différence), ou « possiblement liés » (quatre à six bandes de différences). Dans les cas où plusieurs souches doivent être comparées entre elles, il devient préférable d'utiliser une méthode d'analyse permettant de comptabiliser des coefficients établis en comparant les souches deux à deux dans le but de générer un arbre ou dendrogramme. Pour ce faire, bon nombre de formules élaborées en fonction de la position des bandes sont reconnues. Le coefficient de Dice fait partie de ces méthodes. Il vise à attribuer des coefficients de similarité (S_{AB}) à chaque paire d'isolats afin d'arriver à la création d'un dendrogramme. Tout ceci implique que les conditions utilisées pour les analyses se doivent d'être sensiblement les mêmes d'un gel à un autre afin d'assurer la validité des comparaisons entre isolats. Lors des analyses, on attribue la présence ou l'absence de bandes aux chiffres 1 et 0 respectivement. Afin d'arriver à une valeur de coefficient, on divise le nombre de bandes pouvant être associées entre elles par le nombre total de bandes obtenues pour tous les isolats. On obtient donc la formule suivante :

$$\text{Dice } (S_D) = \frac{2n_{AB}}{2n_{AB} + a + b}$$

où η_{AB} est le nombre de bandes que deux patrons distincts ont en commun, a , le nombre de bandes présentes dans A mais absentes pour B et à l'inverse, b le nombre de bandes présentes dans B mais absentes dans A. Par la suite, la compilation des coefficients de similarité à l'aide de logiciels informatiques permet de créer une matrice utilisant pour sa construction les valeurs générées par la comparaison entre chacune des paires d'isolats. Pour cette comparaison, la méthode UPGMA (Unweighted-Pair Group Method using Arithmetic Averages) est souvent choisie de par sa rapidité lorsque la taille de l'échantillon est grande (174). Le PFGE est par contre une technique qui est coûteuse en temps et en équipement compte tenu qu'elle nécessite des appareils spécialisés servant à l'électrophorèse. Puisqu'elle se retrouve parmi les techniques les plus discriminantes, la plupart des études s'intéressant à la caractérisation génétique de souches bactérienne la privilégie. En effet, le PFGE a été rapporté comme étant un excellent outil autant dans les cas de surveillance épidémiologique que d'investigation d'épisodes infectieux compte tenu de sa grande précision et de sa reproductibilité intéressante (257). Parmi les éléments rendant le PFGE moins attrayant, on pense au temps nécessaire pour la préparation et l'électrophorèse de l'ADN, l'équipement spécialisé et les réactifs dispendieux utilisés (234).

Le séquençage des gènes demeure une méthode de choix quand il s'agit d'établir le niveau de relation entre les souches d'une même espèce. Cependant, une modification de séquence au niveau d'un seul locus ne se produit pas nécessairement assez rapidement chez une même espèce afin qu'on puisse différencier deux organismes hautement reliés génétiquement, mais différents, et ainsi ne permet pas de regroupements. Pour ce faire, plusieurs loci doivent être séquencés. C'est ce que fait la technique du MLST. Celle-ci est basée sur la caractérisation de séquences nucléotidiques de fragments de 500 pb de gènes de ménage associés généralement à des fonctions métaboliques cellulaires. On considère habituellement ces gènes comme étant stables et bien conservés chez les différentes espèces appartenant au même genre bactérien. Il est cependant essentiel de sélectionner minutieusement les amorces qui cibleront les gènes démontrant une évolution permettant la discrimination à différents niveaux de relation génétique entre les souches (174). Les gènes de ménage ciblés chez *Salmonella* sont *aroC* (codant pour la chorismate synthase), *dnaN* (codant pour la sous-unité bêta de l'ADN

polymerase III), *hemD* (codant pour l'uroporphyrinogène III cosynthase), *bisD* (codant pour l'histidinol déhydrogénase), *pmE* (codant pour la phosphoribosylaminoimidazole carboxylase), *sucA* (codant pour l'alpha kétoglutarate déhydrogénase), puis *thrA* (codant pour l'aspartokinase-homosérine déhydrogénase). Les fragments choisis sont premièrement amplifiés par PCR, ensuite purifiés, et une partie des amplicons obtenus par PCR est séquencée. Les allèles uniques sont identifiées pour chacun des loci et un chiffre leur est attribué, permettant ainsi la création d'une séquence typique. Les séquences sont alors fusionnées et utilisées pour fins de comparaison génétique entre les souches (102, 257).

Tableau II : Critères de Tenover utilisés pour la comparaison des patrons de bandes d'isolats bactériens analysés par PFGE (248)

Catégorie	Différences génétiques comparativement à la souche référence typique de l'épidémie	Fragments différents du patron de référence typique de l'épidémie	Interprétation épidémiologique
Indistinguables	0	0	L'isolat fait partie de l'épidémie
Très apparentées	1	2-3	L'isolat fait probablement partie de l'épidémie
Possiblement Apparentées	2	4-6	L'isolat fait peut-être partie de l'épidémie
Différentes	≥ 3	≥ 7	L'isolat ne fait pas partie de l'épidémie

Le RAPD figure aussi parmi les techniques les plus utilisées pour la caractérisation génétique d'organismes. C'est une méthode hautement efficace pour établir le degré de relation entre différentes souches bactériennes. Elle se base sur le PCR et utilise des amorces d'une dizaine de nucléotides choisis aléatoirement à partir du génome bactérien. Ces amorces se lient à l'ADN de la bactérie et amplifient plusieurs régions du génome. Chansiripornchai et al. (58) ont démontré que le pouvoir de discrimination du RAPD était augmenté par l'utilisation d'un plus grand nombre d'amorces. Ainsi, plus le nombre d'amorces utilisées augmente, plus le RAPD devient intéressant en ce qui a trait à la différenciation de clones ou sous-clones pour *Salmonella enterica* ssp. *enterica*. Les produits d'amplification sont par la suite séparés et migrés sur gel d'agarose. Seules les bandes majeures sont retenues pour analyses compte tenu de la faible reproductibilité d'une expérimentation ou d'un laboratoire à un autre pour ce qui est des bandes mineures. Cette caractéristique fait partie des faiblesses de la technique du RAPD (174). Par contre, comme c'est une méthode qui permet d'obtenir rapidement des résultats, qui s'effectue facilement et sans équipement dispendieux, et qui ne nécessite pas de connaître préalablement la séquence nucléotidique de l'ADN visé, plusieurs études ont recours à cette technique (58, 234). Son pouvoir discriminant se compare à celui du PFGE et on rapporte que le RAPD est, avec le PFGE, la méthode privilégiée pour le génotypage. Certaines études rapportent tout de même que le pouvoir discriminant du RAPD, tout comme c'est le cas pour sa reproductibilité, dépend des amorces utilisées ainsi que de la personne effectuant l'expérimentation (234).

L'AFLP est une technique de caractérisation génétique développée en 1995 par Vos et al. (271). Elle fait appel au génome en entier et utilise les principes du PCR. Elle consiste à digérer l'ADN chromosomique à l'aide de deux enzymes de restriction puis d'amplifier de manière sélective les fragments du génome obtenus (5). Les fragments utilisés sont petits et ainsi la mutation d'une seule paire de bases peut être détectée. Elle peut être utilisée sans qu'on ait à connaître a priori la séquence d'ADN et peut être adaptée à divers organismes, qu'ils soient procaryotes ou eucaryotes (145). Des études ont démontré qu'il s'agissait, tout comme le PFGE, d'un excellent outil de surveillance épidémiologique et d'investigation d'épisodes d'infections (215, 233). Son pouvoir discriminant se compare à celui du PFGE (109, 145, 175). L'obtention d'un nombre

optimal de bandes peut être réalisée en faisant une sélection appropriée des amorces et des enzymes de restriction. Lorsque ceci est respecté, l'AFLP devient une technique de caractérisation très performante, pouvant être utilisée aussi bien pour l'identification, l'épidémiologie, que la taxonomie bactérienne (5, 88, 116). L'AFLP utilise deux enzymes de restriction permettant de générer de plus petits fragments et facilitant ainsi l'identification d'insertion ou de délétion de petits segments d'ADN (109). Pour *Salmonella*, les combinaisons d'enzymes les plus utilisées sont *EcoRI-MseI* et *BglII-BspDI* (5, 109, 257). L'AFLP possède par contre une reproductibilité inférieure à celle du PFGE et l'interprétation de ses résultats demeure plus difficile. Tout comme le PFGE, elle requiert un équipement spécialisé qui s'avère trop coûteux pour certains laboratoires.

2.7 L'industrie avicole québécoise et canadienne

Au Québec comme au Canada, l'industrie de la volaille en est une bien structurée autant au niveau de la production de viande ou d'œufs, qu'au niveau de la mise en marché de ces produits. Pour assurer ceci, les producteurs ont formé des associations comme celles des Producteurs de Poulets du Canada (PPC). Cet organisme national dirigé et financé par les producteurs veille à ce que la production de volaille par ses 2800 producteurs réponde à la demande du marché. Ceci est rendu possible grâce à la collaboration et la coopération entre les producteurs, les gouvernements fédéral et provinciaux, les inspecteurs, les transformateurs et les distributeurs. L'aviculture au Canada représente une activité économique importante, représentant à elle seule pour l'année 2003, 5% de tous les revenus provenant d'activités agricoles, soit 1.8 milliard de dollars. En 2003, ce sont 934.1 millions de tonnes de viande de poulet qui ont été produites, assurant ainsi une consommation annuelle moyenne de 30 kilogrammes de viande de poulet par habitant. Le Québec et l'Ontario sont les deux plus importants producteurs de poulet avec chacun près de 30% de la part de marché du poulet au Canada. Au Québec, ce sont 737 producteurs de poulets qui assurent cette part du marché (288, 289, 290).

2.8 L'utilisation des antibiotiques chez la volaille

Il est rapporté que la chimiothérapie moderne semble avoir débuté avec les travaux du physicien et chercheur allemand Paul Ehrlich (38). En effet, après des années de dur labeur, Ehrlich a réussi à mettre au point en 1909 une substance nommée le composé 606, découvert à la suite de sa 606^{ème} expérimentation animale. Ce composé était en fait la première substance à pouvoir guérir la syphilis (74). C'est suite au décès de Ehrlich que Gerhard Domagk eu l'idée de s'inspirer des travaux de son prédécesseur afin de, lui aussi, poursuivre la recherche dans ce sens. Il en vint donc à produire une substance capable de traiter les infections à staphylocoques et à streptocoques chez les souris et les rats, le *protosil rubrum*. Il tenta peu d'essais afin de vérifier si cette nouvelle drogue pouvait être efficace pour l'humain jusqu'au jour où il se vit dans l'obligation de l'utiliser chez sa fille. Le succès remporté par cette action ne fut expliqué que quelques années après lorsque des études montrèrent que ce fameux composé était en fait du sulfanilamide, aujourd'hui un membre de la famille des sulfas (218). Au fil des années qui ont suivi, plusieurs ont emprunté des routes similaires à celle de ces deux pionniers dans le but de découvrir d'autres substances permettant d'éviter la mort à plusieurs humains et animaux. C'est le cas de Fleming avec la pénicilline, Waksman et de son étudiant Schatz avec la streptomycine. Bien que les antibiotiques aient été à l'origine d'une ère nouvelle, ils ont aussi suscité beaucoup de controverses politiques, ainsi que plusieurs poursuites (218). Pour la société actuelle, la prise de conscience concernant l'impact de l'utilisation à grande échelle des antibiotiques arrivera peut-être à mieux gérer ce débat persistant.

La pratique de la médecine vétérinaire avicole se base sur des principes de bonne régie, mais a aussi recours aux agents antimicrobiens. Ces agents sont utilisés pour traiter des conditions pathologiques, sont aussi utilisés dans un but prophylactique, ainsi qu'à doses réduites afin de promouvoir la croissance des animaux. Les antibiotiques ne sont pas les seuls responsables de l'amélioration de la croissance des animaux issus d'élevages intensifs. Les avancées faites en génétique, nutrition, régie et mise en marché ont contribué à une expansion rapide de l'industrie avicole. C'est en 1948 que la vitamine B₁₂ a été découverte. À l'époque, cette vitamine semblait avoir un effet positif sur la croissance des animaux d'élevage. Des études ont aussi mené à la mise en évidence de substances capables de promouvoir, avec plus de puissance, la croissance des volailles.

L'utilisation d'antibiotiques chez des animaux en élevage intensif a fait ses preuves vers la fin des années 1940 où l'administration de doses sub-thérapeutiques d'antibiotiques sous forme de suppléments alimentaires permettait d'améliorer les taux de croissance tout en réduisant les mortalités au sein d'un élevage. La façon dont les antibiotiques améliorent le taux de conversion alimentaire est encore mal comprise. Une explication plausible serait que les antibiotiques limiteraient l'effet néfaste des conditions sub-cliniques sur la croissance de l'oiseau et parviendraient aussi à supprimer ou du moins moduler l'activité de certaines bactéries luttant avec leur hôte pour l'absorption de nutriments. Dans une autre perspective, les antibiotiques pourraient avoir un effet bénéfique sur le système immunitaire en stimulant la production de cytokines, d'hormones et d'autres facteurs. (161). La tétracycline se trouve parmi les premières drogues à avoir été testées (76). C'est en 1950-1951 que Libby et Schaible ont démontré que l'alimentation des volailles qui assurait un apport continu en antibiotiques permettait d'améliorer le gain de poids de ces animaux d'environ 19%. Plusieurs antibiotiques tels que la pénicilline, l'oléandomycine, la virginiamycine, la chlortétracycline, l'oxytétracycline, la spiramycine, la bacitracine de zinc, la tylosine ainsi que l'érythromycine ont par la suite été testés dans des études subséquentes. Chacune de ces drogues administrée à doses sub-thérapeutiques permettait, dans des pourcentages variables pour chacune, d'améliorer le taux de conversion alimentaire tout en limitant le pourcentage de mortalité dans les élevages. De nos jours, les rations alimentaires de poulets de chair renferment normalement un agent anticoccidien (ionophores, sulfonamides) tandis que d'autres substances sont plutôt ajoutées afin de promouvoir la croissance ou l'efficacité alimentaire chez la volaille, ou même dans le but de prévenir l'entérite nécrotique chez le poulet de chair. La bacitracine de zinc, la bambermycine, la chlortétracycline, la pénicilline, la virginiamycine et les composés arsénicaux sont parmi les composés approuvés à cette fin. Malheureusement, suite à la perte d'efficacité thérapeutique de certaines de ces drogues par l'apparition de résistance, notamment la tétracycline, des antibiotiques plus puissants tels que les fluoroquinolones doivent être utilisés, risquant à plus ou moins long terme, de diminuer l'efficacité de ces drogues au moment où elles devront être utilisées dans le traitement de conditions infectieuses chez l'humain, tels les cas de salmonellose humaine avec complications. Pour cette raison, les vétérinaires avicoles québécois ont décidé d'un commun accord de cesser toute utilisation de fluoroquinolones chez la volaille au début des années 2000.

CHAPITRE 3. MATÉRIEL, MÉTHODES ET RÉSULTATS

Use of Antimicrobial susceptibility patterns and pulsed field gel electrophoresis to characterize *Salmonella* strains isolated from broiler chicken ceca at slaughterhouse

M-L.Gaucher¹, M. Boulianne², A. Letellier¹, D. Daignault³, L. Dutil⁴, S. Quessy^{1*}

¹ Research Chair in Meat Safety, Département de Pathologie et Microbiologie, Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal, CP 5000, St-Hyacinthe, Québec, Canada J2S 7C6

² Département de Sciences Cliniques, Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal, CP 5000, St-Hyacinthe, Québec, Canada J2S 7C6

³ Laboratoire de lutte contre les zoonoses d'origine alimentaire, Agence de santé publique du Canada, 3400 Casavant Ouest, St-Hyacinthe, Québec, Canada J2S 8E3

⁴ Laboratoire de lutte contre les zoonoses alimentaires, Direction générale de la santé de la population et de la santé publique, FMV, Université de Montréal, C.P. 5000, St-Hyacinthe, Québec, Canada J2S 7C6

ABSTRACT

An increased prevalence of multidrug resistant *Salmonella* have been observed in the last years. The aim of this study was to describe antimicrobial resistance patterns of the 123 *Salmonella* strains isolated from broiler chicken ceca at slaughter, and try to link antimicrobial use to multidrug resistance profiles of these strains using genetic fingerprinting. Information relative to each flock medication was obtained via a questionnaire filled by producers. Data were validated with veterinarians at slaughterhouse, hatchery and feedmill. Isolates were submitted to antimicrobial susceptibility testing using broth microdilution for 23 identified antibiotics. Isolates were then analysed by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) using *SpeI* enzyme to evaluate their genetic diversity and to look for a possible correlation between antimicrobial susceptibility patterns and presence in a specific genetic cluster. A total of 10 different antibiotic profiles were identified. Strains were considered multidrug resistant when resistant to five or more antibiotics and occurred for 36% of them. More than 14 different macrorestriction profiles were obtained and statistically analyzed for correlation with antibiotic resistance profile. An exact chi-square test demonstrated that multidrug resistant strains were significantly associated with genetic clusters. Analyses also permitted to establish that hatchery and feedmill had an influence on the presence of resistant strains. There was no evidence that antimicrobial use during rearing was related to the presence of multidrug resistant strains in specific flocks.

INTRODUCTION

Salmonella spp. is one of the leading sources of food-borne illness in the USA (39). It remains a major cause of bacterial food-borne disease outbreaks in developed countries and is associated with the death of nearly 600 persons each year in USA (20). Broiler chickens are considered as an important reservoir for human salmonellosis (36). Infection in humans is often acquired through consumption of contaminated poultry meat improperly handled or cooked. *Salmonella* spp. first colonizes the intestinal tract of poultry, allowing for contamination of carcasses during harvest and processing (45, 49). Before the implementation of HACCP models, a study revealed that 60,9 % of broiler carcasses sampled in federally inspected abattoirs across Canada between 1983 and 1986 were positive for *Salmonella* (31). The emergence and spread of antimicrobial-resistant pathogens, including *Salmonella*, has become a serious health concern worldwide (41). The worldwide use of antimicrobials in different fields, such as veterinary medicine and agriculture as prophylactic supplements or growth promoters in the feed of food animals, has created enormous pressure for the selection of antimicrobial resistance among bacterial pathogens and endogenous microflora. The prevalence of resistance among microorganisms has become an important problem with serious implications for treatment and prevention of infectious diseases in both humans and animals (10). Furthermore, problems related to treatment of infections caused by multidrug-resistant bacteria have increased dramatically in recent years.

Phenotypic and genotypic characterization of *Salmonella* is necessary to determine possible links between isolates. Pulsed field gel electrophoresis (PFGE) is recognized as the reference method for DNA fingerprinting of *Salmonella* (42).

In order to improve biosecurity of poultry flocks, the use of antiseptics and disinfectants such as quaternary ammonium compounds has largely increased. However, some resistance to these compounds has been observed. Since *qacEΔ1*, the gene encoding resistance to quaternary ammonium compounds is known to be part of the class 1 integrons isolated from antibiotic-resistant members of *Enterobacteriaceae*, a possible direct link between antiseptic and antibiotic resistance has been suggested (29).

To our knowledge, this is the first study evaluating the possible relationship between resistance from genetic profiles and antimicrobial use in poultry flocks in Canada.

The objectives of this study were to evaluate *Salmonella* strains prevalence, to determine antibiotic resistance profiles among *Salmonella* strains isolated from broiler chicken pools of ceca and to verify for a possible relationship between the observed profiles, genetic clusters and previous antimicrobial use in corresponding flocks. Comparison of antimicrobial resistance patterns and genetic profiles were also used to verify a possible link between antimicrobial and disinfectant use for the distribution of multidrug resistant (MDR) microorganisms (56).

MATERIALS AND METHODS

Rearing conditions and bird treatments information. For each slaughtered flock, a questionnaire was sent to producers shortly after slaughter. This questionnaire included a section on medication, and data pertaining to drug use was validated with veterinarians at hatchery and feedmill.

Sample collections. During the period from April 2003 to February 2004, a sampling of 51 broiler flocks was conducted at four major federally inspected slaughterhouses in the province of Quebec, Canada. Two slaughterhouses were located in St-Damase, one in St-Jean-Baptiste, and the fourth one was located in Berthierville. All of these slaughterhouses were under the inspection of the Canadian Food Inspection Agency. An average number of 30 birds were sampled per flock. For each bird, ceca were aseptically removed from the carcass and placed in an identified sterile plastic bag until further analysis. Samples were stored in an icebox until arrival to the laboratory less than 2 hours later, and immediately frozen at -80 Celsius degrees until analysis for the presence of *Salmonella* in the cecal content.

Isolation and identification of *Salmonella* isolates. For each sampled flock, ceca were pooled in two groups of 15 ceca each. The surface of each ceca was sterilized by heat searing with a hot spatula. Cecal content was collected from one ceca of each bird with a sterile swab and put in a sterile stomacher bag (M-Tech Diagnostic, Warrington,

Cheshire, England) containing 9 ml of buffered peptone water (Beckton-Dickinson (BD), Franklin Lakes, NJ, USA) for primary enrichment. Bags were shaken and incubated at 37°C for 24 hours. After incubation, 0.1 ml was transferred to 10ml of Rappaport-Vassiliadis (RV) broth and incubated at 42°C for 24 hours. A loopful was inoculated on brilliant green sulfa agar (BGS) (Difco Laboratories) plates containing 20µg/ml of novobiocin (Sigma Chemical, Oakville, Ontario) and incubated at 37°C for 24 hours. A maximum of 10 suspected colonies per pool were streaked to triple sugar iron (TSI) (Difco Laboratories) and Christensen's urea agars (Difco Laboratories). Isolates presumptively identified as *Salmonella* spp. were tested by agglutination against polyvalent O-antisera (Poly-A & Vi) (Difco Laboratories) and then submitted for serotyping at Health Canada Laboratory in Guelph, Ontario. Finally, each bacterial strain was stored in 1 ml of glycerol for further analysis.

Antimicrobial susceptibility testing. Antimicrobial MICs for the 123 *Salmonella* isolates were determined by using the Sensititre automated antimicrobial susceptibility system (Trek Diagnostic Systems, Westlake, Ohio) and were interpreted by using the Clinical Laboratory Standard Institute (CLSI), previously the National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS), standards for microdilution broth methods. A total of 23 antimicrobials were tested. Their recommended resistance breakpoints and their percentage of resistant strains are shown in table I. *Escherichia coli* ATCC 25922, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 were used as quality control organisms.

DNA preparation and pulsed-field gel electrophoresis. Plug preparation, restriction digestion, and electrophoresis conditions were essentially performed according to the protocol previously described for *Campylobacter jejuni* by Michaud et al. in 2001 (40). *Salmonella* isolates were grown on 5% sheep blood agar (Quélab) at 37°C for 24 hours. Colonies were harvested and resuspended with a sterile swab in 1000µL cold cell suspension buffer (100mM Tris, 100 mM EDTA, pH 8.0). The optical density was adjusted to 1.4 at 610 nm, and 340µL of this suspension was mixed with 12.5µL of proteinase K (20 mg/ml) (Qiagen). One milliliter of sodium dodecyl sulphate (SDS) 10% was added to 170µL of molten Seakem Gold agarose 1.5% (FMC BioProducts, Rockland, Maine) prepared with TE (10 mM Tris, 0.1 mM EDTA, pH 8.0). This blend was mixed with the first one containing colonies and proteinase K. The resultant

mixture was poured into plug moulds and solidified at 4°C for 20 min. Each plug was dropped into a solution composed of 5 mL of cell lysis buffer (50 mM Tris, 50 mM EDTA, pH 8.0, 1% N-laurylsarcosine) and 25 µL of proteinase K (20 mg/mL). They were then incubated for 2 hours in a 54°C water bath with constant agitation (150 rpm). Plugs were transferred to 40 mL polypropylene flatbottom tubes and washed 6 times, 15 min. each, in the same water bath as previously described. The first two washes were done with 15 mL of preheated water (54°C), and 10 mL of preheated TE (10mM Tris, 0.1 mM EDTA, pH 8.0) for the last ones. Plugs were individually put in 5 mL polystyrene tubes with a hole at both extremities and submerged in an electrophoresis bath filled with 600 mL of TE (10 mM Tris, 0.1 mM EDTA, pH 8.0). Voltage was set to 60 V for 45 min. Individual plugs were added to a mixture containing 267 µL of sterile water, 3 µL of bovine serum albumin (BSA 0.1 mg/mL) (New England Biolabs, Inc., Beverly, Mass.), and 30 µL of NE Buffer 2 (New England Biolabs, Inc., Beverly, Mass.). Plugs were incubated for 1 hour in a 37°C heating block and transferred to a new mixture composed of the same three components and 20 units of *SpeI* (6) (New England Biolabs, Inc., Beverly, Mass.) for 5 hours in a 37°C heating block. The digests were electrophoresed at 200 V in a 1% Seakem Gold agarose gel (FMC BioProducts) in 0.5 X TBE buffer (CHEF Mapper, Bio-Rad Laboratories). Pulsing was set to ramp from 4 to 13.6 s for 14 hours. Gels were stained with SYBR Safe DNA gel stain (Invitrogen) for 30 min, and photographed under UV-illumination. Macrorestriction patterns were compared with the use of BioNumerics software. Cluster analysis using the Dice coefficient for band matching and the unweighted pair group with arithmetic mean (UPGMA) method were used to generate dendrogram describing the relationship among *Salmonella* strains.

DNA isolation, polymerase chain reaction and electrophoresis. Cell lysates for each isolate were prepared by suspending a loopful of bacteria grown on blood agar plates in 1 ml of sterile distilled water. QIAgen DNeasy extraction kit and protocol were then used to extract DNA from bacteria. Two microliters of the template DNA were added to a mixture containing 17.9 µL Dnase free water (Invitrogen, Burlington, Ontario), 2.5µL 10X PCR-reaction-buffer, 1.0 µL MgCl₂ (Qiagen), 0.5µL deoxyribonucleotide triphosphates (dNTP) (0.2mM), 0.5µL of each primer (100nmol/µL) (Invitrogen), and 0.1µL Taq DNA polymerase (5U/µL) (Invitrogen). Primers of oligonucleotide sequences to detect genes coding for florfenicol resistance

(*flo₁₁*), integron (*int*), invasion (*inv*), and virulence (*spvC*) were used in a first PCR experimentation (7, 14). A PCR was also performed to detect *qacEΔ1* gene using the primers described by Kazama et al (28). The amplification was performed. The conditions for the PCRs were an initial denaturation at 94°C for 3 minutes followed by 35 cycles each of 30 s denaturation at 94°C, 45 s annealing at 55°C, and 45 s extension at 72°C. A final extension step of 8 minutes at 72°C ended the reaction. The PCR products were cooled to 4°C. Ten microliters of each PCR product were electrophoresed on a 1.5% agarose gel for 60 min (Sigma) at a constant voltage of 100 V in TBE buffer (89 mM Tris, 89 mM boric acid, and 2 mM ethylene diamine tetra acetate (EDTA)). The gels were stained with SYBR Safe DNA gel stain (Invitrogen) for 30 min, visualized on a ultraviolet (UV) light induced fluorescence and photographed. All components of the reaction mixture except template DNA were used. The experimental strain #4393 was used as positive control for both PCRs.

Statistical analysis. Data were analyzed by SAS version 9.1 software (Cary, N.C.). Results were analyzed by exact chi-square procedures to assess significant relationship between antimicrobial use and the presence of multidrug resistant strain. The influence of the feedmill and hatchery on the presence of multidrug resistant strains in a flock was evaluate with exact chi-square test. Exact chi-square test was also used to evaluate the relationship between resistance and genetic profiles. A *p* value of less than 0,05 was considered significant.

RESULTS

***Salmonella* isolation from pooled ceca.** Twenty-five percent (13/51) of the sampled broiler flocks were positive at the ceca level. A total of 123 *Salmonella* strains were isolated and serotyped. Various serotypes, Heidelberg (62%), Brandenburg (17%), Thompson (7%), Typhimurium (7%), Hadar (3%), and Agona (3%) were identified.

Antimicrobial susceptibility analysis of *Salmonella* isolates from broiler ceca and multidrug resistance. A total of 123 *Salmonella* strains recovered from 102 pools of ceca, and a maximum of 10 strains per flock were tested for antimicrobial susceptibility. Among the 23 antibiotics tested, 11 of them (amikacin, ceftriaxone, chloramphenicol,

ciprofloxacin, enrofloxacin, gentamicin, kanamycin, nalidixic acid, neomycin, oxytetracyclin, sarafloxacin) were effective against all the microorganisms tested. More than 10 different antibiotic resistance profiles were found. Higher levels of resistance were attributed to sulphadimethoxin. In table I, we can see that 95% of the *Salmonella* Braendenburg were resistant to the antibiotic. Also, 100% of the serovars Typhimurium and Hadar showed resistance to sulphadimethoxin. In the present study, multidrug resistance was attributed to strains resistant to five or more antibiotics (pentaresistance). Thirty-six percents (45/123) of the strains were considered multiresistant based on this criterion. Among these strains, some were resistant to more than seven tested antibiotics. The resistance profile most frequently encountered was clavulanic acid-amoxicillin, amoxicillin, ampicillin, cefoxitin, ceftiofur and cephalothin, with 24% (30/123) of the strains showing resistance to that group of antibiotics. Antimicrobial resistance profiles for broiler flocks sampled between July 2003 and February 2004 are presented in Table II.

Association between antibiotic resistance and antibiotic use in the corresponding flock. No association was found between the presence of multidrug resistant (MDR) strains in a flock and the previous use of one or the other or combination of antibiotics as growth promoters and/or therapeutic agents (Exact chi-square test, $p=0,31$). However, further analysis allowed the establishment of a link between the presence of MDR strains in a specific flock and the hatchery of origin (Exact chi-square test, $p<0.0001$). The same relationship was established between the presence of MDR strains in a flock and the feedmill (Exact chi-square test, $p<0.0001$) (Table III). Other analysis also demonstrated that hatchery and feedmill could not be considered individually because of the possible link between both of them. Feedmills and hatcheries were then grouped together for further analysis. A relationship was demonstrated for hatchery A ($p<0,0001$) and K ($p<0,0001$) and the influence of feedmill B, J and K ($p<0,0001$). It was thus possible to determine that both hatchery and feedmill had influenced on the prevalence of MDR strains.

Diversity of PFGE genotypes among the different slaughtered flocks. Of the 123 stains isolated from the 13 positive flocks, 14 different genetic profiles, designated as cluster, were identified from pooled ceca (Table IV, Figure 1). Among a same flock, it

was possible to identify up to four different genetic patterns, while 55% (6/11) of the flocks exhibited only one genotype.

Association between antimicrobial resistance profile and PFGE fingerprinting patterns. From the 14 clusters obtained by using *SpeI* macrorestriction enzyme, only ten of them were used to identify a possible relationship between antimicrobial resistance profile and genetic patterns, the four others were limited to only one strain per family, limiting any possible comparison. Though, clusters 2, 8, 12, and 14 were excluded from statistical analysis. By using an exact chi-square test, an association between the percentage of multidrug resistance and the genetic family was demonstrated ($p < 0.0001$). Percentage of multidrug resistance was as low as 0% for cluster 1, and as high as 100% for cluster 13 (Table IV). Certain PFGE patterns were also found to be linked with serotypes like Typhimurium, Agona and Thompson.

Identification of multidrug resistant strains and *qacEΔ1* by polymerase chain reaction.

Five different genes were targeted by this experimental procedure. The PCR assay was negative for all the strains, considering that the four genes related to the multiplex PCR, *flo*, *inv*, *spvC*, *int*, needed to be present on agarose gel to have a positive result for the multiplex PCR. From the 123 strains of *Salmonella* submitted to polymerase chain reaction to detect the presence of *qacEΔ1* gene associated with quaternary ammonium compounds, none was found to contain this gene.

DISCUSSION

A lot of information on antimicrobial resistance in *Salmonella* of human and food of animal origin is available (17). *Salmonella* is a major foodborne infection, and strains showing resistance to a great variety of antibiotics have recently become an important public health concern. The emergence and spread of antimicrobial-resistant pathogens has become a serious health hazard worldwide (41). It is estimated that nearly 90% of all antibiotic agents use is in food animals, are given prophylactically or to promote growth and it has been suggested that antimicrobial use could positively select for resistant strains (33). Randall et al. in 2004 (51) also reported that the use of biocides alone or

combined with antibiotic treatment could be responsible for increased selective pressure on bacteria to acquire antibiotic and biocide resistance. The aim of this study was to determine if antimicrobial usage could be linked to the level of antibiotic resistance in 123 *Salmonella* isolates originating from fifty-one flocks of birds from four different slaughterhouses. Thereafter, these profiles were compared to the genetic fingerprinting in an attempt to establish a possible relationship between antimicrobial use and some genetic clusters of *Salmonella* strains.

From the fifty-one sampled flocks, thirteen were found to be positive for *Salmonella*, which is consistent with the results published in other studies (3, 9, 30, 36). Serotyping revealed that the most frequent serovar was Heidelberg, with 62% of the strains. This contrast with the results published by Kudaka et al. (30) where 99% of the broiler isolates were Infantis, and Limawongpranee with 72% of the isolates being *Salmonella* Blockley. In a study conducted in Canada by Abouzeed et al. in 2000 (3), *Salmonella* Heidelberg was also identified as the predominant serovar with a prevalence of nearly 44%. Resistance was observed for fifteen antibiotics, and fifteen different resistance profiles were identified. A previous study conducted in the United States 10 years ago reported that the prevalence of resistance was higher for the following antibiotics: streptomycin (33 to 57%), sulfisoxazole (33 to 50%), tetracycline (26 to 50%) and gentamicine (13 to 40%), the serotype influencing the variation of resistance percentage (86). Farrington et al. suggested there may be a relationship between antimicrobial resistance in *Salmonella* and serogroup (19). Poppe et al. in 1996 (50) also reported that *Salmonella* Heidelberg from poultry sources frequently possess large plasmids encoding antimicrobial resistance. In Ireland, the percentages of resistance were estimated between 17% and 52% for sulfas, streptomycin, tetracycline and ampicilline (57). Similar levels of resistance were reported by other studies (33, 50). In our study, antibiotic resistance was considered important, 36% (45/123) of the strains showing resistance to five or more antibiotics. No other study reported such levels of resistance (8, 17, 23, 33, 57). Curiously, resistance to tetracycline was rarely observed in our study, with less than 4% of the isolates showing resistance. This result differs considerably from data published by other authors (10, 21, 32, 33, 37, 53). One explanation would be that this antimicrobial is rarely used in poultry production nowadays.

With the emergence and spread of MDR *Salmonella* strains, antimicrobial use by the poultry industry has been pointed out for being responsible for the presence of resistant microorganisms in the poultry microflora (1, 30). Moreover, Hatha and Lakshmanaperumalsamy (25) have reported that isolates resistant to two or more antibiotics generally originate from poultry farms where antibiotics are commonly used and which represent high-risk sources. Our results showed no relationship between antimicrobial use and the presence of resistant strains in a specific flock (table IV). While there was no association found when flocks were considered individually, we then examined a possible link between presence of MDR strains and hatcheries and feedmills as proposed by other authors (15, 16, 26). One hypothesis is that hatchery or feedmill could also be linked to the presence of MDR *Salmonella* strains in a flock. Because it has been reported before, we found it would be interesting to look for a possible relationship between multidrug resistance and feedmill or hatchery (27, 47, 52). Since ceftiofur was used in 100% of the birds and in every hatchery, it has most probably influenced the resistance to cephalosporins. However, despite this widespread use of ceftiofur, it was possible to observe an influence of feedmills and hatcheries on MDR strains prevalence.

The antiseptic-resistance gene *qacEΔ1*, located on a class 1 integron, has originally been isolated from Gram-negative bacteria. Class 1 integrons are most commonly isolated from antibiotic-resistant isolates of the *Enterobacteriaceae* family. Little is known about the occurrence of *qacEΔ1* and its relation with quaternary ammonium compounds (QACs). Randall et al. (51) have suggested that the combination of antibiotics and some disinfectants could positively select for resistance by increasing the selective pressure on microorganisms (29). In this study, we thus looked for a possible association between antibiotic resistance and the presence of *qacEΔ1*. Our research allowed us to establish that this gene was absent from studied *Salmonella* strains. This agrees with data reported by Kücken et al. (29) that suggest that multiply antibiotic-resistant strains are not necessarily more resistant to antiseptics like QACs than antibiotic-sensitive strains. As reported by Gradel et al. in 2005 (22), resistance to disinfectants would be related to an intrinsic factor. Therefore, repeated use of a specific disinfectant would no be related to persistence of *Salmonella* strains in a specific environment. As found in our study, Kazama et al. (28) demonstrated that strains showing high levels of MICs were found negative for the presence of *qacEΔ1*, genes of

antimicrobial resistance being possibly associated with other antiseptic resistance determinants.

Different methods such as antibiogram analysis, pulsed-field gel electrophoresis, phage typing, plasmid profiling, ribotyping, IS200 typing and RAPD analysis are described for subtyping of *Salmonella*. Because of its discriminatory power, PFGE stays a reference method for differentiation of *Salmonella* (18, 24, 55). PFGE can produce, using fragmentation of the entire genome, a genetic profile as a tool for estimating genetic relatedness between strains (56). In other studies, use of a single restriction enzyme to establish genetic relationship among *Salmonella* isolates has been common (34, 35, 48). Strains were considered genetically different when one band differed from the standard pattern. The restriction enzyme used in this study, *SpeI*, is one of the most useful enzyme to perform PFGE experiment, giving a high number of bands and having an excellent discriminatory power. Macrorestriction with *SpeI* (6, 8) yielded 14 different patterns consisting of 15-18 fragments, which is in accordance with results reported by other authors (8, 56). Correlation between PFGE clusters and antimicrobial susceptibility phenotypes and serotypes has been reported by other authors (24, 56). Other studies reported a possible clonal distribution of the MDR *Salmonella* strains, a well known situation for the serovar Typhimurium of *Salmonella enterica* (6, 13, 38, 46). The high degree of overall similarity found among isolates from poultry ceca (75%) suggested close genetic relationship between these strains (8). A significant statistical relationship was also established between certain serovars and a specific genetic profile (56). This observation has been made for *Salmonella* Hadar, Thompson, Agona, Typhimurium and Thompson. In this study we also found that antimicrobial susceptibility patterns were positively correlated ($p < 0.0001$) with the genetic profile, as reported by Harbottle et al. (24). Cardinale et al. (8), also reported existence of this relationship between these two variables but also suggested that this situation was not exclusively associated with MDR strains.

In conclusion, presence of multiresistance in poultry flocks was found to be linked with the origin of flocks (hatchery and feedmill), suggesting vertical transmission of multiresistant strains. However, given the fact that the current study was realized during a relatively short period of time, it is important to state that while no association was found between antimicrobial use and multiresistance in this study, it does not imply

that at a broader level, such an association may exist and that further studies with higher number of flocks and/or for a longer period of time should be performed to confirm this negative association. In addition, further molecular characterization of strains would be needed to better understand the epidemiology of antimicrobial resistance.

Aknowledgments

We would like to thank the members of the team of Research Chair in Meat Safety of the Faculté de médecine vétérinaire of the Université de Montréal. A special thank to Guy Beauchamp, Danielle Daignault and Lucie Dutil for their technical support.

REFERENCES

1. **Aarestrup, F.M.** 1999. Association between the consumption of antimicrobial agents in animal husbandry and the occurrence of resistant bacteria among food animals. *Int J Antimicrob Agents* 12: 279-285.
2. **Aarestrup, F.M.** 1995. Occurrence of glycopeptide resistance among *Enterococcus faecium* isolates from conventional and ecological poultry farms. *Microb Drug Resist* 1: 255-257.
3. **Abouzeed, Y.M., Hariharan, H., Poppe, C., Kibenge, F.S.B.** 2000. Characterization of *Salmonella* isolates from beef cattle, broiler chickens and human sources on Prince Edward Island. 2000. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 23: 253-266.
4. **Anderson, A.D., Nelson, J.M., Rossiter, S., Angulo, F.J.** 2003. Public health consequences of use of antimicrobial agents in food animals in the United States. *Microb Drug Resist* 9: 373-379.
5. **Arsenault, J., Letellier, A., Quessy, S., Boulianne, M.** Prevalence and risk factors for *Salmonella* enteritis and *Campylobacter* spp. carcass contamination in broiler chickens slaughtered in Quebec, Canada. Article submitted to *Journal of Food Protection*.
6. **Biedenbach, D.J., Toleman, M., Walsh, T.R., Jones, R.N.** 2006. Analysis of *Salmonella* spp. With resistance to extended-spectrum cephalosporins and fluoroquinolones isolated in North America and Latin America: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997-2004). *Diagn Microbiol Infect Dis* 54: 13-21.
7. **Bolton, L.F., Kelley, L.C., Lee, M.D., Fedorka-Cray, P.J., Maurer, J.J.** 1999. Detection of multidrug-resistant *Salmonella enterica* serotype typhimurium DT104 based on a gene which confers cross-resistance to florfenicol and chloramphenicol. *J Clin Microbiol* 37: 1348-1351.

8. **Cardinale, E., Perrier Gros-Claude, J.D., Rivoal, K., Rose, V., Tall, F., Mead, G.C., Salvat, G.** 2005. Epidemiological analysis of *Salmonella enterica* ssp. *enterica* serovars Hadar, Brancaster and Enteritidis from humans and broiler chickens in Senegal using pulsed-field gel electrophoresis and antibiotic susceptibility. *J Appl Microbiol* 99, 968-977.
9. **Carli, K.T., Eyigor, A., Caner, V.** 2001. Prevalence of *Salmonella* serovars in chickens in Turkey. *Epidemiol Infect* 107(1): 201-211.
10. **Carramiñana, J.J., Carmina, R., Agustín, I., Herrera, A.** 2004. High prevalence of multiple resistance to antibiotics in *Salmonella* serovars isolated from a poultry slaughterhouse in Spain. *Vet Micro* 104, 133-139.
11. **CDC 2000, posting date. CDC.** FoodNet Surveillance Report for 2000: Final Report. Atlanta: Centers for Disease Control and Prevention; 2000.
12. **Chambers, J.R., Bisailon, J.-R., Labbé, Y., Poppe, C., Langford, C.F.** 1998. *Salmonella* prevalence in crops of Ontario and Quebec broiler chickens at slaughter. *Poult Sci* 77: 1497-1501.
13. **Cormican, M., DeLappe, N., O'Hare, C., Doran, G., Morris, D., Corbett-Feeney, G., Fanning, S., Daly, M., Fitzgerald, M., Moore, J.** 2002. *Salmonella enterica* serotype Bredeney: antimicrobial susceptibility and molecular diversity of isolates from Ireland and Northern Ireland. *Appl Environ Microbiol* 68(1): 181-186.
14. **Côté, S., Letellier, A., Lessard, L., Quessy, S.** 2004. Distribution of *Salmonella* in tissues following natural and experimental infection in pigs. *Can J Vet Res* 68: 241-248.
15. **Davies, R.H., Wray, C.** 1997. Distribution of *Salmonella* contamination in ten animal feedmills. *Vet Microbiol* 57(2-3): 159-169.
16. **Davies, R.H., Wray, C.** 1996. Persistence of *Salmonella* enteritidis in poultry units and poultry food. *Br Poult Sci* 37(3): 589-596.

17. **Esaki, H., Morioka, A., Ishihara, K., Kojima, A., Shiroki, S., Tamura, Y., Takahashi, T.** 2004. Antimicrobial susceptibility of *Salmonella* isolated from cattle, swine and poultry (2001-2002): report from the Japanese Veterinary Antimicrobial Resistance Monitoring Program. *J Antimicrob Chemother* 53: 266-270.
18. **Fakhr, M., Nolan, L.K., Logue, C.M.** 2005. Multilocus sequence typing lacks the discriminatory ability of pulsed-field gel electrophoresis for typing *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *J Clin Microbiol* 43: 2215-2219.
19. **Farrington, L.A., Harvey, R.B., Buckley, S.A., Droleskey, R.E., Nisbet, D.J., Inskip, P.D.** 2001. Prevalence of antimicrobial resistance in *Salmonellae* isolated from market-age swine. *J Food Prot* 64: 1496-1502.
20. **Gast, R.K.** Bacterial diseases *Salmonella* infections: Paratyphoid infections. In *Diseases of Poultry*. 11th edition. Iowa State Press. Pr. Pp. 583-610.
21. **Gouws, P.A., Brözel, V.S.** 2000. Antimicrobial resistance of *Salmonella* isolates associated with retail chickens and a poultry abattoir. *South African J Sci* 96: 254-256.
22. **Gradel, K.O., Randall, L., Sayers, A.R., Davies, R.H.** 2005. Possible associations between *Salmonella* persistence in poultry houses and resistance to commonly used disinfectants and a putative role of mar. *Vet Microbiol* 107: 127-138.
23. **Harakeh, S., Yassine, H., Gharios, M., Barbour, E., Hajjar, S., El-Fadel, M., Toufeili, I., Tannous, R.** 2005. Isolation, molecular characterization and antimicrobial resistance patterns of *Salmonella* and *Escherichia coli* isolates from meat-based fast food in Lebanon. *Sci Total Environ* 1; 341(1-3): 33-44.
24. **Harbottle, H., White, D.G., McDermott, P.F., Walker, R.D., Zhao, S.** 2006. Comparison of multilocus sequence typing, pulsed-field gel electrophoresis, and antimicrobial susceptibility typing for characterization of *Salmonella enterica* serotype Newport isolates. *J Clin Microbiol* 44(7): 2449-2457.

25. **Hatha, A.A., Lakshmanaperumalsamy, P.** 1995. Antibiotic resistance of *Salmonella* strains isolated from fish and crustaceans. *Lett Appl Microbiol* 21(1): 47-49.
26. **Jones, F.T., Richardson, K.E.** 2004. *Salmonella* in commercially manufactured feeds. *Poult Sci* 83: 384-391.
27. **Jones, F.T., Axtell, R.C., Rives, D.V., Scheideler, S.E., Tarver, F.R., Walker, R.L., Wineland, M.J.** 1991. A survey of *Salmonella* contamination in modern broiler production. *J Food Prot* 54: 502-507.
28. **Kazama, H., Hamashima, H., Sasatsu, M., Arai, T.** 1998. Distribution of the antiseptic-resistance gene *qacEΔ1* in Gram-positive bacteria. *FEMS Microbiol Lett* 165: 295-299.
29. **Kücken, D., Feucht, H.-H., Kaulfers, P.-M.** 2000. Association of *qacE* and *qacEΔ1* with multiple resistance to antibiotics and antiseptics in clinical isolates of Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol Lett* 183, 95-98.
30. **Kudaka, J., Itokazu, K., Taira, K., Iwai, A., Kondo, M., Susa, T., Iwanaga, M.** 2006. Characterization of *Salmonella* isolated in Okinawa, Japan. *Jpn J Infect Dis* 59: 15-19.
31. **Lammerding, A.M., Garcia, M.M., Mann, E.D., Robinson, Y., Dorward, W.J., Truscott, R.B., Tittiger, F.** 1988. Prevalence of *Salmonella* and thermophilic *Campylobacter* in fresh pork, beef, veal, and poultry in Canada. *J Food Prot* 51: 47-52.
32. **Lee, Y.J., Kim, K.S., Kwon, Y.K., Tak, R.B.** 2003. Biochemical characteristics and antimicrobials susceptibility of *Salmonella Gallinarum* isolated in Korea. *J Vet Sci* 4:161-166.
33. **Lee, L.A., Threatt, V.L., Puhr, N.D., Levine, P., Ferris, K., Tauxe, R.V.** 1993. Antimicrobial-resistant *Salmonella* spp. isolated from healthy broiler chickens after slaughter. *J Am Vet Med Assoc* 202, 752-755.

34. Letellier, A., Messier, S., Paré, J., Ménard, J., Quessy, S. 1999. Distribution of *Salmonella* in swine herds in Québec. *Vet Microbiol* 67, 299-306.
35. Liebana, E., Crowley, C.J., Garcia-Migura, L., Breslin, M.F., Corry, J.E.L., Allen, V.M., Davies, R.H. 2002. Use of molecular fingerprinting to assist the understanding of the epidemiology of *Salmonella* contamination within broiler production. *British Poultry Sci* 43: 38-46.
36. Limawongpranee, S., Hayashidani, H., Okatani, A.T., Ono, K., Hirota, C., Kaneko, K., Ogawa, M. 1999. Prevalence and persistence of *Salmonella* in broiler chicken flocks. *J Vet Med Sci* 61(3): 255-259.
37. Manie, T., Khan, S., Veith, W., Brözel, V.S., Gouws, P.A. 1998. Antimicrobial resistance of bacteria isolated from slaughtered and retail chicken in South Africa. *Lett Appl Microbiol* 26: 253-258.
38. Markogiannakis, A., Tassios, P.T., Lambiri, M., Ward, L.R., Kremastinou, J.K., Legakis, N.J., Vatopoulos, A.C. 2000. Multiple clones within multidrug-resistant *Salmonella enterica* serotype typhimurium phage type DT104. *J Clin Microbiol* 38(3): 1269-1271.
39. McCrea, B.A., Tonooka, K.H., VanWorth, C., Boggs, C.L., Atwill, E.R., Schrader, J.S. 2006. Prevalence of *Campylobacter* and *Salmonella* species on farm, after transport, and at processing in specialty market poultry. *Poult Sci* 85, 136-143.
40. Michaud, S., Arbeit, R.D., Gaudreau, C. 2001. Molecular strain typing of *Campylobacter jejuni* by pulsed-field gel electrophoresis in a single day. *Can J Microbiol* 47: 667-669.
41. Miko, A., Pries, K., Schroeter, A., Helmuth, R. 2005. Molecular mechanisms of resistance in multidrug-resistant serovars of *Salmonella enterica* isolated from foods in Germany. *J Antimicrob Chemother* 56, 1025-1033.

42. **Murase, T., Okitsu, T., Suzuki, R., Morozumi, H., Matsushima, A., Nakamura, A., Yamai, S.** 1995. Evaluation of DNA fingerprinting by PFGE as an epidemiologic tool for *Salmonella* infections. *Microbiol Immunol* 39: 673-676.
43. **Nair, S., Schreiber, E., Thong, K.L., Pang, T., Altwegg, M.** 2000. Genotypic characterization of *Salmonella typhi* by amplified fragment length polymorphism fingerprinting provides increased discrimination as compared to pulsed-field gel electrophoresis and ribotyping. *J Microbiol Methods* 41, 35-43.
44. **National Committee for Clinical Laboratory Standards.** 2003. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically-approved standards, manual #M7-A6, 6th ed. NCCLS, Wayne, Pa.
45. **Nayak, R., Stewart, T., Wang, R-F., Lin, J., Cerniglia, C.E., Kenney, P.B.** 2004. Genetic diversity and virulence gene determinants of antibiotic-resistant *Salmonella* isolated from preharvest turkey production sources. *Int J Food Microbiol* 91, 51-62.
46. **NG, L-K., Mulvey, M.R., Martin, I., Peters, G.A., Johnson, W.** 1999. Genetic characterization of antimicrobial resistance in Canadian isolates of *Salmonella* serovar typhimurium DT104. *Antimicrob Agents Chemother* 43(12): 3018-3021.
47. **O'Brien, J.P.D.** 1990. Aspects of *Salmonella enteritidis* control in poultry. *World's Poult Sci J* 46: 119-124.
48. **Olsen, J.E., Skov, M.N., Threlfall, E.J., Brown, D.J.** 1994. Clonal lines of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis documented by IS200-, ribo-, pulsed-field gel electrophoresis and RFLP typing. *J Med Microbiol* 40, 15-22.
49. **Poppe, C., Smart, N., Khakhria, R., Johnson, W., Spika, J., Prescott, J.** 1998. *Salmonella* Typhimurium DT 104: a virulent and drug-resistant pathogen. *Can Vet J* 39: 559-565.

50. **Poppe, C., McFadden, K.A., Demczuk, W.H.B.** 1996. Drug resistance, plasmids, biotypes and susceptibility to bacteriophages of *Salmonella* isolated from poultry in Canada. *Int J Food Microbiol* 30:325-344.
51. **Randall, L.P., Cooles, S.W., Piddock, L.J.V., Woodward, M.J.** 2004. Effect of triclosan or a phenolic farm disinfectant on the selection of antibiotic-resistant *Salmonella enterica*. *J Antimicrob Chemother* 54, 621-627.
52. **Rose, N., Beaudreau, F., Drouin, P., Toux, J.Y., Rose, V., Colin, P.** 1999. Risk factors for *Salmonella enterica* subsp. *enterica* contamination in French broiler-chicken flocks at the end of the rearing period. *Prev Vet Med* 39(4): 265-277.
53. **Tessi, M.A., Salsi, M., Caffer, M., Moguelevski, M.A.** 1997. Drug resistance of *Enterobacteriaceae* isolated from chicken carcasses. *J Food Prot* 60: 1001-1005.
54. **Thakur, S., Gebreyes, W.A.** 2005. *Campylobacter coli* in swine production: antimicrobial resistance mechanisms and molecular epidemiology. *J Clin Microbiol* 43 (11): 5705-5714.
55. **Threlfall, E.J., Powell, N.G., Rowe, B.** 1994. Differentiation of *Salmonellas* by molecular methods. *PHLS Microbiol Dig* 11, 199-202.
56. **Weigel, R.M., Qiao, B., Teferedegne, B., Suh, D.K., Barber, D.A., Isaacson, R.E., White, B.A.** 2004. Comparison of pulsed-field gel electrophoresis and repetitive sequence polymerase chain reaction as genotyping methods for detection of genetic diversity and inferring transmission of *Salmonella*. *Vet Microbiol* 100: 205-217.
57. **Wilson, I.G.** 2004. Antimicrobial resistance of *Salmonella* in raw retail chickens, imported chicken portions, and human clinical specimens. *J Food Prot* 67(6): 1220-1225.

Table I. Percentages of antimicrobial resistance^a for each of the six *Salmonella* serovars isolated from poultry ceca in four Quebec slaughterhouses. (number of strains)

	Braendenburg	Heidelberg	Thompson	Typhimurium	Hadar	Agona
Amikacine	0	0	0	0	0	0
Amoxicillin/Clavulanate	0	54(41)	0	0	0	100(4)
Amoxicillin	0	70(53)	0	0	25(1)	100(4)
Ampicillin	0	70(53)	0	0	0	100(4)
Cefoxitin	0	53(40)	0	0	0	100(4)
Ceftiofur	0	54(41)	0	0	0	100(4)
Ceftriaxone	0	0	0	0	0	0
Cephalothin	0	57(43)	0	0	0	100(4)
Chloramphenicol	0	0	0	0	0	0
Ciprofloxacin	0	0	0	0	0	0
Enrofloxacin	0	0	0	0	0	0
Gentamicine	0	0	0	0	0	0
Kanamycin	0	0	0	0	0	0
Nalidixic acid	0	0	0	0	0	0
Neomycin	0	0	0	0	0	0
Oxytetracycline	0	0	0	0	0	0
Sarafloxacin	0	0	0	0	0	0
Sulfadimethoxine	95(20)	25(19)	22(2)	100(9)	100(4)	50(2)
Streptomycin	0	1(1)	0	0	100(4)	0
Sulfamethoxazole	0	1(1)	0	0	0	0
Sulfathiazole	0	1(1)	0	0	0	0
Tetracycline	0	0	0	0	100(4)	0
Trimethoprim-sulfas	0	0	0	0	0	0

^aBreakpoints for resistance ($\mu\text{g/ml}$): amikacin, ≥ 64 ; ampicillin, ≥ 32 ; amoxicillin, ≥ 32 ; amoxicillin/clavulanic acid, $\geq 32/16$; cephalothin, ≥ 32 ; ceftiofur, ≥ 8 ; ceftriaxone, ≥ 64 ; cefoxitin, ≥ 32 ; chloramphenicol, ≥ 32 ; ciprofloxacin, ≥ 4 ; enrofloxacin, ≥ 2 ; gentamicin, ≥ 16 ; kanamycin, ≥ 64 ; nalidixic acid, ≥ 32 ; neomycin, ≥ 16 ; oxytetracycline, ≥ 16 ; sarafloxacin, 0,25; streptomycin, ≥ 64 ; sulphadimethoxine, ≥ 512 ; sulfamethoxazole, ≥ 512 ; sulfamethoxazole-trimethoprim, $\geq 4/76$; tetracycline, ≥ 16 . MIC – Minimum inhibitory concentration

Table II. Use of antibiotics as growth promoters in broiler flocks sampled between July 2003 and February 2004 and corresponding antimicrobial resistance profiles.

<u>Flock number</u>	<u>Hatchery</u>	<u>Therapeutics</u>	<u>Preventives</u>	<u>Antimicrobial resistance</u>
92	Cef		Aci, Vir	Sud
105	Cef		Aci, Vir	Amc, Amx, Amp, Fox, Ctf, Cef, Str
135	Cef		Aci, Bac, Vir	
137	Cef		Bac	Amc, Amx, Amp, Fox, Ctf, Cef, Sud
142	Cef		Aci, Bac	Amx, Amp, Cef, Sud
149	Cef		Tyl, Vir	Amc, Amx, Amp, Ctf, Cef, Sud
157	Cef		Aci, Bac, Vir	Amx, Sud, Str, Tet
184	Cef		Tyl	Sud
190	Cef	Sxt	Vir	Amx, Amp, Cef
191	Cef		Bac	Sud, Str, Sum
192	Cef		Bac	Amc, Amx, Amp, Fox, Ctf, Cef, Sud

Abbreviations : amikacin, Amk ; ampicillin, Amp ; amoxicillin, Amx ; amoxicillin/clavulanic acid, Amc ; cephalothin, Cef ; ceftiofur, Ctf ; ceftriaxone, Cro ; cefoxitin, Fox ; chloramphenicol, Chl ; ciprofloxacin, Cip ; enrofloxacin, Enr ; gentamicin, Gen ; kanamycin, Kan ; nalidixic acid, Nal ; neomycin, neo ; oxytetracycline, Oxy ; sarafloxacin, Sar ; streptomycin, Str ; sulfadimethoxine, Sud ; sulfamethoxazole, Sum ; sulfamethoxazole-trimethoprim, Sxt ; tetracycline, Tet.

Table III. Number of MDR strains vs total number of isolated strains related to hatcheries and feedmills ($p < 0,0001$)

		Feedmill	
		J	K
Hatchery	A	4/4	
	K		20/20
	E		20/20
	J	0/4	

Table IV. Genotypes of *Salmonella* isolates recovered from broiler chicken ceca for different broiler flocks and slaughter days in Quebec, using *SpeI* digestion and PFGE.

Flock number	Slaughter date (dd/mm/yy)	Slaughterhouse	Genetic cluster	Hatchery	Milling	Multi-resistance (number of ineffective antibiotics)
92	04-09-2003	B	11 (13/18), 12 (1/18), 13 (3/18), 14 (1/18)	E	K	Negative (1)
105	18-09-2003	B	5 (19/19)	K	K	Positive (7)
135	23-10-2003	C	5 (4/15), 6 (11/15)	A	H	Negative (0)
137	28-10-2003	B	4 (20/20)	K	B	Positive (7)
142	05-11-2003	D	4 (5/18), 5 (4/18), 9 (9/18)	A	R	Negative (4)
149	12-11-2003	C	4 (1/1)	A	C	Positive (6)
157	26-11-2003	B	4 (1/4), 7 (2/4), 8 (1/4)	K	Z	Negative (4)
184	14-01-2004	C	3 (9/9)	A	G	Negative (1)
190	26-01-2004	A	6 (2/2)	A	N	Negative (3)
191	26-01-2004	A	1 (2/3), 2 (1/3)	J	J	Negative (4)
192	29-01-2004	B	10 (4/4)	A	J	Positive (7)

Chapitre 4. DISCUSSION GÉNÉRALE

4.1 Isolement de *Salmonella* à partir de caeca de poulets de chair à l'abattoir

Plusieurs auteurs ont travaillé à évaluer la prévalence de *Salmonella* chez les poulets de chair, que ce soit au niveau des élevages ou à l'abattoir en évaluant la contamination des carcasses et/ou la présence du pathogène dans les caeca (30, 46, 141, 144, 203, 204, 259, 262). Cependant, aucune étude ne s'est intéressée à évaluer la prévalence de ce pathogène chez les élevages de poulets de chair au Québec. Ainsi, notre étude avait donc pour objectif dans un premier temps d'évaluer la prévalence de *Salmonella* dans différents lots abattus en procédant à l'isolement de la bactérie à partir des caeca des oiseaux. En second lieu, nous nous sommes intéressés à définir ces souches en fonction de leur patron de résistance aux antibiotiques, puis finalement de les caractériser génétiquement afin de vérifier l'existence de liens entre l'utilisation d'antibiotiques en élevages, la présence de souches multi-résistantes et un possible lien clonal entre ces mêmes organismes multi-résistants.

4.1.1 Prévalence de *Salmonella* dans les caeca de poulets de chair à l'abattoir

Les résultats obtenus pour l'évaluation de la prévalence de *Salmonella* dans différents lots sont intéressants. En fait, sur les 51 lots testés, 13 (soit 25%) ont été trouvés positifs pour la présence de salmonelles. Ces résultats concordent avec ceux publiés lors d'études précédentes (6, 46, 128, 144). Ainsi, les prévalences étaient établies à 32.5% pour une étude à l'Île-du-Prince-Édouard, à 18.6% pour l'étude menée en Turquie, à 18% lors d'échantillonnages effectués au Japon, puis finalement à 14.3% lors d'une seconde réalisée dans une autre région du Japon. Dans notre étude, puisque l'échantillonnage a été réalisé dans quatre abattoirs situés dans différentes régions du Québec et que les lots analysés étaient aussi originaires de régions distinctes, il est possible de croire que cette prévalence reflète bien la situation québécoise. La technique d'échantillonnage qui a consisté au prélèvement de manière stérile du contenu caecal de chacun des oiseaux et à procéder à la formation d'échantillons poolés est aussi une technique qui est rapportée comme étant efficace pour la détection de *Salmonella* (13, 114, 164). Ainsi, dans l'étude réalisée par Arnold et al. (13), on rapporte que plus le nombre d'individus poolés se rapproche de 20, plus la possibilité de détecter la bactérie devient grande. Dans cette étude réalisée chez le porc, on note que la quantité idéale de matières fécales à utiliser pour chacun des individus du pool est de 10 grammes. Puisque

chez la volaille les quantités présentes dans les caeca sont plus limitées, nous avons été dans l'obligation de fixer la contribution de chaque individu à environ 1 gramme, soit, dans la plupart des cas, la totalité du contenu caecal. L'isolement des salmonelles a été effectué selon le protocole décrit par Côté et al. (64), mis à part l'utilisation du bouillon tétrathionate au vert brillant qui a été remplacé par le bouillon Rappaport-Vassiliadis, rapporté comme étant parmi les milieux les plus utilisés, et les plus sélectifs pour l'isolement de *Salmonella* chez les volailles (246, 267, 270). Parmi les mesures permettant d'augmenter la sensibilité, les caeca ont été mis sur la glace pendant le transport jusqu'au laboratoire et on par la suite été congelés à -80°C, technique de conservation démontrée efficace pour la préservation des bactéries entéropathogènes (68). Puisque tous les isolats ont été sérotypés, il nous est alors possible de constater que nos résultats voulant que Heidelberg soit le sérovar le plus prévalent avec 62%, se rapprochent de ceux d'une étude canadienne ayant identifié le même sérotype chez 44% de ses isolats (6). Il est aussi possible de constater que les pourcentages de prévalence des divers sérotypes varient énormément d'un pays à l'autre et donc d'une étude à l'autre. Ainsi, Kudaka et al. (128) ont retrouvé du *Salmonella* Infantis chez plus de 99% de leurs isolats provenant de poulets de chair (144, 230).

4.2 Résistance aux antibiotiques en lien avec leur utilisation en élevages

Au cours des dernières années, plusieurs pratiques ont été remises en doute, notamment l'utilisation d'antibiotiques dans les élevages industriels (9). L'émergence de la résistance aux antibiotiques est la grande responsable de toute cette remise en question. L'industrie avicole a entre autre été pointée du doigt comme étant en grande partie responsable de cette explosion (4, 128). Le lien entre la résistance aux antimicrobiens chez des souches de *Salmonella* aviaires et la possibilité de transfert de ces souches à l'humain demeure un sujet de discussion controversé parmi les scientifiques (108). Chose certaine, depuis les dernières années, de plus en plus d'études se sont intéressées à suivre les changements tant au niveau de leur prévalence qu'au niveau des profils de résistance de souches de *Salmonella* de toutes origines (31, 78, 156, 206, 285). Les souches d'origine animale se retrouvant dans la nourriture destinée à la consommation humaine sont d'un intérêt particulier puisque ce sont ces isolats qui lorsqu'ils sont associés à des cas compliqués de salmonellose humaine deviennent problématiques pour la réussite du traitement des patients aux antibiotiques (48).

Au Canada et principalement au Québec, très peu d'études ont été consacrées à la résistance de *Salmonella* chez la volaille (6, 119, 130, 205, 206). Le plus souvent, ces sont des données associées à des programmes de surveillance qui sont rapportées. Puisque la viande de volaille est une viande de plus en plus consommée (289) et que les poulets de chair sont reconnus pour être des réservoirs importants de salmonelles, il est donc important de connaître les prévalences réelles de *Salmonella* ainsi que d'identifier leur niveau de résistance aux différents antibiotiques. Pour pouvoir établir un lien entre l'utilisation des antibiotiques et la pression qu'ils exercent pour la sélection de souches résistantes, il devient essentiel d'avoir accès à des informations relatives à chacun des élevages, ce qui est le cas pour notre étude. Puisque les caeca représentent le site de prédilection pour l'isolement de *Salmonella*, les profils de résistance aux antimicrobiens ont été déterminés à partir de bactéries provenant de matières fécales caecales (57).

4.2.1 Résistance aux antibiotiques retrouvée chez les souches de *Salmonella* isolées de caeca de poulets de chair à l'abattoir

Le but de cette partie de notre étude était donc de déterminer si l'utilisation des antibiotiques dans un but prophylactique et/ou thérapeutique pouvait influencer le niveau de résistance de souches de *Salmonella* en plus d'identifier le profil propre à chacun des isolats.

Des 51 lots de poulets de chair échantillonnés pour cette étude, 123 souches de *Salmonella* provenant de 102 pools différents ont été caractérisées phénotypiquement par identification de profils de résistance aux antibiotiques. Au total, 23 antibiotiques ont été utilisés. Les valeurs de CMI obtenues ont été interprétées selon les critères établis par le CLSI, anciennement le NCCLS (177). Les souches ont été sensibles à onze antibiotiques : amikacine, ceftriaxone, chloramphénicol, ciprofloxacine, enrofloxacine, gentamicine, kanamycine, acide nalidixique, néomycine, oxytétracycline et sarafloxacine. Les résultats nous ayant le plus surpris sont les niveaux de résistance relativement élevés observés pour plus du tiers (36%) des isolats. Ainsi, une résistance a été observée pour 15 des 23 antibiotiques, ce qui est relativement élevé si on compare à d'autres études. Les plus hauts niveaux de résistance ont été attribués à l'amoxicilline (47%), l'ampicilline (46%), la céphalothine (46%), la sulphadiméthoxine (46%) et le ceftiofur (36%). Ces

résultats différent de ceux rapportés pour d'autres pays tant au niveau des pourcentages de résistance que des antibiotiques eux-mêmes. Ainsi, une étude américaine rapporte que les résistances les plus importantes avaient été remarquées pour la streptomycine (33 à 57%), le sulfisoxazole (33 à 50%), la tétracycline (26 à 50%) et la gentamicine (13 à 40%) selon les sérotypes (131). En Irlande, les pourcentages de résistance variaient entre 17% et 52% et les antibiotiques ciblés étaient les sulfonamides, la streptomycine, la tétracycline et l'ampicilline (280). Au Liban, Harakeh et al. (101) ont étudié les patrons de résistance de souches de *Salmonella* provenant de viande de volaille et ont identifié des niveaux de résistance aussi élevés que 100% pour l'oxacilline, la clindamycine, l'érythromycine et la vancomycine (101). Nos souches ont été considérées relativement résistantes, la résistance à cinq antibiotiques et plus ayant été observée pour plus du tiers d'entre elles. Aucune étude n'a rapporté de tels niveaux de multi-résistance (45, 78, 101, 131, 280). Ainsi, nous avons été dans l'obligation d'élever notre seuil de tolérance en ce qui a trait à la multi-résistance (48). Pour ce faire, toutes les souches ont été considérées multi-résistantes lorsqu'elles ne démontraient pas de sensibilité à cinq agents antimicrobiens et plus, donc pentarésistantes. Avec ce critère de sélection, 36% (45/123) des isolats devenaient donc multi-résistants. Dix profils de résistance distincts ont été identifiés, le plus fréquent impliquant l'amoxicilline-acide clavulanique, l'amoxicilline, l'ampicilline, la cefoxitine, le ceftiofur et la céphalothine, avec 24% (30/123) des isolats affichant une résistance à ce groupe d'antibiotiques. Aucune résistance n'a été observée pour le chloramphénicol, antibiotique dont l'usage est interdit chez les animaux de rente. Ces résultats concordent avec ceux obtenus par Carramiñana et al (48). La résistance à la tetracycline a rarement été observée dans notre étude, avec moins de 4% des isolats affichant une résistance à cet antibiotique. Ces résultats diffèrent de manière considérable de ceux rapportés par d'autres auteurs (48, 90, 131, 133, 156, 249). Le ceftiofur est un antibiotique appartenant à la famille des céphalosporines. Il était, jusqu'à tout dernièrement, utilisé à grande échelle dans les couvoirs sous forme d'injection à tous les poussins d'un jour d'âge ou même *in ovo*. Des résistances à cet antibiotique ayant fait leur apparition, il a donc été convenu en accord avec l'Association des Couvoitiers du Québec, d'arrêter l'injection systématique de tous les oiseaux, destinés à l'élevage de poulets de chair, quittant les couvoirs. La résistance au ceftiofur ayant déjà été rapportée pour *Salmonella* et le ceftiofur étant toujours utilisé au moment où l'échantillonnage de notre étude a été réalisé, il n'est pas surprenant que 36% de nos souches présentent une diminution de sensibilité face à ce composé (201, 208, 275). Dans notre étude, les plus

hauts pourcentages de résistance aux antibiotiques ont été associés à *Salmonella* Heidelberg. Depuis les dix dernières années, l'incidence des infections par *Salmonella* Heidelberg chez l'humain a augmenté de plus de 25% (78). De plus, des études rapportent une augmentation de l'émergence et de la dissémination de souches de *Salmonella* Heidelberg résistantes aux antimicrobiens, potentiellement causées par l'utilisation des antibiotiques en production animale (1, 178, 286). Des résultats semblables aux nôtres ont été publiés par Johnson et al. en 2005, où les plus hauts niveaux de résistance étaient retrouvés aussi pour ce même sérotype (119). Une étude menée par Farrington et al. (81) suggère que pour *Salmonella*, une relation existerait entre la résistance aux antimicrobiens et l'appartenance à un sérotype particulier. En effet, les souches d'origine avicole appartenant au sérovar Heidelberg sont reconnues pour être porteuses de gros plasmides responsables de cette résistance aux antibiotiques (205).

4.2.2 Évaluation du lien entre la présence de résistance aux antibiotiques chez les souches de *Salmonella* isolées de poulets de chair à l'abattoir et l'utilisation d'agents antimicrobiens dans les élevages correspondants

Avec l'émergence de la résistance bactérienne aux antibiotiques, certains auteurs ont tenté de mesurer l'évolution de cette résistance (27, 206, 209). Puisque dans la majorité des études s'intéressant à la résistance de souches bactériennes aux antibiotiques la collecte d'échantillons doit se faire sur une période de temps limitée et prédéterminée par les échéances fixées, il devient plus difficile de pouvoir mesurer l'évolution de la résistance chez les mêmes souches bactériennes soumises à une influence environnementale relativement constante. Il faut donc fréquemment se référer à d'autres études afin de tenter d'établir de possibles liens. La comparaison la plus intéressante à faire repose sur les résultats d'un article publié par McGarr et al. en 1977 (162). Cette étude a été réalisée auprès de l'industrie avicole ontarienne. Des isolats de *Salmonella* ont été cultivés à partir d'échantillons provenant de poulets de chair. Des profils de résistance aux antibiotiques ont par la suite été définis. En examinant les résultats de cette étude et en les comparant avec ceux de nos travaux, il est possible de croire que la résistance aux antibiotiques est un phénomène qui évolue dans le temps et en fonction des pressions exercées. Ainsi, à titre d'exemple, McGarr et al. ont identifié à l'époque une résistance particulièrement élevée à l'endroit du chloramphénicol. À

l'inverse, notre étude a démontré que toutes les souches de *Salmonella* étaient sensibles à cet antibiotique dont l'usage est maintenant interdit depuis plusieurs années. Les sulfas sont beaucoup utilisés par l'industrie avicole ce qui pourrait expliquer pourquoi aujourd'hui nous observons un fort pourcentage d'isolats de *Salmonella* résistants comparativement à ce qui avait été noté en 1977. Ces observations nous permettent donc de croire, qu'à l'échelle d'une province, l'utilisation des antibiotiques en élevage pourrait sélectionner positivement les organismes résistants, et que l'arrêt d'un antibiotique spécifique permettrait, à long terme, de faire diminuer la prévalence des organismes résistants à un agent ou une classe d'antimicrobiens. Ceci pourrait alors expliquer pourquoi aucun lien statistique n'a pu être établi dans notre étude entre la présence de souches multi-résistantes et l'utilisation d'antibiotiques en élevages. Par contre, étant donné la courte période d'échantillonnage, cette relation est plus difficilement mesurable. Ce résultat statistique reflète en fait une situation bien précise dans le temps, c'est-à-dire la période d'échantillonnage. Puisque l'évolution de la résistance s'effectue sur une longue période de temps, on peut supposer que des bactéries dans un environnement donné, soumises de manière répétée à une pression de sélection exercée par des agents antimicrobiens, ont pu au fil des ans acquérir les profils de résistance qu'elles affichent aujourd'hui, et ce, malgré le fait que des antibiotiques aient été utilisés ou non pour un élevage précis (136, 153, 272). Ainsi, la résistance serait le résultat de la pression continue de sélection combinée à la prévalence de gènes de résistance pour un agent antimicrobien donné, dans un milieu donné et pour une période de temps prolongée (231).

4.2.3 Existence possible d'un lien entre la présence de résistance aux antibiotiques chez les souches de *Salmonella* isolées de poulets de chair à l'abattoir et l'utilisation d'agents anticoccidiens dans les élevages correspondants

Les agents anticoccidiens sont des composés chimiques possédant également des activités antimicrobiennes. Ils sont utilisés en élevages pour la prévention de la coccidiose, une maladie économique importante causée par un membre de la famille des *Eimeriidae*. Leur mécanisme d'action diffère de celui des antibiotiques du fait qu'ils agissent en brisant le gradient cationique transmembranaire par interférence avec des

systèmes de transport au potassium, sodium, magnésium et calcium, arrêtant ainsi le développement de la coccidie (231). Les anticoccidiens ne sont pas reconnus pour avoir une action directe contre les bactéries à gram-négatif compte tenu de l'influence de la perméabilité des barrières qui bloquent l'entrée du produit dans la cellule bactérienne. Puisque leurs mécanismes d'action sont différents et qu'ils n'ont pas la même cible, on peut donc supposer que c'est pour cette raison que les résultats de notre étude n'ont pas établi de lien entre l'utilisation des anticoccidiens et la présence de multi-résistance aux antibiotiques. Avec leurs travaux, Scalzo et al. ont conclu que l'acquisition de plasmides de résistance aux antibiotiques ne se faisait pas secondairement à l'utilisation d'agents anticoccidiens, mais plutôt suite au passage de la bactérie à travers le tractus intestinal de l'oiseau, permettant ainsi l'échange de matériel génétique par contact.

4.2.4 Résistance aux désinfectants retrouvée chez les souches de *Salmonella* isolées de caeca de poulets de chair à l'abattoir

Plusieurs gènes de résistance aux antibiotiques retrouvés chez les bactéries négatives à la coloration de Gram sont présents sur des éléments génétiques appelés intégrons. Les intégrons sont composés de deux régions bien conservées et localisées sur les portions 3' et 5', puis d'une région variable renfermant habituellement plus d'un gène de résistance qui s'insèrent sous forme de cassette entre les deux segments. Différentes cassettes ont été identifiées en fonction des déterminants de résistance aux antibiotiques qu'elles portaient tels les aminoglycosides, la pénicilline, le chloramphénicol et le triméthoprim. Quatre classes d'intégrons ont été décrites, la classe 1 étant la plus souvent isolée d'organismes de la famille des *Enterobacteriaceae* résistants aux antibiotiques (127, 200). Le segment 3' renferme le gène de résistance aux sulfonamides, *sulII*, et occasionnellement, le gène codant pour la résistance aux ammoniums quaternaires, *qacEΔ1*. Très peu d'études se sont intéressées à évaluer l'ampleur de cette résistance aux ammoniums quaternaires, à préciser le lien existant entre la présence de ce gène et la résistance à ces désinfectants, et à la relation pouvant exister entre la résistance aux désinfectants et aux antibiotiques chez un même organisme (124, 127, 213). On suggère que le mécanisme de résistance conféré par *qacEΔ1* est en fait un système d'exportation actif généré par la force de mouvement de protons (200). Contrairement aux agents antimicrobiens pour qui l'usage répété est

reconnu favoriser le développement de résistance, ceci est moins certain pour les désinfectants (91). Certains auteurs ont proposé que des déterminants de résistance aux antibiotiques pourraient être impliqués dans la résistance aux désinfectants (137, 213). Randall et al. ont aussi suggéré que l'utilisation combinée des antibiotiques et des désinfectants pouvait être responsable d'une augmentation de la pression de sélection sur les bactéries. L'analyse de la résistance aux désinfectants pour nos souches s'est concentrée sur la détection du gène *qacEΔ1*. Aucune d'entre elles ne s'est révélée porteuse de ce gène. Ces résultats sont en accord avec ceux publiés par Kücken et al. (127) qui veulent que des organismes affichant une multi-résistance aux antibiotiques ne soient pas plus résistants aux désinfectants que des bactéries faiblement résistantes aux agents antimicrobiens. Nos résultats auraient pu être confirmés en mesurant des valeurs de CMI pour toutes les souches testées. D'après Gradel et al. (91), la résistance aux désinfectants serait plutôt associée à un facteur intrinsèque. Aussi, la culture répétée de souches bactériennes dans des milieux contenant des concentrations croissantes de désinfectants ciblés n'a pas provoqué le développement de résistance. Ainsi, l'usage répété des désinfectants ne serait pas relié à une persistance des souches de *Salmonella*, ni à une augmentation de leurs valeurs de CMI (91). Tout comme pour notre étude, il a été rapporté que des souches négatives pour la présence de *qacEΔ1* présentaient des valeurs de CMI élevées pour plusieurs antibiotiques, laissant suspecter que les gènes de la multi-résistance aux antibiotiques pourraient être associés à d'autres déterminants de résistance aux antiseptiques, ou que ce lien n'existerait pas (124). Puisque la détection des gènes associés à la multi-résistance chez *Salmonella* Typhimurium DT 104 (*flo*, *inv*, *spvC* et *int*) par PCR multiplex s'est avérée négative, il aurait été intéressant de regarder pour des gènes codant pour des β-lactamases. En effet, compte tenu que la majorité des profils de résistance obtenus pour les souches de *Salmonella* de cette étude renfermait les antibiotiques tels que l'amoxicilline, l'amoxicilline-acide clavulanique, l'ampicilline, le ceftiofur ainsi que la céphalothine, nous pouvons suspecter la présence de gènes codant pour des β-lactamases, ces enzymes étant majoritairement responsables de la résistance aux β-lactamines chez *Salmonella* (139). La production de β-lactamases représente le principal mécanisme de résistance aux β-lactamines pour les bactéries à Gram négatif (148). Plus de 340 β-lactamases ont été décrites et la plupart ont été retrouvées chez *Salmonella* (39). Chez *Salmonella*, les gènes *bla*_{C_{MIN}}, *bla*_{C_{TX}}, *bla*_{S_{IV}} et *bla*_{T_{EM}}, codant pour des β-lactamases sont de plus en plus souvent retrouvés sur un plasmide arborant aussi

d'autres déterminants de la résistance aux antibiotiques (24, 40). Ceci est d'autant plus inquiétant que les céphalosporines représentent le traitement de choix de la salmonellose chez les enfants (103). Ces gènes sont aussi parmi les plus répandus chez les souches de *Salmonella* isolées d'animaux (139).

4.2.5 Évaluation du lien entre la présence de souches de *Salmonella* multi-résistantes en élevages et l'approvisionnement à un couvoir et une meunerie spécifiques

Avec la réalisation de ce projet, nous nous sommes aussi intéressés à l'impact qu'avait le couvoir et la meunerie sur la prévalence de souches de *Salmonella* multi-résistantes dans les élevages échantillonnés. Nos premières analyses nous ont permis d'affirmer qu'effectivement, une relation globale statistiquement significative existait entre la prévalence de ces souches multi-résistantes et la provenance des oiseaux d'un couvoir particulier ($p < 0,0001$) ou même le fait pour un élevage, de s'approvisionner à une meunerie spécifique ($p < 0,0001$). Le nombre de meuneries et de couvoirs étant limité, nous avons tout de même été en mesure d'effectuer des analyses statistiques plus poussées pour les couvoirs A et K ainsi que pour les meuneries J et K, ceux-ci approvisionnant plusieurs élevages et étant partagés entre les lots analysés (entre 3 et 6). Ces analyses statistiques ont révélé que pour le couvoir A, il existait une relation statistiquement significative ($p < 0,0001$) entre la prévalence de souches de *Salmonella* multi-résistantes et l'approvisionnement à une meunerie en particulier, celle-ci étant la J. La même situation a été retrouvée pour le couvoir K, où cette fois-ci, deux meuneries ont été identifiées, les meuneries B et K. Ainsi, les prévalences de souches multi-résistantes étaient significativement plus élevées pour les meuneries B, J et K que pour toutes les autres meuneries (G, H, R, Z). De la même façon, lorsqu'on a vérifié pour l'effet du couvoir sur la présence de souches multi-résistantes, on a remarqué que les prévalences étaient beaucoup plus élevées pour le couvoir K que le couvoir E ($p < 0,0001$), ces deux couvoirs approvisionnant des lots de poulets de chair alimentés par la meunerie K). Ce même effet a aussi été remarqué pour la meunerie J alimentant des lots dont les oiseaux provenaient des couvoirs A et J. La prévalence de souches multi-résistantes aux antibiotiques était significativement plus élevée pour le couvoir A ($p < 0,0001$).

Le couvoir et la meunerie représentent des étapes critiques pour l'obtention d'un produit de qualité, au même niveau que le sont le suivi des troupeaux reproducteurs et l'abattoir. La contamination des œufs embryonnés par pénétration des divers sérovars de *Salmonella* représente un risque pour la santé humaine. Deux voies de transmission sont rapportées comme étant associées à la contamination des œufs embryonnés par l'organisme pathogène. Verticalement, c'est-à-dire que la poule le transmet à sa progéniture par la présence d'ovaires et d'ovules infectés, puis horizontalement, où la bactérie pénètre la coquille de l'œuf une fois que celui-ci est pondu (65). Des études se sont intéressées à évaluer la prévalence du microorganisme dans divers couvoirs. Cox et al. en 1990 (66) ont évalué que 71%, 80% et 74% respectivement des fragments de coquilles d'œufs, les courroies et les papiers retrouvés dans le fond des papiers d'éclosoirs étaient contaminés par *Salmonella* (66). Byrd et al. (42) ont eux aussi évalué la prévalence de *Salmonella* au niveau des équipements entrant en contact avec les oiseaux au couvoir. Ainsi, 12% des papiers d'éclosoirs étaient contaminés par le microorganisme (42). Cette étude a aussi permis de mettre en évidence le rôle des oiseaux reproducteurs sur la présence de *Salmonella* dans les troupeaux de poulets de chair. Une étude menée par Bailey et al. en 1994 (20) a aussi démontré le rôle que pouvait avoir le couvoir sur la présence d'oiseaux porteurs et excréteurs de *Salmonella* en élevage. De la même façon, des auteurs ont tenté de déterminer le rôle que pouvaient avoir les meuneries dans la contamination des élevages. Dans une étude menée par Davies et al. (72), 9 meuneries ont été échantillonnées afin de vérifier la présence de *Salmonella*. Le taux d'isolement variait selon les meuneries, le nombre d'échantillons positifs atteignant près de 42% pour certaines d'entre elles (72). La plupart des études réalisées auprès des meuneries révèlent que les intrants servant à la fabrication de la nourriture ainsi que la poussière représentent les principales sources de contamination (72, 120).

4.3 Caractérisation génétique des isolats de *Salmonella*

Salmonella est un organisme pathogène que l'on retrouve au niveau de la flore intestinale des poulets de chair, sans qu'on puisse remarquer sa présence cliniquement. Les caeca représentant le site de prédilection pour l'isolement de *Salmonella*, la plupart des auteurs s'intéressant à l'isolement et aux caractérisations phénotypique et génotypique de cet organisme vont donc le faire à partir de matières fécales (6, 57, 78,

216, 229). Comme c'est le cas pour *Campylobacter*, la contamination des carcasses lors du processus d'abattage rend *Salmonella* un pathogène d'importance pour la santé publique (19, 28, 29, 106, 222, 239). Le risque est d'autant plus grand quand on pense que le nombre de souches de *Salmonella* multi-résistantes est lui aussi en augmentation (45, 78, 101, 280). Ainsi, certains auteurs ont travaillé à établir les patrons de résistance aux antibiotiques pour des souches retrouvées chez la volaille (6, 48, 55, 78, 131), d'autres ont été intéressés à caractériser génétiquement les souches associées à cette espèce (5, 58, 102), puis finalement seulement quelques études ont procédé à la caractérisation génétique d'isolats de *Salmonella* multi-résistants (102, 166, 179, 216, 229). À notre connaissance, au Québec, encore aucune étude portant sur les salmonelles aviaires et reliant à la fois les patrons de résistance aux antimicrobiens et la diversité génétique n'avait été réalisée. Ainsi, aucune donnée n'est disponible concernant l'existence possible d'un lien entre la multi-résistance aux antibiotiques et l'appartenance à un regroupement génétique particulier. On retrouve dans la littérature des informations laissant croire à la possibilité d'une dissémination clonale des isolats de *Salmonella* multi-résistants (31, 157, 182). Cette situation est bien connue chez *Salmonella enterica* sérovar Typhimurium (63). Cette relation clonale entre isolats est aussi rapportée pour des souches aviaires dans différents pays tels que la Malaisie, la République Slovaque, et le Japon (154, 171, 251).

Cette section de notre étude avait donc pour objectif de déterminer le niveau de diversité génétique des isolats de *Salmonella* retrouvés à l'intérieur des caeca de poulets de chair à l'abattoir, puis de procéder à une comparaison des profils génétiques afin de tenter d'évaluer un lien possible et donc une origine génétique commune à certains groupes d'isolats. Finalement, nous voulions ultimement voir si l'utilisation des antibiotiques en élevages était responsable de la sélection de souches résistantes partageant des liens génétiques particuliers.

4.3.1 Étude de la diversité génétique des isolats de *Salmonella* au niveau des caeca de poulets de chair

Malgré l'existence de plusieurs techniques de caractérisation génétique, notre étude a privilégié le PFGE compte tenu de son pouvoir discriminant supérieur comparé aux autres méthodes (79, 143, 254). En séparant le génome bactérien en fragments, il

permet de créer des patrons qui sont par la suite utilisés afin d'estimer la relation génétique entre différents isolats (273). Les résultats de notre étude doivent être inévitablement interprétés à l'échelle du lot compte tenu que les souches de *Salmonella* ont été isolées à partir d'échantillons d'individus poolés. Notre étude, comme plusieurs autres, a utilisé une seule enzyme de restriction (135, 141, 142, 193). L'utilisation de l'enzyme de restriction *SpeI* nous a permis d'obtenir 14 profils génétiques distincts, comportant chacun en moyenne 15 à 18 bandes, ce qui est en accord avec ce que d'autres chercheurs ont publié (31, 45, 207, 273). À l'analyse par PFGE, *Salmonella* est reconnue pour présenter un faible niveau de variabilité comparativement à d'autres organismes tels que *Campylobacter*, qui lui est reconnu pour être plutôt pléomorphe (220). Un seul lot présentait une plus grande diversité, renfermant plus de 4 profils génétiques différents, tandis que pour plus de la moitié d'entre eux, soit 55%, un seul patron a pu être identifié. En ce qui nous concerne, compte tenu du fait que nous avons utilisé une seule enzyme de restriction, nous avons considéré que des souches étaient génétiquement distinctes à partir du moment où plus d'une bande les différenciait (175). Nous avons obtenu une diversité génétique de nos isolats relativement faible, comparable à ce que d'autres études ont rapporté, laissant croire que les isolats provenant des lots échantillonnés sont étroitement reliés du point de vue génétique. Cette faible variabilité est d'autant plus intéressante quand on pense que pour un même lot, nos analyses ont été réalisées sur un minimum de 5 colonies par pool, ce nombre allant parfois jusqu'à 10. En se référant à ce qui a déjà été publié principalement pour *Campylobacter*, ce nombre devient, à l'échelle d'un même lot, extrêmement révélateur compte tenu qu'en multipliant le nombre de souches analysées, si la diversité génétique était importante, les chances de la mettre en évidence étaient donc bonifiées (181, 220). Le pourcentage de similarité pour l'ensemble des 123 isolats était significatif (45, 102). Il se situait de manière générale à plus de 75%, avec des regroupements allant jusqu'à presque 100% d'homologie entre les souches en faisant partie. Nous avons aussi constaté que pour les sérotypes présents en nombres plus limités tels que *Salmonella* Hadar, Thompson, Agona, Typhimurium et Thompson, il était en général fréquent de les rencontrer comme appartenant à un même regroupement ou à des regroupements reliés de près génétiquement. Ce lien a aussi déjà été rapporté (273).

4.4 Existence possible d'un lien entre un profil de résistance aux antibiotiques et l'appartenance à une famille génétique particulière

Les techniques de caractérisation moléculaire ont permis au cours des dernières années de réaliser des études épidémiologiques et ainsi de mieux définir les relations existant entre différentes souches de *Salmonella* impliquées dans des épisodes de toxi-infections alimentaires, présentant une distribution géographique clonale, ou même en fonction de leurs profils de résistance aux agents antimicrobiens. Avec l'apparition des souches démontrant une résistance accrue aux antibiotiques, certains auteurs se sont intéressés à savoir si un lien génétique unissait ces souches multi-résistantes, ce qui pourrait laisser croire à une origine commune (31, 157, 182). Cette réalité a été démontrée pour *Salmonella* Typhimurium (63). Encore aucune étude n'avait évalué la situation des élevages avicoles québécois en lien avec la présence de souches de *Salmonella* multi-résistantes, tout comme des souches de ce genre bactérien isolées de poulets de chair n'avaient pas été caractérisées génétiquement. Notre étude voulait donc vérifier si des souches multi-résistantes provenant d'élevages distincts présentaient des similitudes du point de vue génétique nous permettant de les relier entre elles. Il devenait alors intéressant de voir si un lien pouvait exister entre la présence de souches de *Salmonella* multi-résistantes dans un lot et la présence d'un profil génétique particulier. Les analyses utilisant le test chi-carré de Pearson ont démontré qu'une relation statistiquement significative existait entre la présence de souches multi-résistantes et l'appartenance à une famille génétique spécifique ($p < 0.0001$). Harbottle et al. (102) ont aussi obtenu des résultats démontrant la corrélation entre ces deux variables. Pour d'autres études, il a été démontré qu'un lien pouvait être établi entre le profil génétique et le patron de résistance aux antibiotiques sans que les souches ne soient multi-résistantes (45). Nos résultats démontrent que la multi-résistance est absente de certaines familles comme c'est le cas pour la famille 1, et à l'inverse, elle atteint des niveaux aussi élevés que 100% pour les souches appartenant à la famille 13. L'utilisation de désinfectants ne semble pas être responsable de la persistance de certaines souches plus résistantes dans certains élevages(91).

Chapitre 5. CONCLUSIONS

La réalisation de ce projet de maîtrise a permis d'obtenir une vue d'ensemble de la situation des élevages avicoles québécois et de la comparer à ce qui est rapporté pour d'autres pays. Ainsi, des données relatives à la prévalence de *Salmonella* dans les élevages de poulets de chair, de la résistance aux antibiotiques des souches retrouvées dans les caeca de ces oiseaux, ainsi que de la diversité génétique de ces isolats ont pu être récoltées et analysées. Ce projet nous a aussi permis de mieux évaluer la prévalence des souches multi-résistantes, le rôle de l'utilisation des antibiotiques à la ferme, en tant que promoteurs de croissance ou agents thérapeutiques, dans la sélection de ces microorganismes résistants et/ou partageant une relation génétique. Cette étude nous permet de tirer les conclusions suivantes :

-La prévalence de *Salmonella* dans les caeca de poulets de chair recueillis dans les abattoirs d'inspection fédérale du Québec est significative et similaire à celle retrouvée pour d'autres pays, le quart des élevages présentant des oiseaux porteurs

-Le pourcentage de résistance aux antibiotiques chez les souches de *Salmonella* isolées de caeca de poulets de chair à l'abattoir est relativement important, 24% des souches étant résistantes aux antibiotiques suivants : amoxicilline-acide clavulanique, amoxicilline, ampicilline, cefoxitine, ceftiofur, céphalothine.

-La multiple résistance aux antibiotiques au niveau des élevages de poulets de chair du Québec est un phénomène courant. Plus de 36% des isolats testés ont démontré une résistance à cinq antibiotiques ou plus, une résistance allant jusqu'à sept antibiotiques pour certaines souches.

-À l'échelle des fermes étudiées, l'utilisation des antibiotiques comme promoteurs de croissance, agents thérapeutiques ou en prophylaxie n'est pas directement reliée aux profils de résistance.

-À l'échelle du lot, la diversité génétique des isolats de *Salmonella* est faible, plusieurs des lots ne renfermant qu'un seul génotype.

-Le fort pourcentage d'homologie retrouvé de façon générale et plus précisément pour certains lots démontre l'existence d'un lien clonal entre les souches de *Salmonella* multi-résistantes.

-La présence d'un profil de multi-résistance est corrélée avec l'appartenance à une famille génétique particulière.

5.1 Perspectives

Les résultats obtenus pour cette étude soulèvent inévitablement d'autres questions auxquelles il serait intéressant de répondre afin d'approfondir la compréhension du sujet. En tout premier lieu, il serait intéressant de mettre en évidence les facteurs responsables de la présence de souches de *Salmonella* dans les caeca de poulets de chair, et éventuellement de procéder à une comparaison avec les souches responsables de la contamination des carcasses au moment du processus d'abattage. Ainsi, il deviendrait intéressant de procéder à un échantillonnage de toutes les sources pouvant intervenir dans la contamination des poulets de chair, quand on pense aux troupeaux reproducteurs d'origine, au couvoir, à la meunerie, à l'environnement d'élevage, aux cageots utilisés dans le transport des oiseaux prêts pour abattage, à l'impact de la contamination croisée au moment de l'abattage. Ainsi, le fait de procéder à un échantillonnage de toutes ces étapes du processus, et de caractériser phénotypiquement et génétiquement ces souches nous permettrait de mieux comprendre l'implication des différents facteurs de risque associés à la contamination de la viande de volaille en bout de ligne.

Puisque *Salmonella* est un pathogène reconnu pour l'humain et qu'on le retrouve très souvent comme un contaminant de la viande de volaille, il serait alors, suite à la compréhension de l'implication des divers facteurs de risque associés à cette contamination, intéressant de mettre en place des stratégies visant à diminuer la prévalence de la bactérie dans les élevages de poulets de chair. Ces plans de surveillance et de contrôle pourraient alors s'inspirer du modèle porcin utilisé au Québec.

Les résultats de ce projet montrent que des efforts doivent être déployés au plus tôt et de façon agressive afin de s'attaquer à la résistance aux antibiotiques. Plusieurs expérimentations pourraient être réalisées afin de mieux définir l'impact de l'utilisation des antibiotiques en élevages. Ainsi, il deviendrait intéressant de recueillir des informations relatives à la présence de souches résistantes pour des élevages donnés, non seulement de façon ponctuelle, mais d'assurer un suivi de l'évolution de cette résistance dans le temps. De cette façon, un même élevage pourrait être suivi sur une période de plusieurs mois, voire même des années, afin de bien pouvoir quantifier ce changement. À l'intérieur de ce protocole d'expérimentation, il deviendrait alors intéressant d'inclure des lots où l'on procède de manière habituelle et des lots contrôles, c'est-à-dire où aucun agent antimicrobien, que ce soit sous forme de promoteur de croissance ou d'agent thérapeutique ne serait utilisé. Le suivi des souches bactériennes nous permettrait alors de mesurer statistiquement l'impact réel de l'utilisation des antibiotiques sur le développement de résistance.

Le dernier élément à approfondir se rapporte lui aussi à la présence de multi-résistance chez les isolats de *Salmonella* provenant des poulets de chair. Des analyses moléculaires plus poussées nous donneraient la chance de mieux comprendre les mécanismes exacts responsables de l'expression de cette résistance.

Chapitre 6. BIBLIOGRAPHIE

1. **Aarestrup, F.M., Hasman, H., Olsen, I., Sorensen, G.** 2004. International spread of *bla* (CMY-2)-mediated cephalosporin resistance in a multiresistant *Salmonella* enterica serovar Heidelberg isolate stemming from the importation of a boar by Denmark from Canada. *Antimicrob Agents Chemother* 48: 1916-1917.
2. **Aarestrup, F.M., Seyfarth, A.M., Emborg, H.-N., Pederson, K., Hendriksen, R.S., Bager, F.** 2001. Effect of abolishment of the use of antimicrobial agents for growth promotion on occurrence of antimicrobial resistance in fecal enterococci from food animals in Denmark. *Antimicrob Agents Chemother* 45: 2054-2059.
3. **Aarestrup, F.M.** 1999. Association between the consumption of antimicrobial agents in animal husbandry and the occurrence of resistant bacteria among food animals. *Int J Antimicrob Agents* 12:279-285.
4. **Aarestrup, F.M.** 1995. Occurrence of glycopeptide resistance among *Enterococcus faecium* isolates from conventional and ecological poultry farms. *Microb Drug Resist* 1: 255-257.
5. **Aarts, H.J.M., van Lith, L.A.J.T., Keijer, J.** 1998. High-resolution genotyping of *Salmonella* strains by AFLP-fingerprinting. *Lett Appl Microb* 26: 131-135.
6. **Abouzeed, Y.M., Hariharan, H., Poppe, C., Kibenge, F.S.B.** 2000. Characterization of *Salmonella* isolates from beef cattle, broiler chickens and human sources on Prince Edward Island. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 23: 253-266.
7. **Allen, K.J., Poppe, C.** 2002. Occurrence and characterization of resistance to extended-spectrum cephalosporins mediated by β -lactamase CMY-2 in *Salmonella* isolated from food-producing animals in Canada. *Can J Vet Res* 66: 137-144.
8. **Acha, P.N., Szyfres, B.** 2001. Bacterioses and Mycoses: Salmonellosis. In *Zoonoses and Communicable Diseases common to man and animals*. Third edition. World Health Organization. Pp. 233-246

9. **Anderson, A.D., Nelson, J.M., Rossiter, S., Angulo, F.J.** 2003. Public health consequences of use of antimicrobial agents in food animals in the United States. *Microb Drug Resist* 9: 373-379.
10. **Angulo, F., Nargund, V., Chiller, T.** 2004. Evidence of an association between use of antimicrobial agents in food animals and antimicrobial resistance among bacteria isolated from humans and the human health consequences of such resistance. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* 51: 374-379.
11. **Arcangioli, M.A., Leroy-Sétrin, S., Martel, J.L., Chaslus-Dancla, E.** 1999. A new chloramphenicol and florfenicol resistance gene flanked by two integron structures in *Salmonella typhimurium* DT104. *FEMS Microbiol Lett* 174:327-332.
12. **Arthur, M., Courvalin, P.** 1993. Genetics and mechanisms of glycopeptide resistance in enterococci. *Antimicrob Agents Chemother* 37(8): 1563-1571.
13. **Arnold, M.E., Cook, A., Davies, R.** 2005. A modelling approach to estimate the sensitivity of pooled faecal samples for isolation of *Salmonella* in pigs. *J R Soc Interface* 2(4): 365-372.
14. **Arsenault, J., Letellier, A., Quessy, S., Boulianne, M.** Prevalence and risk factors for *Salmonella* enteritis and *Campylobacter* spp. carcass contamination in broiler chickens slaughtered in Quebec, Canada.
15. **Arumugaswamy, R.K., Rusul, G., Abdul Humid, S.N., Cheah, C.T.** 1995. Prevalence of *Salmonella* in raw and cooked foods in Malaysia. *Food Microbiol* 12: 3-8.
16. **Arvanitidou, M., Tsakris, A., Sofianou, D., Katsouyannopoulos, V.** 1999. Antimicrobial resistance and R-factor transfer of salmonellae isolated from chicken carcasses in Greek hospitals. *Int J Food Microbiol* 40(3):197-201.
17. **Aserkoff, B., Bennett, J.V.** 1969. Effect of antibiotic therapy in acute salmonellosis on the fecal excretion of *Salmonella*. *N Engl J Med* 281: 636-640.

18. **Autunes, P., Reu, C., Sousa, J.C., Peixe, L., Pestana, N.** 2003. Incidence of *Salmonella* from poultry products and their susceptibility to antimicrobial agents. *Int J Food Microbiol* 82: 97-103.
19. **Bailey, J.S., Cox, N.A., Craven, S.E., Cosby, D.E.** 2002. Serotype tracking of *Salmonella* through integrated broiler chicken operations. *J Food Prot* 65(5): 742-745.
20. **Bailey, J.S., Cox, N.A., Berrang, M.E.** 1994. Hatchery-acquired *salmonellae* in broiler chicks. *Poult Sci* 73(7): 1153-1157.
21. **Barber, M.** 1947. Staphylococcal infection due to penicillin-resistant strains. *Br Med J* 2: 863-865.
22. **Barth, S., Bauerfeind, R.** 2005. Virulence plasmids of *Salmonella enterica*-incidence and properties. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* 118(1-2): 8-23.
23. **Bass, L., Liebert, C.A., Lee, M.D., Summers, A.O., White, D.G., Thayer, S.G., Maurer, J.J.** 1999. Incidence and characterization of integrons, genetic elements mediating multiple-drug resistance, in avian *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* 43:2925-2929.
24. **Batchelor, M., Hopkins, K., Threlfall, E.J., Clifton-Hadley, F.A., Stallwood, A.D., Davies, R.H., Liebana, E.** 2005. *bla*_{CTX-M} genes in clinical *Salmonella* isolates recovered from humans in England and Wales from 1992 to 2003. *Antimicrob Agents Chemother* 49(4): 1319-1322.
25. **Beal, R.K., Wigley, P., Powers, C., Hulme, S.D., Barrow, P.A., Smith, A.L.** 2004. Age at primary infection with *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in the chicken influences persistence of infection and subsequent immunity to re-challenge. *Vet Immunol Immunopathol* 100:151-164.
26. **Beovic, B.** 2006. The issue of antimicrobial resistance in human medicine. *Int J Food Microbiol* 112: 280-287.

27. Berge, A.C., Adaska, J.M., Sisco, W.M. 2004. Use of antibiotic susceptibility patterns and pulsed-field gel electrophoresis to compare historic and contemporary isolates of multi-drug resistant *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Newport. Appl Environ Microbiol 70(1): 318-323.
28. Berrang, M.E., Buhr, R.J., Cason, J.A., Dickens, J.A. 2001. Broiler carcass contamination with *Campylobacter* from feces during defeathering. J Food Prot 64(12): 2063-2066.
29. Berrang, M.E., Smith, D.P., Windham, W.R., Feldner, P.W. 2004. Effect of intestinal content contamination on broiler carcass *Campylobacter* counts. J Food Prot 67(2): 235-238.
30. Bhatia, T.R.S., McNabb, G.D., Wyman, H., Nayar, G.P.S. 1979. *Salmonella* isolation from litter as an indicator of flock infection and carcass contamination. Avian Dis 24(4): 838-847.
31. Biedenbach, D.J., Toleman, M., Walsh, T.R., Jones, R.N. 2006. Analysis of *Salmonella* spp. with resistance to extended-spectrum cephalosporins and fluoroquinolones isolated in North America and Latin America: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997-2004). Diagn Microbiol Infect Dis 54: 13-21.
32. Bolton, L.F., Kelley, L.C., Lee, M.D., Fedorka-Cray, P.J., Maurer, J.J. 1999. Detection of multidrug-resistant *Salmonella enterica* serotype typhimurium DT104 based on a gene which confers cross-resistance to florfenicol and chloramphenicol. J Clin Microbiol 37: 1348-1351.
33. Bopp, C. A., Brenner, F.W., Wells, J.G., Strockbine, N. A. *Escherichia, Shigella, and Salmonella*. In Murray P, ed. Manual of clinical microbiology. 7th edition. Washington, DC: AM Soc Microbiol Pr. pp.459-474.

34. Breuil, J., Brisabois, A., Casin, I., Armand-Lefebvre, L., Fremy, S., Collatz, E. 2000. Antibiotic resistance in salmonellae isolated from humans and animals in France: comparative data from 1994 and 1997. *J Antimicrob Chemother* 46(6):965-71.
35. Brisabois, A., Cazin, I., Breuil, J., Collatz, E. 1997. Surveillance of antibiotic resistance in *Salmonella*. *Euro Surveill.* 2(3):19-20.
36. Brown, N.F., Vallance, B.A., Coombes, B.K., Valdez, Y., Coburn, B.A., Finlay, B.B. 2005. *Salmonella* pathogenicity island 2 is expressed prior to penetrating the intestine. *Plos Pathogens* 1(3): 252-258.
37. Bunny, K.L., Hall, R.M., Stokes, H.W. 1995. New mobile gene cassettes containing an aminoglycoside resistance gene, *aacA7*, and a chloramphenicol resistance gene, *catB3*, in an integron in pBWH301. *Antimicrob Agents Chemother* 39: 686-693.
38. Burdon, K.L., Williams, R.P. 1968. *Microbiology*. 6th edition, MacMillan, London.
39. Bush, K. 2001. New β -lactamases in gram-negative bacteria: diversity and impact on the selection of antimicrobial therapy. *Clin Infect Dis* 32: 1085-1089.
40. Bush, K., Jacoby, G.A., Medeiros, A.A. 1995. A functional classification scheme for β -lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother* 39: 1211-1233.
41. Butaye, P., Devriese, L.A., Haesebrouck, F. 2003. Antimicrobial growth promoters used in animal feed: effects of less well known antibiotics on gram-positive bacteria. *Clin Microbiol Rev* 16: 175-188.
42. Byrd, J.A., DeLoach, J.R., Corrier, D.E., Nisbet, D.J., Stanker, L.H. 1999. Evaluation of *Salmonella* serotype distributions from commercial broiler hatcheries and grower houses. *Avian Dis* 43(1): 39-47.

43. **Caprioli, A., Busani, L., Martel, J.L., Helmuth, R.** 2000. Monitoring of antibiotic resistance in bacteria of animal origin: epidemiological and microbiological methodologies. *Int J Antimicrob Agents* 14: 295-301.
44. **Carattoli, A.** 2001. Importance of integrons in the diffusion of resistance. *Vet Res* 32: 243-259.
45. **Cardinale, E., Perrier Gros-Claude, J.D., Rivoal, K., Rose, V., Tall, F., Mead, G.C., Salvat, G.** 2005. Epidemiological analysis of *Salmonella enterica* ssp. *enterica* serovars Hadar, Brancaster and Enteritidis from humans and broiler chickens in Senegal using pulsed-field gel electrophoresis and antibiotic susceptibility. *J Appl Microbiol* 99: 968-977.
46. **Carli, K.T., Eyigor, A., Caner, V.** 2001. Prevalence of *Salmonella* serovars in chickens in Turkey. *J Food Prot* 64(11): 1832-5.
47. **Carramiñana, J.J., Yanguela, J., Blanco, D., Rota, C., Agustin, A.I., Arino, A., Herrera, A.** 1997. *Salmonella* incidence and distribution of serotypes throughout processing in a Spanish poultry slaughterhouse. *J Food Prot* 60: 1312-1317.
48. **Carramiñana, J.J., Rota, C., Agustín, I., Herrera, A.** 2004. High prevalence of multiple resistance to antibiotics in *Salmonella* serovars isolated from a poultry slaughterhouse in Spain. *Vet Microbiol* 104: 133-139.
49. **Casin, I., Breuil, J., Brisabois, A., Moury, F., Grimont, F., Collatz, E.** 1999. Multidrug-resistant human and animal *Salmonella* typhimurium isolates in France belong predominantly to a DT104 clone with the chromosome- and integron-encoded beta-lactamasePSE-1. *J Infect Dis* 179(5):1173-82.
50. **Caya, F., Fairbrother, J.M., Lessard, L., Quessy, S.** 1999. Characterization of the risk to human health of pathogenic *Escherichia coli* isolates from chicken carcasses. *J Food Prot* 62(7):741-6.

51. **Centers for Diseases Control and Prevention.** 2002. Preliminary FoodNet data on the incidence of foodborne illnesses-selected sites, United States, 2001. *Morb Mortal Wkly* 51: 325-329.
52. **Chansiripornchai, N., Ramasoota, P., Bangtrakulnonth, A., Sasipreeyajan, J., Svenson, S.B.** 2000. Application of randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis for typing Avian *Salmonella enterica* subsp. *enterica*. *FEMS Immunol Med Microbiol* 29: 221-225.
53. **Chiu, C.H., Lin, T.Y., Ou, J.T.** 1999. A clinical trial comparing oral azithromycin, cefixime and no antibiotic in the treatment of acute uncomplicated *Salmonella* enteritis in children. *J Pediatr Child Health* 35: 372-374.
54. **Chu, C., Chiu, C.H.** 2006. Evolution of the virulence plasmids of non-typhoid *Salmonella* and its association with antimicrobial resistance. *Microbes Infect* 8(7): 1931-1936.
55. **Chung, Y.H., Kim, S.Y., Chang, Y.H.** 2003. Prevalence and antibiotic susceptibility of *Salmonella* isolated from foods in Korea from 1993 to 2001. *J Food Prot* 66(7): 1154-1157.
56. **CDC** 2000, posting date. CDC. FoodNet Surveillance Report for 2000: Final Report. Atlanta: Centers for Disease Control and Prevention; 2000.
57. **Chambers, J. R., Bisailon, J.R., Labbé, Y., Poppe, C., Langford, C.F.** 1998. *Salmonella* prevalence in crops of Ontario and Quebec broiler chickens at slaughter. *Poult Sci* 77:1497-1501.
58. **Chansiripornchai, N., Ramasoota, P., Bangtrakulnonth, A., Sasipreeyajan, J., Svenson, S.B.** 2000. Application of randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis for typing avian *Salmonella enterica* subsp. *Enterica*. *FEMS Immunol Med Microbiol* 29(3): 221-5.

59. **Chiu, C.H., Wu, T.L., Su, L.H., Chu, C., Chia, J.H., Kuo, A.J., Chien, M.S., Lin, T.Y.** 2002. The emergence in Taiwan of fluoroquinolone resistance in *Salmonella enterica* serotype Choleraesuis. *N Engl J Med* 346: 413-419.
60. **Christie, P.J., Davidson, J.N., Novick, R.P., Dunny, G.M.** 1983. Effect of tylosin feeding on the antibiotic resistance of selected gram-positive bacteria in pigs. *Am J Vet Res* 44: 126-128.
61. **Clarke, R.C., Gyles, C.L.** 1993. *Salmonella*. In Pathogenesis of bacterial infections in animals, 2nd edition. Gyles, C.L., and Thoen, C.O. eds Iowa State University Press. pp.133-153.
62. **Clark, L.** 2000. Antibiotic resistance: a growing and multifaceted problem. *Br J Nurs* 9(4): 225-230.
63. **Cormican, M., DeLappe, N., O'Hare, C., Doran, G., Morris, D., Corbett-Feeney, G., Fanning, S., Daly, M., Fitzgerald, M., Moore, J.** 2002. *Salmonella enterica* serotype Bredeney: antimicrobial susceptibility and molecular diversity of isolates from Ireland and Northern Ireland. *Appl Environ Microbiol* 68(1): 181-186.
64. **Côté, S., Letellier, A., Lessard, L., Quessy, S.** 2004. Distribution of *Salmonella* in tissues following natural and experimental infection in pigs. *Can J Vet Res* 68: 241-248.
65. **Cox, N.A., Berrang, M.E., Cason, J.A.** 2000. *Salmonella* penetration of egg shells and proliferation in broiler hatching eggs – a review. *Poult Sci* 79: 1571-1574.
66. **Cox, N.A., Bailey, J.S., Mauldin, J.M., Blankenship, L.C.** 1990. Presence and impact of *Salmonella* contamination in commercial broiler hatcheries. *Poult Sci* 69(9): 1606-1609.
67. **Cruchaga, S., Echeita, A., Aladuena, A., Garcia-Pena, J., Frias, N., Usera, M.A.** 2001. Antimicrobial resistance in salmonellae from humans, food and animals in Spain in 1998. *J Antimicrob Chemother* 47: 315-321.

68. **Dan, M., Richardson, J., Miliotis, M.D., Koornhof, H.J.** 1989. Comparison of preservative media and freezing conditions for storage of specimens of faeces. *J Med Microbiol* 28(2): 151-154.
69. **Datta, N., Hughes, V.M.** 1983. Plasmids of the same Inc groups in Enterobacteria before and after the medical use of antibiotics. *Nature* 306: 616-617.
70. **Davies, J.E.** 1997. Origins, acquisition and dissemination of antibiotic resistance determinants. *Ciba Found Symp* 207: 15-27.
71. **Davies, A., O'Neill, P., Towers, L., Cooke, M.** 1996. An outbreak of *Salmonella* Typhimurium DT 104 food poisoning associated with eating beef. *Commun Dis Rep* 6: R159-R162.
72. **Davies, R.H., Wray, C.** 1997. Distribution of *Salmonella* contamination in ten animal feedmills. *Vet Microbiol* 57(2-3): 159-169.
73. **Davies, R.H., Wray, C.** 1996. Persistence of *Salmonella* enteritidis in poultry units and poultry food. *Br Poult Sci* 37(3): 589-596.
74. **De Kruif, P.** 1926. *Microbe Hunters*. Blue Ribbon Books, New York.
75. **Dowd, S.E., Killinger-Mann, K., Blanton, J., San Francisco, M., Brashears, M.** 2007. Positive adaptive state: microarray evaluation of gene expression in *Salmonella enterica* Typhimurium exposed to nalidixic acid. *Foodborne Pathog Dis* 4(2): 187-200.
76. **Emborg, H.D., Ersboll, A.K., Heuer, O.E., Wegener, H.C.** 2001. The effect of discontinuing the use of antimicrobial growth promoters on the productivity in the Danish broiler production. *Prev Vet Med* 50:53-70.
77. **Eriksson, J., Löfström, C., Aspan, A., Gunnarsson, A., Karlsson, I., Borch, E., de Jong, B., Radström, P.** 2005. Comparison of genotyping methods by application to *Salmonella* livingstone strains associated with an outbreak of human salmonellosis. *International J Food Microbiol* 104: 93-103.

78. **Esaki, H., Morioka, A., Ishihara, K., Kojima, A., Shiroki, S., Tamura, Y., Takahashi, T.** 2004. Antimicrobial susceptibility of *Salmonella* isolated from cattle, swine and poultry (2001-2002): report from Japanese Veterinary Antimicrobial Resistance Program. *J Antimicrob Chemother* 53:266-270.
79. **Fakhr, M.K., Nolan, L.K., Logue, C.M.** 2005. Multilocus sequence typing lacks the discriminatory ability of pulsed-field gel electrophoresis for typing *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *J Clin Microbiol* 43(5): 2215-2219.
80. **Farmer, J.J.** 1999. Enterobacteriaceae: Introduction and Identification. In Murray P, ed. *Manual of clinical microbiology*. 7th edition. Washington, DC: AM Soc Microbiol Pr. Pp.442-458.
81. **Farrington, L.A., Harvey, R.B., Buckley, S.A., Droleskey, R.E., Nisbet, D.J., Inskip, P.D.** 2001. Prevalence of antimicrobial resistance in Salmonellae isolated from market-age swine. *J Food Prot* 64: 1496-1502.
82. **Ferris, K.E., Aalsburg, A.M., Iseminger, G.R.** 2002. *Salmonella* serotypes from animals and related sources during July 2001-June 2002. *Proc U.S. Anim Health Assoc* 106: 467-497.
83. **Findland, M.** 1979. Emergence of antibiotic resistance in hospitals 1935-1975. *Rev Infect Dis* 1: 4-22.
84. **Foley, S.L., White, D.G., McDermott, P.F., Walker, R.D., Rhodes, B., Fedorka-Cray, P.J., Simjee, S., Zhao, S.** 2006. Comparison of subtyping methods for differentiating *Salmonella enterica* serovar Typhimurium isolates obtained from food animal sources. *J Clin Microbiol* 44(10): 3569-3577.
85. **Fukushima, H., Hoshina, K., Nakamura, R., Ito, Y.** 1987. Raw beef, pork and chicken in Japan contaminated with *Salmonella* sp., *Campylobacter* sp., *Yersinia enterocolitica*, and *Clostridium perfringens*-A comparative study. *Zbl Bakt Hyg B* 184: 60-70.

86. **Gast, R.K.** Bacterial diseases *Salmonella* infections: Paratyphoid infections. In Diseases of Poultry. 11th edition. Iowa State Press. Pr. Pp. 583-610.
87. **Gibreel, A., Skold, O.** 1999. Sulfonamide resistance in clinical isolates of *Campylobacter jejuni*: mutational changes in the chromosomal dihydropteroate synthase. Antimicrob Agents Chemother 43(9): 2156-2160.
88. **Gibson, J.R., Slater, E., Xerry, J., Tompkins, D.S., Owen, R.J.** 1998. Use of an amplified-fragment length polymorphism technique to fingerprint and differentiate isolates of *Helicobacter pylori*. J Clin Microbiol 36: 2580-2585.
89. **Glynn, M.K., Bopp, C., Dewitt, W., Dabney, P., Mokhtar, M., Angulo, F.J.** 1998. Emergence of multidrug-resistant *Salmonella enterica* serotype Typhimurium DT104 infections in the United States. N Engl J Med 338(19): 1333-1338.
90. **Gouws, P.A., Brözel, V.S.** 2000. Antimicrobial resistance of *Salmonella* isolates associated with retail chickens and a poultry abattoir. South African J Sci 96: 254-256.
91. **Gradel, K.O., Randall, L., Sayers, A.R., Davies, R.H.** 2005. Possible associations between *Salmonella* persistence in poultry houses and resistance to commonly used disinfectants and a putative role of *mar*. Vet Microbiol 107: 127-138.
92. **Granato, P.A.** 2003. Pathogenic and indigenous microorganisms of humans. In Murray P, ed. Manual of clinical microbiology. 8th edition. Washington, DC: AM Soc Microbiol Pr. Pp. 44-54.
93. **Grohmann, E., Muth, G., Espinosa, M.** 2003. Conjugative plasmid transfer in Gram-positive bacteria. Microbiol Mol Biol Rev 67(2): 277-301.
94. **Groisman, E.A., Ochman, H.** 1996. Pathogenicity islands: bacterial evolution in quantum leaps. Cell 87:791-794.

95. **Guerra, B., Soto, S., Cal, S., Mendoza, M.C.** 2000. Antimicrobial resistance and spread of class 1 integrons among *Salmonella* serotypes. *Antimicrob Agents Chemother* 44:2166-2169.
96. **Gulig, P.A.** 1990. Virulence plasmids of *Salmonella* Typhimurium and other salmonellae. *Microb Pathog* 8:3-11.
97. **Hacker, J., Blum-Oehler, G., Mühldorfer, I., Tschäpe, H.** 1997. Pathogenicity islands of virulent bacteria: structure, function and impact on microbial evolution. *Mol Microbiol* 23:1089-1097.
98. **Hall, R.M.** 1997. Mobile gene cassettes and integrons: moving antibiotic resistance genes in gram-negative bacteria. *Ciba Found Symp* 207: 192-202.
99. **Hall, R.M., Collis, C.M.** 1995. Mobile gene cassettes and integrons: capture and spread of genes by site-specific recombination. *Mol Microbiol* 15: 593-600.
100. **Hall, R.M., Stokes, H.W.** 1993. Integrons: novel DNA elements which capture genes by site-specific recombination. *Genetica* 90: 115-132.
101. **Harakeh, S., Yassine, H., Gharios, M., Barbour, E., Hajjar, S., El-Fadel, M., Toufeili, I., Tannous, R.** 2005. Isolation, molecular characterization and antimicrobial resistance patterns of *Salmonella* and *Escherichia coli* isolates from meat-based fast food in Lebanon. *Sci Total Environ* 1; 341(1-3): 33-44.
102. **Harbottle, H., White, D.G., McDermott, P.F., Walker, R.D., Zhao, S.** 2006. Comparison of multilocus sequence typing, pulsed-field gel electrophoresis, and antimicrobial susceptibility typing for characterization of *Salmonella enterica* serotype Newport isolates. *J Clin Microbiol* 44(7): 2449-2457.
103. **Hasman, H., Mevius, D., Veldman, K., Olesen, I., Aarestrup, F.M.** 2005. β -Lactamase among extended-spectrum β -lactamase (ESBL)-resistant *Salmonella* from poultry, poultry products and human patients in the Netherlands. *J Antimicrob Chemother* 56: 115-121.

104. **Hatha, A.A., Lakshmanaperumalsamy, P.** 1995. Antibiotic resistance of *Salmonella* strains isolated from fish and crustaceans. *Lett Appl Microbiol* 21(1):47-9.
105. **Hernandez, T., Rodriguez-Alvarez, C., Arevalo, M.P., Torres, A., Sierra, A., Arias, A.** 2002. Antimicrobial-resistant *Salmonella enterica* serovars isolated from chickens in Spain. *J Chemother* 14:346-350.
106. **Heyndrickx, M., Vandekerchove, D., Herman, L., Rollier, I., Grijspeerd, K., De Zutter, L.** 2002. Routes for *Salmonella* contamination of poultry meat: epidemiological study from hatchery to slaughterhouse. *Epidemiol Infect* 129(2): 253-265.
107. **Hinton, M., Kaukas, A., Lim, S.K., Linton, A.H.** 1986. Preliminary observations on the influence of antibiotics on the ecology of *Escherichia coli* and the enterococci in the faecal flora of healthy young chickens. *J Antimicrob Chemother* 18:165-173.
108. **Hofacre, C.L., White, D.G., Maurer, J.J., Morales, C., Lobsinger, C., Hudson, C.** 2001. Characterization of antibiotic-resistant bacteria in rendered animal products. *Avian Dis* 45: 953-961.
109. **Hu, H., Lan, R., Reeves, P.R.** 2002. Fluorescent amplified fragment length polymorphism analysis of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium reveals phage-type-specific markers and potential for microarray typing. *Am Soc Microbiol* 40(9): 3406-3415.
110. **Huang, L., Crothers, K., Atzori, C., Benfield, T., Miller, R., Rabodonirina, M., Helweg-Larsen, J.** 2004. Dihydropteroate synthase gene mutations in *Pneumocystis* and sulfa resistance. *Emerg Infect Dis* 10(10): 1721-1728.
111. **Hughes V.M. and Datta N.** 1983. Conjugative plasmids in bacteria of the "pre-antibiotic" era. *Nature* 302: 725-726.

112. **Humphries, A.D., Townsed, S.M., Kingsley, A., Nicholson, T.L., Tsois, R.M., Baumler, A.J.** 2001. Role of fimbriae as antigens and intestinal colonization factors of *Salmonella* serovars. *FEMS Microbiol Lett* 201: 121-125.
113. **Ikeda, J.S., Schmitt, C.K., Darnell, S.C., Watson, P.R., Bispham, J., Wallis, T.S., Weinstein, D.L., Metcalf, E.S., Adams, P., O'Connor, C.D., O'Brien, A.D.** 2001. Flagellar phase variation of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium contributes to virulence in the murine typhoid infection model but does not influence Salmonella-induced enteropathogenesis. *Infect Immun* 69:3021-3030.
114. **Irwin, J.R., Cornelius, P., Messier, S., Finley, G.G., Oggel, J.** 1994. A national survey to estimate the prevalence of *Salmonella* species among Canadian registered commercial turkey flocks. *Can J Vet Res* 58:263-267.
115. **Isaacson, R.E., Argylian, C., Kwan, L., Patterson, S., Yoshinaga, K.** 1999. Phase variable switching of in vivo and environmental phenotypes of *Salmonella* typhimurium. *Adv Exp Med Biol* 473: 281-289.
116. **Janssen, P., Coopman, R., Huys, G., Swings, J., Bleeker, M., Vos, P., Zabeau, M., Kersters, K.** 1996. Evaluation of the DNA fingerprinting method AFLP as a new tool in bacterial taxonomy. *Microbiol* 142: 1881-1893.
117. **Jerngklinchan, J., Koowatananukul, C., Daengprom, K., Saitanu, K.** 1994. Occurrence of *Salmonella* in raw broilers and their products in Thailand. *J Food Prot* 57: 808-810.
118. **Johansen, K.S., Storgaard, M., Carstensen, N., Frank, U., Daschner, F.** 1988. An international study on the occurrence of multiresistant bacteria and aminoglycoside consumption patterns. *Infection* 16: 313-322.
119. **Johnson, J.M., Rajic, A., McMullen, L.M.** 2005. Antimicrobial resistance of selected *Salmonella* isolates from food animals and food in Alberta. *Can Vet J* 46(2): 141-146.

120. Jones, F.T., Richardson, K.E. 2004. *Salmonella* in commercially manufactured feeds. *Poult Sci* 83: 384-391.
121. Jones, F.T., Axtell, R.C., Rives, D.V., Scheideler, S.E., Tarver, F.R., Walker, R.L., Wineland, M.J. 1991. A survey of *Salmonella* contamination in modern broiler production. *J Food Prot* 54: 502-507.
122. Jorgensen, J.H., Turnidge, J.D. 2003. Susceptibility test methods: dilution and disk diffusion methods. In Murray P, ed. *Manual of clinical microbiology*. 8th edition. Washington, DC: AM Soc Microbiol Pr. Pp. 1108-1127.
123. Kai, M., Matsuoka, M., Nakata, N., Maeda, S., Gidoh, M., Maeda, Y., Hashimoto, K., Kobayashi, K., Kashiwabara, Y. 1999. Diaminodiphenylsulfone resistance of *Mycobacterium leprae* due to mutations in the dihydropteroate synthase gene. 1999. *FEMS Microbiol Lett* 177(2): 231-235.
124. Kazama, H., Hamashima, H., Sasatsu, M., Arai, T. 1998. Distribution of the antiseptic-resistance gene *qacEΔ1* in Gram-positive bacteria. *FEMS Microbiol Lett* 165:295-299.
125. Khan, A.A., Nawaz, M.S., Khan, S.A., Cerniglia, C.E. 2000. Detection of multidrug-resistant *Salmonella* Typhimurium DT104 by multiplex polymerase chain reaction. *FEMS Microbiol Lett* 182: 355-360.
126. Kresken, M., Hafner, D., Mittermayer, H. Et al. 1994. The study group Bacterial resistance of the Paul-Ehrlich-Society for chemotherapy: prevalence of fluoroquinolone resistance in Europe. *Infection* 22: 90-98.
127. Kücken, D., Feucht, H.H., Kaulfers, P.M. 2000. Association of *qacE* and *qacEΔ1* with multiple resistance to antibiotics and antiseptics in clinical isolates of Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol Lett* 183:95-98.

128. Kudaka, J., Itokazu, K., Taira, K., Iwai, A., Kondo, M., Susa, T., Iwanaga, M. 2006. Characterization of *Salmonella* isolated in Okinawa, Japan. *Jpn J Infect Dis* 59: 15-19.
129. Lammerding, A.M., Garcia, M.M., Mann, E.D., Robinson, Y., Dorward, W.J., Truscott, R.B., Tittiger, F. 1988. Prevalence of *Salmonella* and thermophilic *Campylobacter* in fresh pork, beef, veal, and poultry in Canada. *J Food Prot* 51: 47-52.
130. Larkin, C., Poppe, C., McNab, B., McEwen, B., Mahdi, A., Odumeru, J. 2004. Antibiotic resistance of *Salmonella* isolated from hog, beef, and chicken carcass samples from provincially inspected abattoirs in Ontario. *J Food Prot* 67:448-455.
131. Lee, L.A., Threatt, V.L., Puhr, N.D., Levine, P., Ferris, K., Tauxe, R.V. 1993. Antimicrobial-resistant *Salmonella* spp isolated from healthy broiler chickens after slaughter. *J Am Vet Med Assoc* 202(5): 752-755.
132. Lee, C.-Y., Chiu, C.-H., Chuang, Y.-Y., Su, L.-H., Wu, T.-L., Chang, L.-Y., Huang, Y.-C., Lin, T.-Y. 2002. Multidrug-resistant non-typhoid *Salmonella* infections in a medical center. *J Microbio Immunol Infect* 35: 78-84.
133. Lee, Y.J., Kim, K.S., Kwon, Y.K., Tak, R.B. 2003. Biochemical characteristics and antimicrobials susceptibility of *Salmonella* Gallinarum isolated in Korea. *J Vet Sci* 4:161-166.
134. LeMinor, L. 1984. Facultative anaerobic gram-negative rods, In *Bergey's Manual of Systemic Bacteriology*. Krieg, N.R., Holt, J.G. eds., Williams & Wilkins, Baltimore. pp.427-458.
135. Letellier, A., Messier, S., Paré, J., Ménard, J., Quessy, S. 1999. Distribution of *Salmonella* in swine herds in Québec. *Vet Microbiol* 67: 299-306.
136. Levin, B.R., Perrot, V., Walker, N. 2000. Compensatory mutations, antibiotic resistance and the population genetics of adaptive evolution in bacteria. *Genetics* 154: 985-997.

137. **Levy, S.B.** 2002. Active efflux, a common mechanism for biocide and antibiotic resistance. *J Appl Microbiol* 92: 65S-71S.
138. **Levy, S.B.** 1997. Antibiotic resistance: an ecological imbalance. *Ciba Found Symp* 207: 1-9.
139. **Li, X.-Z., Mehrotra, M., Ghimire, S., Adewoye, L.** 2007. β -lactam resistance and β -lactamases in bacteria of animal origin. *Vet Microbiol* 121: 197-214.
140. **Libby, S.J., Halsey, T.A., Altier, C., Potter, J., Gyles, C.L.** 2004. *Salmonella*. In *Pathogenesis of bacterial infections in animals*, 3rd edition. Gyles, C.L., Prescott, J.F., Songer, J.G., Thoen, C.O. eds Iowa State University Press. pp.143-167.
141. **Liebana, E., Crowley, C.J., Garcia-Migura, L., Breslin, M.F., Corry, J.E.L., Allen, V.M., Davies, R.H.** 2002. Use of molecular fingerprinting to assist the understanding of the epidemiology of *Salmonella* contamination within broiler production. *British Poult Sci* 43: 38-46.
142. **Liebana, E., Guuns, D., Garcia-Migura, L., Woodward, M.J., Clifton-Hadley, F.A., Davies, R.H.** 2001. Molecular typing of *Salmonella* serotypes prevalent in animals in England : assessment of methodology. *J Clin Microbiol* 39, 3609-3616.
143. **Liebisch, B., Schwarz, S.** 1996. Molecular typing of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar enteritidis isolates. *J Med Microbiol* 44(1): 52-59.
144. **Limawongpranee, S., Hayashidani, H., Okatani, A.T., Ono, K., Hirota, C., Kaneko, K., Ogawa, M.** 1999. Prevalence and persistence of *Salmonella* in broiler chicken flocks. *J Vet Med Sci* 61(3): 255-259.
145. **Lindstedt, B.A., Heir, E., Vardund, T., Kapperud, G.** 2000. Fluorescent amplified-fragment length polymorphism genotyping of *Salmonella enterica subsp. enterica* serovars and comparison with pulsed-field gel electrophoresis typing. *J Clin Microbiol* 38: 1623-1627.

146. Linton, A.H., Howe, K., Bennett, P.M., Richmond, M.H., Whiteside, E. 1977. The colonization of the human by antibiotic resistant *Escherichia coli* from chickens. J Appl Bacteriol 43:465-469.
147. Liu, G.R., Rahn, A., Liu, W.Q., Sanderson, R., Johnston, N., Liu, S.L. 2002. The evolving genome of *Salmonella enterica* serovar Pullorum. J Bacteriol 184:2626-2633.
148. Livermore, D.M. 1995. β -lactamases in laboratory and clinical resistance. Clin Microbiol Rev 8: 557-584.
149. Llanes, C., Kirchgesner, V., Plesiat, P. 1999. Propagation of TEM- and PSE-type beta-lactamases among amoxicillin-resistant *Salmonella* spp. isolated in France. Antimicrob Agents Chemother 43: 2430-2436.
150. Logue, C.M., Sherwood, J.S., Olah, P.A., Elijah, L.M., Dockter, M.R. 2003. The incidence of antimicrobial-resistant *Salmonella* spp. on freshly processed poultry from US Midwestern processing plants. J Appl Microbiol 94:16-24.
151. Maddocks, S., Olma, T., Chen, S. 2002. Comparison of CHROMagar *Salmonella* medium and xylose-lysine-desoxycholate and *Salmonella-Shigella* agars for isolation of *Salmonella* strains from stools samples. J Clin Microbiol 40(8): 2999-3003.
152. Madsen, L., Aarestrup, F.M., Olsen, J.E. 2000. Characterisation of streptomycin resistance determinants in Danish isolates of *Salmonella typhimurium*. Vet Microbiol 75: 73-82.
153. Maisnier-Patin, S., Berg, O.G., Liljas, L., Andersson, D.I. 2002. Compensatory adaptation to the deleterious effect of antibiotic resistance in *Salmonella typhimurium*. Mol Microbiol 46(2): 355-366.

154. Majtanova, L., Szaboova, M., Majtan, V. 2004. Molecular epidemiology of *Salmonella enterica* serovar enteritidis strains by pulsed-field gel electrophoresis isolated in the Slovak Republic. *Pol J Microbiol* 53(4): 287-290.
155. Mammina, C., Cannova, L., Massa, S., Goffredo, E., Nastasi, A. 2002. Drug resistances in salmonella isolates from animal foods, Italy 1998-2000. *Epidemiol Infect* 129:155-161.
156. Manie, T., Khan, S., Brözel, V.S., Veith, W.J., Gouws, P.A. 1998. Antimicrobial resistance of bacteria isolated from slaughtered and retail chickens in South Africa. *Lett Appl Microbiol* 26: 253-258.
157. Markogiannakis, A., Tassios, P.T., Lambiri, M., Ward, L.R., Kremastinou, J.K., Legakis, N.J., Vatopoulos, A.C. 2000. Multiple clones within multidrug-resistant *Salmonella enterica* serotype typhimurium phage type DT104. *J Clin Microbiol* 38(3): 1269-1271.
158. Mead, P. S., Slutsker, L., Dietz, V., McCaig, L.F., Bresee, J.S., Shapiro, C., Griffin, P.M., Tauxe, R.V. 1999. Food-related illness and deaths in the United States. *Emerg Infect Dis* 5: 607-625.
159. McCrea, B.A., Tonooka, K.H., VanWorth, C., Boggs, C.L., Atwill, E.R., Schrader, J.S. 2006. Prevalence of *Campylobacter* and *Salmonella* species on farm, after transport, and at processing in specialty market poultry. *Poult Sci* 85:136-143.
160. McDermott, P.F., Zhao, S., Wagner, D.D., Simjee, S., Walker, R.D., White, D.G. 2002. The food safety perspective of antibiotic resistance. *Anim Biotechnol* 13:1:71-84.
161. McEwen, S.A., Fedorka-Cray, P.J. 2002. Antimicrobial use and resistance in animals. *Clin Infect Dis* 34:S93-106.

162. **McGarr, C., Mitchell, W.R., Carlson, H.C., Fish, N.A.** 1977. Antimicrobial susceptibility of *Salmonella* isolates from the broiler chicken industry in Ontario. *Can J Comp Med* 41: 107-112.
163. **McGowen, J.E.** 1983. Antimicrobial resistance in hospital organisms and its relation to antibiotic use. *Rev Infect Dis* 5: 1033-1048.
164. **Mejia, W., Casal, J., Zapata, D., Sanchez, G.J., Martin, M., Mateu, E.** 2006. Epidemiology of *Salmonella* infections in pig units and antimicrobial susceptibility profiles of the strains of *Salmonella* species isolated. *Vet Rec* 159(9): 271-276.
165. **Michaud, S., Arbeit, R.D., Gaudreau, C.** 2001. Molecular strain typing of *Campylobacter jejuni* by pulsed-field gel electrophoresis in a single day. *Can J Microbiol* 47: 667-669.
166. **Miko, A., Pries, K., Schroeter, A., Helmuth, R.** 2005. Molecular mechanisms of resistance in multidrug-resistant serovars of *Salmonella enterica* isolated from foods in Germany. *J Antimicrob Chemother* 56:1025-1033.
167. **Miller, G.H., Sabatelli, F.J., Hare, R.S. et al.** 1997. The most frequent aminoglycoside resistance mechanisms-changes with time and geographic area: a reflection of aminoglycoside usage patterns? *Clin Infect Dis* 24: 46-62.
168. **Moellering, R.C.** 1992. Emergence of *Enterococcus* as a significant pathogen. *Clin Infect Dis* 15: 1173-1178.
169. **Mokrousov, I., Jiao, W.W., Sun, G.Z., Liu, J.W., Li, M., Narvskaya, O., Shen, A.D.** 2006. Evaluation of the *ipoB* macroarray assay to detect rifampin resistance in *Mycobacterium tuberculosis* in Beijing, China. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 25(11): 703-710.
170. **Mullany, P.** 2002. Introduction to the multi-author review on conjugative transposons. *Cell Mol Life Sci* 59: 2015-2016.

171. Murakami, K., Horikawa, K., Ito, T., Otsuki, K. 2001. Environmental survey of *Salmonella* and comparison of genotypic character with human isolates in Western Japan. *Epidemiol Infect* 126(2): 159-171.
172. Murase, T., Okitsu, T., Suzuki, R., Morozumi, H., Matsushima, A., Nakamura, A., Yamai, S. 1995. Evaluation of DNA fingerprinting by PFGE as an epidemiologic tool for *Salmonella* infections. *Microbiol Immunol* 39: 673-676.
173. Murray, I.A., Shaw, W.V. 1997. O-Acetyltransferases for chloramphenicol and other natural products. *Antimicrob Agents Chemother* 41: 1-6.
174. Murray, P.R., Baron, E.J., and American Society for Microbiology. 2003. *Manual of clinical microbiology*, 8th ed. ASM Press, Washington, D.C.
175. Nair, S., Schreiber, E., Thong, K. L., Pang, T., Altwegg, M. 2000. Genotypic characterization of *Salmonella* typhi by amplified fragment length polymorphism fingerprinting provides increased discrimination as compared to pulsed-field gel electrophoresis and ribotyping. *J Microbiol Methods* 41: 35-43.
176. Nastasi, A., Mammina, C. 2001. Presence of class 1 integrons in multi-drug resistant, low-prevalence *Salmonella* serotypes, Italy. *Emerg Infect Dis* 7:455-458.
177. National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2003. *Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically-approved standards*, manual #M7-A6, 6th ed. NCCLS, Wayne, Pa.
178. Nayak, R., Call, V., Kaldhone, P., Tyler, C., Anderson, G., Phillips, S., Kerdahi, K., Foley, S.L. 2007. Comparison of *Salmonella enterica* serovar Heidelberg susceptibility testing results. *Clin Med Res* 5(2): 98-105.
179. Nayak, R., Stewart, T., Wang, R.-F., Lin, J., Cerniglia, C.E., Kenney, P.B. 2004. Genetic diversity and virulence gene determinants of antibiotic-resistant *Salmonella* isolated from preharvest turkey production sources. *Int J Food Microbiol* 91: 51-62.

180. **Nayak, R., Kenney, P.B.** 2003. Screening of *Salmonella* isolates from a turkey production facility for antibiotic resistance. *Br Poult Sci* 44: 192-202.
181. **Newell, D.G., Shreeve, J.E., Toszeghy, M., Domingue, G., Bull, S., Humphrey, T., Mead, G.** 2001. Changes in the carriage of *Campylobacter* strains by poultry carcasses during processing in abattoirs. *Appl Environ Microbiol* 67: 2636-2640.
182. **NG, L.-K., Mulvey, M.R., Martin, I., Peters, G.A., Johnson, W.** 1999. Genetic characterization of antimicrobial resistance in Canadian isolates of *Salmonella* serovar typhimurium DT104. *Antimicrob Agents Chemother* 43(12): 3018-3021.
183. **North, E.A., Christie, R.** 1946. Acquired resistance of staphylococci to the action of penicillin. *Med J Aust* 1: 176-179.
184. **Nye, K.J., Fallon, D., Frodsham, D., Gee, B., Graham, C., Howe, S., Messer, S., Turner, T., Warren, R.E.** 2002. An evaluation of the performance of XLD, DCA, MLCB, and ABC agars as direct plating media for the isolation of *Salmonella enterica* from faeces. *J Clin Pathol* 55(4): 286-288.
185. **O'Brien, Thomas F.** 1997. The global epidemic nature of antimicrobial resistance and the need to monitor and manage it locally. *Clin Infect Dis* 24: S2-8.
186. **O'Brien, J.P.D.** 1990. Aspects of *Salmonella* enteritidis control in poultry. *World's Poult Sci J* 46: 119-124.
187. **O'Brien, T.F.** Members Task Force 2. Resistance of bacteria to antibacterial agents: report of task Force 2. *Rev Infect Dis* 9(3): S244-260.
188. **O'Brien, T.F., Hopkins, J.D., Gilleece, E.S.** 1982. Molecular epidemiology of antibiotic resistance in *Salmonella* from animals and human beings in the United States. *N Engl J Med* 307: 1-6.

189. O'Brien, T.F., Ross, D.G., Guzman, M.A., Medeiros, A.A., Hedges, R.W., Botstein, D. 1980. Dissemination of an antibiotic resistance plasmid in hospital patient flora. *Antimicrob Agents Chemother* 17: 537-543.
190. Ochoa, F., Rodriguez, V. 2005. Molecular mechanisms for pathogenicity of *Salmonella* spp. *Rev Latinoam Microbiol* 47(1-2): 25-42.
191. Ohl, M., E., Miller, S., I. 2001. *Salmonella*: a model for bacterial pathogenesis. *Annu Rev Med* 52:259-274.
192. Olive, D.M., Bean, P. 1999. Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms. *J Clin Microbiol* 37(6): 1661-1669.
193. Olsen, J.E., Skov, M.N., Threlfall, E.J., Brown, D.J. 1994. Clonal lines of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis documented by IS200-, ribo-, pulsed-field gel electrophoresis and RFLP typing. *J Med Microbiol* 40, 15-22.
194. Over, U., Gur, D., Unal, S., Miller, G.H., Aminoglycoside resistance study group. 2001. The changing nature of aminoglycoside resistance mechanisms and prevalence of newly recognized resistance mechanisms in Turkey. *Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis* 7: 470-478.
195. Padungtod, P., Kaneene, J.B. 2006. *Salmonella* in food animals and humans in northern Thailand. *Int J Food Microbiol* 108(3): 346-354.
196. Paesold, G., Guiney, D.G., Eckmann, L., Kagnoff, M.F. 2002. Genes in the *Salmonella* pathogenicity island 2 and the *Salmonella* virulence plasmid are essential for *Salmonella*-induced apoptosis in intestinal epithelial cells. *Cell Microbiol* 4(11): 771-781.
197. Pang, T., Bhutta, Z.A., Finlay, B.B., Altwegg, M. 1995. Typhoid fever and other salmonellosis: a continuing challenge. *Trends Microbiol* 3(7):253-255.
198. Parry, C.M. 2003. Antimicrobial drug resistance in *Salmonella enterica*. *Curr Opin Infect Dis* 16:467-472.

199. **Parsonnet, K.C., Kass, E.H.** 1987. Does prolonged exposure to antibiotic-resistant bacteria increase the rate of antibiotic-resistant infection? *Antimicrob Agents Chemother* 31(6): 911-914.
200. **Paulsen, I.T., Littlejohn, T.G., Radstrom, P., Sundstrom, L., Skold, O., Swedberg, G., Skurray, R.A.** 1993. The 3' conserved segment of integrons contains a gene associated with multidrug resistance to antiseptics and disinfectants. *Antimicrob Agents Chemother* 37(4):761-768.
201. **PICRA.** 2003. Programme intégré canadien de surveillance de la résistance aux antimicrobiens (PICRA)-Rapport Annuel. Santé Canada 2nd Edition, 113 pages.
202. **Piddock, L.J.V.** 2002. Fluoroquinolone resistance in *Salmonella* serovars isolated from humans and food animals. *FEMS Microbiol Rev* 26(1): 3-16.
203. **Poppe, C., Irwin, R.J., Messier, S., Finley, G.G., Oggel, J.** 1991. The prevalence of *Salmonella enteritidis* and other *Salmonella* sp. among Canadian registered commercial chicken broiler flocks. *Epidemiol Infect* 107(1): 201-11.
204. **Poppe, C.** 1994. *Salmonella enteritidis* in Canada. *Int J Food Microbiol* 21: 1-5.
205. **Poppe, C., McFadden, K.A., Demczuk, W.H.B.** 1996. Drug resistance, plasmids, biotypes and susceptibility to bacteriophages of *Salmonella* isolated from poultry in Canada. *Int J Food Microbiol* 30:325-344.
206. **Poppe, C., Ayroud, M., Ollis, G., Chirino-Trejo, M., Smart, N., Quessy, S., Michel, P.** 2001. Trends in antimicrobial resistance of *Salmonella* isolated from animals, foods of animal origin, and the environment of animal production in Canada, 1994-1997. *Microb Drug Resist* 7(2): 197-212.
207. **Poppe, C., Ziebell, K., Martin, L., Allen, K.** 2002. Diversity in antimicrobial resistance and other characteristics among *Salmonella typhimurium* DT104 isolates. *Microb Drug Resist* 8(2): 107-122.

208. **Poppe, C., Martin, L.C., Gyles, C.L., Reid-Smith, R., Boerlin, P., McEwen, S.A., Prescott, J.F., Forward, K.R.** 2005. Acquisition of resistance to extended-spectrum cephalosporins by *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Newport and *Escherichia coli* in the turkey poult intestinal tract. *Appl Environ Microbiol* 71: 1184-1192.
209. **Poppe, C., Martin, L., Muckle, A., Archambault, M., McEwen, S., Weir, E.** 2006. Characterization of antimicrobial resistance of *Salmonella* Newport isolated from animals, the environment, and animal food products in Canada. *Can J Vet Res* 70(2): 105-114.
210. **Poppe, C., Smart, N., Khakhria, R., Johnson, W., Spika, J., Prescott, J.** 1998. *Salmonella* Typhimurium DT 104: a virulent and drug-resistant pathogen. *Can Vet J* 39: 559-565.
211. **Prescott, L.M., Harley, J.P., Klein, D.A.** 1995. *Microbiologie*. 2nd edition. De Boeck-Wesmael S.A., Bruxelles. pp. 1014.
212. **Rabsch, W., Andrews, H.L., Kingsley, R.A., Prager, R., Tschape, H., Adams, L.G., Baumler, A.J.** 2002. *Salmonella enterica* serotype typhimurium and its host-adapted variants. *Infect Immun* 70:2249-2255.
213. **Randall, L.P., Woodward, M.J.** 2002. The multiple antibiotic resistance (*mar*) locus and its significance. *Res Vet Sci* 72: 87-93.
214. **Randall, L.P., Cooles, S.W., Piddock, L.J.V., Woodward, M.J.** 2004. Effect of triclosan or a phenolic farm disinfectant on the selection of antibiotic-resistant *Salmonella enterica*. *J Antimicrob Chemother* 54: 621-627.
215. **Reche, M.P., Echeita, M.A., los Rios, J.E., Usera, M.A., Jimenez, P.A., Rojas, A.M., Colas, J., Rodriguez, I.** 2003. Comparison of phenotypic and genotypic markers for characterization of an outbreak of *Salmonella* serotype Havana in captive raptors. *J Appl Microbiol* 94: 65-72.

216. Riaño, I., Moreno, M.A., Teshager, T., Sáenz, Y., Domínguez, L., Torres, C. 2006. Detection and characterization of extended-spectrum β -lactamases in *Salmonella enterica* strains of healthy food animals in Spain. *J Antimicrob Chemother* 58: 844-847.
217. Rice, L.B., Sahn, D., Bonomo, R.A. 2003. Mechanisms of resistance to antimicrobial agents. In Murray P, ed. *Manual of clinical microbiology*. 8th edition. Washington, DC: AM Soc Microbiol Pr Pp. 1074-1101.
218. Ricke, S.C., Jones, F.T. 2003. Observations on the history of the development of antimicrobials and their use in poultry feeds. *Poult Sci* 82(4): 613-617.
219. Ridley, A., Threlfall, E.J. 1998. Molecular epidemiology of antibiotic resistance genes in multiresistant epidemic *Salmonella* typhimurium DT 104. *Microb Drug Resist* 4(2): 113-118.
220. Rivoal, K., Denis, M., Salvat, G., Colin, P., Ermel, G. 1999. Molecular characterization of the diversity of *Campylobacter* spp. isolates collected from a poultry slaughterhouse: analysis of cross-contamination. *Lett Appl Microbiol* 29:370-374.
221. Roberts, M.C., Sutcliffe, J., Courvalin, P., Jensen, L.B., Rood, J., Seppala, H. 1999. Nomenclature for macrolide and macrolide-lincosamide-streptogramin B resistance determinants. *Antimicrob Agents Chemother* 43: 2823-2830.
222. Rose, N., Beaudeau, F., Drouin, P., Toux, J.Y., Rose, V., Colin, P. 1999. Risk factors for *Salmonella enterica* subsp. *enterica* contamination in French broiler-chicken flocks at the end of the rearing period. *Prev Vet Med* 39(4): 265-277.
223. Russell, A.D. 2000. Do biocides select for antibiotic resistance. *J Pharm Pharmacol* 52: 227-233.
224. Rychlik, I., Gregorova, D., Hradecka, H. 2006. Distribution and function of plasmids in *Salmonella enterica*. *Vet Microbiol* 112: 1-10.

225. Salyers, A.A. and Whitt, D.D. 1994. Bacterial pathogenesis, a molecular approach. ASM Press. Washington D.C. pp.97-110.
226. Salyers, A.A. and Whitt, D.D. 2002. Bacterial pathogenesis, a molecular approach. ASM Press. Washington D.C. pp.168-181.
227. Salyers, A.A. and Whitt, D.D. 2002. Bacterial pathogenesis, a molecular approach. ASM Press. Washington D.C. pp.381-397.
228. Sandvang, D., Aarestrup, F.M., Jensen, L.B. 1997. Characterisation of integrons and antibiotic resistance genes in Danish multiresistant *Salmonella enterica* Typhimurium DT104. FEMS Microbiol Lett 157:177-181.
229. San Martin, B., Lapierre, L., Toro, C., Bravo, V., Cornejo, J., Hormazabal, J.C., Borie, C. 2005. Isolation and molecular characterization of quinolone resistant *Salmonella* spp. from poultry farms. Vet Microbiol 110:239-244.
230. Sasipreeyajan, J., Jerngklinchan, J., Koowatananukul, C., Saitanu, K. 1996. Prevalence of salmonellae in broiler, layer and breeder flocks in Thailand. Trop Anim Health Prod 28(2): 174-180.
231. Scalzo, S., Corkill, J.E., Shanks, D.J., Rowan, T.G., Delaval, J., Fleetwood, A., Murphy, M., Hart, C.A. 2004. Phenotypic and genotypic changes in *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serotype Typhimurium during passage in intestines of broiler chickens fed on diets that included ionophore anticoccidial supplements. J Clin Microbiol 42(8): 3399-3405.
232. Schweizer, H.P. 2001. Triclosan: a widely used biocide and its link to antibiotics. FEMS Microbiol Lett 1: 1-7.
233. Scott, F., Threlfall, J., Stanley, J., Arnold, C. 2001. Fluorescent amplified fragment length polymorphism genotyping of *Salmonella* Enteritidis: a method suitable for rapid outbreak recognition. Clin Microbiol Infect 7: 479-485.

234. Seo, Y-S., Lee, S-H., Shin, E-K., Kim, S-J., Jung, R., Hahn, T-W. 2006. Pulsed-field gel electrophoresis genotyping of *Salmonella Gallinarum* and comparison with random amplified polymorphic DNA. *Vet Microbiol* 115: 349-357.
235. Shaw, K.J., Rather, P.N., Hare, R.S., Miller, G.H. 1993. Molecular genetics of aminoglycoside resistance genes and familial relationships of the aminoglycoside-modifying enzymes. *Microbiol Rev* 57: 138-163.
236. Shimizu, K., Kumada, T., Hsieh, W.-C., Chung, H.-Y., Chong, Y., Hare, R.S., Miller, G.H., Sabatelli, F.J., Howard, J. 1985. Comparison of aminoglycoside resistance patterns in Japan, Formosa, and Korea, Chile, and the United States. *Antimicrob Agents Chemother* 28(2): 282-288.
237. Shivaprasad, H.L. 2003. Bacterial diseases *Salmonella* infections: Pullorum disease and fowl typhoid. In *Diseases of Poultry*. 11th edition. Iowa State Press. Pr. Pp. 568-582.
238. Shryock, T.R. 1999. Relationship between usage of antibiotics in food-producing animals and the appearance of antibiotic resistant bacteria. *Int J Antimicrob Agents* 12:275-278.
239. Smith, D.P., Cason, J.A., Berrang, M.E. 2005. Effect of fecal contamination and cross-contamination on numbers of coliforms, *Escherichia coli*, *Campylobacter*, and *Salmonella* on immersion-chilled broiler carcasses. *J Food Prot* 68(7): 1340-1345.
240. Smith, H.W. 1967. The effect of the use of antibacterial drugs, particularly as food additives, on the emergence of drug-resistant strains of bacteria in animals. *N Zealand Vet J* 15: 153-166.
241. Soltani, M., Beighton, D., Philpott-Haward, J., Woodford, N. 2000. Mechanisms of resistance to quinupristin-dalfopristin among isolates of *Enterococcus faecium* from animals, raw meat, and hospital patients in Western Europe. *Antimicrob Agents Chemother* 44: 433-436.

242. **Stoycheva, M.V., Murdjeva, M.A.** 2006. Antimicrobial therapy of salmonellosis – current state and perspectives. *Folia Med (Plovdiv)* 48(1): 5-10.
243. **Swann, M.M.** 1969. Joint Committee on the Use of Antibiotics in Animal Husbandry and Veterinary Medicine, HMSO, London.
244. **Swedberg, G., Ringertz, S., Skold, O.** 1998. Sulfonamide resistance in *Streptococcus pyogenes* is associated with differences in the amino acid sequence of its chromosomal dihydropteroate synthase. *Antimicrob Agents Chemother* 42(5): 1062-1067.
245. **Szych, J., Cieslik, A., Paciorek, J., Kaluzewski, S.** 2001. Multidrug resistance to antibacterial drugs of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* strains isolated in Poland in the 1998-1999 period. *Med Dosw Mikrobiol* 53: 17-29.
246. **Tadesse, W.M., Cizek, A.** 1994. The isolation of salmonellae from poultry carcasses and equipment in the poultry processing plant by means of two procedures. *Vet Med* 39(6): 315-20.
247. **Tate, C.R., Miller, R.G., Mallinson, E.T., Douglass, L.W., Johnston, R.W.** 1990. The isolation of Salmonellae from poultry environmental samples by several enrichment procedures using plating media with and without novobiocin. *Poult Sci* 69(5): 721-726.
248. **Tenover, F.C., Arbeit, R.D., Goering, R.V., Mickelsen, P.A., Murray, B.E., Persing, D.H., Swaminathan, B.** 1995. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strains typing. *J Clin Microbiol* 33(9): 2233-2239.
249. **Tessi, M.A., Salsi, M., Caffer, M., Moguilevski, M.A.** 1997. Drug resistance of *Enterobacteriaceae* isolated from chicken carcasses. *J Food Prot* 60: 1001-1005.

250. **Thakur, S., Gebreyes, W.A.** 2005. *Campylobacter coli* in swine production: antimicrobial resistance mechanisms and molecular epidemiology. *J Clin Microbiol* 43(11):5705-5714.
251. **Thong, K.L., Ngeow, Y.F., Altwegg, M., Navaratnam, P., Pang, T.** 1995. Molecular analysis of *Salmonella* enteritidis by pulsed-field gel electrophoresis and ribotyping. *J Clin Microbiol* 33(5): 1070-1074.
252. **Thorrold, C.A., Letsoalo, M.E., Dusé, A.G., Marais, E.** 2007. Efflux pump activity in fluoroquinolone and tetracycline resistant *Salmonella* and *E. coli* implicated in reduced susceptibility to household antimicrobial cleaning agents. *Int J Food Microbiol* 113(3): 315-320.
253. **Threlfall, E.J., Fisher, I.S.T., Berghold, C., Gerner-Smidt, P., Tschäpe, H., Cormican, M., Luzzi, I., Schnieder, F., Wannet, W., Machado, J., Edwards, G.** 2003. Trends in antimicrobial drugs resistance in *Salmonella* enterica serotypes Typhi and Paratyphi A isolated in Europe, 1999-2001. *Int J Antimicrob Agents* 22:487-491.
254. **Threlfall, E.J., Powell, N.G., Rowe, B.** 1994. Differentiation of *Salmonellas* by molecular methods. *PHLS Microbiol Dig* 11, 199-202.
255. **Tokumar, M., Konuma, H., Umesako, M., Konno, S., Shinagawa, K.** 1991. Rates of detection of *Salmonella* and *Campylobacter* in meats in response to the sample size and the infection level of each species. *Int J Food Microbiol* 13: 41-46.
256. **Tollefson, L., Miller, M.A.** 1999. Antibiotic use in food animals: controlling the human health impact. *J AOAC Int* 83:245-254.
257. **Torpdahl, M., Skov, M.N., Sandvang, D., Baggesen, D.L.** 2005. Genotypic characterization of *Salmonella* by multilocus sequence typing, pulsed-field gel electrophoresis and amplified fragment length polymorphism. *J Microbiol Methods* 63: 173-184.

258. Turnidge, J.D., Ferraro, M.J., Jorgensen, J.H. 2003. Susceptibility test methods: general considerations. In Murray P, ed. Manual of clinical microbiology. 8th edition. Washington, DC: AM Soc Microbiol Pr Pp. 1102-1107.
259. Uyttendaele, M.R., Debevere, J.M., Lips, R.M., Neyts, K.D. 1998. Prevalence of *Salmonella* in poultry carcasses and their products in Belgium. International J Food Microbiol 40: 1-8.
260. Van Asten, A.J.A.M., van Dijk, J.E. 2005. Distribution of classic virulence factors among *Salmonella* spp. FEMS Immunol Med Microbiol 44: 251-259.
261. van de Giessen, A.W., Peters, R., Berkers, P.A., Jansen, W.H., Notermans, S.H. 1991. *Salmonella* contamination of poultry flocks in the Netherlands. Vet Q 13(1): 41-46.
262. van de Giessen, A.W., Bouwknecht, M., Dam-Deisz, W.D., van Pelt, W., Wannet, W.J., Visser, G. 2006. Surveillance of *Salmonella* spp. and *Campylobacter* spp. in poultry production flocks in the Netherlands. Epidemiol Infect 2: 1-10.
263. Vandemaele, F., Vereecken, M., Derucke, J., Goddeeris, B.M. 2002. Incidence and antibiotic resistance of pathogenic *Escherichia coli* among poultry in Belgium. Vet Rec 151:355-356.
264. Van den Boogard, A.E., London, N., Driessen, C., Stobberingh, E.E. 2001. Antibiotic resistance of faecal *Escherichia coli* in poultry, poultry farmers and poultry slaughterers. J Antimicrob Chemother 47:763-771.
265. Van den Boogard, A.E., Stobberingh, E.E. 1999. Antibiotic usage in animals. Impact on bacterial resistance and public health. Drugs 58: 589-607.
266. van Duijkeren, E., Wannet, W.J., Houwers, D.J., van Pett, W. 2003. Antimicrobial susceptibilities of *Salmonella* strains isolated from humans, cattle, pigs, and chickens in the Netherlands from 1984 to 2001. J Clin Microbiol 41(8):3574-8.

267. Vassiliadis, P., Trichopoulos, D., Papadakis, J., Kalapothaki, V., Zavitsanos, X., Serie, C. 1981. *Salmonella* isolation with Rappaport's enrichment medium of different compositions. Zentralbl Bakteriell Mikrobiol Hyg 173(5): 382-389.
268. Vedantam, G., Nichols, B.P. 1998. Characterization of a mutationally altered dihydropteroate synthase contributing to sulfathiazole resistance in *Escherichia coli*. Microb Drug Resist 4(2): 91-97.
269. Veldkamp, H., van Germden, H., Harder, W., Laanbroek, H.J. 1984. Competition among bacteria: an overview. In Klug M.J., Reddy, C.A. eds. Current perspectives in microbial ecology. Washington, DC: American Society for Microbiology, 279-290.
270. Voogt, N., Raes, M., Wannet, W.J., Henken, A.M., van de Giessen, A.W. 2001. Comparison of selective enrichment media for the detection of *Salmonella* in poultry faeces. Lett Appl Microbiol 32(2): 89-92.
271. Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M. et al. 1995. AFLP : a new technique for DNA fingerprinting. Nucleic Acids Res 23: 4407-4414.
272. Walker, R.A., Lindsay, E., Woodward, M.J., Ward, L.R., Threlfall, E.J. 2001. Variation in clonality and antibiotic-resistance genes among multiresistant *Salmonella enterica* serotype typhimurium phage-type U302(MR U302) from humans, animals, and foods. Microb Drug Resist 7(1): 13-21.
273. Weigel, R.M., Qiao, B., Teferedegne, B., Suh, D.K., Barber, D.A., Isaacson, R.E., White, B.A. 2004. Comparison of pulsed-field gel electrophoresis and repetitive sequence polymerase chain reaction as genotyping methods for detection of genetic diversity and inferring transmission of *Salmonella*. Vet Microbiol 100: 205-217.
274. Weisblum, B. 1995. Erythromycin resistance by ribosome modification. Antimicrob Agents Chemother 39: 577-585.

275. **White, D.G., Zhao, S., Singh, R., McDermott, P.F.** 2004. Antimicrobial resistance among gram-negative foodborne bacterial pathogens associated with foods of animal origin. *Foodborne Pathog Dis* 1: 137-152.
276. **White, P.A., McIver, C.J., Rawlinson, W.D.** 2001. Integrons and gene cassettes in the *Enterobacteriaceae*. *Antimicrob Agents Chemother* 45: 2658-2661.
277. **White, A.C., Atmar, R.J., Wilson, J., Cate, T.R., Stager, C.E., Greenber, S.B.** 1997. Effects of requiring prior authorization for selected antimicrobials: expenditures, susceptibilities, and clinical outcomes. *Clin Infect Dis* 25: 230-239.
278. **Wierup, M., Engstrom, B., Engvall, A., Wahlstrom, H.** 1995. Control of *Salmonella* enteritidis in Sweden. *Int J Food Microbiol* 25: 219-226.
279. **Wierup, M., Wahlstrom, H., Engstrom, B.** 1992. Experience of a 10-year use of competitive exclusion treatment as part of the *Salmonella* control program in Sweden. *Int J Food Microbiol* 15(3-4): 287-291.
280. **Wilson, I.G.** 2004. Antimicrobial resistance of *Salmonella* in raw retail chickens, imported chicken portions, and human clinical specimens. *J Food Prot* 67(6): 1220-1225.
281. **Winokur, P.L., Brueggemann, A., DeSalvo, D.L., Hoffmann, L., Apley, M.D., Uhlenhopp, E.K., Pfaller, M.A., Doern, G.** 2000. Animal and human multidrug-resistant, cephalosporin-resistant *Salmonella* isolates expressing a plasmid-mediated CMY-2 AmpC β -lactamase. *Antimicrob Agents Chemother* 44(10): 2777-2783.
282. **Wise, R., Hart, T., Cars, O., Streulens, M., Helmuth, R., Huovinen, P., Sprenger, M.** 1998. Antimicrobial resistance is a major threat to public health. *Br Med J* 317: 609-610.
283. **World Health Organization (WHO).** 2000. WHO global principles for the containment of antimicrobial resistance in animals intended for food. WHO

Department of Communicable Disease Surveillance and Response, Geneva, Switzerland, 5-9 June. Report of a WHO consultation 1-7.

284. Wybot, I., Wildemaue, C., Godard, C., Bertrand, S., Collard, J.M. 2004. Antimicrobial drug resistance in nontyphoid human *Salmonella* in Belgium: trends for the period 2000-2002.

285. Zhao, S., McDermott, P.F., Friedman, S., Abbott, J., Ayers, S., Glenn, A., Hall-Robinson, E., Hubert, S.K., Harbottle, H., Walker, R.D., Chiller, T.M., White, D.G. 2006. Antimicrobial resistance and genetic relatedness among *Salmonella* from retail foods of animal origin: NARMS retail meat surveillance. *Foodborne Pathog Dis* 3(1): 106-117.

286. Zhao, S., White, D.G., Friedman, S.F., Glenn, A., Ayers, S.L., Abbott, J.W., Hubert, S.K., Hall-Robinson, E., Harbottle, H.C., Walker, R.D., McDermott, P.F. 2006. Characterization of *Salmonella* Heidelberg from retail meat samples: National Antimicrobial Resistance Monitoring System (NARMS): 2002-2004. Proceedings from the 10th Annual PulseNet Update Meeting, Miami, FL.

287. Zhao, S., Fedorka-Cray, P.J., Friedman, S., McDermott, P.F., Walker, R.D., Qaiyumi, S., Foley, S.L., Hubert, S.K., Ayers, S., English, L., Dargatz, D.A., Salamone, B., White, D.G. 2005. Characterization of *Salmonella* Typhimurium of animal origin obtained from the National Antimicrobial Resistance Monitoring System. *Foodborne Pathog Dis* 2(2): 169-181.

288. www.nfpc-cnpa.gc.ca

289. www.volailleduquebec.gc.ca

290. www.chicken.ca

291. www.hc-sc.gc.ca/dhp-mps/vet/faq/cipars-picra_faq_f.html

292. www.fda.gov/cvm/narms_pg.html

293. www.rivm.nl/earss/

ACCORD ET PERMISSION DES COAUTEURS D'UN ARTICLE¹

IDENTIFICATION DE L'ÉTUDIANT

Nom de l'étudiant Marie-Lou Gaucher		Code permanent [REDACTED]
Sigle du programme M.Sc.	Titre du programme Sciences vétérinaires	Option Microbiologie

DESCRIPTION DE L'ARTICLE

Auteurs M-L.Gaucher, M. Boulianne, A. Letellier, D. Daignault, L. Dutil, S. Quessy	
Titre Use of antimicrobial susceptibility patterns and pulsed field gel electrophoresis to characterize <i>Salmonella</i> strains isolated from broiler chicken ceca at slaughterhouse	
Revue	Date de publication

DÉCLARATION DES COAUTEURS

Déclaration		
<p>À titre de coauteurs de l'article identifié ci-dessus, nous autorisons le microfilmage du mémoire et sommes d'accord que</p> <p style="text-align: center;"><i>Marie-Lou Gaucher inclut cet article dans son mémoire de maîtrise qui a pour titre : Caractérisation phénotypique et génotypique d'isolats de Salmonella provenant de caeca de poulets de chair dans quatre abattoirs d'inspection fédérale du Québec.</i></p>		
Coauteur Martine Boulianne	[REDACTED]	Date 30/04/07
Coauteur Danielle Daignault		Date 07-04-07
Coauteur Lucie Dutil		Date 16/04/07
Coauteur Ann Letellier		Date 05/04/07
Coauteur Sylvain Quessy		Date 05/04/07
Coauteur		Date
Coauteur		Signature
Coauteur	Signature	Date

¹Annexe II du Guide de présentation et d'évaluation des mémoires de maîtrise et des thèses de doctorat, mars 2001

