

Université de Montréal

Prévalence, facteurs de risque et mécanismes de dissémination des gènes de résistance aux
antibiotiques

*L'espèce équine et l'espèce porcine ont été étudiées en insistant particulièrement sur les
antibiotiques de haute importance en médecine humaine dans chaque filière
(céphalosporines de 3^e génération et fluoroquinolones respectivement)*

par

Maud de Lagarde

Département de pathologie et microbiologie

Faculté de médecine vétérinaire

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

Septembre 2020

© Maud de Lagarde, 2020

Université de Montréal

Département de pathologie et microbiologie Faculté de médecine vétérinaire

Cette thèse intitulée :

**Prévalence, facteurs de risque et mécanismes de dissémination des gènes de résistance
aux antibiotiques**

***L'espèce équine et l'espèce porcine ont été étudiées en insistant particulièrement sur les
antibiotiques de haute importance en médecine humaine dans chaque filière
(céphalosporines de 3^e génération et fluoroquinolones respectivement)***

Présentée par :

Maud de Lagarde

A été évaluée par un jury composé des personnes suivantes

Christopher Fernandez Prada

Président-rapporteur

John Morris Fairbrother

Directeur de recherche

Julie Arsenault

Co-directrice

Marie Archambault

Membre du jury

Jacques Mainil

Examineur externe

Résumé

La résistance aux antibiotiques a pris une ampleur considérable du fait de l'utilisation des antibiotiques dans de nombreux domaines. Pour respecter l'approche « OneHealth », il est essentiel d'avoir une image spécifique de chaque situation, afin d'orienter les recommandations et de limiter la dissémination des gènes, des plasmides et des clones. Nos objectifs étaient adaptés à nos populations d'étude (chevaux et porcs) afin d'ajuster les résultats aux besoins des filières.

Dans la filière équine, nous avons quantifié les résistances phénotypiques et identifié les gènes de β -lactamases à spectre étendu (BLSE/AmpC) présents dans le microbiome des chevaux sains, et nous avons identifié les facteurs de risque associés à leur portage en France et au Québec. En France, nous avons également caractérisé les mécanismes de dissémination des gènes de BLSE/AmpC. Nous avons mis en évidence qu'en France et au Québec, les *E. coli* commensaux provenant de fèces de chevaux sains étaient majoritairement non susceptibles à l'ampicilline, l'amoxicilline/acide clavulanique et la streptomycine et que des *E. coli* multirésistants et porteurs de gènes codant pour des BLSE/AmpC étaient détectés dans respectivement environ 45% et 8% des chevaux. Le *bla*_{CTX-M-1} était majoritairement détecté bien qu'en France d'autres BLSE aient été identifiés (*bla*_{CTX-M-2} et *bla*_{CTX-M-14}) ainsi que le gène AmpC *bla*_{CMY-2}. L'administration d'un traitement médical, le nombre de personnes s'occupant des chevaux, le type d'activité et le fait de participer à un événement équestre dans les trois derniers mois ont été identifiés comme des facteurs de risque du portage des *E. coli* multirésistants ou producteurs de gènes BLSE/AmpC, soit en France soit au Québec. En France, le plasmide IncHI1-ST9 était majoritairement associé aux gènes *bla*_{CTX-M-1/2} et à l'opéron *fos*.

Pour la filière porcine, nos objectifs étaient de colliger les données de la base de données du laboratoire ECL entre 2008 et 2016, d'évaluer la présence d'un agrégat spatio-temporel pour les isolats ETEC:F4 non susceptibles à l'enrofloxacin et de caractériser ces isolats et les éléments génétiques mobiles qu'ils transportent. En effet, l'enrofloxacin est un antibiotique de haute importance en santé humaine, et doit donc faire l'objet d'une surveillance accrue. Nous avons trouvé que plus de 90% des isolats d'*E. coli* entérotoxigènes détectés chez des cas de porcs malades soumis au laboratoire ECL de 2008 à 2016 au Québec, étaient

multirésistants. Le virotype LT:STb:F4 prédominait jusqu'en 2014, puis a été dépassé par le virotype LT:STb:STa:F4. Un agrégat spatio-temporel d'isolats LT:STb:STa:F4 non susceptibles à l'enrofloxacin a été détecté entre 04/2015 et 09/2016 au centre de la Montérégie. Nous avons démontré la présence d'un clone ETEC:F4 non susceptible à l'enrofloxacin, à haut risque, qui se dissémine en Amérique du Nord depuis 2013. Les isolats appartenant à ce clone sont ST100, O149:H10. Ils sont multirésistants, et associés à une pathogénicité et une virulence augmentée par rapport aux isolats détectés avant 2000. Ils portent le réplicon IncFII. Les résistances et leur mécanisme de dissémination sont différents selon l'espèce animale. Ces divergences sont fonction de l'usage des antibiotiques, et des échanges possibles avec les différents protagonistes en contact avec les animaux.

Mots clés : Résistance aux antibiotiques, Céphalosporinases, BLSE, Non-susceptibilité aux fluoroquinolones, Cheval, Porc, Microbiote, Fructo-oligosaccharides à courte chaîne, ETEC, Clone à haut risque.

Abstract

Antimicrobial resistance has become an essential issue in the last decades because of the extensive use of antimicrobials in numerous sectors. In order to follow the OneHealth approach, it is critical to have a precise picture of each situation, to adjust recommendations and prevent resistance gene dissemination as well as plasmid and clone spread. Our objectives were adapted to the animal populations under study. Therefore, our results were compatible with each sector.

In the equine sector, we quantified phenotypic resistance and identified β -lactamase (ESBL/AmpC) genes present in the intestinal microbiome of healthy horses and we identified risk factors associated with their carriage both in France and in Quebec. Then, in France we characterized ESBL/AmpC gene spread mechanisms. We demonstrated that commensal *E. coli* originating from the feces of healthy horses were mostly non-susceptible to ampicillin, amoxicillin/clavulanic acid and streptomycin. The presence of multidrug resistant *E. coli* and of *E. coli* carrying ESBL/AmpC genes was found in around 45% and 8% of horses respectively. The most frequently detected gene was *bla*_{CTX-M-1}, although *bla*_{CTX-M-2} and *bla*_{CTX-M-14} were also identified in France. The AmpC gene *bla*_{CMY-2} was identified in both localities. Medical treatment, staff number, activity, and participation in an equestrian event within the last three months were identified as risk factors for MDR or ESBL/AmpC *E. coli*. In France, commensal *E. coli* from healthy horses most commonly possessed the IncHI1-ST9 plasmid. This plasmid carries *bla*_{CTX-M-1/2} genes and the *fos* operon.

For the swine sector in Quebec, our objectives were to gather data provided by the Animal pathogenic and zoonotic *E. coli* (APZEC) database between 2008 and 2017, to assess the presence of a spatio-temporal cluster for enrofloxacin non-susceptible ETEC:F4 and to characterize these isolates and the mobile genetic elements they carry. Enrofloxacin is an antibiotic classified as highly important in human medicine and as such needs to come under higher scrutiny. For this sector, we demonstrated that more than 90% of enterotoxigenic *E. coli* (ETEC) isolates from diseased swine submitted to the ECL between 2008 and 2016, were multidrug resistant. The main virotype in 2014 was LT:STb:F4. It was subsequently replaced by the LT:STb:STa:F4 virotype. A spatio-temporal cluster of LT:STb:STa:F4 isolates non-

susceptible to enrofloxacin was detected between 04/2015 and 09/2016 in the centre of the Monteregie region. These isolates constituted an ETEC:F4 high risk enrofloxacin non-susceptible clone, which has been spreading in North America since 2013. Isolates belonging to this clone are ST100, O149H10, phylogroup A, and *fimH* gene negative. These isolates are multidrug resistant and associated with a higher pathogenicity and virulence than isolates detected before 2000. They all carry the incFII replicon.

Resistance and mechanisms of dissemination are different according to the animal species being studied. This is likely due to different patterns of antimicrobial use in each industry and possible interactions with different protagonists in contact with the animals. It is essential to understand the situation for each animal species in order to adapt recommendations for efficiently limiting the spread of resistance genes, plasmids and clones.

Key words : Antimicrobial resistance, Cephalosporinase, ESBL, Fluoroquinolones non-susceptibility, Equine, Swine, Microbiota, Short-chain fructo-oligosaccharides, ETEC, High-risk clone.

TABLE DES MATIÈRES

Résumé	3
Abstract	5
TABLE DES MATIÈRES	7
LISTE DES TABLEAUX	15
LISTE DES FIGURES	18
LISTE DES ABRÉVIATIONS	20
DÉDICACE	24
REMERCIEMENTS	25
AVANT-PROPOS	26
INTRODUCTION	1
REVUE DE LITTERATURE	4
<i>E. coli</i> comme indicateur de l'antibiorésistance	5
<i>E. coli</i> , une bactérie ubiquitaire	5
Caractéristique de <i>E. coli</i>	5
Classification de <i>E. coli</i> (commensal et pathogène)	6
Les techniques de différenciation classiques	6

La technique de différenciation « nouvelle génération » : le séquençage du génome complet (Whole genome sequencing (WGS) en anglais) -----	8
E. coli entérotoxigène (ETEC) chez le porc-----	9
Connaissance sur E. coli chez le cheval -----	14
<i>E. coli</i> comme indicateur de résistance aux antibiotiques -----	15
Ubiquité-----	15
Présence de la résistance aux antibiotiques chez les E. coli pathogènes-----	16
L'étude de E. coli permet l'obtention d'une image globale de la situation. -----	16
Les résistances antibiotiques importantes -----	16
Quelques définitions -----	16
Multirésistance-----	17
Résistance vs non-susceptibilité. -----	19
Définitions utilisées dans notre ouvrage -----	19
Classifications des antibiotiques par ordre d'importance-----	19
Santé Canada -----	20
Catégorie I : Très haute importance -----	20
Catégorie II : Haute importance -----	20
Catégorie III : Moyenne importance -----	21
Catégorie IV : Faible importance-----	21
Classification de l'organisation Mondiale de la Santé (OMS)-----	21
Classification européenne prenant en compte l'aspect vétérinaire. -----	22
Mécanisme d'action et de résistance des β -lactames et des fluoroquinolones. -----	23
Mécanismes d'action-----	23
Les β -lactames -----	23
Les fluoroquinolones-----	27
Mécanismes de résistance -----	28
Les β -lactames -----	28
La résistance aux quinolones et aux fluoroquinolones. -----	34
La résistance aux antibiotiques dans la filière équine-----	36
L'utilisation des antibiotiques dans l'espèce équine-----	37
Utilisation qualitative-----	37
Utilisation quantitative-----	37
Les résistances phénotypiques aux céphalosporines et 3 ^{ème} génération et aux fluoroquinolones de E. coli décrites chez le cheval. -----	37
La résistance aux antibiotiques dans la filière porcine-----	38
Utilisation des antibiotiques dans la filière porcine au Québec et résistances associées. -----	38
L'enrofloxacin dans la filière porcine -----	38

La résistance aux β -lactames dans la filière porcine. -----	39
La dissémination des différents mécanismes de résistance -----	40
Les différents mécanismes de dissémination-----	40
Les gènes de résistance -----	40
Le transfert horizontal de gène (HGT) -----	40
Transformation -----	42
Conjugaison -----	42
Transduction : Phages -----	50
Les agents de transfert de gènes -----	52
Le transfert vertical -----	53
Définition d'un clone-----	53
Émergence de clones à haut risque-----	54
Les connaissances actuelles dans les filières équine et porcine : la dissémination des gènes de résistance aux β -lactames et aux fluoroquinolones -----	54
La filière équine -----	54
La dissémination des gènes de BLSE/AmpC -----	54
La dissémination des gènes de résistance aux fluoroquinolones. -----	56
La filière porcine -----	56
La dissémination des gènes BLSE/AmpC-----	56
La dissémination des gènes de résistance aux fluoroquinolones -----	57
Les facteurs de risque d'excrétion de bactéries résistantes aux antibiotiques -----	59
Connaissances générales-----	59
Définition et problématique-----	59
Le facteur de risque reconnu universellement : Utilisation des antibiotiques. -----	61
L'espèce équine -----	61
L'espèce porcine-----	62
Utilisation orale d'antibiotique -----	62
Les facteurs de risque concernant la gestion d'élevage -----	62
 HYPOTHESES ET OBJECTIFS -----	 64
 ARTICLES SCIENTIFIQUES-----	 66
 Enjeux et synthèse des principaux résultats dans la filière équine. -----	 66

ARTICLE 1: Prevalence, risk factors, and characterization of multidrug resistant and extended spectrum β -lactamase/AmpC β -lactamase producing *Escherichia coli* in healthy horses in France in 2015.-----67

Auteurs et affiliations -----	67
Contribution de Maud de Lagarde à cet article -----	67
Auteurs -----	67
Affiliations -----	67
Journal de Publication -----	67
Résumé en français -----	68
Abstract -----	68
Introduction -----	69
Materials and Methods -----	71
Sampling -----	71
Indicator <i>E. coli</i> collection: non-enriched culture, antimicrobial susceptibility testing, ESBL/AmpC gene identification, and descriptive statistics. -----	72
Potential ESBL/AmpC producing <i>E. coli</i> collection: culture, antimicrobial susceptibility testing, ESBL/AmpC and virulence gene identification and descriptive statistics. -----	73
Risk factors. -----	75
Results -----	75
Indicator collection -----	75
ESBL/AmpC collection -----	76
Risk factors -----	77
Discussion -----	78
Figures and table -----	82

ARTICLE 2 : Spread of Multidrug Resistance IncHI1 Plasmids Carrying ESBL Gene *bla*_{CTX-M-1} and Metabolism Operon of Prebiotic Oligosaccharides in Commensal *Escherichia coli* From Healthy Horses, France: *bla*_{CTX-M-1} Plasmids in Healthy Horses, France. -----91

Auteurs et affiliations -----	91
Contributions de Maud de Lagarde à cet article -----	91
Auteurs -----	91
Affiliation -----	91
Journal de publication -----	91
Résumé en français -----	92
Abstract -----	92
Introduction -----	93
Materials and Methods -----	94
Sampling, bacterial isolates, and antimicrobial susceptibility testing -----	94
Molecular typing, and phylogenetic analysis -----	95

Detection, plasmid typing, sequencing and transferability of ESBL/AmpC genes-----	95
Metabolism of scFOSs conferred by ESBL/AmpC plasmids and detection of fos operon -----	96
Results and Discussion-----	96
Phylogenetic characteristics of isolates -----	97
Antimicrobial resistance, ESBL/AmpC genes, transferability, and plasmid typing -----	97
blaCTX-M InCHI1-pST9 plasmids confer the property of scFOS metabolism -----	99
Acknowledgements-----	100
Tables and Figures -----	100
ARTICLE 3 : Prevalence, risk factors, and characterization of multidrug resistant and ESBL/AmpC producing	
<i>Escherichia coli</i> in healthy horses in Quebec, Canada, in 2015-2016. -----	107
Auteurs et affiliations -----	107
Contribution de Maud de Lagarde à cet article -----	107
Auteurs -----	107
Affiliation -----	107
Journal de f publication -----	107
Résumé en français-----	107
Abstract-----	108
Introduction -----	109
Materials and Methods-----	111
2.1. Sampling and Data Collection -----	111
2.2. Indicator Collection: Non-enriched Culture, Antimicrobial Susceptibility Testing, ESBL/AmpC Gene Identification, and Prevalence Estimation. -----	112
2.3. Potential ESBL/AmpC Producing <i>E. coli</i> Collection: Culture, Antimicrobial Susceptibility Testing, ESBL/AmpC and Virulence Gene Identification and Descriptive Statistics. -----	113
MDR and ESBL/AmpC: Risk Factors. -----	113
Results-----	114
Indicator collection-----	114
ESBL/AmpC Collection-----	115
Risk Factors-----	115
Discussion -----	116
Tables and Figures -----	120
Enjeux et synthèse des principaux résultats dans la filière porcine. -----	126
ARTICLE 4 : A new multidrug-resistant Enterotoxigenic <i>Escherichia coli</i> Pulsed-Field Gel Electrophoresis cluster associated with enrofloxacin non-susceptibility in diseased pigs. -----	127
Auteurs et affiliations -----	127
Contribution de Maud de Lagarde à cet article -----	127

Auteurs-----	127
Affiliations-----	127
Journal de Publication-----	127
Résumé en français-----	127
Abstract-----	128
Introduction-----	129
Materials and Methods-----	131
Results-----	134
Discussion-----	136
Tables and Figures-----	140
Matériel supplémentaire-----	147

ARTICLE 5 : High Risk clone for antibiotic resistance dissemination: A proposal of revised criteria adapted to the OneHealth context with application to Enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) F4 associated with enrofloxacin non-susceptibility in the porcine population in North America. ----- 149

Auteurs et affiliations-----	149
Contribution de Maud de Lagarde à cet article-----	149
Auteurs-----	149
Affiliations-----	149
Journal de Publication-----	149
Résumé en français-----	149
Abstract-----	150
Introduction-----	151
Materials and Methods-----	153
Proposal of criteria for a high risk clone in a One health context and application-----	153
Isolates selection-----	153
Antimicrobial susceptibility-----	153
DNA extraction, Library preparation and Whole genome sequencing-----	154
Quality assessment and assembly-----	154
MLST, serotype, phylogroup and fimH-----	154
Virulence and resistance gene and replicon determination-----	154
Phylogenetic analysis-----	155
Mortality rate and stage of production.-----	156
Selection of other whole genome sequence from Genbank.-----	156
Results-----	157
Proposal of criteria and application to ETEC:F4 clone detected in pigs in Quebec-----	157
Identification of clonal lineage and clones-----	157
Virulence gene profiles of the different clonal lineages.-----	159

Resistance gene, MDR and replicon profiles of the different clonal lineages. -----	160
Production phase of affected pigs, mortality rate and persistence on farm of isolates from the different clonal lineages. -----	162
Presence of isolates belonging to the clonal lineage A in North America. -----	162
Application of the criteria for “high risk” clone to the clones AI, A2, A3, A4, C1 and B1. -----	163
Discussion -----	164
Tables and Figures -----	169
Table 3 : Revised criteria for high risk clone applied to the clones identifies in our study. -----	174
Matériel supplémentaire-----	175
DISCUSSION et CONCLUSIONS -----	182
Clones et clone à haut risque. -----	182
Dissémination clonale et dissémination plasmidique -----	184
Résistance aux antibiotiques phénotypiques et génotypiques -----	187
Résistance et multirésistance -----	187
Les BLSE/AmpC et carbapénémases. -----	187
La résistance aux fluoroquinolones -----	189
Remarques sur la résistance à la colistine. -----	190
Les facteurs de risque -----	191
Retombées et recommandations. -----	192
Conclusion -----	194
REFERENCE -----	195
APPENDICES -----	224
Appendice 1 : Questionnaire de l’Article 1. -----	224
Appendice 2 : Questionnaire de l’Article 2 -----	234
Version en français. -----	234
Version en anglais -----	254
Appendice 3 : Matériel supplémentaire de l’article 4 -----	274

Appendice 4 : Matériel supplémentaire de l'article 5	275
Appendice 5 : Résumé de l'étude des facteurs de risque de la présence et de la dissémination du clone AI dans les fermes porcines au Québec.	286
Contexte	286
Hypothèse	286
Objectifs	286
Matériel et Méthode	286
Résultats	287
Conclusion	287
Questionnaire	289
Appendice 6 : Récapitulatif des gènes BLSE/AmpC retrouvés chez le porc entre 2018 et 2019.	291

LISTE DES TABLEAUX

Dans la revue de littérature

Tableau 1 : Liste des antibiotiques par catégories selon Magiorakos et al.	17
Tableau 2 : Critères de catégorisation des antibiotiques par Santé Canada	20
Tableau 3 : Classification des six groupes de pénicillines, adapté et traduit à partir de (101).	25
Tableau 4 : Classification des céphalosporines adaptée et traduite à partir de (101)	26
Tableau 5 : Classification des β -lactamases	29
Tableau 6 : Classification des carbapénémases rencontrées chez les Enterobacteriaceae, traduites et adaptées de (127).....	32

Dans l'article 1

Tableau 1 : On the left of the table: Prevalence estimates of healthy adult horses shedding <i>E.coli</i> isolates non-susceptible to more than 1, 3, 5, 7 or 9 classes of antimicrobials and premises housing these horses based on the indicator collection results in a cross-sectional study of 132 horses, in 38 premises, in France in 2015. On the right of the table: Prevalence estimates of premises housing healthy adult horses shedding isolates non-susceptible to more than 1, 3, 5, 7 or 9 classes of antimicrobial in the ESBL/AmpC collection, based on the ESBL/AmpC collection results in a cross-sectional study on healthy horses, in 38 premises, in France in 2015.	82
Tableau 2 : Potential risk factors for ESBL/AmpC and multidrug resistant (MDR) status at the premises level, in a cross-sectional study performed on healthy adult horses, in France, in 2015. A positive MDR status for a horse was defined as the detection of a least one MDR isolate for that horse. A premises was attributed a positive MDR status if it housed at least one positive MDR horse. P-value are derived from the likelihood ratio test in univariate analysis.	83
Tableau 3 : Parameter estimates and odds ratio from a multivariable logistic regression modeling ESBL/AmpC positive status at the premises level, based on the results of a cross-sectional study performed on 38 premises housing healthy adult horses, sampled in France in 2015.....	87

Dans l'article 2

Tableau 1 : Characteristics of ESC-resistant <i>E.coli</i> strains from horses, France	100
--	-----

Dans l'article 3

Tableau 1 : Prevalence estimates (%) with 95% confidence intervals (95% CI) of healthy adult horses shedding E.coli isolates that are non-susceptible to more than 1, 3, 5, 7 or 9 classes of antimicrobials and premises housing these horses based on the indicator collection results in a cross-sectional study of 209 horses in 32 premises in Quebec in 2015 and 2016 .Abbreviations: CI = confidence interval, MDR = multidrug-resistant. 122

Tableau 2 : Descriptive statistics and p-value (Wald test) from univariable multilevel logistic regression analyses of potential risk factors for MDR status in horses in a cross-sectional study performed on healthy adult horses, in Quebec, in 2015 and 2016. In bold are the factors that were retained for the multivariable analysis. 123

Tableau 3: Parameter estimates and odds ratios from a multivariable regression modeling MDR positive status at the horse level, based on the results of a cross-sectional study performed on 32 premises and 209 healthy adult horses, sampled in Quebec, in summers 2015 and 2016. The estimated variance at the premises level was 0.171 (standard error of 0.316). 125

Dans l'article 4

Tableau S1 : Frequency of clinical signs in 3773 cases of diseased pigs in Quebec submitted to the EcL from 2008 to 2016. (when several clinical signs were present, the most severe one was attributed to the case). 148

Dans l'article 5

Tableau 1 : Definition of criteria for determination of a high risk bacterial clone in the context of the OneHealth concept.....172

Tableau 2 : Virulence genes (detected from VirulenceFinder of VFDB databases), identified exclusively in the clonal lineage and in all isolates from this clonal lineage. 173

Tableau 3 : Revised criteria for high risk clone applied to the clones identifies in our study.....174.

Tableau S2 : Details of the genes absent (highlighted in gray) of present (not highlighted) in the isolates belonging to the clonal lineage A, classified by function. The nomenclature is the same used in the VFDB database. 178

Dans l'article 4

Tableau S2 : Complete profile of all isolates entered in the APZEC database between 2008 and 2016..... 274

Dans l'article 5

Tableau S1: Données de qualité d'assemblage et de données brutes pour les 173 isolats du Quebec (double cliquer sur le tableau pour le voir au complet dans excel)	275
Tableau S3: Résultat de VirulenceFinder (double cliquer sur le tableau pour le voir au complet dans excel).....	276
Tableau S4: Résultat de VFDB (double cliquer sur le tableau pour le voir au complet dans excel)	277
Tableau S5: Résultat de ResistanceFinder (double cliquer sur le tableau pour le voir au complet dans excel).....	278
Tableau S6 : Résultat de ARG-Annot (double cliquer sur le tableau pour le voir au complet dans excel)	279
Tableau S7 : Résultat poue les gènes de BLSE/AmpC (double cliquer sur le tableau pour le voir au complet dans excel).....	280
Tableau S8 : Résultat de PlasmidFinder (double cliquer sur le tableau pour le voir au complet dans excel).....	281
Tableau S9 : Métadatas pour les 192 isolats (double cliquer sur le tableau pour le voir au complet dans excel).....	282
Tableau S10 : Matrice de Distance de la deuxième analyse phylogénétique base sur les SNPs. (double cliquer sur le tableau pour le voir au complet dans excel).....	282
Tableau S11: Number of isolates associated with a disease severity score per clonal lineage. The clonal lineage D, E and F were gathered because the number of isolates for which necropsy reports were available was low.....	283
Tableau S12 : Number of isolates associated with a disease severity score per clone within the clonal lineage A.	283
Tableau S13 : Number of isolates associated with each stage of production. The clonal lineage D, E and F were gathered because the number of isolates for each clonal lineage was low.	284
Tableau S14 : Number of isolates associated with each stage of production score per clone within the clonal lineage A.....	285

LISTE DES FIGURES

Dans la revue de littérature

Figure 1: Mécanisme d'action de STa..	11
Figure 2 : Mécanisme d'action de l'entérotoxine STb.....	11
Figure 3 : Mécanisme d'action de LT.....	12
Figure 4 : Représentation schématique des étapes impliquées dans la pathogénèse de l'infection par des ETEC.....	13
Figure 5 : Résumé des mécanismes d'action des β -lactames.....	24
Figure 6 : Mécanisme de transfert d'ADN entre bactéries.....	41
Figure 7 : Correspondance entre les groupes Inc et MOB des plasmides présents chez les protéobactéries	49
Figure 8 : Type de transduction et cycle de vie des phages.....	51

Dans l'article 1

Figure 1: Geographical distribution of sampled premises over the French territory in a cross-sectional study of 132 healthy adult horses, in 41 premises, performed in 2015.	88
Figure 2: Prevalence estimates of resistance per antimicrobial, at the horse level (A), and at the premises level (B), in a cross-sectional study of 132 healthy adult horses, in 38 premises, performed in 2015, in France.....	89
Figure 3: Characterization of susceptibility profiles of <i>E.coli</i> isolates in the ESBL/AmpC collection, in a cross-sectional study performed on healthy adult horses, in France, in 2015.	90

Dans l'article 2

Figure 1: Analysis of <i>Xba</i> I-PFGE patterns obtained from ESBL/AmpC-producing <i>E.coli</i> isolates.....	105
Figure 2: Analysis of <i>Eco</i> RI-RFLP profiles of IncHI1 plasmids carrying <i>bla</i> _{CTX-M1/2} genes....	106

Dans l'article 3

Figure 1: Geographical distribution of the sampled premises (based on center point of their 6-digit postal code) over the administrative regions of the province of Quebec in a cross-sectional study of 209 healthy adult horses in 32 premises performed in 2015 and 2016. .	120
--	-----

Figure 2: Prevalence estimates (%) of non-susceptibility (yellow and red) for each antimicrobial, at the horse level **(A)**, and at the premises level **(B)**, in a cross-sectional study of 209 healthy adult horses, in 32 premises, performed in 2015 and 2016, in Quebec..... 121

Figure 3: Susceptibility profiles of E.coli isolates in the ESBL/AmpC collection, in a cross-sectional study performed on healthy adult horses, in Quebec in 2015 and 2016..... 122

Dans l'article 4

Figure 1: Outline of the EcL approach for the detection of the virulence genes which define the E. coli pathotypes commonly found in pigs..... 140

Figure 2: Percentage of positive cases per pathovirotype in diseased pigs in Quebec among all cases submitted to the EcL from 2008 to 2016. 141

Figure 3: Number of positive cases per virotype in diseased pigs in Quebec among ETEC:F4 cases submitted to the EcL from 2008 to 2016.. 142

Figure 4: Susceptibility to enrofloxacin in ETEC:F4 isolates from positive cases, classified by virotype, detected in samples from diseased pigs of Quebec submitted to the EcL from 2008 to 2016. 142

Figure 5: Number of multidrug resistant ETEC:F4 isolates, classified by virotype, detected in samples from diseased pigs of Quebec submitted to the EcL from 2008 to 2016..... 143

Figure 6: Representation of the spatio-temporal cluster. 144

Figure 7: Phylogenetic additive tree based on the PFGE profiles of ETEC:F4 isolates collected from 2013 to 2016 by the EcL in diseased pigs in Quebec. 145

Figure 8: Geographical distribution of isolates belonging to the PFGE clusters over the Quebec territory in 2013, 2014, 2015 and 2016 according to the EcL database..... 146

Figure S1: Susceptibility to antimicrobials in ETEC:F4 isolates from positive cases, detected in samples from diseased pigs of Quebec submitted to the EcL from 2008 to 2016..... 147

Dans l'article 5

Figure 1: Circular Tree based on SNP phylogeny.. 170

Figure 2: Circular Tree based on SNP phylogeny. 171

Figure S1: Number of maximum SNPs in relation to the number of years between two isolates within each branch tree with a bootstrap value of one and composed of 3 isolates and more. 175

Figure S2: Number of maximum SNPs in relation to the number of years between two isolates within each branch tree with a bootstrap value of one and composed of 3 isolates and more. 176

Figure S3: Circular Tree based on SNP phylogeny..... 177

LISTE DES ABRÉVIATIONS

Abbreviations	Description
ADN	Acide déoxyribonucléique (DNA en anglais)
A/E	Attachement/effacement
AMC	Amoxicillin-Clavulanic Acid
AMK	Amikacine
AMP	Ampicilline
AmpC	AmpC β -lactamase
ATM	Aztreonam
AZY	Azithromycine
BHI	Brain heart infusion (Infusion cerveau cœur)
bla	β -lactamase
BLSE/ESBL	β -lactamase à spectre étendu/Extended spectrum β -lactamase
CAZ	Cefoperazone
CC	Complexe clonal
CFP	Ceftazidime
CHL	Chloramphenicol
CI	Confidence interval
CIP	Ciprofloxacine
CIPARS/PICRA	Canadian Integrated Program of Antimicrobial Resistance Surveillance/Programme intégré canadien de surveillance de la résistance aux antimicrobiens
CLSI	Clinical Laboratory Standard Institute

CN	Cefalexine
CRO	Ceftriaxone
CXM	Cefuroxime
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECDC	European Center of Disease Control
Ecl	Reference Laboratory for <i>Escherichia coli</i>
ENR	Enrofloxacin
EPEC	<i>E. coli</i> Enteropathogénique
ESBL	Extended Spectrum β -lactamase
ETEC	<i>E. coli</i> Enterotoxigenique
EUCAST	Comité européen des tests de susceptibilité antimicrobienne
ExPEC	<i>E. coli</i> pathogénique Extra-intestinal
FEP	Cefepime
FFC	Florfenicol
FOX	Cefoxitin
GEN	Gentamicin
GTA	Gene transfert Agent (Agent de transfert de gènes)
HGT	Horizontal gene transfert (Transfert horizontal de gène)
IFCE	Institut français du Cheval et de l'Équitation (French Institute of the Horse and Equitation)
IG	Ilot génomique
IS	Insertion de séquence
IPA	Ilot de pathogénicité
IPM	Imipenem
IR	Inverted repeats (séquence d'ADN inversée et répétée)

KAN	Kanamycine
LEE	Locus d'effacement des entérocytes
LPS	Lipopolysaccharide
MDR	Multi-drug resistant (multirésistant)
CMI	Concentration minimale inhibitrice
MLST	Multi-Locus sequence typing
cgMLST	core genome MLST
wgMLST	whole genome MLST
MLVA	Multiple loci VNTR analysis
NAL	Nalidixic acid
PFGE	Pulse-Field gel electrophoresis (Electrophorèse à champ pulsée)
PIP	Piperacilline
RAPD	Random Amplified Polymorphic DNA
SARM	<i>Staphylococcus aureus</i> résistant à la méthicilline
SGC	Séquençage du génome complet
SIRS	Syndrome de réponse inflammatoire systémique
SNP	Single Nucleotide Polymorphism (= Polymorphisme d'un nucléotide simple)
SPT	Spectinomycine
SSS	Sulfisoxazole
ST	Sequence type (type de séquence selon la classification MLST)
STEC	Shiga-toxin producing <i>E. coli</i>
STR	Streptomycine
TCC	Ticarcillin-Clavulanic Acid
TET	Tetracycline

TIC	Ticarcilline
TMP	Triméthoprime
TMS	Trimethoprime-sulfamethoxazole
Tn	Transposon
TSA	Tryptic Soy Agar
TZP	Piperacillin-Tazobactam
UB	Flumequine
VNTR	Variable-Number Tandem Repeat
WGS	Whole genome sequencing (Séquençage du génome complet)
XNL	Ceftiofur

DÉDICACE

A mon fils Noah, qui a donné un sens nouveau à ma vie,

A mon frère Michael, qui est une source d'inspiration sans cesse renouvelée,

A ma mère Maryse et à mon père Bruno, qui m'ont transmis les valeurs qui me tiennent à cœur aujourd'hui,

A Pavlina et à Marion, qui sont toujours là pour moi,

A mon conjoint Mathieu, qui me soutient dans les hauts et les bas.

REMERCIEMENTS

Je souhaite remercier tous les membres du laboratoire ECL qui ont participé de près ou de loin à la construction de ce travail :

Ghyslaine pour sa capacité éternelle de remise en question et son travail rigoureux en toutes circonstances.

Gabriel pour sa constance et sa rigueur au travail,

Passoret qui a été là pour discuter...

Laryssa qui m'a appris à faire les antibiogrammes et les PCR...

Et bien évidemment mes deux directeurs et co-directrices Dr Fairbrother et Dr Arsenault, qui m'ont tellement appris et soutenu tout au long de ces 6 dernières années et sans qui rien n'aurait été possible.

AVANT-PROPOS

Lorsqu'à la fin de ma résidence de Médecine Interne des Équins, j'ai pris la décision de démarrer un PhD, je n'avais pas réellement conscience de l'aventure dans laquelle je me lançais.

Mon expérience de clinicienne, et les patients que nous avons perdus à cause d'infections à *Escherichia coli* multirésistants m'ont poussée à me poser de nombreuses questions sur le rôle des vétérinaires dans la problématique de l'antibiorésistance. J'ai réalisé que les données disponibles dans l'espèce équine étaient trop rares et trop vagues pour amener des réponses claires sur la marche à suivre.

Dr Fairbrother a alors accepté de me prendre comme étudiante et de commencer des démarches pour pallier ce manque de données dans l'espèce équine. Cette première étape m'a amené à m'intéresser, avec passion, aux différentes problématiques de dissémination des gènes d'antibiorésistance dans les populations animales. J'ai eu, quelques années plus tard, la grande chance de me greffer au projet concernant l'apparition d'un clone résistant aux fluoroquinolones dans la population porcine au Québec.

Cet ouvrage est le résultat de ces six années d'études pendant lesquelles, au côté de tous les membres du laboratoire ECL et Dr Arsenault, j'ai eu la chance de parfaire mes connaissances sur le vaste sujet de la dissémination des gènes de résistance et d'apporter ma pierre à l'édifice de la lutte contre l'antibiorésistance.

INTRODUCTION

Le risque que le 21^e siècle soit le siècle « post-antibiotique » est bien réel, selon plusieurs experts (1). L'antibiorésistance a été déclarée par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), en 2014, comme une des plus grandes menaces pour la médecine classique. L'échec des thérapies empiriques augmente la longueur et le coût des traitements ainsi que la mortalité associée aux infections. O'Neil et son équipe ont estimé que 700 000 morts humaines pouvaient être attribuées à l'antibiorésistance en 2014, et que ce chiffre déjà alarmant pourrait passer à 10 millions annuels d'ici 2050 si aucune action n'était entreprise. Ce coût humain tragique, qui touche majoritairement les pays en développement (en Afrique et en Asie), n'est malheureusement pas la seule conséquence. Dans le même rapport, l'évaluation économique du problème s'élève à 100 milliards de dollars américains en 2050 (2). Le rapport « When antibiotic fails » (1) a établi qu'en 2018-2019, près d'un quart des infections humaines au Canada sont résistantes (c'est-à-dire « résistante à au moins un antibiotique utilisé en première ligne de traitement »). Ces infections résistantes sont liées à 14 000 décès annuellement (contre 15 500 morts de la COVID-19 dans ce pays en 2020) et 40% de ces décès auraient pu être évités si la bactérie avait été sensible au traitement de première intention.

Bien qu'il soit reconnu que les résistances microbiennes puissent toucher tous les types de micro-organismes, incluant les virus (3), les champignons (4) et les parasites (5), les résistances bactériennes ont pris une ampleur considérable dans les dernières décennies, du fait de l'utilisation extensive des antibiotiques bactériens dans de nombreux domaines, tels que la médecine humaine ou l'agriculture intensive (6). Heureusement, certaines études encourageantes démontrent que l'antibiorésistance n'est pas une fatalité et qu'en utilisant les antibiotiques de manière raisonnée, nous pouvons diminuer la prévalence de certaines résistances antimicrobiennes (7). Chaque espèce bactérienne développe des stratégies de résistance particulières en fonction des antibiotiques auxquels elle est exposée. Il existe également plusieurs mécanismes permettant aux bactéries d'acquérir, de perdre et d'échanger ces caractéristiques de manière à s'adapter rapidement à l'environnement dans lequel elles se développent.

Dans ce travail, nous allons étudier les résistances importantes, leurs mécanismes de dissémination ainsi que les facteurs de risque de la présence de ces résistances, dans deux espèces très différentes : l'espèce équine, classifiée comme un animal de compagnie (8), et l'espèce porcine qui est un animal de production. Ces deux filières comportent, comme nous allons le voir, des enjeux très différents en termes de santé publique et de santé animale.

La filière équine a été, jusqu'à très récemment, le parent pauvre de la surveillance de l'antibiorésistance. Pourtant, les praticiens équins doivent faire face, de plus en plus fréquemment, à des échecs de traitement dus à des micro-organismes multirésistants (MDR), à la fois sur le terrain et en milieu hospitalier (8). Du fait de l'utilisation commune du ceftiofur (une céphalosporine de 3^e génération), chez le cheval, les résistances aux β -lactames sont devenues un problème fondamental. La résistance au ceftiofur a été documentée dans différentes situations cliniques, chez l'adulte sain (9) ou encore chez le poulain (10). Le gène *bla_{CTX-M-1}* est le plus souvent identifié (11), mais les gènes *bla_{CTX-M-2}* (12), *bla_{CTX-M-14}* (13) et *bla_{CTX-M-15}* (14) ont également été détectés. Ces gènes codant pour des β -lactamases à spectre étendu (BLSE) ont été trouvés à la fois sur des chevaux sains ou sur des chevaux ayant une infection clinique. Le gène *bla_{CMY-2}* a été identifié en Amérique du Nord et en Europe, mais jusqu'à présent il a été trouvé seulement dans des cas d'infections cliniques (15). Les variantes *bla_{CMY-34}*, *bla_{CMY-53}* ont été identifiées chez des animaux sains au Danemark (13), et la variante *bla_{CMY-7}* a été identifiée sur des chevaux en Australie (16). La dissémination de ces gènes se fait surtout par l'intermédiaire de plasmides. Les groupes d'incompatibilité identifiés sont variés, mais les principaux sont IncI, IncH et IncN, des plasmides à large spectre. Il a également été démontré que certains isolats de *E. coli* produisant des BLSE, ainsi que les plasmides portant les gènes codant pour ces BLSE, sont transmissibles du cheval à l'humain et aux mouches qui vivent en contact rapprochés (17). Cependant, il n'y a pas de données sur la capacité zoonotique de ces isolats. Pour l'instant, aucun clone « à haut risque » Gram négatif n'a été identifié dans cette espèce. En Angleterre, une étude a démontré que l'hospitalisation et des traitements avec des antibiotiques augmentaient le risque d'excréter des bactéries multirésistantes chez le cheval (18). L'enjeu majeur de cette filière est d'acquérir un maximum de données supplémentaires à la fois au niveau moléculaire et épidémiologique, avec toutefois des moyens financiers limités. Nous avons donc choisi d'étudier des chevaux sains

dans deux territoires différents (France et Québec), afin de pallier un manque évident de données dans cette catégorie de la population équine.

La filière porcine est une filière de production de la viande. Les possibles risques de santé publique engendrés par la dissémination des résistances via la chaîne alimentaire font que la surveillance est bien documentée. Par exemple, au Québec, le laboratoire ECL réalise une surveillance passive, en continu, des isolats cliniques porcins qu'il reçoit quotidiennement. Dans ce cadre, depuis le début de l'année 2014, une augmentation substantielle du nombre et de la sévérité des cas de diarrhée du porcelet a été détectée. La diarrhée néonatale et post-sevrage du porcelet est très souvent causée par des *E. coli* entérotoxigènes (ETEC). Elle entraîne des pertes économiques considérables dans la filière porcine du fait d'une mortalité et d'une perte de poids importante (19). Les ETEC produisent une ou plusieurs entérotoxines (LT, STa ou STb) et s'attachent à l'épithélium intestinal par l'intermédiaire de fimbriae dont les principaux sont des F4 et les F18 (20). D'après les données provenant du laboratoire ECL, au Québec, le pathovirotype principal est le ETEC :F4 (21). L'augmentation des cas observés en 2014 semble avoir été associée à un nouveau virotype de ETEC :F4, le LT:STa:STb:F4, qui présente de la multirésistance, mais surtout une non-susceptibilité constante à l'enrofloxacin. Cet antibiotique, de la famille des fluoroquinolones, est classé dans la catégorie de la plus haute importance pour la santé humaine par Santé Canada. Depuis 1995, au Québec, il a été démontré que les isolats ETEC :F4 possèdent des combinaisons variées d'entérotoxines, mais appartiennent à un nombre limité de clusters clonaux (basé sur le profil PFGE principalement) qui varient au cours du temps. Il semble également que les isolats appartenant au même cluster clonal peuvent être présents soit sur une même ferme porcine à deux ans d'intervalle, soit sur plusieurs sites différents (20-23). Ces données renforcent l'idée que l'augmentation des cas pourrait être due à la transmission d'un ou plusieurs clone(s) de ETEC :F4 au sein de la population porcine québécoise (23). La nature clonale de ces isolats nécessite confirmation. L'enjeu dans cette filière est donc très spécifique. Il consiste à caractériser des isolats responsables d'une problématique de terrain, afin d'apporter des solutions concrètes aux vétérinaires praticiens québécois.

REVUE DE LITTÉRATURE

Dans cette partie de l'ouvrage, nous allons voir pourquoi nous avons choisi *Escherichia coli* comme bactérie d'étude et comment, étant à l'interface entre hommes et animaux, elle pourrait être à l'origine de transferts de gènes dus aux contacts directs ou par l'intermédiaire de la chaîne de production de la viande (24).

Ensuite, nous aborderons les résistances aux β -lactames et aux fluoroquinolones qui représentent des enjeux majeurs dans les deux filières à l'étude, respectivement la filière équine et la filière porcine. Les résistances à ces deux familles d'antibiotiques sont reconnues d'importance critique par la communauté internationale (25).

Puis, nous examinerons les mécanismes de dissémination des gènes de résistance à ces deux familles d'antibiotiques. Comme nous allons le voir, une des questions primordiales est le type de transfert prédominant entre les différentes espèces animales et humaine, à savoir un transfert clonal, ou un transfert d'éléments génétiques mobiles. Nous verrons comment les deux espèces animales à l'étude (l'espèce équine et l'espèce porcine) illustrent chacune un des deux mécanismes de dissémination.

La dernière partie de la revue de littérature sera consacrée aux différents facteurs de risque de la présence de ces gènes de résistance et aux facteurs de dissémination des différents éléments porteurs de ces gènes, en insistant particulièrement sur les deux espèces animales étudiées.

***E. coli* comme indicateur de l'antibiorésistance**

***E. coli*, une bactérie ubiquitaire**

Caractéristique de *E. coli*

Découverte en 1885, par Théodor Escherich dans des fèces d'un enfant (26), *Escherichia coli* est un bacille Gram négatif, non sporulant, anaérobie facultatif, de la famille des *Enterobacteriaceae*. Elle est le plus souvent commensale et occupe principalement le tube digestif des animaux à sang chaud, mais aussi des reptiles (27). Elle croît sur des milieux bactériologiques simples, tels que des géloses MacConkey, sur lesquelles elle forme en général de grosses colonies roses. Certaines de ses caractéristiques, incluant une réaction positive à l'indole, un résultat négatif aux tests de production d'uréase et d'hydrogène sulfide et une incapacité à utiliser le citrate comme seule source de carbone, facilitent sa reconnaissance en laboratoire. Sa température de croissance idéale est 37°C. Elle peut être non motile ou motile avec des flagelles péritriches. Du fait de sa facilité de mise en culture, de son innocuité et de sa reproduction rapide, elle est devenue, au fil du temps, un organisme modèle pour de nombreux microbiologistes du XX^e siècle, et reste de nos jours un organisme très étudié à la fois en microbiologie classique, mais aussi en microbiologie moléculaire (28). Bien qu'en infériorité numérique par rapport aux bactéries anaérobies, *E. coli* est l'espèce anaérobie facultative prédominante dans le tractus gastro-intestinal. Elle est typiquement présente à hauteur de 10⁷ à 10⁹ organismes par gramme de fèces chez les mammifères. Son rôle précis dans l'ensemble du microbiome intestinal n'est pas encore défini et reste actuellement à l'étude (29).

Le génome de *E. coli* est constitué de deux parties. La première partie est appelée, en anglais, le « core » génome, code pour les fonctions essentielles de la cellule (28). La deuxième partie du génome est plus flexible, spécifique à chaque souche, et code pour des facteurs impliqués dans l'adaptation des bactéries à leur environnement (ou fitness, en anglais). Ce type d'adaptation inclut la capacité de colonisation, de virulence, ou de résistance aux antibiotiques ou aux désinfectants (28). Dans ce cadre, les éléments génétiques mobiles font partie du génome flexible. La combinaison de ces deux génomes est appelée pan-génome. En raison de cette variabilité, la taille du génome de *E. coli* varie entre 4.6 et 5.6 millions de paires de bases (Mbp) (30). Du fait de cette capacité d'adaptation du génome, de son ubiquité et de

ce fait de cette exposition continue, *E. coli* est particulièrement prédisposé à l'acquisition de gènes de résistances antimicrobiennes, ce qui en fait un candidat parfait pour devenir un réservoir de gènes d'antibiorésistance.

Une partie des souches de *E. coli* sont pathogènes. Elles sont classifiées par pathotypes en fonction des facteurs de virulence qu'elles portent et des mécanismes qui causent les maladies dont elles sont responsables. Les facteurs de virulence sont codés par des gènes de virulence. Ils peuvent être présents sur le chromosome bactérien ou, plus souvent, sur des éléments génétiques mobiles. Les gènes codant pour les entérotoxines ou les fibrilles sont en général portés par les plasmides. Les gènes codant pour la production des shiga-toxines sont en général portés par les phages, Les gènes codant pour les facteurs de virulence induisant des lésions d'attachement et d'effacement (AE) sont quant à eux situés dans les îlots de pathogénicité (IPA) qui se trouvent sur le chromosome (31).

Classification de *E. coli* (commensal et pathogène)

Les techniques de différenciation classiques

(a) Le sérotypage.

Le sérotypage reste une des méthodes les plus répandues pour la différenciation des souches de *E. coli*. Cette technique, utilisée depuis les années 1940 (32), fut une des premières permettant d'identifier de manière probabilistique les souches pathogènes. Elle consiste à utiliser des anticorps pour détecter la présence d'antigènes de surface (33, 34). Les antigènes testés sont principalement :

- L'antigène O, porté par la portion polysaccharidique distale du lipopolysaccharide (LPS). Il y a actuellement environ 181 antigènes O décrits. La méthode conventionnelle de reconnaissance est basée sur la réaction d'agglutination de l'antigène O avec de l'antisérum de lapin contre chaque sérotype O. Cependant, cette technique est laborieuse en plus d'être subjective.
- L'antigène H, originaire de protéines de flagelles. Il y a actuellement 53 antigènes H connus, qui servent communément pour le typage.
- L'antigène K, provenant de la capsule polysaccharidique, n'est plus utilisé en routine, sauf pour certains comme K1.

- L'identification de certains antigènes F (provenant des fibrilles) apporte également une information importante pour la caractérisation de certaines souches, en particulier les ETEC.

De manière générale, les nouvelles méthodes de sérotypage moléculaire, soit par PCR, soit basées sur la détection des gènes *in silico*, sont plus fiables (35).

(b) Les phylogroupes

La classification par phylogroupe se faisait, à l'origine, par électrophorèse enzymatique multi locus ou par ribotypage (36, 37). Ces techniques classaient initialement les souches de *E. coli* en 4 groupes distincts : A, B1, B2 et D. Elles étaient utilisées pour différencier des souches pathogènes (appartenant majoritairement aux groupes B2 et D (38)), des souches commensales (appartenant plus souvent aux groupes A et B1). Cependant, ces techniques étaient laborieuses et manquaient de discrimination. L'équipe de Clermont et al. a développé des techniques de PCR multiplex pour tenter de pallier à ces deux problèmes (37, 39). Les souches de *E. coli* peuvent être maintenant classées en 9 groupes phylogénétiques principaux (A, B1, B2, C, D, E, F, et G), appartenant à *E. coli stricto sensu* et au clade 1 de *Escherichia* cryptique (37, 39) (40, 41). Cette technique peut être réalisée par PCR *in silico* avec les données de séquençage du génome complet (42).

(c) Le typage de séquence par multi locus (MLST)

À partir du moment où le séquençage de gènes a été intégré dans la routine des laboratoires de microbiologie (dans les années 90), la technique de MLST a été proposée pour différencier les bactéries (43). Cette technique implique le séquençage de 7 gènes (chez *E. coli*) de ménage. Ces gènes sont hautement conservés. L'analyse de leur variation d'une souche à l'autre permet une classification phylogénétique. Pour *E. coli*, il existe deux classifications de référence :

- Warwick (ou Achtman) (44) : les gènes utilisés sont : *adk* (adenylate kinase), *fumC* (fumarate hydratase), *gyrB* (ADN gyrase), *icd* (isocitrate/isopropylmalate dehydrogenase), *mdh* (malate dehydrogenase), *purA* (adenylosuccinate dehydrogenase), *recA* (motif de liaison ATP/GTP)
- Pasteur : les gènes utilisés sont : *dinB*, *icdA*, *pabB*, *polB*, *putP*, *trpA*, *trpB*, *uidA* (45).

La classification de Warwick est plus souvent utilisée et la banque de données est donc plus fournie, ce qui rend la classification plus précise. C'est cette classification que nous utilisons dans cet ouvrage. Cette technique est basée sur le séquençage des gènes, soit faisant suite à une analyse PCR soit à l'aide du séquençage du génome complet (46). Toutes les bactéries peuvent être classées (il n'existe pas de catégorie « non-typable »). En revanche, c'est une technique moins discriminante que l'électrophorèse à champ pulsé (voir paragraphe suivant) et relativement laborieuse.

(d) L'électrophorèse à champs pulsé (PFGE)

Pour cette technique, la première étape est de fragmenter l'ADN chromosomique et plasmidique de la bactérie grâce à une enzyme de restriction qui coupe l'ADN à certains sites spécifiques en plusieurs fragments de différentes tailles (47). Ensuite, on fait migrer l'ADN (chargé négativement) dans le gel soumis à un champ électrique discontinu (48). La comparaison des profils PFGE des bactéries étudiées permet de créer des arbres phylogénétiques construits sur le degré de similarité de ces profils. Cette technique a été pendant longtemps reconnue comme étant le test de référence pour comparer des souches lors d'une éclosion (« outbreak » en anglais) d'une maladie infectieuse bactérienne (47). Cependant, elle est très laborieuse et reste relativement critiquée pour son manque d'objectivité et son manque de fiabilité vis-à-vis de la recombinaison homologue (49). En effet, la corrélation entre le degré de similarité des empreintes PFGE ne permet pas nécessairement de retrouver un lien phylogénétique réel (50).

(e) Autres

D'autres procédures de différenciation des souches incluent l'analyse d'ADN polymorphique (RAPD), l'analyse des loci VNTR (MLVA), le profil plasmidique ou encore le profil de résistance aux antibiotiques. La description de toutes ces techniques est au-delà du sujet de ce travail.

La technique de différenciation « nouvelle génération » : le séquençage du génome complet (Whole genome sequencing (WGS) en anglais)

Le séquençage du génome complet (SGC) est très précis dans la caractérisation microbienne (virus, bactéries, parasites, etc.). Cette technique a été récemment popularisée du fait de la diminution de son coût et de la difficulté technique qu'elle représente (51). En tant que bactérie modèle, le génome de *E. coli* a déjà été très étudié. Le SCG permet, en une analyse de laboratoire, d'obtenir une mine d'informations sur les gènes de virulence, de résistance et

de fitness de la bactérie (52). À partir des données de séquençage, on peut également classer les bactéries d'un point de vue phylogénétique (53, 54). Les informations sur le sérotype (35), le phylogroupe (42), ou le patron de MLST classique (46) peuvent toutes être déduites très facilement par analyse *in silico*. De plus, on peut analyser les séquences de manière beaucoup plus précise. Grâce à différentes techniques basées sur les données de séquençage. On peut classer ces techniques d'analyse en deux grandes catégories (55):

- Une analyse phylogénétique basée sur le polymorphisme d'un nucléotide simple (single nucleotide polymorphism (SNP) en anglais) (56).
- Une analyse phylogénétique basée sur le MLST étendu soit au « core » génome (cgMLST) (57), soit au pan-génome (wgMLST)(58). Ces techniques utilisent le même principe que le MLST classique (analyse de la variation d'allèles de gènes communs), mais le nombre de gènes est largement augmenté, puisqu'en général quand le séquençage est de bonne qualité on arrive à se baser sur environ 2500 gènes pour une analyse cgMLST ou plus pour le wgMSLT.

E. coli entérotoxigène (ETEC) chez le porc

Il existe de nombreuses souches de *E. coli* pathogènes, à la fois chez les animaux et chez les humains. Nous allons focaliser ce travail sur le pathotype d'intérêt pour notre recherche, à savoir les ETEC chez le porc. Les ETEC sont des agents causatifs communs de diarrhée chez les porcs (59). Ils produisent des entérotoxines et des adhésines qui permettent l'adhésion et la colonisation intestinale (60). Les fimbriae (F4, F5, F41, F6, et F18) sont responsables de l'attachement cellulaire (61, 62). La présence des gènes codant pour ces fimbriae est utilisé pour déterminer le pathovirotype d'une souche (par exemple le pathovirotype ETEC:F4). Les entérotoxines sont soit thermostables (par exemple STa ou STb), soit thermolabiles (LT). La présence des gènes codant pour ces entérotoxines est utilisée pour classer les isolats selon le virotype (par exemple LT :STb :STa:F4).

(a) Les facteurs d'adhérence

Les fimbriae sont des structures filiformes attachées à la surface des bactéries. Ils jouent un rôle majeur dans l'attachement à la paroi intestinale de l'hôte (61, 62).

- Le fimbriae F4 (K88) est une structure fibrillaire, qui est composée d'une sous-unité mineure et d'une sous-unité majeure (61). Il existe 3 variantes antigéniques de F4 :

F4ab, F4ac, F4ad. L'adhérence induite par ce fimbriae est spécifique d'espèce (60). Les ETEC porteurs du facteur F4 sont pathogènes exclusivement chez le porc.

- Le fimbriae F18 est long et fortement flexible. L'adhésine FedF est responsable de l'adhésion (63). Il existe deux variants de F18 (ab et ac). F18ab est souvent associé à des souches STEC. Ces souches sont, en général, impliquées dans la maladie de l'œdème (20). Certaines souches produisant des entérotoxines et shiga-toxines se nomment les ETEC :STEC :F18. Elles sont associées à des cas de diarrhée plutôt qu'à des cas de la maladie de l'œdème.
- Il existe d'autres structures responsables de l'adhésion, tel que les fimbriae F5 et F6 ou l'adhésine non fibrillaire AIDA.

(b) Les entérotoxines.

Il existe deux classes majeures d'entérotoxines. : les entérotoxines stables à la chaleur (ST) et les entérotoxines labiles à la chaleur (LT). Ces dernières sont inactivées lorsqu'elles restent plus de 15 minutes à 60°C. Les entérotoxines sont codées par des gènes plasmidiques. Elles causent des déséquilibres électrolytiques au sein du métabolisme intestinal, mais ne causent pas, à proprement parler, de lésions pathologiques ou de modifications morphologiques des cellules intestinales épithéliales (64).

- STa est un peptide de 2000 Dalton (Da). Le gène *estA* codant pour STa est plasmidique (65). La figure 1 illustre son mécanisme d'action.
- STb est un peptide de 5000 Da. Il n'est pas relié à STa en termes de composition ou de mécanismes d'action. La majorité des souches ETEC porcines produisent la toxine STb (65). La figure 2 illustre son mécanisme d'action.
- LT (Enterotoxines sensibles à la chaleur) a un gros poids moléculaire (84 kDa). Il existe deux sous-types de LT : LT-I et LT-II. La toxine LT-I est neutralisée par les toxines anti-choléra et est principalement retrouvée chez le porc (60). C'est une toxine complexe, composée de plusieurs sous-unités : une sous-unité A qui est active biologiquement et 5 sous-unités B. La figure 3 illustre son mécanisme d'action.

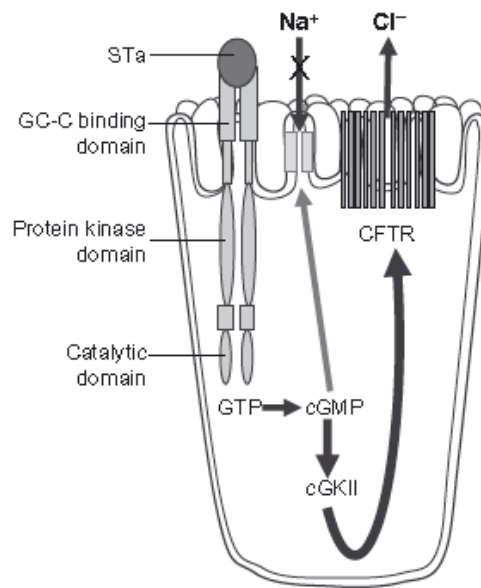


Figure 1: Mécanisme d'action de STa. En se liant à son récepteur (GC-C) la protéine STa active le domaine catalytique du récepteur et ainsi cause la conversion de GTP en cGMP (66). Numéro de licence de l'autorisation de reproduction 4810851450258.

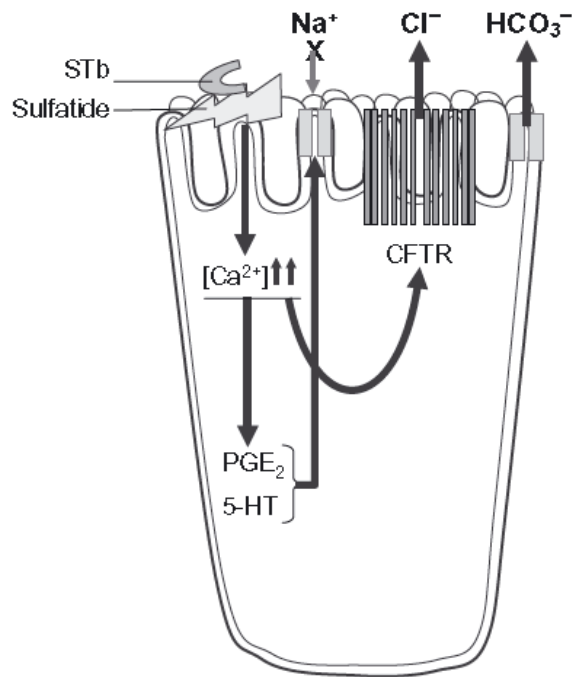


Figure 2 : Mécanisme d'action de l'entérotoxine STb. En se liant à son récepteur sulfatide, la protéine STb provoque une augmentation du calcium intracellulaire. Ce niveau de calcium augmenté active le CFTR et la sécrétion de prostaglandine et de 5-hydroxytryptamine, ce qui augmente la sécrétion de Cl- et de HCO₃⁻ et inhibe l'absorption de Na+(66). Numéro de licence de l'autorisation de reproduction 4810851450258.

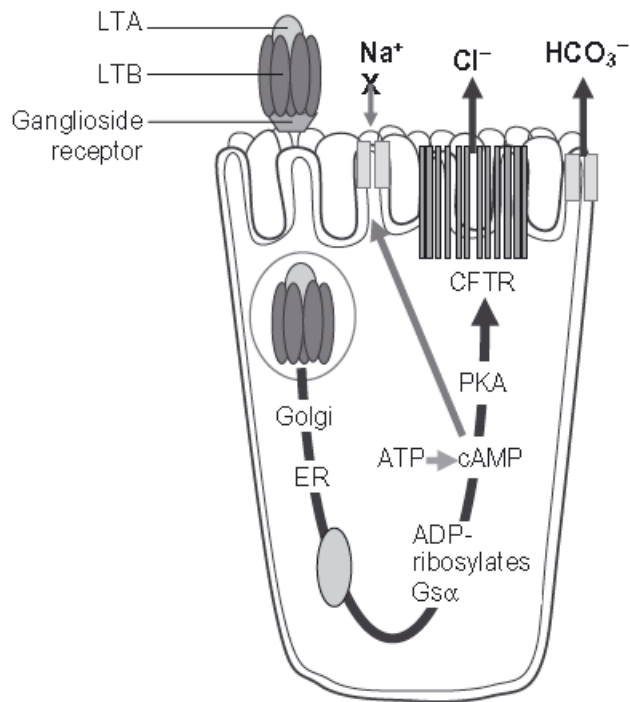


Figure 3 : Mécanisme d'action de LT. LT se lie au récepteur GM1 résultant en une internalisation par endocytose induite par les récepteurs. Après le transport vers l'appareil de Golgi, le LTA1 est translocalisé vers le cytosol où il se lie à l'ADP – ribosylates qui irrévérablement, stimule la production d'AMP cyclique. L'AMPc augmente la production de protéine kinase A, conduisant à l'activation du CFTR qui entraîne la sécrétion de Cl⁻ à partir de cellules épithéliales, ce qui stimule la sécrétion de HCO₃⁻ (66). Numéro de licence de l'autorisation de reproduction 4810851450258.

(c) La pathogénie des ETEC chez le porc

La transmission des ETEC se fait par la voie oro-fécale. Lorsqu'ils sont présents en quantité suffisante, ils sont capables de coloniser le tube digestif de l'hôte. La figure 4 illustre la pathogénie des ETEC. Les facteurs qui favorisent le développement des signes cliniques sont le manque d'hygiène (67, 68), la désinfection inadéquate, l'excès de courant d'air et la température plus froide (15°C vs 30°C)(69), un système de mise bas en continu (20) ou encore des modifications dans la fréquence des repas et une augmentation du nombre de truies sur la ferme (70). Les deux périodes les plus critiques sont les quelques jours suivant la naissance des porcelets, et juste après le sevrage. En effet, ce sont les deux périodes où les porcelets sont les plus fragiles. Juste après la naissance, les défenses immunitaires doivent se mettre en place. Le sevrage est un moment stressant pendant lequel les défenses immunitaires sont également plus faibles (19, 71). La modification de l'alimentation est aussi un facteur de fragilité. Dans ces deux groupes d'âge, une des problématiques importantes qui peut empirer les signes cliniques est la présence de co-infections avec d'autres agents pathogènes, tels que

le rotavirus (72). La plupart du temps, cliniquement, cela se traduit par une diarrhée très aqueuse qui se résout avec un traitement antibiotique, mais la colibacillose peut également se compliquer en Syndrome de Réponse Inflammatoire Systémique puis en choc septique (SIRS) (73) et entraîner la mort très rapidement (71). Lorsque les mesures d'élevages incluent une proportion élevée de protéines dans la ration (tel que du plasma), des agents acidifiants, ou de l'oxyde de zinc, les SIRS peuvent être retardés et apparaître plutôt à la fin de la période de sevrage, au moment de l'entrée à l'engraissement (71).

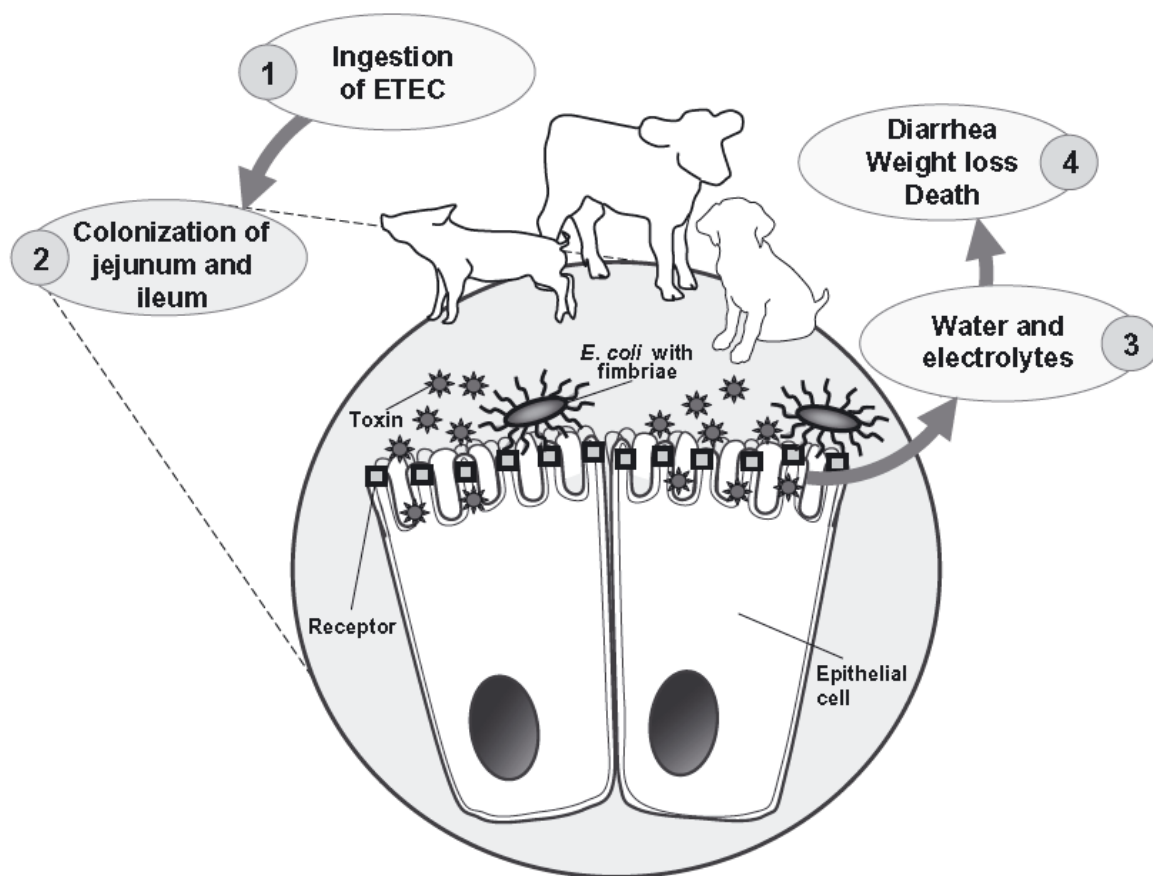


Figure 4 : Représentation schématique des étapes impliquées dans la pathogenèse de l'infection par des ETEC. Les isolats ETEC présents dans l'environnement de l'animal sont ingérés (étape 1), ils traversent l'estomac, adhèrent à l'épithélium intestinal où ils produisent des entérotoxines (étape 2) qui stimulent la sécrétion d'eau et d'électrolytes dans la lumière intestinale (étape 3). La perte d'eau et d'électrolytes entraîne de la diarrhée, une perte de poids et éventuellement la mort (étape 4) (66). Numéro de licence de l'autorisation de reproduction 4810851450258.

Connaissance sur E. coli chez le cheval

E. coli entraîne moins de pathologies chez le cheval que dans d'autres espèces. Le manque de chapitre consacré à cette bactérie dans une des bibles de l'infectiologie équine le confirme (74).

(a) Septicémie néonatale

E. coli peut causer un SIRS allant jusqu'au choc septique hautement fatal chez le poulain nouveau-né. Il est en réalité l'agent pathogène le plus communément isolé chez les poulains septiques (75, 76). Cependant, les cas sont décrits principalement dans des études rétrospectives orientées vers la clinique. La caractérisation des facteurs de virulence n'a été que rarement réalisée. Les polyarthrites, méningites, et pneumonies peuvent se développer et sont accompagnées d'un pronostic très sombre.

(b) Infection du tractus urinaire

E. coli est un agent pathogène plus souvent isolé chez les chevaux présentant des cystites (77), et a aussi été isolé dans l'urine des chevaux sains. Il semble qu'une concentration au-dessus de 20 000 CFU/mL traduit un phénomène pathologique (78). La colonisation urétrale implique l'adhérence de bactéries aux cellules épithéliales. Typiquement, les bactéries fécales (surtout chez la femelle) qui possèdent des pili (adhésines fibrillaires) se lient aux récepteurs glycolipidiques des cellules uroépithéliales et pénètrent dans le tractus urinaire. À la connaissance de l'auteur, la caractérisation des *E. coli* responsables d'infections urinaires, chez le cheval, n'a jamais été réalisée. Cependant, il est légitime de penser que comme dans d'autres espèces, un petit nombre de souches spécifiques sont responsables de la majorité des infections (79).

(c) Les infections du tractus génital

E. coli est fréquemment isolé chez les juments présentant des endométrites. Encore une fois, les articles rapportant ces données sont orientés vers la clinique et l'identification des facteurs de virulence n'a pas été réalisée (80, 81). La réponse immunitaire induite par *E. coli* dans l'utérus a été largement étudiée et met en jeu la production de pièges extracellulaires par les neutrophiles (*Neutrophils extracellular traps = NET*) in vitro (82).

(d) Les syndromes opportunistes

Certains ExPEC peuvent également apparaître de façon opportuniste chez des patients dont le système immunitaire est compromis. Par exemple, ExPEC O2 :H21 a été associé avec une bronchopneumonie fatale chez un Quarter Horse de 12 ans (83).

(e) Les entérocolites

Bien que quelques cas de chevaux présentant de la diarrhée et chez lesquels l'identification de ETEC ait été rapportée, il n'y a aucune évidence que la présence de ce microorganisme soit en rapport avec les lésions observées (84). En effet, l'inoculation d'ETEC à des poulains n'a pas reproduit de diarrhée ou d'autres signes cliniques non spécifiques (85). Une étude réalisée en 2000 rapporte que le seul facteur de virulence retrouvé chez *E. coli*, sur des chevaux en diarrhée par rapport à des chevaux sains, est le facteur F17 (86). D'après ce rapport, F17 pourrait donc être impliqué dans la pathogénie de problèmes entériques chez le cheval dus à *E. coli*. Cependant, la confirmation de ce résultat nécessite d'autres investigations à plus grande échelle. Les autres formes de colibacillose associées à des problèmes entériques n'ont pas été rapportées chez le cheval adulte. L'opinion actuelle est donc que *E. coli* a peu d'importance dans les maladies entériques dans cette espèce.

***E. coli* comme indicateur de résistance aux antibiotiques**

Ubiquité

L'existence de *E. coli* dans le tube intestinal de tous les animaux à sang chaud et des reptiles permet une comparaison de la présence des gènes de résistance aux antibiotiques entre les différentes espèces et les différents pays. Ces comparaisons sont essentielles dans un contexte de surveillance et pour savoir quels sont les facteurs influençant la variation des résistances. À titre d'exemple, on peut citer une étude de Vounba et al (87) qui étudie la présence de gènes de résistance à la colistine chez *E. coli* aviaire, dans trois pays différents. Cette étude permet d'émettre des hypothèses sur l'influence des habitudes d'utilisations d'antibiotiques sur la présence de résistance dans ces différents pays.

Présence de la résistance aux antibiotiques chez les *E. coli* pathogènes

L'acquisition de résistance aux antibiotiques chez les souches pathogènes de *E. coli* cause un réel problème de santé publique et de santé animale comme en témoignent les divers exemples suivants :

- Les *E. coli* ExPEC ST131 causent des infections urinaires et des SIRS chez l'humain. Ils sont très difficiles à traiter puisqu'ils sont résistants à la fois aux quinolones et aux β -lactames. Ce clone est l'archétype du clone à haut risque (88) (concept détaillé plus loin).
- Les *E. coli* ExPEC ST410 causent également des SIRS chez l'homme. Ils sont aussi résistants aux fluoroquinolones et porteurs de plusieurs carbapénémases (89). Ils sont donc également très difficiles à traiter.
- Il existe nombreux exemples de *E. coli* ETEC/STEC porteurs de plasmides conférant de la résistance aux différentes classes d'antibiotiques. Ces *E. coli* sont, eux aussi, difficiles à traiter chez le porc (19).

L'étude de *E. coli* permet l'obtention d'une image globale de la situation.

La comparaison phylogénétique entre les différentes souches de *E. coli*, ainsi que les éléments génétiques mobiles qu'ils transportent, permet d'obtenir des renseignements sur le transfert de résistances entre les différentes espèces bactériennes et parmi de différents hôtes de *E. coli*. Par exemple, le transfert du plasmide IncI1 porteur du gène *bla_{CTX-M-1}* entre des *E. coli* humains et aviaires a été mis en évidence (90).

Pour toutes ces raisons, *E. coli* est un candidat parfait pour la surveillance de la résistance aux antibiotiques, tel que cela est d'ailleurs recommandé par l'ECDC (25).

Les résistances antibiotiques importantes

Quelques définitions

Certaines définitions dans la littérature nécessitent une clarification.

Multirésistance

Jusqu'à 2012, les termes « multirésistants », « résistants extensifs » et « panrésistants » étaient définis de manière variable. La diversité des définitions rendait les comparaisons entre études et la communication de l'information extrêmement difficiles (91). De 2008 à 2012, un groupe d'experts internationaux s'est employé à uniformiser ces définitions, dans le but de rendre comparables les informations publiées (92). La première étape du groupe d'experts a été de créer des catégories d'antibiotiques, utiles en clinique, pour chaque agent pathogène. Pour *E. coli*, 17 catégories d'antibiotiques ont été assignées. Elles sont détaillées dans le Tableau 1 (adapté de (92)). Les agents antibiotiques dans chaque catégorie ont été choisis de manière la plus exhaustive possible afin de refléter les pratiques médicales humaines dans la plupart des pays du monde.

Tableau 1 : Liste des antibiotiques par catégories selon Magiorakos et al.

Catégorie d'antibiotique	Agent antibiotique
Aminoglycosides	Gentamicine
	Tobramycine
	Amikacine
	Netilmicine
Céphalosporines anti-MRSA	Ceftaroline
Pénicillines Antipseudomonale + inhibiteurs de β -lactamases	Ticarcilline + Acide Clavulanique
	Piperacilline + Tazobactame
	Ertapénème
Carbapénèmes	Imipenème
	Méropénème
	Doripénème
Céphalosporines de 1 ^{re} et 2 ^e génération	Céfazaline
	Céfuroxime

	Cefotaxine ou Ceftriaxone
Céphalosporines de 3 ^e et 4 ^e génération	Ceftazidime
	Cefepime
Céphamycines	Cefoxitin
	Cefotetan
Fluoroquinolones	Ciprofloxacine
Inhibiteurs de la voie des folates	Triméthoprime-Sulphaméthoxazole (TMS)
Glycylcyclines	Tigécyclines
Monobactames	Aztréonam
Pénicillines	Ampicilline
	Amoxicilline + Acide Clavulanique
Pénicillines + inhibiteurs de β -lactamases	Ampicilline + Sulbatame
Phénicolés	Chloramphénicol
Acide Phosphonique	Fosfomycine
Polymyxines	Colistine
	Tétracycline
Tétracyclines	Doxycycline
	Minocycline

Ce tableau ayant été réalisé pour la médecine humaine, il n'est donc pas surprenant de ne pas retrouver le ceftiofur ou l'enrofloxacin, car ces deux molécules sont utilisées en médecine vétérinaire seulement. Il n'existe pas à l'heure actuelle de consensus pour les termes MDR, XDR et PDR en médecine vétérinaire (93). Nous avons donc adapté ce tableau en incluant la résistance au ceftiofur et à l'enrofloxacin.

Résistance vs non-susceptibilité.

Dans ce consensus, les résistances intrinsèques n'ont pas été prises en compte. De plus, un isolat bactérien est classé non susceptible à un antibiotique s'il est résistant ou intermédiaire selon les seuils cliniques déterminés par l'EUCAST (94, 95), le CSLI (96) ou l'Administration américaine des aliments et des médicaments (FDA). La résistance à une catégorie d'antibiotique est définie par le fait d'être non susceptible à au moins un agent de cette catégorie.

Définitions utilisées dans notre ouvrage

Les définitions proposées dans le consensus (92) et donc celles que nous avons utilisées sont les suivantes. Pour des raisons de cohérence avec la littérature anglaise les abréviations anglaises seront utilisées : MDR (multidrug resistant) pour multirésistant, XDR pour résistant extensif, et PDR pour panrésistant.

- Un MDR est non susceptible à au moins un agent dans trois catégories d'antibiotique ou plus.
- Un XDR est non susceptible à au moins un agent dans toutes les catégories d'antibiotique sauf deux catégories (ces agents restent susceptibles à des antibiotiques dans au moins une ou deux catégories).
- Un PDR est non susceptible à tous les antibiotiques testés, dans toutes les catégories définies.

Lorsque les antibiogrammes ne sont pas complets, il est conseillé d'utiliser les termes « possible XDR » ou « possible PDR ».

Classifications des antibiotiques par ordre d'importance

Dans le but d'améliorer l'utilisation des antibiotiques en médecine humaine et de réglementer, au mieux, l'usage des antibiotiques en médecine vétérinaire, plusieurs classifications des familles d'antibiotiques, par ordre d'importance, ont été proposées dans les dernières années. Nous allons détailler les plus pertinentes pour notre travail.

Santé Canada

Santé Canada a établi une classification par rapport à l'importance de la molécule en santé humaine, dans laquelle il existe 4 catégories décrites dans le Tableau 2.

Tableau 2 : Critères de catégorisation des antibiotiques par Santé Canada

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

Catégorie I : Très haute importance

Ces antibiotiques sont de très haute importance pour la médecine humaine. Ils sont essentiels dans le traitement des infections bactériennes sévères. De plus, il existe très peu ou tout simplement pas d'alternative permettant un traitement efficace en cas d'urgence d'une résistance à ces agents. On peut citer par exemple : les carbapénèmes, les céphalosporines (troisième et quatrième générations), les fluoroquinolones, les glycopeptides, les glycylicyclines, les nitroimidazoles (métronidazole), les oxazolidinones, les pénicillines résistantes aux β -lactamases (Associations) ou encore les polymyxines (colistine).

Catégorie II : Haute importance

Ces antibiotiques peuvent être utilisés pour traiter plusieurs types d'infections bactériennes (infections graves incluses), mais il existe généralement des alternatives disponibles. En voici quelques exemples : les aminoglycosides administrés par voie générale, les pénicillines et céphalosporines (1^{re} et 2^e générations et céphamycines), les macrolides, les quinolones (sauf fluoroquinolones), ou encore le triméthoprime/sulfaméthoxazole.

Catégorie III : Moyenne importance

Les antibiotiques de cette catégorie sont utilisés pour le traitement d'infections bactériennes pour lesquelles des médicaments de remplacement sont généralement disponibles. Les infections causées par des bactéries résistantes à ces médicaments peuvent être traitées avec des antibiotiques de catégorie I ou II. En voici quelques exemples : les aminoglycosides utilisés en agents topiques, les phénicolés, les sulphonamides, les tétracyclines ou le triméthoprime seul.

Catégorie IV : Faible importance

Pour l'instant, les antibiotiques de cette catégorie ne sont pas utilisés en médecine humaine. La création de la quatrième catégorie est spécifique au Canada, elle n'est pas reconnue au niveau international. Elle peut être responsable de confusion auprès du grand public. Les représentants plus importants de cette catégorie sont les ionophores.

Classification de l'organisation Mondiale de la Santé (OMS)

La classification des catégories d'antibiotiques par l'OMS (97) est basée sur 3 niveaux d'importance :

- Importance critique, par exemple : les céphalosporines (à partir de la 3^e génération), les quinolones ou encore les carbapénèmes,
- Importance élevée, par exemple : les phénicolés, les céphalosporines de 1^{re} et 2^e génération ou encore les pénicillines,
- Important, par exemple : les aminocyclitol ou les nitrofurantoinés.

L'appartenance à chaque niveau d'importance est déterminée par 5 critères :

- C1 : Classe d'antibiotique qui est la seule, ou quasiment la seule, à traiter des infections humaines graves,
- C2 : Classe d'antibiotiques utilisée pour traiter des infections humaines dues à des bactéries qui 1) sont d'origine non humaine, mais peuvent être transmises à l'homme, ou 2) peuvent acquérir des gènes de résistance d'une source non humaine,
- P1 : Classe d'antibiotique qui est la seule ou une des rares permettant de traiter des infections humaines sévères, soit présentes chez un grand nombre de patients, soit fréquentes chez des patients hospitalisés,

- P2 : Classe d'antibiotiques utilisée fréquemment pour traiter des infections humaines sévères ou non, ou pour traiter des infections humaines sévères chez des patients hospitalisés, et dont l'utilisation peut dans tous les cas favoriser la sélection de résistance,
- P3 : Classe d'antibiotiques utilisée pour traiter des infections humaines pour lesquelles la transmission de bactéries résistantes ou de gènes de résistance à partir de sources non humaines est démontrée.

Classification européenne prenant en compte l'aspect vétérinaire.

Au sein de l'Union européenne, la plupart des pays (comme la France) se basent sur la classification de l'OMS. Cependant, il existe également une classification des antibiotiques considérant le risque pour la santé publique dû à l'usage de ces antibiotiques en médecine vétérinaire. Cette classification comprend 4 catégories (98):

- Catégorie A (Évite) : inclut les antibiotiques autorisés en médecine humaine, mais pas en médecine vétérinaire en Europe. Cette catégorie comprend par exemple les carbapénèmes, les glycylicyclines et les céphalosporines de dernières générations (ie : ceftobiprole).
- Catégorie B (Restreint) : inclut les antibiotiques considérés à haut risque par l'OMS (à l'exception des macrolides). Pour ces antibiotiques, en raison des risques que les résistances représentent pour la santé publique, l'utilisation chez l'animal doit être régit par des restrictions spécifiques. Cette catégorie inclut les fluoroquinolones, les céphalosporines de 3^e génération et les polymyxines.
- Catégorie C (Attention) : inclut les antibiotiques considérés à haut risque par l'OMS (incluant les macrolides). Ces antibiotiques présentent une alternative en médecine humaine, mais très peu d'alternatives en médecine vétérinaire. Ils ne doivent être utilisés en médecine vétérinaire que s'il n'existe aucune possibilité efficace cliniquement et appartenant à la catégorie D. Cette catégorie comprend par exemple les aminoglycosides (à l'exception de la streptomycine), les céphalosporines de 1^{re} et 2^e génération ou le rifampin.
- Catégorie D (Prudence) : inclut les antibiotiques dont l'utilisation en médecine vétérinaire représente un risque faible pour la santé publique. Les pénicillines

naturelles, les aminopénicillines ou encore les tétracyclines font partie de cette catégorie.

Mécanisme d'action et de résistance des β -lactames et des fluoroquinolones.

Compte tenu de leur place en tant qu'antibiotiques d'importance primordiale dans toutes les classifications citées ci-haut, ainsi que de leur importance respective dans les deux filières à l'étude dans cette thèse, deux catégories d'antibiotiques ont été ciblées : les β -lactames et les fluoroquinolones. Les mécanismes d'action et de résistance seront abordés dans les paragraphes suivants.

Mécanismes d'action

Les β -lactames

Toutes les β -lactames ont en commun un anneau β -lactame qui leur confère des propriétés communes (99). Le mécanisme d'action des β -lactames consiste à empêcher la formation de la paroi cellulaire de la bactérie en interférant avec l'étape finale de la synthèse du peptidoglycane. Elles inhibent l'activité d'enzymes se liant à la pénicilline. Pour des raisons d'homogénéité avec la littérature anglaise nous appellerons ces enzymes « penicillin-binding proteins » (PBPs). Les PBPs catalysent la formation du lien entre les polymères de glycopeptides qui forment la paroi cellulaire (99). Ces molécules ont donc un effet bactéricide sur les bactéries en croissance (la synthèse de la paroi doit être en cours de manière à être vulnérable). La variation de l'activité des β -lactames dépend des différentes affinités de chaque molécule pour les PBPs. La figure 5 présente les différents mécanismes d'action sur les bactéries Gram positives et Gram négatives.

Les pénicillines, les céphalosporines, les céphamycines, les carbapénèmes et les monobactames appartiennent tous à la grande famille des β -lactames. Du fait de l'importance de ces sous-catégories dans le développement des mécanismes de résistance, nous allons décrire leurs caractéristiques plus en détails dans les paragraphes suivants.

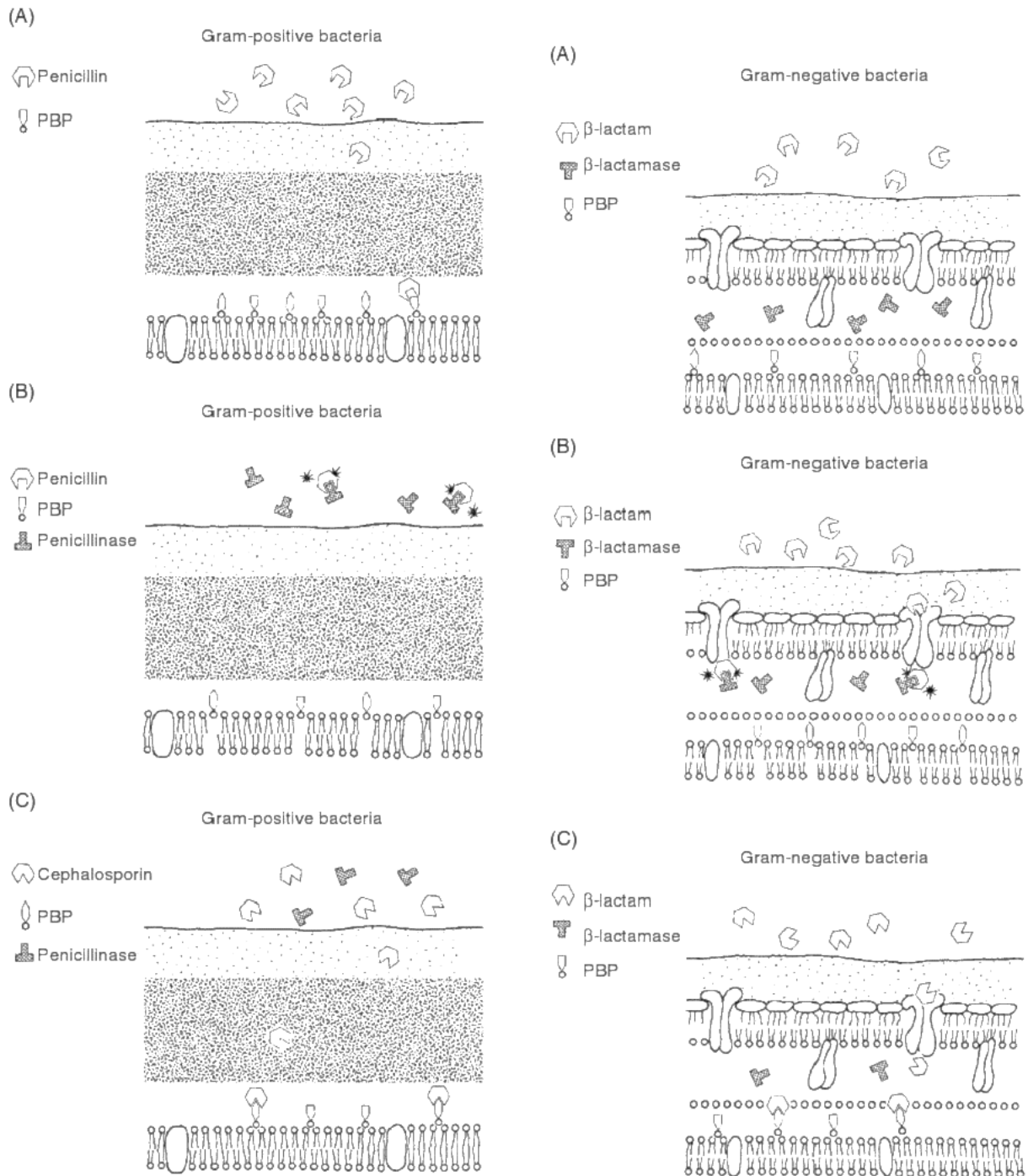


Figure 5 : Résumé des mécanismes d'action des β -lactames. A gauche : sur les bactéries Gram positives (A) Bactérie susceptible, (B) Bactéries produisant des β -lactamases exogènes (C) Bactéries produisant des pénicillinases, mais restant susceptibles aux céphalosporines. A droite : Sur les bactéries Gram négatives. (A) Bactérie résistante de manière constitutive à la pénétration des β -lactames (B) Pénétration des β -lactames mais destruction de ces β -lactames dans le périplasme (C) Bactéries susceptibles. D'après (100). Numéro de licence de l'autorisation de reproduction 4815400365306.

(a) Les pénicillines

Le tableau 3 résume les caractéristiques des pénicillines pertinentes pour la clinique, adapté et traduit de (100).

Tableau 3 : Classification des six groupes de pénicillines, adapté et traduit à partir de (101).

Groupe	Dérivés importants	Avantage de l'antibiotique
Benzyl pénicillines	Pénicilline procaïne	Bactéries Gram positives
Pénicillines absorbées	Phénoxyéthyl pénicilline	Bactéries Gram positives
Pénicillines antistaphylocoques	Oxacilline, Mécicilline	Activité contre les staphylocoques producteurs de β -lactamases (mais pas contre les staphylocoques résistants à la mécicilline (SARM))
Pénicillines à spectre étendu	Aminobenzylpénicilline (Amoxicilline et Ampicilline)	Large spectre mais sensible aux β -lactamases
Pénicillines anti-pseudomonales	Uréidopénicilline (Pipéracilline)	Activité contre les pseudomonas, mais réduction de l'activité contre les bactéries Gram positives.
Penicillines résistantes aux β -lactamases	Temocilline	Résistantes aux β -lactamases

(b) Les céphalosporines de 1re et 2e génération.

Les céphalosporines de première et deuxième génération ont été introduites initialement pour le traitement des infections à *Staphylocoques* résistants à la pénicilline. Elles avaient également l'avantage d'avoir le même spectre d'action que les pénicillines à spectre étendu sur les bactéries Gram négatives.

Les céphamycines sont très proches des céphalosporines ; ensemble, elles forment un sous-groupe appelé cephèmes. Elles comprennent le céfotétant et la cefoxitine.

(c) Céphalosporines – de 3^e,4^e et 5^e génération

Les céphalosporines de 3^e génération ont été développées entre 1970 et 1980. Elles sont plus stables que les céphalosporines des générations antérieures et ont un spectre d'activité augmenté contre les *Enterobacteriaceae* (101). Du fait du développement de résistance aux céphalosporines de 3^e génération, une quatrième génération de céphalosporines a été introduite en 1993, dont les principaux membres sont le céfépime et la cefpirome (102). Ce groupe de céphalosporines est particulièrement résistant aux β -lactamases et représente des antibiotiques de choix pour traiter des infections nosocomiales en soins intensifs. Cette catégorie d'antibiotiques est disponible en médecine vétérinaire, mais devrait être utilisée avec la plus grande prudence (103). Il existe même quelques céphalosporines de 5^e génération (ceftaroline and ceftobiprole) qui ont une activité contre les staphylocoques multirésistants (104). Le tableau 4 résume la catégorisation des céphalosporines par ordre chronologique d'apparition.

Tableau 4 : Classification des céphalosporines adaptée et traduite à partir de (101)

Groupe	Caractéristiques	Exemples
Première génération	Parentérale : Résistantes aux β -lactamases des staphylocoques, mais sensibles aux β -lactamases des <i>Enterobacteriaceae</i> . Modérément active.	Cephazaline
Première génération	Parentérale : Résistantes aux β -lactamases des staphylocoques et modérément résistants aux β -lactamases des <i>Enterobacteriaceae</i> . Modérément active.	Céfalexine
Deuxième génération	Parentérale : Résistants à beaucoup de β -lactamases. Modérément active.	Cefoxitine
Troisième génération	Parentérale : Résistants à beaucoup de β -lactamases. Fortement active.	Ceftiofur, Ceftriaxone
Troisième génération	Orale : Résistants à beaucoup de β -lactamases. Fortement active.	Cefexime

Troisième génération	Parentérale : Résistants à beaucoup de β -lactamases. Active contre <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .	Ceftazidime
Quatrième génération	Parentérale : Résistant à la plupart des β -lactamases. Fortement active.	Cefepime

(d) Carbapénèmes

Les carbapénèmes sont des dérivatifs de *Streptomyces spp.* Ils ont le plus large spectre d'activité de tous les antibiotiques (exceptés pour certaines fluoroquinolones telles que le travofloxacine) (105). Les carbapénèmes sont également résistants à de nombreuses β -lactamases. Cependant, dans les dernières années, la dissémination des carbapénémases a réduit de manière inquiétante leur efficacité (106). Ils ne sont pas approuvés en médecine vétérinaire et devraient être réservés en dernier recours, y compris en médecine humaine hospitalière. La tendance, de plus en plus fréquente, pour les hôpitaux de petits animaux d'utiliser l'imipénème en première ligne pour les animaux sévèrement malades favorise la progression du développement d'infection nosocomiale avec des organismes résistants dans ce genre de structure (107). Le problème avec leur utilisation n'est pas seulement les surinfections nosocomiales, mais aussi la contamination de l'environnement et de ce fait la persistance de micro-organismes résistants (108).

(e) Monobactams

Les β -lactames monocycliques, ou monobactams, dont l'aztréonam est le plus important, sont actifs seulement contre les bactéries Gram négatives. Leur place en médecine vétérinaire est mince. Cependant, leur résistance à certaines céphalosporinases (Groupe 1 dans la classification de Bush (109) (cette classification est détaillée plus bas)) leur confère un intérêt clinique de plus en plus important.

Les fluoroquinolones

Les fluoroquinolones consistent en un groupe d'antibiotiques synthétiques découvert dans les années 1980. Elles dérivent des quinolones et s'en distinguent notamment par l'ajout d'un atome de fluor (101). Les quinolones et les fluoroquinolones diffèrent par leur spectre respectif d'activité et leurs propriétés pharmacocinétiques. Les quinolones de 1^{re} génération

ont un spectre d'activité dirigé essentiellement contre les bactéries Gram négatives, excepté *Pseudomonas spp.* Les fluoroquinolones de 2^e génération ont un spectre élargi. La plupart des fluoroquinolones développées pour la médecine vétérinaire sont de 2^e génération. On peut citer l'enrofloxacin ou la ciprofloxacine. Les fluoroquinolones de 3^e génération (par exemple le pradofloxacin) sont, en plus, efficaces contre les streptocoques et les anaérobies obligatoires. Toutes ces molécules sont d'origine purement synthétique (110). En médecine vétérinaire, la fluméquine a été utilisée dans le traitement des infections digestives chez les animaux de rente.

Les quinolones inhibent la synthèse de l'ADN bactérien en se fixant sur le complexe "ADN-ADN gyrase" en empêchant la réplication et transcription de l'ADN bactérien (101). De manière plus détaillée, les cibles des quinolones sont l'ADN gyrase et l'ADN topoisomérase. Ce sont deux enzymes composées de deux paires de sous-unités. Pour l'ADN gyrase, ces deux sous-unités sont respectivement codées par les gènes *gyrA* et *gyrB* (97 et 90 kDa respectivement). En ce qui concerne l'ADN topoisomérase IV, les deux sous unités sont codées par les gènes *parC* et *parE* (75 et 70 kDa respectivement). Le rôle de l'ADN gyrase est d'enrouler ou de dérouler l'ADN pour permettre ou empêcher sa réplication. Les quinolones vont se lier à ces deux enzymes et bloquer la réaction, ce qui va inhiber la synthèse de l'ADN. Chez les bactéries Gram négatives, c'est la gyrase qui est le plus sensible à l'inhibition. Quelques bactéries sont capables de fonctionner avec une seule des deux enzymes, mais la plupart ont besoin des deux pour survivre (111).

Mécanismes de résistance

Les β-lactames

Il existe trois mécanismes de résistance aux β-lactames : inactivation enzymatique, modification des PBPs et diminution de la perméabilité de la membrane (101). Nous allons traiter ces trois mécanismes dans l'ordre d'importance décroissante.

(a) Inactivation enzymatique

Les enzymes inactivant les β-lactames sont appelées les β-lactamases. De manière générale, ces enzymes ont pour caractéristique d'hydrolyser l'anneau β-lactame. Avec la diversification des β-lactames, les β-lactamases ont évolué pour augmenter en efficacité.

(i) *La classification des β -lactamases.*

Historiquement, il existe deux façons de classer ces enzymes : une classification basée sur la structure primaire (c'est-à-dire la séquence d'acides aminés) appelée classification de Ambler (112), et une classification basée sur la fonction, appelée classification de Bush (109). Cependant, dans la littérature, les classifications Bush et Amber sont peu utilisées et les β -lactamases sont « classées » en 4 grands types : les β -lactamases à spectre étroit, les β -lactamases à spectre étendu, les AmpC β -lactamases et carbapénémases. À l'heure actuelle, les β -lactamases à spectre étroit représente un intérêt clinique moindre et ne seront donc pas passées en revue dans ce travail.

(a) *La classification Ambler*

Elle sépare les β -lactamases en 4 catégories selon la séquence d'acides aminés. Les catégories A, C et D sont des sérine- β -lactamases et la catégorie B sont des métallo- β -lactamases (113). La catégorie B est divisée en 3 (soit B1, B2 et B3) selon la conservation des séquences (105).

(b) *La classification Bush*

Cette classification est plus compliquée, mais elle est plus proche de l'importance clinique de chaque catégorie. Les enzymes sont classées en 3 groupes majeurs basés sur leur profil d'inhibition. Le groupe 1 comprend les céphalosporinases qui ne sont pas inhibées par l'acide clavulanique. Le groupe 2 comprend les pénicillinases, les céphalosporinases et des β -lactamases à spectre étendu (BLSE) qui sont inhibées par l'acide clavulanique (et les autres inhibiteurs classiques). Le groupe 3 est composé de métallo- β -lactamases qui sont très peu inhibées par l'acide clavulanique. Il existe un groupe 4, qui est un groupe fourre-tout pour les enzymes difficiles à classer. Le tableau suivant, reproduit à partir de l'article de Bush (109), résume les correspondances entre les deux classifications. Depuis 1995, les deux classifications se sont affinées et donc compliquées, mais nous avons choisi de présenter une version relativement simplifiée.

Tableau 5 : Classification des β -lactamases

Classification Bush	Classification Ambler	Substrat	Exemple d'enzyme
1	C	Céphalosporines	AmpC (CMY) et MIR-1
2a	A	Pénicillines	Pénicillinase chez certaines bactéries à Gram positives

2b	A	Pénicillines et céphalosporines	TEM-1 et 2 et SHV1 CTX-M
2be	A	Pénicillines, Céphalosporines (spectre étroit et large spectre), Monobactames	TEM3 à 26 et SHV-2 à 6 CTX-M
2br	A	Pénicillines	TEM-30 à 36 CTX-M
2c	A	Pénicillines et carbenicilline	PSE
2d	D	Pénicillines et cloxacilline	OXA
2e	A	Céphalosporines	Céphalosporines produites par <i>Proteus vulgaris</i>
2f	A	Pénicillines, céphalosporines et certains carbapénèmes.	KPC
3	B	Tous les β -lactames incluant les carbapénèmes.	Toutes les carbapénèmases (IMP, VIM) sauf KPC
4	N/A	Pénicillines	Pénicillinases produites par <i>Pseudomonas cepacia</i>

(ii) Les β -lactamases à spectre étendu (BLSE)

Compte tenu de leur diversification croissante, leur classification est de plus en plus compliquée, mais à l'origine ces enzymes faisaient partie de la classe A ou D dans la classification de Ambler (112) et du groupe 2b, 2be, 2br et 2d dans la classification de Bush (109). Bien qu'il n'y ait pas de consensus sur leur définition, de manière classique, les BLSE sont définies comme des enzymes ayant pour origine un parent à un spectre d'action étroit. Elles sont actives contre certaines céphalosporines de 3^e génération, la plupart des pénicillines (y compris les pénicillines à spectre étendu telles que l'ampicilline ou l'amoxicilline), et

l'aztréonam, mais pas les cephamycines. Elles sont inhibées par l'acide clavulanique, le sulbactam et le tazobactam (114).

À l'origine, cette classe regroupait des enzymes dérivant par mutation simple des gènes *bla_{TEM}* et *bla_{SHV}*, qui proviennent de *Klebsiella oxytoca* (115). Cependant, au cours des années, sont apparues des β -lactamases similaires, en termes de spectre et de mécanismes d'action, mais ayant une origine très différente. L'exemple le plus important est la famille des CTX-M (116). Les familles des PER (117) des VEB (118) sont également apparues plus tard. Les gènes codant pour ces enzymes sont, en général, portés par des plasmides. Les gènes codant pour les CTX-M, en particulier, ne résultent pas de mutations primaires, mais ont été acquis « de novo » par transfert horizontal (119). Les CTX-M étaient originellement des enzymes produites par *Kluyvera spp.* Le nom CTX-M dérive de leur activité contre la cefotaxime préférentiellement par rapport à la ceftazidime (120). Le « M » fait référence à Munich, où elles ont été décrites en premier, dans les années 1990 (121, 122).

(iii) Les AmpC β -lactamases (AmpC)

Les AmpC appartiennent à la classe C dans la classification d'Ambler et au groupe 1 dans la classification de Bush (109). Les AmpC sont peu inhibées par l'acide clavulanique, le sulbactam et le tazobactam, bien que certaines présentent une sensibilité au tazobactam. Cependant, l'oxacilline, la cloxacilline et l'aztreonam sont de bons inhibiteurs de ces enzymes.

Initialement chromosomiques, les gènes plasmidiques d'AmpC sont connus depuis 1989 (123). Dans de nombreuses *Enterobacteriaceae*, l'expression des AmpC est basse, mais peut être induite par la présence de β -lactames (124). Le gène *bla_{CMY}* est le plus fréquent, plus spécifiquement en Amérique du Nord (125). À l'heure actuelle on a dénombré 43 allèles de ce gène. Les gènes *bla_{FOX}*, *bla_{ACC}*, *bla_{LAT}*, *bla_{MIR}*, *bla_{ACT}*, *bla_{MOX}* et *bla_{DHA}* sont également décrits et ont également plusieurs variants. Certains variants sont très proches des gènes présents sur le chromosome. Par exemple, les variantes *bla_{CYM-1}*, 8, 9, 10, 11 et 19 sont reliées à l'AmpC- β -lactamase qu'on trouve dans *Aeromonas spp.* La variante *bla_{CMY-2}*, qui est actuellement la plus répandue à l'échelle mondiale, est reliée aux AmpC- β -lactamases de *C. freundii*.

Une variété d'éléments génétiques sont impliqués dans la mobilisation de gènes sur des plasmides. La séquence d'insertion *ISEcp1* est très souvent associée aux différentes variantes de CMY, en particulier CMY-2. Elle est impliquée dans la transposition de gènes adjacents, et est capable de mobiliser un gène chromosomique *bla* sur un plasmide (126). Elle joue

également un rôle efficace de promoteur et favorise une expression élevée des gènes qui l’entourent (124). Par convention, les AmpC-β-lactamases sont classées séparément des BLSE, mais d’un point de vue taxinomique cela peut poser des problèmes en ce qui concerne les mutants AmpC qui ont une activité augmentée contre la céfépime et la ceftioxime, des céphalosporines de 4e génération, qui présentent une relative stabilité devant des AmpC classiques (114). Ces mutants ayant un spectre d’activité plus important que leurs parents originaux, certains les classeraient tels que des BLSE.

(iv) Les carbapénémases (=ESBL_{CARBA})

Les carbapénémases qu’on trouve dans les *Enterobacteriaceae* sont divisées en trois types : les metallo-β-lactamases (VIM, IMP et NDM), le type KPC et le type OXA-48 (127).

Les metallo-β-lactamases présentent une diversité de séquence importante, mais partagent trois caractéristiques importantes : la capacité d’hydrolyser les carbapénèmes, la résistance aux inhibiteurs (i.e : acide clavulanique) et la susceptibilité aux agents chélateurs (i.e : EDTA). On les retrouve très souvent sur des plasmides. Elles sont actives contre la majorité des β-lactames, à l’exception des monobactames, car elle manque d’affinité pour ces molécules. Les KPC-β-lactamases ont été détectées principalement chez *K. pneumoniae*, et sont exclusivement d’origine plasmidique. Elles sont actives contre toutes des β-lactames. Les OXA-β-lactamases sont rencontrées fréquemment chez les acitenobactères. Les premiers variants OXA (tels que OXA-23 ou OXA-58) ont une activité carbapénémase très limitée. C’est en 2001 que la variante OXA-48 a été découverte chez *K. pneumoniae* (128). Cette variante présente une activité carbapénémase marquée. Le tableau suivant récapitule les différentes variantes classées comme étant des carbapénémases en fonction des catégories citées plus hauts.

Tableau 6 : Classification des carbapénémases rencontrées chez les *Enterobacteriaceae*, traduites et adaptées de (127)

Type	Classe	Groupe		Espèces
	moléculaire	fonctionnel	Exemples de	
	(Classification	(Classification	Variants	bactériennes
	Amber)	Bush)		

KPC	A	2f	KPC-2 à 13	<i>K. pneumoniae</i> , <i>E. coli</i> , <i>S. enterica</i>
VIM	B (B1)	3a	VIM-1 à 32	<i>K. pneumoniae</i> , <i>E. coli</i> , <i>Proteus stuartii</i> ...
IMP	B (B1)	3a	IMP-1 à 8	<i>K. pneumoniae</i> , <i>E. coli</i> , <i>Citrobacter spp</i> ...
NDM	B (B1)	3a	NDM-1 à 6	<i>K. pneumoniae</i> , <i>E. coli</i> , <i>Enterobacter spp</i> ...
OXA	D	2df	OXA-48	<i>K. pneumoniae</i> , <i>E. coli</i> , <i>Proteus mirabilis</i> ...

(v) *Problèmes causés par le manque de consensus des définitions.*

L'incidence réelle des BLSE et des autres β -lactamases est difficile à estimer du fait du manque de consensus dans leur définition (129). À l'heure actuelle, il existe des recommandations pour détecter les BLSE initiaux (TEM et SHV) établies par le CLSI (130), mais certains auteurs pensent que ces normes ne sont pas assez sensibles (131). En revanche, aucune recommandation n'est disponible pour la détection des AmpC et des OXA- β -lactamases.

(b) *Autres mécanismes de résistance aux β -lactames*

Les bactéries sont capables de modifier les PBPs cibles, par transformation, fragmentation et recombinaison homologue de l'ADN responsable de leur synthèse (132). Ce processus favorise la formation de nouveaux gènes produisant des PBPs ayant une affinité réduite pour les β -lactames. Il est bien décrit pour des agents pathogènes humains.

La réduction de production de certaines porines par lesquelles les β -lactames pénètrent les bactéries Gram négatives favorise la résistance. Ce mécanisme peut engendrer des résistances croisées et ainsi permettre une résistance à très large spectre contre des antibiotiques appartenant à plusieurs catégories (133).

La résistance aux quinolones et aux fluoroquinolones.

La résistance aux quinolones est un problème depuis l'introduction de l'acide nalidixique en médecine clinique il y a plus de 40 ans. Pour un temps, les fluoroquinolones sont restées très efficaces, mais l'augmentation de leur utilisation a mené à une augmentation de la résistance. À titre d'exemple, dans les années 1990 aux États-Unis, l'utilisation des fluoroquinolones a augmenté d'environ 40%. La proportion d'entérobactéries résistantes a également augmenté d'environ 10% dans les années 2000 (110), en particulier pour les agents pathogènes humains entériques des espèces *Enterobacter cloacae*, *Morganella morganii*, *Proteus mirabilis* et *Serratia marcescens*. Dans d'autres parties du monde, le problème a pris encore plus d'ampleur (134). En Chine, entre 1997 et 1999, 60% des *E. coli* causant des infections nosocomiales humaines étaient résistants aux quinolones (135). Il existe plusieurs mécanismes reconnus de résistance aux quinolones : les mutations qui altèrent la cible de l'antibiotique, les mutations qui réduisent l'accumulation de quinolones dans la cellule et les résistances plasmidiques. Nous allons voir en détail chacun des mécanismes dans les paragraphes suivants.

- (a) Les mutations chromosomiques altérant la cible de l'antibiotique.

Les cibles principales des quinolones sont l'ADN gyrase et l'ADN topoisomérase IV. Le mécanisme qui permet aux bactéries de résister à cette famille d'antibiotiques implique une ou plusieurs mutations. Ces mutations entraînent une substitution d'acides aminés dans la région appelée « région déterminant la résistance aux quinolones » (en anglais « quinolone-resistance-determining region » (QRDR)). Cette mutation entraîne une diminution d'affinité de la cible pour la molécule antibiotique. Pour les bactéries Gram négatives, c'est la gyrase qui est touchée en premier par les mutations. La QRDR est le site de liaison entre l'enzyme et l'ADN. Chez *E. coli*, cette région correspond aux acides aminés entre les positions 51 et 107 de la gyrase. Les mutations retrouvées le plus souvent sont situées en position 83 et 87. Une fois que la première étape de mutation est réalisée, des mutations additionnelles ailleurs dans

gyrA ou dans *parC* peuvent augmenter le degré de résistance. En adéquation avec ce modèle, on trouve plusieurs publications qui démontrent que les mutations dans la QRDR diminuent l'affinité de la gyrase pour l'ADN (136-138). Une seule mutation dans l'un ou l'autre des gènes codant pour ces enzymes ne suffit pas à causer une résistance cliniquement significative. En effet, c'est l'accumulation de plusieurs mutations qui vont rendre l'isolat difficile à traiter. Le niveau de résistance est, de manière générale, corrélé au nombre de mutations trouvées dans le chromosome (139). Ainsi, la fréquence des mutations influence la capacité des bactéries à résister aux quinolones. En situation clinique, il a été démontré qu'un taux de mutation élevé était fortement corrélé à l'accumulation de mutations permettant de résister aux quinolones (139). Certains plasmides ont des effets mutagènes et jouent un rôle dans le développement de résistances aux quinolones (140). Un de ces plasmides code pour une ADN polymérase spécialisée dans l'évitement des sites d'ADN endommagés (141). Le processus de réparation est donc altéré, ce qui favorise les mutations. Les quinolones sont elles-mêmes capables de provoquer le système SOS qui va engendrer un niveau de mutations élevé (142).

(b) Les mutations chromosomiques qui modifient les mécanismes d'efflux des antibiotiques.

Afin d'atteindre leurs cibles intracellulaires, les quinolones doivent franchir les parois et membranes cellulaires. Les bactéries Gram négatives peuvent réguler la perméabilité de leurs membranes en modifiant l'expression des porines. Ces dernières forment des canaux qui favorisent le transport passif à travers la membrane. Chez *E. coli*, on peut citer les protéines OmpF et OmpC comme exemple. De plus, il existe des systèmes d'efflux dépendants de la présence d'ATP. Chez *E. coli*, le système ATP-dépendant qui joue un rôle central dans l'efflux des quinolones est le système de pompe à efflux AcrAB-TolC. Il est donc logique de penser que des mutations susceptibles d'activer plus efficacement les pompes à efflux ou diminuant l'entrée des quinolones, augmentent la résistance à ces molécules antibiotiques. En exemple de ce type de mutation, on peut citer une mutation dans *acrR* (qui est un répresseur de *acrAB*) qui va augmenter l'activité de la pompe (135). À l'inverse, une mutation inactivant *marR* (qui est un répresseur de *marA*) va activer *marA* et ainsi activer *acrA* et *tolC*, ainsi qu'un gène diminuant la traduction de OmpF. Tous ces mécanismes vont diminuer l'efflux de quinolones dans la cellule (143, 144).

(c) La résistance portée par les plasmides.

Certains plasmides sont également capables de produire de la résistance directement. Ces plasmides ont été découverts dans un isolat clinique de *Klebsiella pneumoniae* en Alabama, qui pouvait transférer de la résistance faible aux quinolones à des *E. coli* et à d'autres bactéries Gram négatives (145). Les premiers gènes de résistances aux quinolones transportés par des plasmides ont été appelés *qnr*. La protéine codée par ce gène se lie à l'ADN gyrase et à l'ADN topoisomérase et les protège de l'inhibition (146, 147). Le gène *qnr* est associé à un intégron ou à une structure « intégron-like » dans les environs d'un élément Orf513. Cet élément pourrait être une recombinase impliquée dans l'acquisition de gènes de résistance (146, 148). En réalité, lorsqu'il est présent seul, ce plasmide ne confère qu'une résistance faible à la bactérie. En 2006, un second mécanisme de résistance plasmidique aux quinolones a été décrit : le *aac(6')-Ib-cr*, une variante de l'acétyltransférase des aminoglycosides qui a deux acides aminés modifiés (Trp102Arg et Asp179Tyr). Cette enzyme est donc bifonctionnelle, et peut inactiver les aminoglycosides et les quinolones. De manière identique, cette enzyme ne confère à la bactérie qu'une résistance faible (149-151). En 2007, un autre système de pompe à efflux, porté par des plasmides et conférant de la non-susceptibilité aux fluoroquinolones est découvert par Yamane. Ce système est codé par les gènes *qepA* et *rmtB* (152). Il est responsable de l'évacuation significative de plusieurs quinolones.

En conclusion, il existe plusieurs mécanismes de résistance aux quinolones qui, pris un à un ne confèrent pas des niveaux de résistance très élevés aux bactéries. Cependant, la combinaison de ces mécanismes a une importance significative en clinique.

La résistance aux antibiotiques dans la filière équine

La relation du cheval et de l'homme a radicalement changé dans les dernières décennies (153, 154). Même si les chevaux peuvent apparaître moins présents dans la vie de tous les jours, puisqu'ils ne sont plus utilisés pour les travaux dans les champs, les contacts physiques rapprochés entre les chevaux et leurs propriétaires sont courants. De nos jours, le cheval se classe plus du côté des animaux de compagnie (155). Pourtant le cheval vit le plus souvent à l'extérieur. Il est en contact direct et constant avec les contaminants de l'environnement. Cette espèce a donc une place particulière dans l'écologie de *E. coli* et surtout dans les gènes

de résistance qu'il pourrait porter. Cependant, très peu de données sont disponibles en ce qui concerne son rôle dans la dissémination de l'antibiorésistance (8).

L'utilisation des antibiotiques dans l'espèce équine

Utilisation qualitative

En médecine équine les antibiotiques les plus utilisés sont la pénicilline, le triméthoprim sulfamide et la tétracycline (156). Depuis plusieurs années, l'utilisation du ceftiofur est devenue également très courante (157). Cette céphalosporine de troisième génération est très bien tolérée par les chevaux. L'administration se fait par voie intraveineuse ou intramusculaire, ce qui la rend facile à utiliser. Une formulation, relativement récente, longue action : Exceed® (une injection tous les quatre jours), a rendu son utilisation sur le terrain quasi routinière. Dans de nombreux pays développés, malgré le fait que cet antibiotique soit classé dans une catégorie d'antibiotiques de la plus haute importance en médecine humaine, il est utilisé en première intention par les praticiens équins, qui n'ont en réalité pas d'autres alternatives (156, 158). L'enrofloxacin, bien qu'ayant une homologation chez le cheval est encore relativement peu utilisée sur le terrain.

Utilisation quantitative

Il existe très peu de données sur la quantité d'antibiotiques utilisée chez le cheval. Cependant, dans le rapport de l'Agence National de Sécurité Sanitaire Alimentation, Environnement, Travail (ANSES) de 2014, la quantité d'antibiotiques vendue rapportée en mg/kg était supérieure dans l'espèce équine par rapport à la quantité utilisée chez les bovins (157). En revanche, le PICRA ne rapporte aucune donnée pour cette espèce.

Les résistances phénotypiques aux céphalosporines et 3^{ème} génération et aux fluoroquinolones de *E. coli* décrites chez le cheval.

La résistance au ceftiofur a été documentée dans différentes situations cliniques, chez l'adulte sain (9) ou encore chez le poulain (10). En Angleterre, une étude a démontré qu'une hospitalisation et des traitements avec des antibiotiques augmentaient le risque pour le cheval d'excréter des bactéries MDR (18). En France, le « bilan du réseau Résapath » (<https://www.anses.fr/fr/system/files/LABO-Ra-Resapath2014.pdf>) mis en place depuis 2005, permet de suivre les résistances des bactéries pathogènes, par l'intermédiaire de laboratoires d'analyse volontaires qui mettent à disposition les antibiogrammes réalisés sur le terrain. Ce

bilan a mis en évidence une augmentation significative de la résistance au ceftiofur chez les bactéries pathogènes équine depuis 2005.

Au Canada, une étude québécoise (159) rapporte une augmentation de la résistance au ceftiofur chez les entérobactéries pathogènes pour les périodes 1996-1998 et 2007-2013 (de 21 à 52% des isolats). Cependant, la même étude rapporte qu'il n'y a pas d'augmentation de résistance entre les deux périodes pour *E. coli*. Les gènes porteurs de ces résistances seront abordés dans le chapitre sur les mécanismes de dissémination.

La résistance aux fluoroquinolones est relativement peu présente en médecine équine, à la fois chez les pathogènes et chez les commensales pour lesquelles nous avons des données (11, 18, 159).

La résistance aux antibiotiques dans la filière porcine

Utilisation des antibiotiques dans la filière porcine au Québec et résistances associées. Dans la filière porcine au Canada, les trois catégories d'antibiotiques qui ont été utilisées les plus fréquemment sont les tétracyclines, les macrolides et les lincosamides, du fait de leur rôle à la fois prophylactique et thérapeutique (160, 161). D'autres familles, telles que les céphalosporines, les sulfonamides, les pénicillines ou les streptogramines sont également utilisées (162). La résistance à la tétracycline des *E. coli* pathogènes chez le porc est un problème récurrent depuis plusieurs décennies (163). Il est quantitativement le plus important, bien que la résistance à toutes les catégories d'antibiotiques soit aussi retrouvée, y compris aux céphalosporines de 3^e génération (22).

L'enrofloxacin dans la filière porcine

Les données sur l'utilisation de l'enrofloxacin dans la filière porcine au Québec sont, de manière surprenante, quasi inexistantes. En réalité, si on regarde le rapport du PICRA 2016 (164) il est noté que cet antibiotique n'est pas utilisé du tout dans cette filière. En revanche, ces données ne concernent que les porcs à l'engraissement et aucune donnée dans ce rapport n'est disponible sur les porcelets en maternité ou en pouponnière. Le MAPAQ a réalisé une étude en 2014 (données non publiées). Dans cette étude, les cas de nécropsie de porcs, soumis au service diagnostic de la faculté de médecine vétérinaire, ont été répertoriés afin de déterminer si l'enrofloxacin avait été utilisée dans les fermes. Cette étude a montré que

l'enrofloxacin a été utilisée dans 10 cas sur 32 (soit dans 31,2% des sites étudiés). Un cas était défini dans ce contexte comme un « dossier ouvert dans les laboratoires du MAPAQ entre le 1er janvier 2014 et le 20 juillet 2015 avec au moins un isolat d'*E. coli* d'origine porcine non susceptible à l'enrofloxacin ». L'association Les Éleveurs de porcs du Québec a réalisé une étude sur la consommation d'antibiotiques en 2016 sur 153 sites porcins. Dans cette analyse, deux sites ont acheté de l'enrofloxacin parmi l'ensemble des sites étudiés (31 maternités, 41 pouponnières et 81 engraissements). Ces deux études ne sont pas directement comparables. En revanche, il semble que la tendance d'utilisation d'enrofloxacin dans la filière porcine au Québec soit en baisse (30% des cas en 2014 et 2.5% des sites en 2016). En réalité, la présence de non-susceptibilité à l'enrofloxacin au Québec dans cette filière a été signalée rapidement (dès 2014) et a attiré l'attention des éleveurs et des vétérinaires. L'utilisation de cette molécule a peut-être diminué grâce à l'intervention et à la réactivité des différents intervenants.

De manière plus générale, la non-susceptibilité à l'enrofloxacin dans des *E. coli* porcins a commencé à apparaître à travers le monde il y a environ une décennie. De nombreux articles décrivent les tendances de résistance aux fluoroquinolones de *E. coli* chez le porc dans de nombreuses situations (*E. coli* pathogènes (ETEC, STEC, EPEC), *E. coli* génériques). En Chine, par exemple, elle concerne près de 50% des isolats porcins depuis 2008 (165). Aux États-Unis, elle est présente également puisque près de 60% des isolats ETEC de l'étude de Jiang (166) sont non susceptibles à l'enrofloxacin. Elle est également documentée en Australie (167) et en Europe (168, 169).

La résistance aux β -lactames dans la filière porcine.

D'après les rapports du MAPAQ, la fréquence de la résistance au ceftiofur dans les isolats cliniques d'origine porcine au Québec est en augmentation depuis 1997, pour atteindre 22% en 2014. Ce type de résistance est documentée dans tous les pays du monde. En revanche, la diversité des méthodes de rapport (isolats cliniques vs isolats commensaux, résistance phénotypique vs recherche de gènes) fait que la comparaison entre les différents pays n'est pas possible. L'appendice 6 est un récapitulatif des articles de la littérature publiés entre 2018 et 2019, rapportant ce type de résistance dans le monde.

La dissémination des différents mécanismes de résistance

Les différents mécanismes de dissémination

Les gènes de résistance

Les résistances peuvent être induites par des gènes extra-chromosomiques qui codent pour des enzymes ou d'autres protéines impliquées dans la résistance. Les plus souvent ces gènes sont portés par des éléments génétiques mobiles. Les gènes de BLSE/AmpC sont d'excellents exemples de cette catégorie. Cependant, les résistances peuvent également être induites par des mutations de gènes déjà présents sur le chromosome. Les mutations modifient alors la fonction du gène et la bactérie devient résistante à l'antibiotique. La résistance aux fluoroquinolones induite par les mutations des gènes *parC* et *gyrA* est un exemple de ce type de mécanisme. La dissémination de ces deux types de gènes sera traitée dans les paragraphes suivants.

Le transfert horizontal de gène (HGT)

Les échanges génétiques sont une force majeure de l'évolution bactérienne (170). Le processus d'échange génétique permet aux bactéries l'acquisition d'un ensemble de gènes accessoires qui leur permet de s'adapter à leur environnement et qui favorise ainsi l'émergence de lignées bactériennes ayant acquis de nouvelles caractéristiques phénotypiques (171). La recombinaison génétique chez les bactéries est le phénomène conduisant à l'apparition, dans une cellule bactérienne fille, d'une association des gènes différente de celle observée chez la bactérie mère (172). Elle peut être considérée comme synonyme de brassage génétique. Chez les bactéries, il existe trois mécanismes de recombinaison génétique qu'on englobe sous le terme transfert horizontal de gène (173) : la transformation, la conjugaison et la transduction (171). La figure 6 illustre ces trois mécanismes. Ces mécanismes sont responsables de la dissémination des gènes extra-chromosomiques.

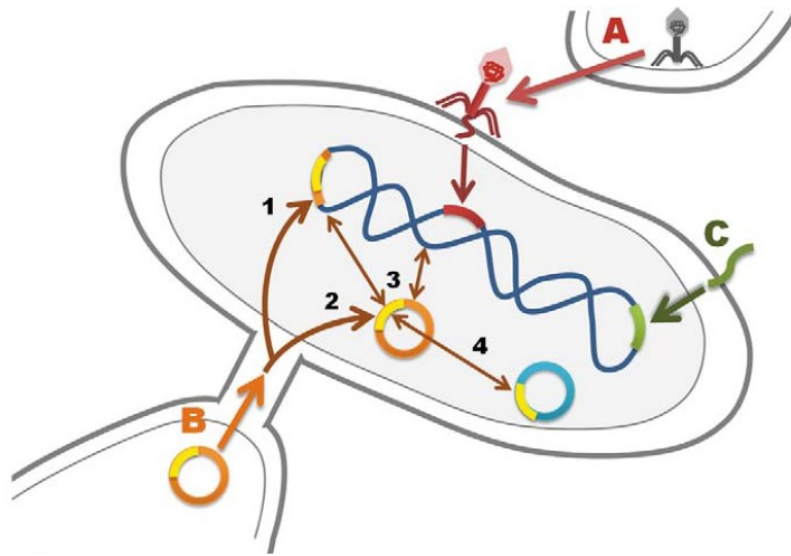


Figure 6 : Mécanisme de transfert d'ADN entre bactéries. (A) Transduction : injection d'ADN dans la bactérie par un phage. (B) Conjugaison : Un plasmide est transféré d'une cellule donneuse à une cellule receveuse. (1) le plasmide passe complètement sur le chromosome (2) le plasmide est séparé, une partie reste dans le cytoplasme et l'autre passe sur le chromosome (3) le plasmide reste dans le cytoplasme (4) le plasmide échange du matériel avec d'autres plasmides, (C) Transformation : Récupération de matériel génétique « nu » dans la cellule. Figure reproduite (174) avec autorisation.

Le transfert horizontal de gène a permis aux différents gènes de résistance aux antibiotiques de se disséminer de bactéries commensales à des bactéries pathogènes (et inversement), ainsi que de bactéries environnementales à des bactéries portées par les différentes espèces animales. Il est maintenant reconnu que l'ensemble de ces bactéries forme un réservoir de gènes de résistance, « le résistome » (175). Il existe trois mécanismes essentiels de transfert horizontal de gènes : la conjugaison, la transformation et la transduction (Figure 6). Il existe cependant d'autres éléments génétiques mobiles (EGM) qui peuvent également contribuer à la dissémination des gènes de résistance. Historiquement, on pensait que la conjugaison était le mécanisme le plus important. De ce fait, les plasmides et autres éléments génétiques mobiles seront discutés en détail dans les paragraphes suivants. Cependant, certaines récentes découvertes ont montré que la transduction et la transformation pourraient jouer un rôle plus important qu'initialement compris (176). Les mécanismes de dissémination sont anciens, puisqu'il a été démontré que des gènes de β -lactamases de type OXA se sont transférés entre bactéries il y a des millions d'années (177). En revanche, il semblerait que l'augmentation de la pression de sélection due à l'usage des antibiotiques en médecine humaine et vétérinaire a provoqué l'augmentation du taux de transmission dans les dernières décennies (176).

Transformation

En 1928, Griffith est le premier à démontrer des échanges directs d'ADN entre différentes souches de *Streptococcus pneumoniae* (178). Certaines bactéries sont capables de « prendre » des fragments d'ADN extracellulaire, de les intégrer dans leur génome puis d'exprimer des gènes fonctionnels provenant de ces fragments. C'est ce qu'on appelle la transformation "naturelle" ou physiologique. Il est devenu rapidement évident que les bactéries pouvaient utiliser ce processus pour échapper aux antibiotiques (179, 180). La transformation naturelle a lieu lorsque plusieurs conditions sont respectées. Premièrement, de l'ADN extracellulaire doit être présent dans l'environnement, deuxièmement la bactérie receveuse doit être en état de « compétence », et enfin, une fois à l'intérieur de la bactérie, l'ADN doit être stabilisé, soit par intégration dans le génome soit par circularisation. La « compétence » naturelle est programmée génétiquement. On l'oppose à la compétence induite en laboratoire (par certains traitements tels que l'électroporation, la chaleur, l'exposition au Ca^{2+}). Cette compétence naturelle est très répandue dans le monde bactérien, mais pas universelle. En général, elle est déterminée par une douzaine de gènes qui codent pour des composants structurels et de régulation de la transformation (171). Certaines bactéries, comme *Neisseria spp*, sont considérées comme compétentes de manière intrinsèque. D'autres peuvent acquérir cette compétence dans certaines conditions, telles que le stress ou l'environnement nutritionnel (181). Certaines études ont même démontré que l'exposition aux antibiotiques pouvait induire la compétence dans plusieurs espèces bactériennes (182).

Conjugaison

Les plasmides sont des éléments génétiques extra-chromosomiques présents de manière ubiquitaire dans les bactéries et qui se transmettent par l'intermédiaire de la conjugaison. Leur génome inclut toutes sortes de gènes accessoires comme des gènes de résistance aux antibiotiques, mais il comprend aussi une « colonne vertébrale » qui est conservée entre les plasmides d'une même famille (183).

(a) Les différents types de plasmides

Il existe plusieurs types de plasmides : les plasmides conjugables, les plasmides mobilisables et les plasmides non mobilisables. De manière générale, la mobilité est une caractéristique

essentielle pour la survie des plasmides. Deux fonctions sont nécessaires pour la mobilisation : la réplication de l'ADN et le transfert horizontal.

(i) *Les plasmides conjugatifs vs mobilisables*

Les plasmides conjugatifs possèdent à la fois un système de réplication et un complexe de formation de paires, qui est composé d'un système de sécrétions de type IV. Ces plasmides sont généralement des « gros » plasmides, puisqu'ils portent dans leur « colonne vertébrale » (la partie conservée de leur génome) plusieurs gènes composant un système complexe permettant le transfert : l'opéron *tra*. Les plasmides conjuguables contiennent aussi des gènes codant pour des protéines d'exclusion qui évitent que la cellule hôte devienne une cellule réceptrice pour le même plasmide ou un plasmide de la même famille (184). Les plasmides mobilisables portent seulement le composant *oriT* du relaxosome qui permet la réplication du plasmide. Ils exploitent le système de transfert des plasmides conjuguables présents dans la même cellule (184).

(ii) *Spectre d'hôte (large vs étroit)*

Le spectre d'hôte d'un plasmide inclut le type de bactéries dans lesquelles le plasmide est capable de se répliquer. En général, il est déterminé par la région d'origine de réplication (*oriT*). Plus le plasmide possède des gènes nécessaires à sa réplication, moins il dépend de la cellule hôte, et plus son spectre d'hôte est large.

(iii) *Le nombre de copies des plasmides*

De manière à équilibrer la capacité de transmission (et ainsi leur héritabilité) et le poids métabolique qu'ils représentent pour l'hôte, les plasmides régulent leur nombre de copies. Les mécanismes de contrôle varient grandement d'un type de plasmide à l'autre. Cependant deux stratégies de base ont été décrites. La première consiste en l'utilisation d'un codon ARN anti-sens qui s'exprime proportionnellement au nombre de copies du plasmide et qui réprime la transcription. La seconde correspond à une régulation de l'activité des protéines Rep (responsable de la réplication) en fonction du nombre de plasmides dans la cellule.

(b) *Le processus de conjugaison*

Le transfert conjugatif a été décrit par Joshua Lederberg et Edward Tatum en 1946 comme une reproduction sexuée entre bactéries (185). Il constitue un phénomène biologique fondamental permettant l'échange de gènes entre bactéries. Pour exister de manière libre,

les plasmides doivent être capables de se répliquer de manière indépendante. Les gènes nécessaires à cette réplication sont localisés près de la séquence *ori* (cette séquence correspond à l'origine de la réplication). En général, les plasmides ne transportent que très peu de gènes nécessaires à la réplication et empruntent le reste des protéines à la cellule dans laquelle ils se trouvent. Il existe plusieurs mécanismes de réplication (réplication thêta ou réplication en cercle) dont la description va au-delà de ce travail de thèse.

Le transfert est en général plus facile entre bactéries d'une même espèce, mais les transferts sont également possibles entre bactéries de différentes espèces et même entre procaryote et eucaryote (186). Il s'effectue à l'aide de plasmides conjugatifs, capables de passer d'une souche à l'autre. C'est un processus très régulé qui comporte 3 phases : le traitement du substrat, le recrutement du substrat et son transfert. Les deux premières étapes se déroulent dans le cytoplasme de la cellule, puis le transfert se fait grâce à la présence d'un système de sécrétion de type IV (T4SS). L'initiation de la conjugaison se fait dans le cytoplasme. Une région appelée *oriT*, au sein de l'ADN à transférer, est transformée par la formation d'un complexe multiprotéique appelé « relaxosome ». La relaxase forme une partie essentielle de ce complexe, mais d'autres protéines diverses sont nécessaires pour la reconnaissance de *oriT*. Ensuite, une protéine du système T4SS vient recruter le complexe relaxase-ADN. L'ADN est alors transféré de la cellule donneuse à la cellule receveuse (187).

(c) La classification des plasmides

Le fait de classer les plasmides selon leurs caractéristiques phylogénétiques fournit des informations rapides sur leur épidémiologie (188). Cela est particulièrement utile dans le cadre de l'étude de la dissémination des gènes de résistance aux antibiotiques portés par les plasmides. La tendance des plasmides à gagner, perdre ou réarranger des gènes rend leur étude phylogénétique particulièrement compliquée. Cependant, cette étude est essentielle dans la compréhension des mécanismes de dissémination des gènes de résistance. En effet, même si jusqu'à maintenant les études cliniques sur la dissémination des gènes de résistance aux antibiotiques se faisaient majoritairement à l'échelle de l'isolat, il a été démontré que le transfert de plasmides peut se faire sur des périodes très courtes (189). Ainsi, la chaîne de transmission ne devrait plus être pensée seulement en termes de transmission de souches, mais aussi en termes de transmission de plasmides (190). Nous pourrions alors avoir à gérer des éclosions plasmidiques.

(i) *Classification basée sur le système de répllication*

(a) Généralités

Cette classification tient compte d'éléments appartenant à la région du réplicon, impliqués dans la machine de répllication du plasmide. Il est reconnu que les plasmides avec un système de répllication similaire sont souvent incapables de se maintenir dans une même cellule hôte. C'est pourquoi on parle de groupes d'incompatibilité (Inc group). La technique de classification de Carattoli (191), basée sur le PCR, est la plus couramment utilisée à l'heure actuelle. Cependant, cette technique n'est capable de classer qu'entre 50 et 75% des plasmides, en fonction des espèces bactériennes et est largement plus efficace pour les bactéries Gram négatives que pour les bactéries Gram positives. Historiquement, avant de classer un plasmide dans tel ou tel groupe d'incompatibilité, il était nécessaire de démontrer son incompatibilité effective avec d'autres plasmides de la même famille par des expériences directes. Actuellement, le nombre de plasmides connus a largement augmenté. Même si la base de la classification est toujours présente, l'identification se fait à partir de la séquence de différentes parties du génome du plasmide et non sur la preuve directe d'incompatibilité. Certains groupes d'incompatibilité importants (IncA/C, IncI, IncN, IncH) de plasmides ont également été caractérisés avec des schémas de pMLST (192). Ces schémas sont basés sur des fragments de 2 à 5 gènes. Ils reflètent des différences uniquement sur ces fragments et sont, par conséquent, limités dans l'étude de la dissémination des plasmides. Un système de classification, appelé la formule FAB, existe pour les plasmides du groupe IncF. Cependant, ce système basé sur 20 allèles du réplicon FIA, 69 allèles du réplicon FIB et 105 allèles du réplicon FII rend les comparaisons compliquées et amène de la confusion pour les comparaisons entre plasmides. Il est très rare que la classification des plasmides selon ce système amène à une conclusion pertinente (173).

(b) Les familles de plasmides d'importance dans la dissémination des gènes de résistance.

(i) *Les plasmides incA/C*

Les plasmides appartenant au groupe d'incompatibilité A/C ont été dans les premiers à être associés à des gènes de résistance aux antibiotiques (193). Ce sont des plasmides de 40 à 230kb, conjugatifs à faible nombre de copies et à large spectre. En effet, on les retrouve dans

des bêta, gamma et delta protéobactéries. Sur les plasmides de groupe A/C₂ on trouve un îlot de gènes de résistance aux antibiotiques qui peut porter une grande variété de gènes codant pour de la résistance à de multiples classes d'antibiotiques. Ces plasmides sont retrouvés à l'échelle mondiale dans des sources animales et humaines et sont largement impliqués dans la diffusion du gène AmpC *bla*_{CMY-2}. Ils sont aussi très couramment porteurs de certains gènes de BLSE, tels que *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} ou d'autres AmpC (tel que le *bla*_{DHA}) et des gènes de carbapénèmases (tels que les gènes *bla*_{OXA}, *bla*_{NDM}, *bla*_{IMP}). Cependant, ils sont très rarement impliqués dans la diffusion des variants du *bla*_{CTX-M}. Des groupes de gènes codant pour des résistances à d'autres familles d'antibiotiques comme les sulphonamides (*sul1*, *sul2*), les aminoglycosides (*aphA1*, *aadA*, *aadB*, *strA*, *strB*, *aacC*), les tétracyclines (*tet(A)*), les phenicolés (*floR*, *catA1*) et le triméthoprim (dfrA) (194-197) peuvent être retrouvés sur ces plasmides également. En ce qui concerne la résistance aux quinolones, des gènes *qnrA1* ont été identifiés sur des plasmides de ce groupe d'incompatibilité en provenance de 4 continents (198).

(ii) Les plasmides Incl

Cette famille de plasmides comporte les plasmides Incl, mais aussi B/O, K et Z. Cette classification est basée sur la similarité des gènes de pilis portés par ces plasmides. Ce sont des plasmides conjugatifs, qui ont un nombre de copies bas et un spectre d'hôte étroit. Leur taille varie entre 50 et 250kb (197). Ces plasmides génèrent un pilus épais pour le transfert d'ADN et un pilus plus fin qui semble stabiliser l'appareil conjugatif lors du transfert en milieu liquide. Ils possèdent un système de recombinaison spécifique de site appelé « shufflon ». Ce « shufflon » crée des réarrangements qui permettent de former des variantes du *pilV* avec des terminaux C différents. Ce « shufflon » est à l'origine d'une difficulté supplémentaire en termes d'assemblage des contigs obtenus en séquençage du génome complet (199). Ces plasmides ont été associés, dans les *Enterobacteriaceae* (principalement chez *E. coli* et les *S. enterica*), à des gènes de BLSE/AmpC tel que *bla*_{CTX-M-1}, *bla*_{CMY-2}, principalement chez les animaux (200), et plus spécifiquement chez la volaille en Europe (90). Incl1-ST7 ou ST3 sont les plasmides les plus souvent associés au *bla*_{CTX-M-1}. Ils sont très souvent retrouvés dans des *E. coli* de ST10, 58, 117 et 131 (201, 202). Des gènes de résistance à d'autres antibiotiques, tel que les aminoglycosides, tétracyclines et quinolones sont également associés à ce type de plasmides. Il a été rapporté que les plasmides Incl2 peuvent porter les gènes *bla*_{CTX-M-55} et

*bla*_{KPC-3} (203, 204). Plus récemment, il a été décrit que ces plasmides peuvent également porter des gènes de résistance à la colistine, à savoir plusieurs variantes du gène *mcr* (205, 206).

(iii) *Les plasmides IncF*

Les premiers plasmides conjugatifs décrits ont été appelés plasmides F (le F signifie facteur de fertilisation) (184). Il s'agit d'une grande famille de plasmides qui contient différents types de réplicons définissant des sous-groupes d'incompatibilité (de FI à FVII). Ils sont parmi les plus abondants dans les *Enterobacteriaceae*. Ils ont, très tôt, été associés à des gènes de résistance aux antibiotiques. Ce sont des plasmides avec un faible nombre de copies, dont la taille peut varier entre 45 et 200 kb. Ils ont un spectre d'hôte limité aux *Enterobacteriaceae* (197). Une de leurs particularités est qu'ils portent plusieurs réplicons. Typiquement ces plasmides portent le réplicon FII avec le FIA et le FIB. Ce groupe de plasmides est très fréquemment décrit chez les humains et les animaux (207). Ils sont souvent retrouvés chez *E. coli*. En termes d'antibiorésistance, ils sont souvent associés à des gènes de BLSE, carbapénémases, mais aussi à des gènes de résistance aux aminoglycosides et aux fluoroquinolones. Un réplicon particulièrement prévalent de cette famille est le FII retrouvé dans le clone ST131 qui porte le *bla*_{CTX-M-15} (197).

(iv) *Plasmides coligéniques (Col)*

Ces plasmides, qu'on retrouve principalement chez les *E. coli*, codent pour des bactériocines appelées colicines qui sont létales pour les souches qui ne les produisent pas. Il existe deux types de plasmides coligéniques. Les plasmides du type I sont petits (6 à 10kb), mobilisables et en général génèrent une vingtaine de copies par cellule. Les plasmides du type II sont plus gros (40kb) et la cellule n'en porte en général qu'une seule copie (197). Bien que ces plasmides puissent porter différents types de gènes de résistance aux antibiotiques, ils ont été associés principalement à la dissémination des gènes de résistance aux quinolones *qnrS1* et *qnrB19* (208). Toutefois, ils peuvent également porter des gènes de BLSE ou AmpC (209), ou des gènes *mcr* (210).

(v) *Les plasmides IncH*

Les plasmides de cette famille se composent de 75 à 400kb. Ils ont un faible nombre de copies et sont reconnus pour avoir un des plus gros spectres d'hôtes (197). En effet, on les retrouve chez les *Enterobacteriaceae* et chez *Vibrio* ou encore *Aeromonas*. Ils sont reconnus pour être

le principal porteur de résistance dans les *S. typhi*. Ils peuvent porter des gènes de résistance aux métaux lourds, aux phages ou à la colicine en plus de gènes de résistance aux antibiotiques (211). Il est intéressant de remarquer que le taux de transfert de ces plasmides est dépendant de la température. On obtient le maximum d'efficacité entre 22 et 30°C (212). Cette information suggère que ces plasmides sont un support efficace de la dissémination des gènes de résistance dans l'environnement. Les plasmides IncHI ont été isolés de bactéries provenant de sources humaines et animales. La plupart de ces plasmides sont des supports pour la multirésistance, puisqu'en plus de gènes de BLSE (213, 214) ils peuvent être porteurs de gènes de résistance aux sulphonamides, aux aminoglycosides, aux tétracyclines aux quinolones et à la colistine (215-217). Comme nous allons le voir plus loin, ce sont les plasmides prépondérants dans les souches de *E. coli* équine pathogènes ou génériques.

(vi) *Les autres familles de plasmides*

Il existe d'autres familles de plasmides, telles que les plasmides IncQ, IncN, IncP, IncX, IncL/M, IncR, IncW, IncT, IncU et IncD dont la description exhaustive n'est pas le sujet de cette thèse. Cependant, les gènes plasmidiques responsables de la résistance aux fluoroquinolones (en particulier *qnrB19* et *qnrS1*), sont souvent portés par les plasmides des groupes d'incompatibilité IncN et IncX (197, 218).

(ii) *Une autre classification basée sur les relaxases*

La classification selon les relaxases (MOB typing) se base sur la séquence conservée du N-terminal de la relaxase. La relaxase est le composant essentiel du relaxosome pour initier le transfert d'ADN à la fois pour les plasmides conjugatifs et les plasmides mobilisables. En effet, la classification selon le type de réplicon est compliquée par le fait que certains plasmides portent plusieurs réplicons ou même des mosaïques de réplicons (219). La relation phylogénétique des relaxases a permis une classification des plasmides en 6 familles MOB : MOB_F, MOB_H, MOB_Q, MOB_C, MOB_P, MOB_V (220). De manière générale, les familles MOB_F et MOB_H sont présentes sur des plasmides conjuguables et les autres familles sont plutôt retrouvées sur des plasmides mobilisables (220, 221). La figure 7 (197) illustre la correspondance entre les deux types de classifications.

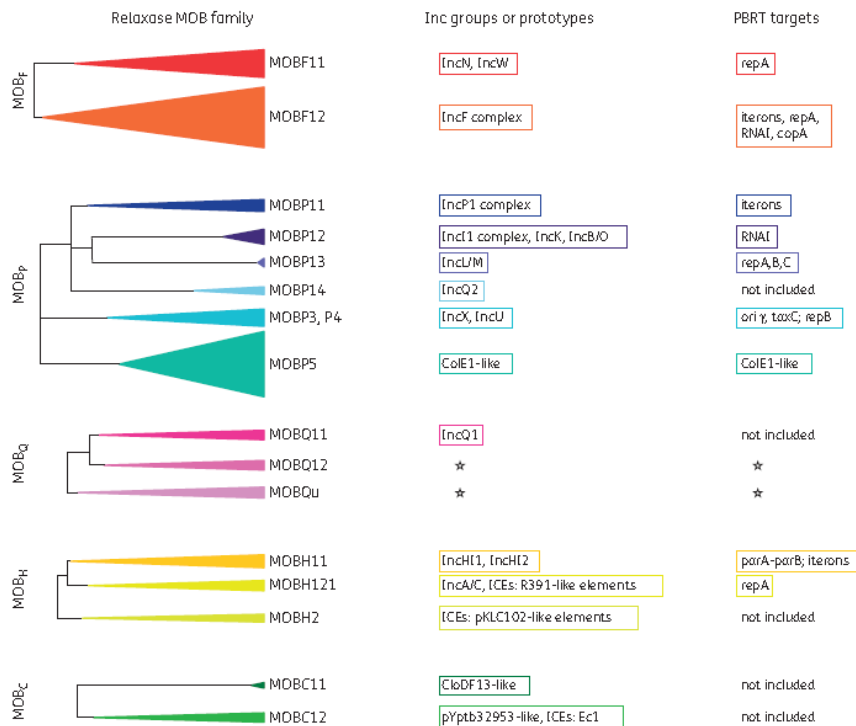


Figure 7 : Correspondance entre les groupes Inc et MOB des plasmides présents chez les protéobactéries (197). Sur la droite, une représentation simplifiée de la phylogénie des 5 familles de relaxases principales. Les triangles représentent les sous-familles de MOB. Au milieu, les groupes d'incompatibilités Inc contenus dans chaque famille de relaxases MOB. Les étoiles signifient qu'aucun groupe d'incompatibilité n'a été associé avec cette famille de relaxase. À gauche, les gènes cibles utilisés pour identifier les gènes par PCR. PBRT = PCR-based replicon typing. Reproduit avec autorisation n° 4818210875334.

(d) Les autres éléments génétiques mobiles (EGM)

Il existe d'autres types d'EGM. Les séquences d'insertion (IS), les transposons, les intégrons et les îlots génomiques en sont des exemples (173). Nous allons faire une brève revue des plus importants, en ce qui concerne le transfert de gènes de résistance aux antibiotiques parmi les bactéries Gram négatives.

(i) Les séquences d'insertions (IS)

Les IS sont des petits segments d'ADN, qui portent typiquement un (parfois deux) gène de transposase (appelé *tnp*) (173). Il existe deux types de classifications pour les IS. La première classification est basée sur le motif actif du Tnp et est désignée par les acides aminés qui le composent (soit DDE, soit DEDD ou HUH). La deuxième classification est basée sur le mécanisme de transposition :

- soit conservatif, la séquence est alors enlevée du donneur pour être transmise au receveur,
- soit réplcatif, la séquence est alors répliquée et transférée (173).

Il existe une myriade de familles d'IS impliquée dans le transfert des gènes de résistance aux antibiotiques.

(ii) *Les unités transposons*

Initialement, on pensait que les unités transposons (Tn) étaient des unités plus longues que les IS, liées entre elles par des séquences d'ADN inversées et répétées, incluant un gène de transposase et un ou des gènes passagers internes (par exemple des gènes de résistances aux antibiotiques). La distinction entre IS et Tn devient cependant problématique au fur et à mesure que les connaissances sur ces unités se précisent (173). En effet, on a décrit des IS portant des gènes passagers (222) ainsi que des Tn sans gène passager (223). Nous ne reviendrons pas ici sur la classification des Tn, car elle est très variable d'une revue à l'autre. Les gènes d'antibiorésistance sont souvent associés à la famille des Tn3 ou des Tn7.

(iii) *Les îlots génomiques, les cassettes de gènes et les intégrons.*

Les îlots génomiques (IG) sont des régions distinctes du chromosome bactérien qui ont été acquises par transfert horizontal. Ils varient en taille et sont classifiés selon le phénotype exprimé par la bactérie. Si on prend une définition large du terme, les IG englobent les éléments intégratifs conjugatifs (ICE), les éléments intégratifs mobilisables et d'autres éléments qui peuvent se transférer par HTG, par exemple par les phages.

Les cassettes de gènes sont de très petits éléments mobiles (environ 0.5 à 1kb) composés d'un gène (très occasionnellement deux) et d'un site de recombinaison *attC*, mais ne portant pas de promoteur. La famille la plus souvent liée au transfert de gènes de résistance aux antibiotiques est la famille des intégrons de classe 1 (173, 224, 225).

Transduction : Phages

Les bactériophages (ou phages) sont des virus qui infectent les bactéries. Ils sont parmi les entités les plus diverses de la biosphère. Ces phages sont capables de transférer l'ADN bactérien. C'est ce qu'on appelle la transduction. La transduction est de plus en plus reconnue comme un facteur important du transfert horizontal de gène de résistance aux antibiotiques

(226). La transduction se produit soit au cours d'un cycle lytique, soit d'un cycle lysogénique. Au cours du cycle lysogénique, le chromosome du phage est intégré dans le génome bactérien, dans lequel il peut rester latent pour plusieurs générations. Le phage présent sous cette forme dans la bactérie est alors appelé prophage. Sous certaines conditions (le stress par exemple), le génome du phage est excisé du génome bactérien et le cycle lytique commence. Ce cycle lytique donne lieu à la destruction de la bactérie infectée. Le virus existe alors comme une entité séparée et se réplique grâce à la machinerie cellulaire de la bactérie. La figure ci-dessous (226) détaille les mécanismes des différentes transductions.

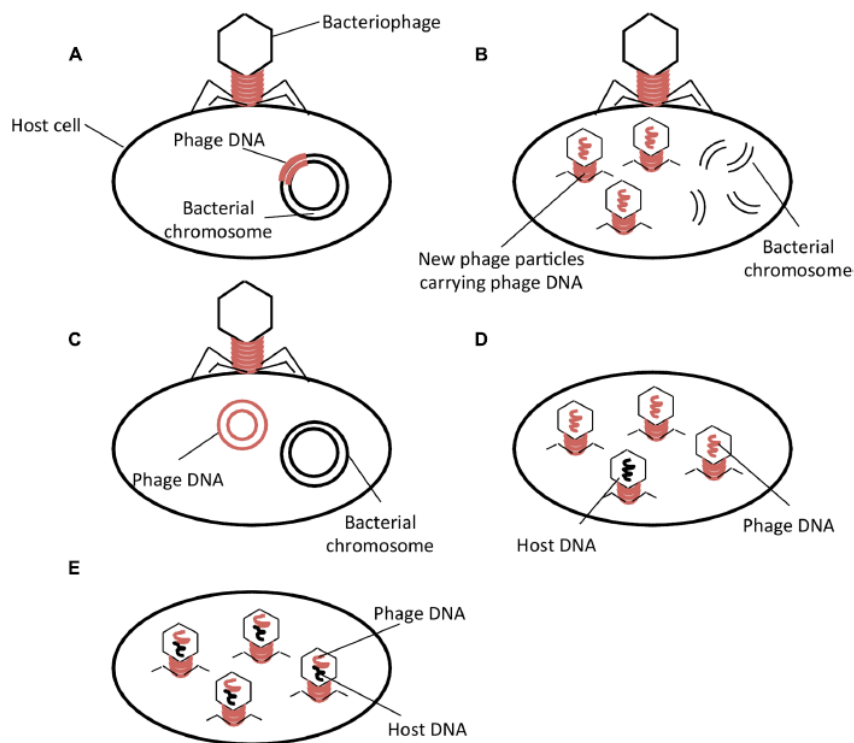


Figure 8 : Type de transduction et cycle de vie des phages. (A) Cycle de vie d'un phage tempéré, (B) cycle de vie d'un phage virulent (C) Pseudolysog  nie (D) Transduction généralisée (E) Transduction spécialisée. Figure en open access (226).

La mobilisation de gènes de résistance aux antibiotiques par l'intermédiaire de bactériophages a été documentée pour plusieurs espèces bactériennes. Par exemple, le transfert de gènes de résistance à l'érythromycine ou à la tétracycline chez certaines bactéries Gram positives comme *Streptococcus pyogenes* (227), ou le portage de g  ne de β -lactamases par des bactériophages chez *E. coli* (228) ou *Salmonella* (229). Des études récentes ont démontré la

présence de gènes de BLSE (*bla_{TEM}* et *bla_{CTX-M}*) dans des bactériophages identifiés dans l'environnement, suggérant que la transduction pourrait avoir un rôle plus important qu'initialement supposé (230). Une autre étude a également démontré que l'exposition aux antibiotiques augmentait le nombre de gènes de résistance aux antibiotiques dans le phageome intestinal de souris ainsi que les interactions entre phages et bactéries (231). De plus, de nombreux articles ont démontré la présence de beaucoup de gènes de résistance dans des bactériophages retrouvés dans les eaux usées, les fèces d'animaux et humains et les déchets provenant d'hôpitaux ou de traitement de plantes (232-235). Si on considère que certains bactériophages ont un très large spectre d'hôte (pouvant même traverser certains taxons bactériens) (236), ces observations fournissent des éléments nouveaux dans l'interprétation du rôle de la transduction dans la dissémination des gènes de résistance aux antibiotiques dans les écosystèmes microbiens.

Les agents de transfert de gènes

Les agents de transfert de gènes (GTA) sont des particules produites par une cellule hôte, qui ressemblent à des bactériophages, et qui sont capables de transferts de gènes de résistance aux antibiotiques. Ils ont certaines caractéristiques : (i) les GTA transportent des parties de génome de la cellule hôte sélectionné au hasard, (ii) la quantité d'ADN transportée par les GTA n'est pas suffisante pour coder tous leurs composants protéiques, faisant d'eux des organismes incapables de se reproduire par eux-mêmes, (iii) la production de GTA est contrôlée par des mécanismes de régulation cellulaire, (iv) les GTA sont libérés lors de la lyse cellulaire, (v) il a été suggéré récemment que les GTA combinent des aspects clés de la transformation et de la transduction pour l'entrée dans la cellule (176). En réalité le transfert d'ADN par l'intermédiaire de GTA comporte plusieurs avantages par rapport aux autres mécanismes de transfert horizontal. Premièrement, il protège l'ADN des facteurs environnementaux. Deuxièmement, il n'a pas besoin de contact direct entre bactéries. Troisièmement, il transporte des morceaux d'ADN bactérien plutôt que de l'ADN de phage. Il est notable que dans l'environnement marin le transfert de gènes par GTA est maintenant reconnu comme des millions de fois plus élevé qu'initialement estimé, excédant probablement les transferts dus à la transformation et à la transduction (237). Pour l'instant, les GTA ont été peu étudiés, en ce qui concerne les transferts de gènes de résistance aux

antibiotiques, mais compte tenu de leur capacité d'échange entre phylum bactériens, il semble qu'il serait utile d'approfondir nos connaissances sur ces particules.

Le transfert vertical

Définition d'un clone

La capacité d'analyser phylogénétiquement, de manière fiable, des isolats bactériens entre eux est essentielle pour la surveillance épidémiologique de ces isolats. À l'heure actuelle, probablement dû à la multiplicité des techniques de classification et d'identification bactérienne, il existe beaucoup de confusion dans la littérature en ce qui concerne la nomenclature. Quand doit-on utiliser le mot « clone », « souches », « isolats » ? Il existe des lignes directrices (238) sur lesquelles nous allons nous baser pour construire la discussion. Tout d'abord, revenons sur les définitions des mots « souches » et « isolats » trouvés dans cette référence.

Un isolat est un spécimen bactérien isolé en culture pure. **Une souche** est un isolat ou un groupe d'isolats qui peut être distingué d'autres isolats par des techniques de phylogénie (mais non distinguable entre eux par ces mêmes techniques). **Un clone** est composé d'isolats bactériens, qui, bien qu'ils aient été mis en culture indépendamment à partir de sources différentes dans des localisations différentes et des périodes de temps différentes, ont quand même tellement de similarités génétiques (ou phylogénétiques) et phénotypiques que l'explication la plus plausible est une origine commune. **Un groupe (ou cluster) clonal** est un groupe d'isolats bactériens qui ont un degré de similarité élevé. Dans l'article que nous venons de citer (238), les auteurs ne font pas de différences entre groupe et cluster clonal. En revanche, dans la littérature, il n'est pas rare d'utiliser ces deux termes de manière distincte pour « grader » le niveau de similarité entre isolats (239).

Ces définitions peuvent sembler parfois floues. Les termes « tellement de similarité » et « degré de similarité élevé » sont largement subjectifs. De plus, ils dépendent à la fois de l'espèce bactérienne et du degré d'échange génétique auquel elle est sujette, mais aussi de la technique de phylogénie utilisée. Il est donc nécessaire de revoir ces critères pour chaque utilisation spécifique.

Émergence de clones à haut risque

Un des phénomènes inquiétants à propos de la dissémination des gènes de résistance, dans les dernières années, est le développement de « clones à haut risque ». Le plus spectaculaire est le *E. coli* ExPEC ST131 qui s'est disséminé depuis les années 2000 à travers le monde. Initialement, on a retrouvé des lignées ST131 porteuses du *bla*_{CTX-M-15} dans plusieurs pays tels que le Canada, la France, la Suisse, le Portugal, l'Espagne, le Koweït, le Liban, l'Inde et la Corée (240, 241). Puis une lignée résistante aux fluoroquinolones s'est disséminée dans toutes les régions du monde (242). Les « clones à haut risque » sont définis par Mathers (88) comme des lignées bactériennes ayant une origine commune (i) qui ont une distribution mondiale, (ii) sont associées à de la multirésistance antibiotique, (iii) ont la capacité de coloniser l'hôte et de persister pour de longues périodes (6 mois), (iv) sont capables de se transmettre de manière efficace d'un hôte à l'autre, (v) démontrent une pathogénicité augmentée et par conséquent (vi) causent des infections récurrentes. Ils sont inquiétants, car en plus de leur expansion propre, ils sont d'excellents véhicules de tous les éléments génétiques mobiles qu'ils transportent. Cette définition, bien que très utile pour jeter une base de réflexion manque de précision et surtout n'englobe pas plusieurs aspects de la médecine vétérinaire. Elle devrait donc être revue et adaptée au contexte « OneHealth ». Pour l'instant, aucun clone aussi problématique que le ST131 n'a été retrouvé chez l'animal, mais une telle possibilité n'est pas à exclure dans le futur.

Les connaissances actuelles dans les filières équine et porcine : la dissémination des gènes de résistance aux β -lactames et aux fluoroquinolones

La filière équine

La dissémination des gènes de BLSE/AmpC

(a) Les gènes de BLSE/AmpC déjà identifiés

(i) *En Europe*

En Europe, dans la filière équine comme pour les autres espèces animales, il semble que la famille de gènes BLSE *bla*_{CTX-M} soit la plus prévalente (119, 243-245). Le variant *bla*_{CTX-M-1} est la

plus souvent identifiée, bien que les gènes *bla*_{CTX-M-2}, *bla*_{CTX-M-14}, et *bla*_{CTX-M-15} aient déjà été identifiés aussi chez des *E. coli* commensaux ou des *E. coli* associés à des infections retrouvées chez des chevaux (10, 14, 155, 246). Le gène *bla*_{SHV-12} a aussi été identifié (14), en particulier en Guadeloupe (247) (même si la méthodologie de cet article reste un peu floue en termes de séquençage du génome complet). Le gène AmpC *bla*_{CMY-2} a été retrouvé chez des *Salmonella* pathogènes d'origine équine (248, 249). La présence de gènes de carbapénémases chez le cheval a été décrite en Europe en de rares occasions (14, 250).

(ii) *En Amérique du Nord*

En Amérique du Nord, les données sur les chevaux sains sont quasi-inexistantes. En ce qui concerne les chevaux hospitalisés, les données phénotypiques démontrent que la non-susceptibilité au ceftiofur est présente (11, 159), mais l'identification génotypique correspondant à cette non-susceptibilité phénotypique est manquante. Les gènes de carbapénémases ont été trouvés dans l'environnement d'un hôpital équin (108) chez la bactérie *Aeromonas veronii*.

(iii) *Dans le reste du monde*

Pour ce qui est du reste du monde, les données sont éparpillées. Des rapports démontrent la présence de non-susceptibilité au ceftiofur en Nouvelle-Zélande (10) et en Corée (251), mais l'identification des gènes de BLSE n'a pas été réalisée par ces auteurs.

(b) Les éléments clés de dissémination des gènes de BLSE.

En date de 2020, aucun clone bactérien à « haut risque » n'a été décrit dans la population équine. Les gènes de BLSE/AmpC et carbapénémases se disséminent par l'intermédiaire d'éléments génétiques mobiles.

(i) *Le plasmide IncHI1 dans l'espèce équine*

Plusieurs études ont démontré que le gène *bla*_{CTX-M-1} dans l'espèce équine était souvent associé au plasmide de la famille IncHI1 (217, 252-254). Ils ont commencé à émerger dans *Salmonella* spp. (212). Ils sont également trouvés chez d'autres espèces bactériennes, par exemple *Citrobacter*, provenant de différentes sources animales (255). Cependant, l'association *E. coli*/IncHI1 est décrite majoritairement chez des bactéries retrouvées chez des chevaux, à quelques exceptions près (255-257). Cette association est pourtant mal comprise.

La présence de l'opéron *fos* sur ce plasmide a été décrite (217). Cet opéron est nécessaire pour la métabolisation des fructo-oligosaccharides et représente un avantage dans la colonisation du caecum chez le poulet (258). Il semble légitime de penser que cet opéron représente un avantage pour la persistance de *E. coli* dans le microbiome du cheval, même sans pression de sélection par des antibiotiques. Les deux types de IncHI1 qui prédominent en Europe sont les IncHI1-ST2 et IncHI1-ST9, qui ne diffèrent entre eux que par un seul SNP (252). Il est important de noter que ces deux types de plasmides (ST2 et ST9) sont porteurs de gènes de résistance à plusieurs familles d'antibiotiques. Ils contribuent donc à la dissémination de la multirésistance dans l'espèce équine (217).

La dissémination des gènes de résistance aux fluoroquinolones.

De manière générale, la résistance phénotypique aux fluoroquinolones est relativement peu rapportée chez le cheval, que ce soit chez les bactéries commensales ou pathogènes (168, 259). Cependant, elle est observée en médecine équine hospitalière et semble augmenter dans le temps, en fonction des localités (157, 159, 260). On trouve aussi, dans la littérature, des exemples de la présence de gènes plasmidiques portant la résistance aux quinolones (217, 252, 261, 262), et quelques rapports de bactéries pathogènes équines présentant de la résistance aux fluoroquinolones du fait de mutations des gènes *parC* et *gyr A* (252). Tous ces rapports concernent principalement des pays européens. Il existe très peu de données pour les chevaux dans le reste du monde (en particulier pour l'Amérique du Nord).

La filière porcine

La dissémination des gènes BLSE/AmpC

(a) Les gènes BLSE/AmpC déjà identifiés

(i) *Le Québec*

Dans la filière porcine, au Québec, le gène AmpC *bla_{CMY-2}* prédomine parmi les gènes de BLSE/AmpC (22), bien que le gène BLSE *bla_{CTX-M-1}* ait également été détecté et semble prendre l'avantage dans les dernières années.

(ii) *Dans le reste du monde*

Des gènes de BLSE/AmpC et carbapénémases ont été rapportés chez les porcs (de différents âges et présentant des pathologies ou non) dans de nombreux pays à travers le monde.

L'appendice 6 est un récapitulatif des différents articles retrouvés sur PubMed (en combinant les mots clés (pigs et ESBL) publiés entre janvier 2018 et décembre 2019, qui rapportent ce type de données. Comme on peut le voir, si on considère seulement les articles publiés en 2018 et 2019, nous avons trouvé 34 publications rapportant de nombreux gènes BLSE/AmpC et des gènes de carbapénèmases identifiés sur tous les continents. Il est cependant difficile d'établir des tendances nettes, compte tenu de la variabilité des méthodologies employées pour l'identification des gènes.

- (b) Les éléments clés de la dissémination des gènes :
Les plasmides

Pour l'instant, il n'existe pas de démonstration dans la littérature qu'une lignée clonale bactérienne serait responsable d'une dissémination de gènes de résistance aux différentes β -lactames dans l'espèce porcine au niveau mondial. La dissémination des gènes se fait donc probablement par l'intermédiaire d'éléments génétiques mobiles tels que les plasmides. Les plasmides portant les différents gènes de résistance aux antibiotiques sont moins souvent identifiés que les gènes eux-mêmes, comme en témoigne le tableau de l'appendice 6 où les plasmides sont rapportés dans seulement 4 articles sur les 34. En revanche, les plasmides les plus souvent identifiés tels que le IncI1/ST3 ou le IncFII sont des plasmides classés comme épidémiques (218). Au Québec, le gène de β -lactamase le plus souvent identifié chez le porc est le *bla_{CMY-2}*. Il semble être souvent associé au plasmide du groupe d'incompatibilité IncA/C (22).

La dissémination des gènes de résistance aux fluoroquinolones

- (a) Apparition de lignées clonales à différents endroits du monde : lien avec la non-susceptibilité à l'enrofloxacin.

Selon les différentes techniques de phylogénie utilisées et les définitions de « clones » ou « lignées clonales » qui sont présentes dans la littérature, il existe de nombreuses publications décrivant des « clones » pathogènes et multirésistants dans les populations porcines à travers le monde (22, 163, 263-266). Voici un résumé de celles qui ont retenues notre attention, en lien avec la dissémination de la résistance à l'enrofloxacin.

En 2016, Kusumoto (267) rapporte l'émergence d'une lignée pathogène chez le porc de ETEC/STEC au Japon. Les isolats de cette lignée forment un cluster basé sur leur profil PFGE (50% de similarité). Cette lignée est du séro groupe O116 ou OSB9. Les isolats appartiennent tous au même type de séquence (ST88). Ils produisent les toxines Stx2e, LT et ST et sont porteurs du fimbriae F18. De manière particulièrement intéressante, ces isolats sont aussi majoritairement non susceptibles aux fluoroquinolones (dans cet article la ciprofloxacine est testée) et montrent un degré de multirésistance important. En revanche, dans cet article, les mécanismes, qu'ils soient plasmidiques ou chromosomiques, à l'origine de cette résistance ne sont pas décrits. En 2015, Abraham (167) rapporte, en Australie la présence d'une lignée ST744, résistante à la fois aux fluoroquinolones et aux céphalosporines de 3^e génération, présente chez des porcs, mais qui aurait également été trouvée chez des oiseaux sauvages au Bangladesh et chez des humains au Laos. Ces données sont intéressantes, mais basées sur la technique classique de MLST pour la définition de clone. Cette technique, bien que très utilisée, est basée sur l'identification de seulement 7 gènes de ménage. Elle est relativement peu discriminante dans ce contexte. En 2019, Jiang (166) rapporte également la présence de souches ETEC non susceptibles à l'enrofloxacin dispersées dans plusieurs états aux États-Unis, isolées dans les années 2013 et 2014. La non-susceptibilité aux fluoroquinolones de ces souches est due à deux mutations chromosomiques de *parC* et *gyrA*. Cet article démontre même un lien clonal très fort entre ces souches, basé sur le séquençage du génome complet. Il est cependant remarquable que les auteurs passent complètement sous silence la présence de ce clone dans leur discussion. Toutes ces lignées clonales ont comme caractéristique d'être non susceptibles aux fluoroquinolones, à l'instar du *E. coli* ST131 (49) ou du *E. coli* ST410 (89), deux exemples de clones à haut risque causant des problèmes en médecine humaine. Il est donc légitime de se demander si la résistance aux quinolones pourrait constituer un premier pas vers la clonalité à haut risque. Il est possible de penser que l'acquisition de cette non-susceptibilité confère aux bactéries un avantage sélectif conséquent qui leur permet de se disséminer efficacement dans des niches écologiques dans un contexte de pression antibiotique persistante (268-270).

(b) Les gènes de résistance aux fluoroquinolones plasmidiques chez le porc.

On trouve une myriade de gènes de résistance aux fluoroquinolones portés par des plasmides chez des isolats *E. coli* d'origine porcine, tels que *qnrA*, *qnrB*, *qnrS*, *aac(6')-Ib-cr*, *qepA*, et *oqxAB* (166, 169, 271-275). Ces gènes de résistance ont été trouvés dans le monde entier, mais plus particulièrement en Asie.

Les facteurs de risque d'excrétion de bactéries résistantes aux antibiotiques

Connaissances générales

Définition et problématique

Selon la définition de l'OMS, un facteur de risque est « tout attribut, caractéristique ou exposition d'un sujet qui augmente la probabilité de développer une maladie » ou dans notre cas de porter des bactéries hébergeant de la résistance aux antibiotiques. La détermination de ces facteurs de risque est capitale afin de pouvoir agir et minimiser la sélection de résistance aux antibiotiques. Cependant, ils peuvent être particulièrement difficiles à mesurer, car l'apparition de résistance ne suit pas un modèle causal classique, c'est-à-dire basé sur le fait qu'une cause est nécessaire et suffisante pour entraîner un résultat. En effet, le phénotype de non-susceptibilité peut être causé par, non seulement, différents génotypes, mais aussi différentes conditions dans lesquelles se trouve la bactérie (276). Les variations de génotype, soit au niveau chromosomique (acquisition de mutation), soit par transfert horizontal, ont un coût d'adaptation (« fitness cost » en anglais) qui varie en fonction de la modification. Les conditions environnementales, telles que le pH ou la présence d'antibiotiques influencent le niveau d'expression des gènes et donc le phénotype de non-susceptibilité d'une bactérie. Les causes d'apparition de résistance sont souvent multiples. Dans le cas du transfert horizontal, par exemple, la pression antibiotique et la présence d'au moins une bactérie porteuse de l'élément génétique mobile à proximité, sont nécessaires pour que la résistance se développe. De plus, l'existence de co-résistance (par exemple entre métaux lourds et antibiotiques) (277) rend la problématique encore plus complexe. Dans ce cas, il peut exister plusieurs causes suffisantes (exposition à deux types de molécules) pour arriver à un même résultat.

Il est aussi important de mentionner qu'en fonction du mode d'apparition de la résistance (que se soit par mutation d'un gène, transmission d'un plasmide, ou dissémination d'un clone multirésistant) les facteurs recherchés ne sont pas les mêmes. À titre d'exemple, lorsque la dissémination est clonale, il faut chercher des facteurs de dissémination de ce clone. Ces facteurs peuvent être (i) soit les facteurs extrinsèques au clone, par exemple les liens qui existent entre les fermes, les mesures de biosécurité, etc.), (ii) soit des facteurs intrinsèques au clone (facteurs de virulence ou de fitness). À l'inverse, si on a affaire à une mutation qui est sélectionnée à plusieurs endroits en même temps, il faut alors chercher les facteurs qui pourraient forcer l'apparition de cette mutation (exposition à différentes substances toxiques, ou pression par des antibiotiques spécifiques). Lorsque les plasmides sont à l'origine de la dissémination de la résistance, on va alors plutôt rechercher les facteurs qui favorisent le transfert horizontal (278). Cette notion souligne l'importance de l'analyse moléculaire des mécanismes de dissémination des gènes et l'importance également de la collaboration entre microbiologistes et épidémiologistes pour trouver des solutions concrètes et efficaces. De plus, il est important de faire une différence entre le risque de sélection d'une résistance chez un individu et le risque de dissémination entre plusieurs individus.

La validité des associations trouvées dépend beaucoup de la qualité et de la représentativité de l'échantillon. Il faut tenir compte des différents degrés d'agrégation (individus, fermes, vétérinaires, propriétaires, régions géographiques, etc.), des biais de sélection, des biais de confusion et des interactions entre les facteurs. De manière générale, en ce qui concerne la littérature sur les facteurs de risque de présence de résistance aux antibiotiques, les études manquent souvent de validité externe ou de puissance statistique. Les résultats sont donc très difficiles à extrapoler à l'ensemble d'une population. Dans l'article de Murphy (279), dont l'objectif était de décrire de manière quantitative la littérature rapportant des relations entre des facteurs et la résistance aux antibiotiques chez les animaux de rentes (bovins, poulets et porcs), il est intéressant de noter que leur recherche bibliographique a conduit à une sélection initiale de 14 966 articles. Après une revue de ces articles et une sélection de ceux pertinents dans leur contexte, ils n'ont retenu que 28 publications. Ce faible nombre d'articles retenus illustre bien la difficulté de financer et donc de réaliser des études valides et surtout comparables les unes avec les autres. Dans cette étude, le facteur de risque le plus important

et le plus communément rapporté pour la présence de résistance est l'utilisation des antibiotiques.

En conclusion, il est très difficile de mettre en évidence des associations, et d'évaluer leur causalité. C'est probablement dû à cette complexité que les études peuvent comporter des résultats semblant divergents. Chaque résultat doit donc être remis dans son contexte particulier avant de le juger comme contradictoire avec des résultats d'études antérieures.

Le facteur de risque reconnu universellement : Utilisation des antibiotiques.

Il est reconnu, à l'heure actuelle que l'utilisation des antibiotiques est pour une grande partie responsable du développement accru de résistance aux antibiotiques. On ne compte plus les articles et les revues qui démontrent que les traitements antibiotiques augmentent les risques d'être porteurs de résistances. Des analyses ont été réalisées chez l'homme (280), chez les animaux de production (281), chez les animaux de compagnie (282), aussi bien dans des études observationnelles (283, 284) que dans des études expérimentales contrôlées (285). Les traitements antibiotiques augmentent la proportion de bactéries résistantes dans la flore commensale des sujets traités (283, 284), mais aussi augmente le risque d'être atteints d'agents pathogènes résistants (286). La voie d'administration (orale, intraveineuse ou topique) semble avoir un impact sur l'acquisition des résistances par les différentes bactéries. En effet, l'administration d'antibiotiques par voie orale modifie la présence de résistance dans le microbiome intestinal (284), la voie topique quant à elle a plutôt tendance à modifier le microbiome de la peau (287). Cependant, compte tenu de la diversité des molécules, des doses, des espèces et des maladies traitées, il est extrêmement difficile de résumer toutes les données présentes dans la littérature.

L'espèce équine

En médecine équine, très peu de données sont disponibles dans la littérature concernant les facteurs de risque de l'excrétion fécale de bactéries multirésistantes. Il a été démontré que le traitement antibiotique et l'hospitalisation pourraient avoir une influence (11). Cependant les données renseignent peu sur la durée ou le type de traitement et son effet sur la durée d'excrétion ou la quantité de *E. coli* multirésistants. Il semblerait cependant que la durée d'excrétion après un traitement antibiotique soit au minimum de deux semaines (13, 288). Toutefois, ces études, bien qu'utiles, concernent principalement les chevaux hospitalisés. Les

données de facteurs de risque agissant sur la population équine générale sont très rares. L'hospitalisation récente (ou le contact avec des chevaux hospitalisés récemment), le contact avec des animaux non équins, le type d'écurie, l'utilisation des terres environnantes, la raison des traitements vétérinaires reçus dans les six derniers mois seraient des facteurs de risque pour le portage de résistance (289). Toutefois, dans cette étude, toutes les résistances aux différents antibiotiques sont prises en compte. Le nombre élevé d'associations évaluées, bien que ne modifiant pas le risque α pour chaque association, peut augmenter le risque de trouver des associations significatives par hasard globalement. Tous ces critères devraient donc être examinés dans d'autres études, et d'autres situations.

L'espèce porcine

Plusieurs articles ont cherché à identifier des facteurs de risque influençant la présence d'antibiorésistance dans les fermes porcines.

Utilisation orale d'antibiotique

Il a été démontré que l'administration orale d'antibiotiques sur les fermes porcines est un facteur de risque pour la présence d'antibiorésistance chez les *E. coli* commensaux dans les fermes porcines (290). Or, ce type d'utilisation, même si elle est en baisse dans les pays occidentaux, reste très courante (291). L'utilisation des aminoglycosides, des quinolones et de la tétracycline a été décrite relativement souvent dans la littérature et semble avoir le plus d'impact sur la présence de résistance dans les élevages (285). Cependant, beaucoup d'études sont imprécises, en particulier pour ce qui est de rapporter les doses, les fréquences et la durée d'administration des antibiotiques (284).

Les facteurs de risque concernant la gestion d'élevage

D'autres facteurs concernant la gestion d'élevage ont aussi été démontrés comme des facteurs de risque. En particulier, l'espace par porc, la taille et le stade de l'élevage, la taille des lots, la propreté de l'établissement, l'entrée d'animaux dans le troupeau, les contacts avec les humains, la distance entre les fermes, la température et la saison (292-307) sont des facteurs de risque possibles. Cependant, l'amplitude, la signification statistique et la direction des associations pour chaque facteur diffèrent en fonction des études. La raison principale pour expliquer ces différences est que ces associations peuvent découler de nombreux schémas causaux et être influencées par de nombreuses interactions. L'obtention d'une image

exhaustive du problème est difficile. De plus, il existe des facteurs ayant une influence directe et des facteurs ayant une influence indirecte sur la présence de gènes de résistance sur une ferme, ce qui complique encore le problème. De ce fait, il devient extrêmement difficile d'établir des recommandations de gestion d'élevage basées sur la littérature actuelle. Les recommandations basées sur le bon sens, tels que le lavage des mains entre la manipulation des lots, la gestion des installations avec le « tout plein-tout vide », la réduction des contacts entre lots, mais aussi entre les porcs et les autres animaux présents sur la ferme et les humains (etc.) sont pour l'instant celles qui prédominent.

HYPOTHESES ET OBJECTIFS

Tel que nous venons de le voir, l'antibiorésistance représente un enjeu complexe et multifactoriel. De manière à aborder le problème méthodiquement, et comme les enjeux des filières sont différents, nous avons émis plusieurs hypothèses et objectifs spécifiques :

- Pour la filière équine

Hypothèses spécifiques : (i) Le microbiote des chevaux adultes sains représente un réservoir de gènes d'antibiorésistance, en particulier des gènes de β -lactamases à spectre étendu et/ou des AmpC β -lactamases. Les gènes de résistance peuvent être portés par des *E. coli* génériques ou pathogènes. (ii) Les gènes de ESBL/AmpC (*bla*) se disséminent principalement par voie plasmidique. (iii) Certains facteurs de risque favorisent l'émergence et la dissémination des gènes de ESBL/AmpC.

Objectif 1 : Quantifier et caractériser les résistances phénotypiques présentes dans le microbiome des chevaux sains, en France et au Québec. Cet objectif a été traité dans les articles 1 et 3.

Objectif 2 : Identifier les gènes de β -lactamases (ESBL/AmpC) présents dans le microbiome intestinal des chevaux sains, en France et au Québec. Cet objectif a été traité dans les articles 1 et 3.

Objectif 3 : Identifier les facteurs de risques associés à leur excrétion. Cet objectif a été traité dans les articles 1 et 3.

Objectif 4 : Caractériser les mécanismes de dissémination des gènes *bla* identifiés. Pour des raisons financières, cet objectif a été réalisé seulement pour la population équine française. Cet objectif a été traité dans l'article 2.

Objectif 5 : Établir le potentiel pathogénique des isolats porteurs de BLSE/AmpC. Pour des raisons financières, cet objectif a été réalisé seulement pour la population équine française. Cet objectif a été traité dans l'article 1.

- Pour la filière porcine

Hypothèse spécifique : (i) Un clone à haut risque de ETEC:F4 non susceptible à l'enrofloxacin émerge dans la population de ETEC responsable de diarrhée chez le porcelet au Québec, depuis 2014. Ce clone est multirésistant, se dissémine efficacement, possède un profil de virulence spécifique et présente une pathogénicité augmentée. (ii) Certains facteurs de risque favorisent l'émergence, la persistance et la dissémination des gènes de ce clone.

Objectif 1 : Colliger les données fournies par la base de données APZEC pour la période 2008-2017, afin de démontrer l'émergence du pathovirotype ETEC:F4 non susceptible à l'enrofloxacin. Cet objectif a été traité dans l'article 4.

Objectif 2 : Évaluer la présence d'un cluster spatio-temporel pour les isolats ETEC:F4 non susceptibles à l'enrofloxacin. Cet objectif a été traité dans l'article 4.

Objectif 3 : Établir le lien phylogénétique potentiel des isolats ETEC:F4 responsables de diarrhée chez le porcelet au Québec. Cet objectif a été traité dans l'article 4, avec la technique de PFGE, pour la période 2013-2016, puis dans l'article 5 avec la technique des SNP basée sur les données du SGC pour la période 1990-2018.

Objectif 4 : Caractériser les gènes de résistance et de virulence présents dans ces isolats ainsi que les éléments génétiques mobiles qu'ils transportent. Cet objectif a été traité dans l'article 5.

Objectif 5 : Identifier les facteurs de risque associés à la présence du clone dans les fermes québécoises.

Cet objectif n'a pas été traité dans un article, mais est décrit dans l'appendice 5 de cet ouvrage.

ARTICLES SCIENTIFIQUES

De manière à pouvoir répondre aux enjeux spécifiques des deux filières à l'étude, le travail de cette thèse a été séparé selon l'espèce animale. La présentation des résultats est faite sur le même modèle. Les trois premiers articles répondent aux objectifs spécifiques de la filière équine. Les deux derniers articles répondent aux objectifs spécifiques de la filière porcine.

Enjeux et synthèse des principaux résultats dans la filière équine.

L'enjeu majeur de cette filière est d'acquérir un maximum de données supplémentaires à la fois au niveau moléculaire et épidémiologique, avec toutefois, des moyens financiers limités. Nous avons donc choisi d'étudier des chevaux sains dans deux territoires (France et Québec) différents afin de pallier un manque évident de données dans cette catégorie de la population équine.

En France et au Québec, les *E. coli* commensaux provenant de fèces de chevaux sains étaient majoritairement non susceptibles à l'ampicilline, l'amoxicilline/acide clavulanique et la streptomycine. Des *E. coli* multirésistants et porteurs de gènes codant pour des β -lactamases à spectre étendu BLSE/AmpC ont été détectés dans respectivement environ 45% et 8% des chevaux.

Le *bla*_{CTX-M-1} était majoritairement détecté sur les deux territoires, bien qu'en France d'autres gènes de BLSE aient été identifiés (*bla*_{CTX-M-2} et *bla*_{CTX-M-14}). Le *bla*_{CMY-2} a été identifié chez des chevaux sains en France et au Québec.

En France, les *E. coli* porteurs de BLSE/AmpC véhiculaient majoritairement le plasmide IncHI1-ST9 associé aux gènes *bla*_{CTX-M-1/2} et à l'opéron *fos*. L'analyse phylogénétique des isolats français (par la technique de PFGE) a mis en évidence l'absence de dissémination clonale de *E. coli* commensaux dans cette espèce. Le gène de virulence *iutA* a été identifié dans un 1/50 isolats porteurs de BLSE/AmpC.

L'administration d'un traitement médical, le nombre de personnes s'occupant des chevaux, le type d'activité et le fait de participer à un évènement équestre dans les trois derniers mois

ont été identifiés comme des facteurs de risque de l'excrétion des *E. coli* multirésistants ou producteurs de gènes de BLSE/AmpC.

ARTICLE 1: Prevalence, risk factors, and characterization of multidrug resistant and extended spectrum β -lactamase/AmpC β -lactamase producing *Escherichia coli* in healthy horses in France in 2015.

Auteurs et affiliations

Contribution de Maud de Lagarde à cet article

Pour cet article Maud de Lagarde a contribué majoritairement aux demandes de subvention, à l'établissement de la collaboration entre les deux équipes, au devis de l'étude, à l'exécution des expérimentations, à l'analyse des données et à la rédaction du manuscrit initial et sa révision.

Auteurs

Maud de Lagarde, DVM, ACVIM¹; Caroline Larrieu, DVM; Karine Praud; Catherine Schouler, PhD³; Benoît Doublet, PhD³; Guillaume Sallé, DVM³; John M. Fairbrother, BVSc, PhD¹; Julie Arsenault, DVM, MSc, PhD².

Affiliations

¹ OIE Reference Laboratory for *Escherichia coli*, Faculty of Veterinary Medicine, Université de Montréal, Saint-Hyacinthe, QC, Canada.

² Department of pathology and microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, Université de Montréal, Saint-Hyacinthe, QC, Canada.

³ ISP, Institut National de la Recherche Agronomique, Université François Rabelais de Tours, UMR 1282, Nouzilly, France

Journal de Publication

Cet article a été publié en janvier 2019 dans le *Journal of Veterinary Internal Medicine*.

Résumé en français

Bien que la résistance aux antibiotiques devienne de plus en plus commune en médecine équine, les données moléculaires et épidémiologiques restent disparates.

Nous avons évalué la prévalence et les facteurs de risque d'excrétion de *E. coli* multirésistant et producteur de BLSE/AmpC (ou les deux) chez le cheval en bonne santé en France. Nous avons testé les isolats porteurs de BLSE/AmpC pour la susceptibilité à 14 antibiotiques et pour la présence de gènes de virulence et de BLSE/AmpC par PCR.

Des échantillons fécaux ont été prélevés de chevaux adultes répartis dans 41 écuries. Un questionnaire a été rempli pour chaque écurie par le responsable de l'écurie. Un sous-ensemble de ces échantillons ont été utilisés pour élaborer 2 collections bactériennes.

Des *E. coli* indicateurs (sélectionnés sans enrichissement) et spécifiques (collectés après enrichissement avec de la ceftriaxone) ont été testés pour la susceptibilité aux antibiotiques. La prévalence des isolats non susceptibles aux antibiotiques testés a été estimée au niveau individuel et au niveau de l'écurie. Les gènes de virulence et de BLSE/AmpC ont été identifiés par PCR. Une régression logistique multivariée a été utilisée pour évaluer les facteurs de risque au niveau de l'écurie. Environ 44% des chevaux étaient excréteurs de *E. coli* MDR. L'ampicilline, l'amoxicilline/acide clavulanique et la streptomycine étaient les antibiotiques qui présentaient le plus de non-susceptibilité. Parmi les écuries, 29% abritaient des chevaux porteurs de *E. coli* producteur de BLSE/AmpC. Le gène le plus souvent détecté était le *bla_{CTX-M-1}*. Le gène de virulence *iutA* a été identifié dans un isolat producteur de BLSE/AmpC. Le traitement médical, le nombre de personnes s'occupant des chevaux, et l'activité ont été identifiés comme des facteurs de risque d'excréter des isolats producteurs de BLSE/AmpC.

La prévalence de chevaux sains porteurs de gènes de BLSE/AmpC et de multirésistance dans leur microbiote intestinal est substantielle. Des recommandations, basées sur les facteurs de risque détectés, pourraient être mises en place pour limiter leur dissémination.

Abstract

Background: Although antimicrobial resistance is increasingly common in equine medicine, molecular and epidemiological data remains scarce.

Objectives: We estimated the prevalence of, and risk factors for, shedding of multidrug resistant (MDR), extended spectrum β -lactamase (ESBL)-producing, and AmpC β -lactamase-producing, or some combination of these in *Escherichia coli* in horses in France. We

characterized ESBL/AmpC isolates for antimicrobial susceptibility and the presence of virulence and ESBL/AmpC associated resistance genes.

Animals: Fecal samples from healthy adult horses at 41 premises were collected. A questionnaire was completed by each premises manager. A subset of these samples was tested to build 2 bacterial collections.

Methods: Indicator (without enrichment) and specific (enrichment with ceftriaxone) *E. coli* tested for antimicrobial susceptibility. Prevalence of isolates nonsusceptible to antimicrobials was estimated at the horse and the premises level. The ESBL/AmpC and virulence genes were identified by PCR. Multivariable logistic regression was used to investigate risk factors for MDR and ESBL/AmpC isolates at premises.

Results: Approximately 44% of horses shed MDR *E. coli*. Resistance most commonly was observed to ampicillin, streptomycin, and amoxicillin/clavulanic acid. Twenty-nine percent of premises housed horses shedding ESBL/AmpC-producing isolates. The ESBL/AmpC gene most commonly identified was *bla_{CTX-M-1}*. Virulence gene *iutA* was identified in 1 ESBL/AmpC-producing isolate. Medical treatment, staff numbers, and activity were identified as risk factors for housing horses shedding ESBL/AmpC-producing *E. coli* isolates.

Conclusions and Clinical Importance: Prevalence of healthy horses harboring ESBL/AmpC genes and MDR isolates in their intestinal microbiota is substantial. Risk factors could be used to elaborate guidelines to prevent their dissemination.

Introduction

Antimicrobial resistance was declared by the World Health Organization in 2014 as the greatest threat for human and veterinary medicine(308). Equine medicine also is affected, as demonstrated by the recent publication of several case reports(309, 310). Nevertheless, molecular and epidemiological data in this species remains scarce(18). Since their domestication, horses mainly have been considered working animals or livestock, although more recently some also may be considered companion animals. Therefore, they represent a potential source of contamination by direct contact with their owners or through the food chain. Horses have been overlooked in the global approach to antimicrobial resistance (311). Nevertheless, they received more antimicrobials per kilogram than did cattle in France in 2013 (312).

Escherichia coli is present in the intestinal microbiota of mammals, being mostly commensal although some strains can be pathogenic. Because of its ubiquity, frequent exposure to systemic antimicrobial treatment and its great genomic plasticity, this bacterium is considered by the European Center of Disease Control (ECDC) as an excellent indicator for antimicrobial surveillance (25).

An important mechanism of resistance that can be found in *E. coli* is the production of extended spectrum β -lactamases (ESBL), AmpC cephalosporinases (AmpC) (311) or both, resulting in the enzymatic inactivation of β -lactams. The global prevalence of β -lactamase genes (e.g. *bla*) has increased considerably over the last 30 years throughout the world, both in humans and in animals. This increase might be due to spatial dispersal of mobile genetic elements or high-risk clones or could arise from antimicrobial pressure. In horses, phenotypic resistance to ceftiofur has been documented in foals (10) and in adults (11). The ESBL gene variant *bla*_{CTX-M-1} most often is identified (155). However, *bla*_{CTX-M-2}, *bla*_{CTX-M-9(14)}, *bla*_{CTX-M-15(246)} and several variants of *bla*_{CMY} also have been detected (155). All of these variants also have been found in other animal (155) species and in humans(119). The gene *bla*_{CTX-M-15} is the most prevalent variant in humans because it disseminates through epidemic plasmids and high-risk *E. coli* clones (313), such as the sequence-type ST131. The β -lactamase genes mostly are carried by plasmids, which also may convey resistance to other antimicrobial classes, thus conferring multi-drug resistance (314). Moreover, owning a horse is a risk factor for carriage of ESBL in humans (315), highlighting potential concern for public health. The use of third and fourth generation cephalosporins marketed for veterinary medicine is authorized in horses in France, possibly enhancing the dissemination of ESBL/AmpC genes.

Antimicrobial resistance genes may co-exist with virulence genes on the same plasmids in pathogenic bacteria (316). Although *E. coli* is not considered an enteric pathogen in adult horses, extra-intestinal pathogenic *E. coli* (ExPEC) sporadically have been recognized as potential pathogenic agents in horses (83), and the presence of virulence factors has been reported in *E. coli* isolated from horses (317). The ExPEC are of public health concern because some isolates may be zoonotic. The presence of highly virulent and antimicrobial-resistant strains in the intestinal microbiota of horses could represent a risk for horse handlers because of the possibility of transmission through close contact (17).

No data is available on the presence of MDR or ESBL/AmpC-producing isolates and ExPEC in the healthy equine population in France. Our objective was to determine the prevalence of, and risk factors for, shedding MDR or ESBL/AmpC-producing *E. coli* isolates in horses. We characterized potential ESBL/AmpC isolates for antimicrobial susceptibility and the presence of virulence and ESBL/AmpC-associated resistance genes.

Materials and Methods

Sampling

This work was part of a larger study on resistance to anthelmintics and antimicrobials in horses in France. Sampling details were described elsewhere (318). Briefly, premises housing more than 40 horses, as mentioned in the French Horse and Riding Institute (IFCE) database, were contacted by telephone and selected on a voluntary basis. For each breeding premises, a riding school within a radius of 50 kilometers was recruited when available. At time of the study, we estimated the number of riding schools in the source population as 1600 and the number of breeding premises as 249 in the study area (only riding schools located in French departments including selected breeding premises were considered). To be included in the study, horses had to be > 2 years old and considered healthy by the premise manager. They also had to be present on the premises for > 4 weeks before sampling and must not have received anthelmintic treatment within the last 2 months. On the premises, a convenience sample of horses was assembled based on accessibility.

At each premises, between 8 and 36 horses were sampled. Two grams of feces were obtained, either from the rectum or within 5 minutes of defecation and stored at 4°C up to 6 hours. On the collection day, 18 mL of 30% glycerol were added to each sample and the samples were stored at -20°C before analysis.

A questionnaire was developed based on published risk factors in the horse (289). It was administered on the farm during an interview with the manager. Questions were directed to the general manager of the premises and were always at the premise level. The questionnaire was written in French and is available on request*.

* Le questionnaire est disponible dans l'appendice 1 de cet ouvrage.

Indicator *E. coli* collection: non-enriched culture, antimicrobial susceptibility testing, ESBL/AmpC gene identification, and descriptive statistics.

Because of financial and logistic restrictions, we were not able to test all samples. At first, 3 individual fecal samples per premises were randomly selected, by mixing them up by premises and picking them blinded to horse identification. Because of loss of viability of *E. coli* during transportation observed for the first set of samples (see results), the number of selected samples per premises was increased to 6 on remaining premises where we did not initially obtain samples with viable *E. coli*. One mL of the sample suspension in 30% glycerol was inoculated in 4 mL of peptone water. After ≤ 15 minutes, 100 μ L of this suspension was inoculated onto a Tryptic Soy Agar (TSA) slope tube which was sent to the Reference Laboratory for *Escherichia coli* (Ecl). On receipt, tubes were incubated for 24 hours at 37°C, scraped and bacterial growth passaged onto MacConkey agar and incubated at 37°C overnight. All colonies, up to a maximum of 3, were selected for each fecal sample. Lactose-positive colonies were selected preferentially, but when not present, lactose-negative colonies were selected and retained for further analysis if indole-positive and citrate-negative(319). Isolates were confirmed as *E. coli* by PCR detection of the *uidA* gene(320).

Isolates were tested for susceptibility to the 14 antimicrobial agents examined in the Canadian Integrated Program for Antimicrobial Surveillance (CIPARS 2008) using the disk-diffusion assay as previously described (163). The following antimicrobial disks were used: azithromycin (15 μ g), streptomycin (10 μ g), gentamicin (10 μ g), trimethoprim-sulfamethoxazole (23.75 μ g), sulfisoxazole (250 μ g), tetracycline (30 μ g), nalidixic acid (30 μ g), ciprofloxacin (5 μ g), chloramphenicol (30 μ g), ampicillin (10 μ g), amoxicillin/clavulanic acid (30 μ g), ceftiofur (30 μ g), ceftriaxone (30 μ g), and ceftiofur (30 μ g). The *E. coli* strain ATCC 25922 was used as a susceptible quality control. Veterinary CLSI 2015 clinical breakpoints were used when available; CLSI 2015 clinical breakpoint were used otherwise.

When isolates were non-susceptible (intermediate or resistant) to 3rd generation cephalosporins, we looked for 5 β -lactamase resistance genes (*bla*_{SHV}, *bla*_{TEM}, *bla*_{CMY-2}, *bla*_{OXA}, *bla*_{CTX-M}) by PCR multiplex. We used the primer sequences described previously (239). The ESBL/AmpC resistance genes were detected by PCR performed on DNA extracted by heat lysis, as previously described(321). The protocol was provided by the National Microbiology Laboratory of the Public Health Agency of Canada(322) with control strains ECL3482,

PMON38, and CTX-M15. When *bla*_{CTX-M} was detected, the CTX-M group was determined by PCR(323). The amplicon was purified using the QIAquick® PCR Purification Kit, according to manufacturer instructions. The variant was identified by Sanger sequencing and compared using the Comprehensive Antibiotic Resistance Database (CARD) (<https://card.mcmaster.ca/>).

We estimated the prevalence of horses shedding resistant or non-susceptible (resistant and intermediate) isolates for each antimicrobial and of premises housing these horses. We then estimated the global prevalence and 95% confidence intervals (CI) of horses shedding isolates non-susceptible to > 1, 3, 5, 7 or 9 classes of antimicrobials and of premises housing these horses. An isolate was considered MDR if non-susceptible to ≥ 1 agent of ≥ 3 antimicrobial classes(92). Positive MDR status for a horse was defined as detection of ≥ 1 MDR isolate for that horse. A premises was attributed positive MDR status if it housed ≥ 1 MDR positive horse.

At the horse level, prevalence estimates were adjusted for sampling weights to consider the different sampling probabilities of premises (riding school vs. breeding) and horses within each premises (i.e. the proportion of horses sampled was not constant across all premises). For the estimation of confidence intervals, variances were adjusted for stratification by type of premises (riding school vs. breeding) and for clustering to consider potential non-independence of horses sampled within the same premises. At the premise level, prevalence estimates also were adjusted for sampling weights (at the premise level only) and stratification. The Surveyfreq procedure of SAS 9.4. was used for estimation, based on the Taylor series method.

Potential ESBL/AmpC producing *E. coli* collection: culture, antimicrobial susceptibility testing, ESBL/AmpC and virulence gene identification and descriptive statistics.

Bacteria producing ESBL/AmpC may be shed in small quantities in healthy animals(324). To improve detection sensitivity and permit more accurate estimation of the proportion of positive premises, 2 different approaches were used for enrichment with ceftriaxone. In the first approach, samples used to produce the indicator collection were processed. After receipt at the Ecl and first incubation, plates were scraped and inoculated in 10 mL of MacConkey broth containing 1 mg/L of ceftriaxone and incubated overnight at 37°C. When bacterial growth was positive, 100 μ L of MacConkey broth was inoculated on MacConkey agar containing 1 mg/L of ceftriaxone and incubated at 37°C overnight. Between 1 and 3 lactose-positive isolates per sample were selected.

In the second approach, 8 individual fecal samples per premises were examined individually. When available, these fecal samples were different from those used to produce the indicator collection. In addition, pools of samples from 6 to 10 horses were examined for each premises, and these pooled samples also came from different horses. One mL of the initial glycerol/feces mixture was added to 9 mL of Brain Heart Infusion broth (BHI) and incubated 4 hours at 37°C. One hundred μ L of the BHI broth were inoculated on MacConkey agar with ceftriaxone, 1 mg/L. When bacterial growth was observed, 1 to 3 lactose-positive isolates were selected.

All isolates of this collection were confirmed as *E. coli* by the detection of the *uidA* gene using PCR(320) and were tested for susceptibility against 30 antimicrobials by the disk diffusion method. The following disks were used: streptomycin (10 μ g), gentamicin (10 μ g), amikacin (30 μ g), kanamycin (30 μ g), spectinomycin (100 μ g), trimethoprim-sulfonamide (5 μ g), sulfisoxazole (200 μ g), tetracycline (30 μ g), nalidixic acid (30 μ g), ciprofloxacin (5 μ g), flumequin (30 μ g), enrofloxacin (5 μ g), chloramphenicol (30 μ g), florfenicol (30 μ g), ampicillin (10 μ g), amoxicillin-acid clavulanic (30/10 μ g), piperacillin (100 μ g), piperacillin-tazobactam (100/10 μ g), ticarcillin (75 μ g), ticarcillin-acid clavulanic (75/10 μ g), cefalexin (30 μ g), ceftiofur (30 μ g), cefuroxim (30 μ g), ceftriaxone (30 μ g), ceftazidim (30 μ g), ceftiofur (30 μ g), cefoperazone (75 μ g), cefepim (30 μ g), aztreonam (30 μ g), and imipenem (10 μ g). The *E. coli* strain ATCC 25922 was used as a control. Veterinary CLSI 2015 clinical breakpoints were used when available, CLSI 2015 clinical breakpoints otherwise were used when available, and EUCAST clinical breakpoints were used if criteria could not be found in the 2 first sources.

For all isolates in this collection, we looked for 5 β -lactamase resistance genes (*bla*_{SHV}, *bla*_{TEM}, *bla*_{CMY-2}, *bla*_{OXA}, *bla*_{CTX-M}) by PCR multiplex (PCR and gene identification protocols described above).

The potential pathogenicity of ESBL/AmpC-producing isolates was determined based on the presence of virulence genes which define *E. coli* pathotypes in animals (Enterotoxigenic *E. coli* [ETEC] [*eltB*, *estA*, *estB*], Enteropathogenic *E. coli* [EPEC] [*eae*], Shiga-toxin producing *E. coli* [STEC] [*stxA* and *stx2A*] and Extra-Intestinal *E. coli* [ExPEC] [*iutA*]). The PCR procedures were performed following the protocol of the Ecl available at .

Descriptive statistics were used to present susceptibility profiles per antimicrobial. We also estimated the prevalence and 95% confidence intervals of premises housing horses shedding isolates non-susceptible to > 1, 3, 5, 7 or 9 classes of antimicrobials in this collection, adjusted

for stratification and sampling weights as previously described. The ESBL/AmpC status for premises was attributed in the same manner as MDR status.

Risk factors.

Two outcome variables were defined: MDR and ESBL/AmpC status of premises. Putative risk factors from the questionnaire with $P < .20$ (likelihood ratio test) in univariable logistic regression analysis were selected for inclusion in a multivariable model for each outcome. Pairwise associations between these selected variables were assessed by χ^2 test. In the presence of significant association ($P < .05$), only 1 of 2 correlated variables was kept based on the biological relevance with the outcome. For the ESBL/AmpC model, the number of horses tested per premises was categorized (≤ 10 , 11 to 20 and ≥ 21) and included as a covariate in the full model to consider potential impact on the sensitivity of ESBL/AmpC detection. The final multivariable model then was refined by sequentially omitting variables with $P > .05$. However, if the removal of a variable caused a $>20\%$ change in the odds ratio of another variable, it was kept in the model as a potential confounder. No interaction was tested. The fit of the final model was evaluated using the Hosmer and Lemeshow goodness-of-fit test. The Genmod procedure of SAS 9.4 software was used.

Results

Indicator collection

Overall, 1061 fecal samples from individual horses were collected from 41 premises, distributed as shown in Figure 1. Because of financial and logistic restrictions, a subset of 195 samples, from 41 premises, were sent to the Ecl. We detected viable *E. coli* in 132 of these 195 samples (68%). A total of 348 *E. coli* isolates was selected from these 132 horses, originating from 38 premises. Prevalence estimates were calculated based on the *E. coli*-positive samples only. Prevalence estimates of horses and premises shedding resistant and non-susceptible isolates per antimicrobial are shown in Figure 2. Over 40% of the horses and 80% of the premises showed non-susceptibility to ampicillin, streptomycin and amoxicillin/clavulanic acid.

Non-susceptibility to third generation cephalosporins was observed in isolates from 10.6% of horses and 31.7% of premises. None of these isolates demonstrated presence of *bla* genes by PCR.

Prevalence estimates of non-susceptibility to first generation quinolone (nalidixic acid) was substantial (23.8% of horses and 66.7% of premises) even though non-susceptibility to fluoroquinolones was lower (3.8% of horses and 10.6% of premises).

Prevalence estimates of horses shedding isolates non-susceptible to > 1, 3, 5, 7 or 9 classes of antimicrobials, and premises housing these horses, are summarized in Table 1. The prevalence of horses shedding, isolates non-susceptible to ≥ 1 antimicrobial and MDR isolates were high (84.4% and 44.4% respectively). A total of 79.7% of premises housed horses shedding MDR isolates. In addition, 7.6% of horses shed isolates non-susceptible to 7 classes of antimicrobials.

ESBL/AmpC collection

Twenty-nine percent (95% CI, 11.5-46.5) of premises housed horses that shed isolates non-susceptible to ceftriaxone, and thus belonging to the ESBL/AmpC collection. In the first approach, 195 samples from individual horses from 41 premises were tested, and we detected positive samples for 5 premises. In the second approach, 744 samples from the 41 premises were tested either in pools or individually. We detected positive samples for 16 premises (including the 5 premises identified using the first approach).

Non-susceptibility was observed for a wide range of antimicrobial classes among the 50 isolates of this collection originating from the 16 positive premises (Figure 3). Indeed, all isolates were non-susceptible to ampicillin, piperacillin, cefalexin and ceftriaxone, although only 1 isolate was non-susceptible to amoxicillin/clavulanic acid and ceftiofur (second-generation cephalosporin classified as a cephamycin). In addition, > 60% of these isolates were non-susceptible to aminoglycosides (gentamicin, kanamycin, streptomycin), tetracycline, and folate inhibitors (trimethoprim-sulfonamides, sulfizoxazole). The proportion of isolates non-susceptible to quinolones was lower in this collection than in the indicator collection. Nevertheless, we found 1 isolate that was resistant to fluoroquinolones in this collection. All isolates were susceptible to carbapenems and amikacin. For all premises that housed horses shedding ESBL/AmpC isolates (29.0% of total premises), at least isolate was non-susceptible to 5 classes of antimicrobials, and 2.1% of all premises housed horses that shed isolates non-susceptible to up to 9 classes of antimicrobials (Table 1).

The main ESBL genes identified were *bla*_{CTX-M-1} (33/50 tested isolates) and *bla*_{CTX-M-2} (8/50), but we also identified isolates that carried the ESBL genes *bla*_{CTX-M-14} (2/50), and *bla*_{SHV-12} (6/50). Only 1 isolate carried the AmpC gene *bla*_{CMY-2}. No isolate with ≥ 2 ESBL/AmpC genes was observed.

A high diversity of non- β -lactam resistance patterns was observed among isolates that shared the same *bla* gene, but the 1 isolate carrying *bla*_{CMY-2} was resistant only to ceftioxin and clavulanic acid. The presence of *bla*_{SHV-12} most often was associated with intermediate resistance to ceftriaxone and ceftiofur, but with resistance to cefoperazone (third-generation cephalosporin) and aztreonam (monobactam). No virulence genes associated with enteric pathogenic *E. coli* were observed. Only 1 isolate carried *iutA*.

Risk factors

Risk factors were calculated for 38 premises, because 3 questionnaires were not filled out completely. Sixteen potential risk factors were identified from the questionnaire (Table 2). All were dichotomous or categorical.

Five risk factors were considered for multivariate modelling (all $P < .20$ in univariable analysis) for the ESBL/AmpC outcome, but “transportation” and “contact with wild life” were excluded because they were associated with “the number of persons taking care of the horses” and “activity”, respectively. According to the multivariate model, the odds of being an ESBL/AmpC premises were 14.6 times higher ($P = .03$) among the riding schools compared to breeding premises, 9.6 times higher ($P = .03$) if the premises housed a horse that had been medically treated within the last 3 months and 35.7 times higher ($P = .006$) in premises where the staff consisted of > 5 persons (Table 3). The Hosmer-Lemeshow goodness-of-fit analysis indicated that our model fitted the data ($P = .6$). Transportation was marginally but not statistically significant ($P = .06$) in the univariate analysis but was excluded from multivariable analysis.

The odds of being an MDR premises were 6.7 (95% CI 1.2-38.4) times higher ($P = .03$) in premises where the staff consisted of > 5 persons. This was the only statistically significant variable for this outcome. No regional trends were observed from these analyses.

Discussion

We demonstrated that the fecal microbiota of healthy horses harbors MDR and ESBL/AmpC *E. coli* isolates. The prevalence of premises housing horses shedding ESBL/AmpC *E. coli* isolates (29.0%) is comparable to that found in pig farms in other European countries(325). This finding is both surprising and worrisome because as horses can be considered companion animals(155). Until now, the focus concerning antimicrobial resistance in animals has been on food-producing animals(25). These results suggest that companion animals, including horses, also are important in the persistence of antimicrobial resistance genes.

Ceftiofur is a wide spectrum third-generation cephalosporin approved for use in veterinary medicine that is very well tolerated by horses. Thus, its common use by equine practitioners(101) may promote ESBL/AmpC gene persistence in this species. Nevertheless, the occurrence of ESBL/AmpC genes in other animal species and in the environment is a global problem affecting both animal and public health(326), and also may contribute to the prevalence of ESBL/AmpC genes in horses. Although most ESBL/AmpC-positive isolates in our study were commensals, ESBL/AmpC genes may be transmissible to potential pathogenic or zoonotic strains.

The predominant family of ESBL genes found in the equine microbiota was ESBL *bla*_{CTX-M}. This ESBL family has been of public health concern since the 2000s. In Europe, a dramatic increase in the incidence and diversity of this family has occurred, and over the last 2 decades a shift from other ESBL enzymes in Enterobacteriaceae such as *bla*_{TEM} and *bla*_{SHV} to *bla*_{CTX-M} variants has been observed. The *bla*_{CTX-M} encoded ESBL family is characterized by the ability to hydrolyze oxy-imino-cephalosporins (3rd and 4th generation) and monobactams, but not cephamycins and carbapenems. These bacteria generally are susceptible to β -lactam inhibitors. The predominance of the *bla*_{CTX-M-1} suggests global dissemination of this gene in the equine population. Moreover, it also has been found in all other food-producing animal species in Europe(119), suggesting dissemination among species.

In addition to CTX-M ESBLs, the AmpC resistance gene *bla*_{CMY-2} frequently is found in food production animals in North America(22), but it also has been found in Europe(327). To the best of our knowledge, this gene has not previously been identified in healthy horses, and this

finding reinforces the idea that AmpC genes may spread through the healthy animal population.

The ESBL/AmpC genes often are carried by MDR plasmids, which play a key role in their dissemination(314). The high prevalence of ESBL/AmpC and MDR *E. coli* isolates observed in our study may be explained by the combination of the presence of such plasmids and antimicrobial pressure. Nevertheless, their mobile genetic elements, such as transposons and conjugative plasmids, and their ability to disseminate, should be investigated further(119).

Our approach of examining an indicator *E. coli* collection identified extensive drug resistance in *E. coli* in the intestinal microbiome of healthy horses in France, as previously observed in the United Kingdom(18). The large amount of non-susceptibility to ampicillin in the indicator collection could be explained by the frequent use of penicillin in equine medicine.

Acquired resistance to quinolones and fluoroquinolones is a result of the appearance of chromosomal mutations. Generally, the mutations appear in sequence and involve the genes *gyrA* (coding for the gyrase) and *parC* (coding for a subunit of the topoisomerase). The first mutation confers resistance to quinolones and the combination of the 2 mutations confers resistance to fluoroquinolones. Hence, non-susceptibility to nalidixic acid generally is considered a predictor for fluoroquinolone treatment failure(328). The finding in the indicator collection that > 55% of premises featured this type of resistance suggests that enrofloxacin should be used with caution in horses.

Although we detected non-susceptibility to 3rd generation cephalosporins in the indicator collection, none of the isolates carried tested ESBL/AmpC genes, suggesting that other ESBL/AmpC genes may be present in the population, (e.g *bla*_{OXA}, *bla*_{PER}, *bla*_{GES-1} and *bla*_{VER-1}) or other mechanisms of resistance to cephalosporins may be present (e.g an efflux pump). These other mechanisms would less likely be transmissible by mobile elements but also could account for treatment failure when using cephalosporins, and therefore still could have an impact on the health of horses.

In the indicator collection, we detected viable *E. coli* in only 68% of the fecal samples. This viability rate is low compared to other published studies in healthy horses(18), and compared to internal data available in our laboratory. Some *E. coli* isolates may have been lost during shipping. This issue questions the validity of the indicator collection results, but if it had any

effect on the results it would have underestimated resistance. Indeed, antimicrobial resistance has a fitness cost(329), and resistant isolates should have died first. Nevertheless, the level of resistance we found in the indicator collection, based only on *E. coli* positive samples, is comparable to that of other studies(18). Therefore, we do not believe shipping had considerable influence on the results of the indicator collection.

Our results showed that medication represented a risk factor for ESBL/AmpC-positive premises. Antimicrobial treatment already has been identified as a risk factor at the individual level in other studies(289). Although our results pertain to the premises level, we could hypothesize that medically-treated horses are more likely to shed ESBL/AmpC isolates. Based on this information, we could suggest isolating horses that are medically treated, or at least implementing appropriate biosecurity measures. As an example, limiting contact between treated and healthy horses and handling healthy horses before treated horses might be beneficial to limit antimicrobial gene dissemination. More longitudinal studies are needed to establish the duration of shedding in non-hospitalized horses and to develop more accurate recommendations. Nevertheless, based on other studies(13, 288), the isolation of the horses should be for at least 2 weeks.

The finding that the number of persons taking care of horses influences the presence of ESBL/AmpC genes or the presence of MDR isolates has not been documented previously, to our knowledge. Although more studies are needed to confirm such an association, considering that this information is easy to obtain, it could be helpful for elaborating guidelines to improve the health of horses. For example, it could help equine practitioners to define “at-risk” populations and justify the performance of antimicrobial susceptibility testing more frequently.

Riding schools also seem to be more at risk, as compared to breeding premises, for the presence of ESBL/AmpC genes. This risk factor is relevant because riding schools are an interface with the general population. This finding could provide the impetus to set up prevention measures to limit dissemination of ESBL/AmpC genes and MDR isolates. Appropriate recommendations could include washing hands after touching horses or limiting contact between horses and infants at this type of premises, although further studies are needed to quantify the risk of transmission from horses to humans, and reciprocally.

Our study has some limitations. First, horses within a premises were not selected randomly. However, we have no reason to believe that this selection process would have biased our results, considering that the people in charge of field sampling were blinded to the outcome status and drug use history of the horses. In addition, confidence intervals for odd ratios were wide because of the small sample size of premises. Based on these results, it is not possible to compare the strength of association among the identified risk factors, and this low precision should be considered in interpreting the impact of these risk factors in the horse population. Small sample size also limited the statistical power of our study, and thus true associations with risk factors might have been missed. Finally, because many risk factors were tested, some risk factors may have been statistically significant based on chance alone, and thus more studies should be conducted to confirm these associations.

In conclusion, we found a high prevalence of ESBL/AmpC genes and MDR isolates in the microbiota of healthy horses. Surveillance of ESBL/AmpC gene dissemination and quantification of MDR isolates would be beneficial to characterize the nature and extent of the risk they represent, with the aim of limiting their transmission among horses, but also to other species including humans and to the environment.

Figures and table

Tableau 1 : On the left of the table: Prevalence estimates of healthy adult horses shedding *E. coli* isolates non-susceptible to more than 1, 3, 5, 7 or 9 classes of antimicrobials and premises housing these horses based on the indicator collection results in a cross-sectional study of 132 horses, in 38 premises, in France in 2015. On the right of the table: Prevalence estimates of premises housing healthy adult horses shedding isolates non-susceptible to more than 1, 3, 5, 7 or 9 classes of antimicrobial in the ESBL/AmpC collection, based on the ESBL/AmpC collection results in a cross-sectional study on healthy horses, in 38 premises, in France in 2015. Prev = Prevalence, CI = Confidence interval, MDR = Multidrug resistant.

Number of resistant antimicrobial classes	Bacterial collection					
	Indicator				ESBL/AmpC	
	Horse level (n=132)		Premise level (n = 38)		Premise level (n=41)	
	Pre (%)	CI (95%)	Pre (%)	CI (95%)	Pre (%)	CI (95%)
≥1	84.4	77.4-91.4	99.2	97.5-100	29.0	11.5-46.5
≥ 3 (MDR)	44.4	33.1-55.6	79.7	63.5-96.0	29.0	11.5-46.5
≥ 5	21.9	14.1-29.6	60.2	39.9-80.5	29.0	11.5-46.5
≥ 7	7.6	1.5-13.7	26.1	7.0-45.2	28.3	10.8-45.8
≥ 9	0	n/a	0	n/a	2.1	0.0-4.4

Tableau 2 : Potential risk factors for ESBL/AmpC and multidrug resistant (MDR) status at the premises level, in a cross-sectional study performed on healthy adult horses, in France, in 2015. A positive MDR status for a horse was defined as the detection of a least one MDR isolate for that horse. A premises was attributed a positive MDR status if it housed at least one positive MDR horse. P-value are derived from the likelihood ratio test in univariate analysis.

Risk factor (MDR)	ESBL/AmpC status			MDR status		
	Nb of stables per category	% of positive stables per category	P (univariate analysis)	Nb of stables per category	% of positive stables per category	P (univariate analysis)
Number of horses tested			0.82			N/A
- 10 and less	1	0.0				
- Between 11 and 20	36	41.7				
- 21 and more	4	25.0				
Region			0.26			0.56
- Normandy	19	42.1		18	66.7	
- Aquitaine	14	50.0		12	75.0	
- East	8	12.5		8	87.5	
Transportation			0.06			0.39
- Twice per month or more	27	44.4		24	75.0	
- Less than twice per month	11	9.1		10	60.0	

Total number of horses in the stable				0.09		0.76
- Less than 50	13	15.4			9	66.7
- 50 and more	25	44.0			25	72.0
Staff taking care of horses (daily)				0.007		0.03
- 5 persons and less	21	14.3			17	52.9
- More than 5 persons	17	58.9			17	88.2
Decision to administrate antimicrobials without medical advice				0.77		0.84
- Yes	33	33.3			30	70.0
- No	5	40.0			4	75.0
Contact with wild life				0.20		0.85
- Yes	27	40.7			23	69.6
- No	11	18.2			11	72.7
Presence of other animals on the farm				0.58		0.20
- Farm animals	4	25.0			4	75.0
- Pets	17	35.3			14	85.7
- Farm animals and pets	12	25.0			11	45.5

- No	5	60.0	5	80.0	
Fertilizer spread on the pasture					0.65
- Yes	10	40.0	9	66.7	0.76
- No	28	32.1	25	72.0	
Stall cleansing frequency					0.44
- Less than once a week	8	50.0	7	71.4	0.90
- Once a week and more	26	34.5	23	73.9	
Activity					0.05
- Breeding facility	20	55.0	17	82.4	0.28
- Riding school	21	23.8	21	66.7	
One person of the staff in contact with human or veterinarian medical environment					0.23
- Yes	28	28.6	25	68.0	0.58
- No	10	50.0	9	77.8	
Vet is specialized in equine medicine					0.97
- Yes	36	36.1	32	68.8	0.97
- No	2	0.0	2	100	

One horse has been hospitalized in the last 3 months 0.49 0.84

- Yes 4 50.0 4 75.0
- No 34 32.4 30 70.0

One horse has undergone surgery in the last three months 0.49 0.35

- Yes 4 50.0 4 50.0
- No 34 32.4 30 73.3

One horse has been medically treated in the last three months (all treatments considered) 0.04 0.60

- Yes 20 50.0 18 66.7
 - No 18 16.7 16 75.0
-

Tableau 3 : Parameter estimates and odds ratio from a multivariable logistic regression modelling ESBL/AmpC positive status at the premises level, based on the results of a cross-sectional study performed on 38 premises housing healthy adult horses, sampled in France in 2015.

Risk Factor	Odds ratios		
	Estimate	95% CI	P
<u>Riding school</u> vs breeding facility	14.6	1.3-164.6	.03
<u>One horse has been medically treated in the last three months (all treatments considered)</u> vs no horse treated	9.6	1.2-76.9	.03
<u>More than 5 persons taking care of horses daily</u> vs 5 persons or less	35.7	2.9-500.0	.006

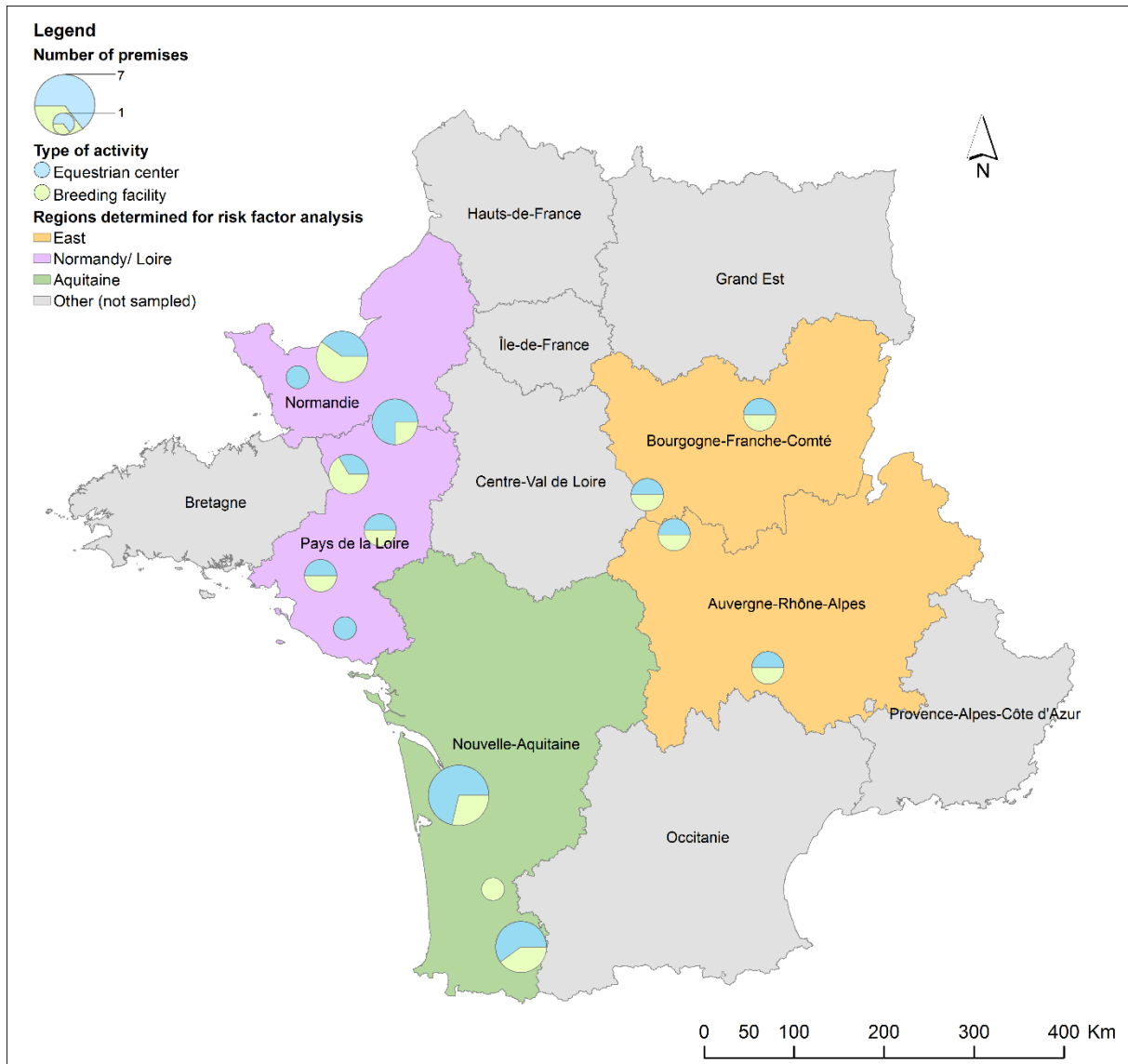
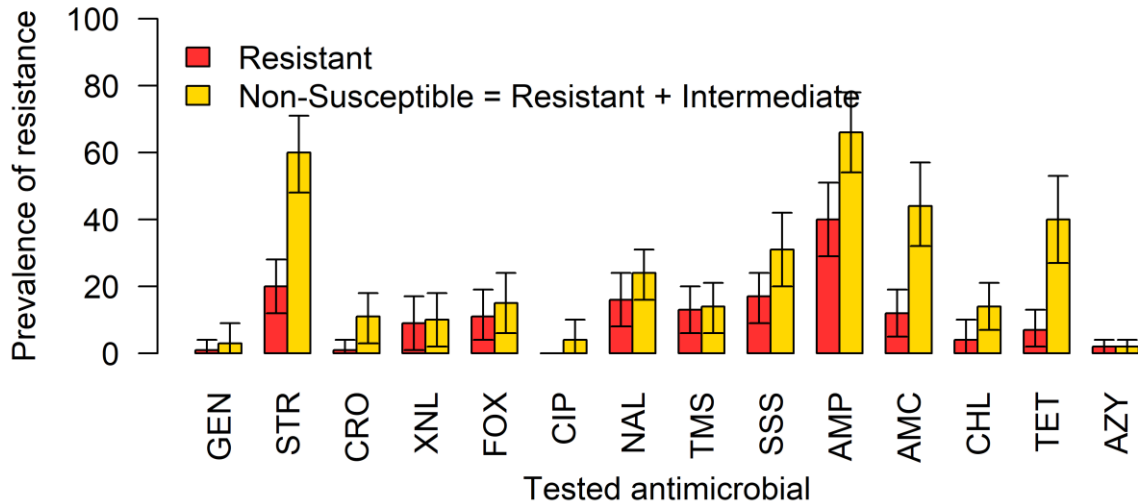


Figure 1. Geographical distribution of sampled premises over the French territory in a cross-sectional study of 132 healthy adult horses, in 41 premises, performed in 2015. Colored regions were defined for the risk factor calculation. The size of the circle is proportional to the number of premises sampled.

A. Prevalence of horses shedding susceptible isolates per antimicrobial (n=132 horses)



B. Prevalence of premises housing horses shedding susceptible isolates per antimicrobial (n=38 premises)

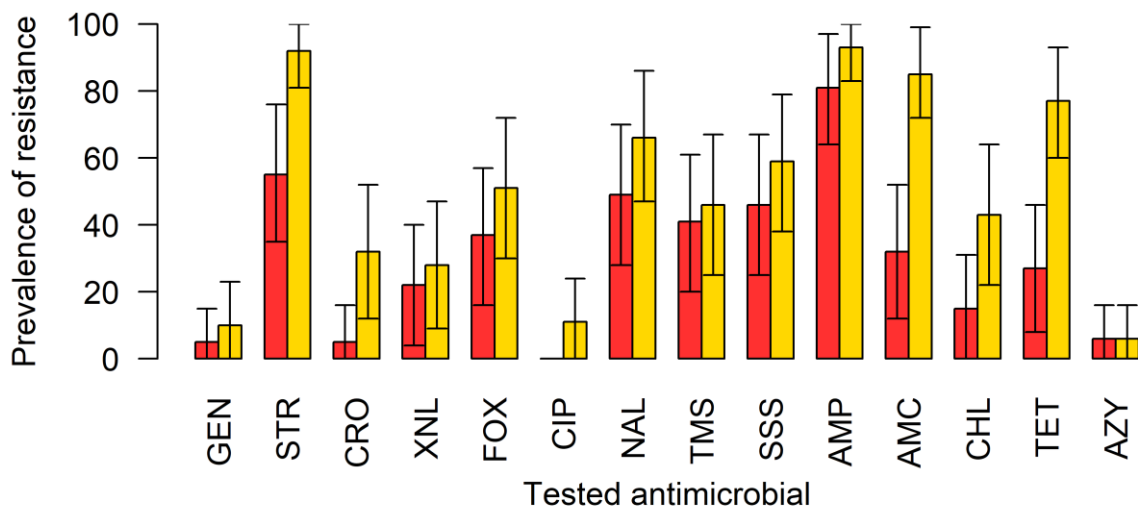


Figure 2 : Prevalence estimates of resistance per antimicrobial, at the horse level (A), and at the premises level (B), in a cross-sectional study of 132 healthy adult horses, in 38 premises, performed in 2015, in France. STR = Streptomycin, GEN = Gentamicin, CRO = Ceftriaxone, XNL = Ceftiofur, FOX = Cefoxitin, CIP = Ciprofloxacin, NA = Nalidixic acid, SSS = Sulfisoxazole, TMS = Trimethoprim-sulfamethoxazole, AMP = Ampicillin, AMC = Amoxicillin-Clavulanic Acid, CHL = Chloramphenicol, TET = Tetracycline, AZY = Azithromycin. Bars represents 95% confidence intervals. We tested 348 isolates in total.

Susceptibility pattern of isolates in the ESBL/AmpC collection



Figure 3 : Characterization of susceptibility profiles of *E. coli* isolates in the ESBL/AmpC collection, in a cross-sectional study performed on healthy adult horses, in France, in 2015 (n = 50 isolates). CHL = Chloramphenicol, FFC = Florfenicol, AMK = Amikacin, GEN = Gentamicin, KAN = Kanamycin, STR = Streptomycin, SPT = Spectinomycin, SSS = Sulfisoxazole, TET = Tetracycline, TMP = Trimethoprim, NAL = Nalidixic acid, UB = Flumequine, ENR = Enrofloxacin, CIP = Ciprofloxacin, AMP = Ampicillin, AMC = Amoxicillin-Clavulanic Acid, PIP = Piperacillin, TZP = Piperacillin-Tazobactam, TIC = Ticarcillin, TCC = Ticarcillin-Clavulanic Acid, CN = Cefalexin, FOX = Cefoxitin, CXM = Cefuroxim, CRO = Ceftriaxone, CFP = Ceftazidime, XNL = Ceftiofur, CAZ = Cefoperazon, FEP = Cefepime, IPM = Imipenem, ATM = Aztreonam.

ARTICLE 2 : Spread of Multidrug Resistance IncHI1 Plasmids Carrying ESBL Gene *bla*_{CTX-M-1} and Metabolism Operon of Prebiotic Oligosaccharides in Commensal *Escherichia coli* From Healthy Horses, France: *bla*_{CTX-M-1} Plasmids in Healthy Horses, France.

Auteurs et affiliations

Contributions de Maud de Lagarde à cet article

Pour cet article Maud de Lagarde a contribué aux demandes de subvention, à l'établissement de la collaboration entre les deux équipes, au devis de l'étude, à une partie de l'exécution des expérimentations et de l'analyse des données, en particulier les sections sur l'analyse phylogénétique des isolats et à la révision de l'article.

Auteurs

Maud de Lagarde, DVM, ACVIM¹⁻²; Caroline Larrieu, DVM; Karine Praud; Catherine Schouler, PhD³; Guillaume Sallé, DVM³; John M. Fairbrother, BVSc, PhD¹⁻²; Benoît Doublet, PhD³.

Affiliation

¹ OIE Reference Laboratory for *Escherichia coli*, Faculty of Veterinary Medicine, Université de Montréal, Saint-Hyacinthe, QC, Canada.

² Department of pathology and microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, Université de Montréal, Saint-Hyacinthe, QC, Canada.

³ ISP, Institut National de la Recherche Agronomique, Université François Rabelais de Tours, UMR 1282, Nouzilly, France

Journal de publication

Cet article a été publié en mars 2020 dans le *International Journal of Antimicrobial Agents*.

Résumé en français

L'objectif de cet article était d'identifier les éléments génétiques de la résistance aux céphalosporines et leurs mécanismes de dissémination dans des isolats commensaux collectés chez des chevaux sains en France en 2015.

Des échantillons fécaux de 744 cheval adultes sains ont été analysés pour détecter des *E. coli* résistant aux céphalosporines. Les gènes de résistance ont été identifiés par PCR et séquençage. Le phénotype de résistance aux céphalosporines a été transféré par conjugaison ou par transformation. Les réplicons des plasmides porteurs de gènes de BLSE/AmpC ont été typés par PCR. Ces plasmides ont également été typés par pMLST et par RFLP. Les *E. coli* résistants aux céphalosporines ont été typés par une analyse de macrorestriction avec l'enzyme XbaI. Seize écuries sur 41 abritaient au moins un cheval porteur de *E. coli* résistant aux céphalosporines. La proportion de chevaux testés individuellement portant des *E. coli* résistants aux céphalosporines était de 8.5% (28/238). Cinquante *E. coli* résistants aux céphalosporines non redondants ont été analysés. Ils démontraient une grande variété de profile de macrorestriction XbaI, appartenaient majoritairement au phylogroupe B1 et étaient négatifs pour les gènes de virulence principaux usuellement détectés chez *E. coli*. Le gène de ESBL de la famille des *bla*_{CTX-M} était prédominant (*bla*_{CTX-M-1}, n=34; *bla*_{CTX-M-2}, n=8; *bla*_{CTX-M-14}, n=2) et localisé sur des plasmides conjugatifs dont les groupes d'incompatibilité étaient variés ((IncHI1, IncI1, IncN, IncY, ou non-typable). Parmi eux, le plasmide IncHI1-ST9 était dominant et porteur soit du *bla*_{CTX-M-1} ou 2 et de l'opéron (scFOS) permettant le métabolisme des oligosaccharides à courte chaîne.

En conclusion, les *E. coli* commensaux provenant de fèces de chevaux français en santé, étaient majoritairement porteur du plasmide IncHI1-ST9 portant les gènes *bla*_{CTX-M-1/2} et l'opéron fos. Ces données soulignent le risque de co-sélection du plasmide IncHI1 porteur de multirésistance et de gènes de ESBL, possiblement médié par l'utilisation des prébiotiques scFOS chez le cheval.

Abstract

The objective was to identify the genetic determinants and supports of expanded-spectrum cephalosporin (ESC) resistance in commensal *Escherichia coli* from healthy horses in France in 2015. Faecal samples from 744 adult horses were screened for ESC-resistant *E. coli* isolates. The ESBL/AmpC resistance genes were identified using PCR and sequencing. ESC phenotypes

were horizontally transferred by conjugation or transformation. Plasmids carrying ESBL/AmpC genes were typed by PCR-based replicon typing, restriction fragment length polymorphism, and plasmid MLST. The ESC-resistant *E. coli* isolates were typed by XbaI macrorestriction analysis. Sixteen stables out of 41 harboured at least one horse carrying ESC-resistant *E. coli*. The proportion of individually tested horses carrying ESC-resistant *E. coli* was 8.5% (28/328). Fifty non-redundant ESC-resistant *E. coli* isolates showing a great diversity of XbaI macrorestriction profiles, belonged mainly to phylogroup B1, and were negative for major *E. coli* virulence genes suggesting that they are commensal isolates. ESBL bla_{CTX-M} genes were dominant (*bla*_{CTX-M-1}, n=34; *bla*_{CTX-M-2}, n=8; *bla*_{CTX-M-14}, n=2) and located on conjugative plasmids belonging to various incompatibility groups (IncHI1, IncI1, IncN, IncY, or non-typeable). Among these, the multidrug-resistance IncHI1-pST9 plasmids were dominant and simultaneously harboured the *bla*_{CTX-M-1/2} genes and an operon enabling the metabolism of short-chain fructo-oligosaccharides (scFOS). In conclusion, commensal *E. coli* of French horses displayed a significant distribution of IncHI1-pST9 plasmids carrying both the *bla*_{CTX-M-1/2} gene and the fos metabolism operon. This finding highlights the risk of co-selection of multidrug-resistance IncHI1 plasmids carrying ESBL gene possibly mediated by the use of scFOS as prebiotic in horses.

Introduction

Extended-Spectrum β -Lactamases (ESBLs) or plasmid-mediated AmpC-producing Enterobacteriaceae(330) resistant to expanded-spectrum cephalosporins, especially *Escherichia coli*, were initially reported in human clinical settings, but recent concern about the faecal carriage among healthy humans has emerged . Surveillance programs monitor antimicrobial resistance of pathogenic bacteria in food-producing animals to prevent food-borne human contamination(331). However, faecal carriage of ESBL/AmpC-producing Enterobacteriaceae by healthy animals, especially among companion animals and horses, have been under less scrutiny. Zoonotic transmission of ESBL/AmpC-producing microorganisms between livestock/companion animals and humans is currently a subject of intense debate (17, 330, 331). Horses have a peculiar status being considered as companion animals, working animals, or livestock depending on the circumstances. Previous studies on the presence of ESBL/AmpC-producing Enterobacteriaceae in equids focused on clinical isolates, the risk of horse-to-horse nosocomial spread in equine clinic, or faecal shedding after

ESC treatments (12, 13, 17, 247, 252-254, 332). Moreover, close contact with horse represents a risk factor of ESBL-carriage in humans (315), although evidence of transmission of ESBL/AmpC-producing isolates between healthy horses or with humans remains scarce (8, 12, 13, 17, 247, 252-254, 315, 332).

Conjugative plasmids of incompatibility groups (Inc) A/C, F, HI, I1, L and N play a major role for horizontal transfer of antimicrobial resistance genes in Enterobacteriaceae, leading to the widespread diffusion of CTX-M ESBL, AmpC cephalosporinase, carbapenemase resistance genes among others (197). IncHI1 plasmids carrying the blaCTX-M-1/2 genes have been described in clinical *E. coli* isolates from diseased or hospitalized horses in Belgium, the Czech Republic, the Netherlands, Denmark, Germany, Sweden and France (12, 17, 252-254, 332). Moreover, complete sequences of IncHI1 type 2 plasmids (pMLST sequence type 9) carrying blaCTX-M-1 in equine *E. coli* revealed that they contained the fos operon involved in short-chain fructo-oligosaccharides (scFOS) metabolism(217). This operon has been shown to increase the colonization abilities of avian pathogenic *E. coli* in the chicken digestive tract(258).

We have recently reported the prevalence of, and risk factors for, fecal carriage of ESBL/AmpC producing *E. coli*, at the premises level in the healthy equine population in France(333). The objective of the present study was to characterize ESBL/AmpC producing *E. coli* shedded by healthy horses at the strain- and plasmid- level to understand the ESBL/AmpC spread among horses.

Materials and Methods

Sampling, bacterial isolates, and antimicrobial susceptibility testing

Sampling was carried out as described previously (333). Briefly, forty-one equine facilities including 21 breeding and 20 riding centres in the 4 main French administrative regions of horse breeding (Normandy, Pays-de-Loire, Aquitaine, and Auvergne-Burgundy). were selected on a voluntary basis. Seven hundred and forty-four healthy horses were sampled during the summer of 2015. For each facility, 8 individual samples were analysed, and 6 to 10 additional samples were pooled and processed to increase the detection of ESC-resistant isolates in each facility. ESC-resistant *E. coli* isolates were selected on MacConkey agar plates supplemented with 1 mg/L ceftriaxone. A set of non-redundant ESC-resistant *E. coli* isolates were selected

based on XbaI-PFGE typing (to avoid clonal isolates with identical pulsotype from the same horse) for further phenotypic and genotypic analysis of antimicrobial resistance. Susceptibility to 30 antibiotics and the production of ESBLs were determined by the disk diffusion method on Mueller-Hinton agar and using the double-disk synergy test, respectively, as recommended by EUCAST 2016 (<http://www.eucast.org/>) using disks (Biorad, Marne-la-Coquette, France) containing the following antibiotics: streptomycin, spectinomycin, gentamicin, kanamycin, amikacin, nalidixic acid, flumequine, ciprofloxacin, enrofloxacin, chloramphenicol, florfenicol, tetracycline, sulphonamides, trimethoprim, amoxicillin, amoxicillin/clavulanic acid, piperacillin, piperacillin/tazobactam, ticarcillin, ticarcillin/clavulanic acid, cefalotin, ceftiofur, cefuroxime, cefoperazone, ceftriaxone, ceftazidime, ceftiofur, cefepime, aztreonam and imipenem, and the *E. coli* control strain ATCC25922, as previously described (12).

Molecular typing, and phylogenetic analysis

Redundancy of ESC-resistant *E. coli* isolates were investigated by XbaI-PFGE using the Pulsenet protocol (<https://www.cdc.gov/pulsenet/PDF/ecoli-shigella-salmonella-pfge-protocol-508c.pdf>). Electrophoresis was carried out at 14°C and 6V/cm in a BioRad CHEF-DRIII system (Biorad, Marne-la-Coquette, France). Cluster analysis was done using Dice similarity indices with BioNumerics 7.6 software (1 % tolerance, 1 % optimization) (Applied Maths, Ghent, Belgium). Unweighted pair-group method using arithmetic (UPGMA) averages were used to generate an additive tree. *E. coli* isolates were classified into the 4 main ECOR phylogenetic groups by triplex PCR (*chuA*, *yjaA*, and *TspE4C2*) as described by Clermont et al.(37). Isolates were assigned to phylogenetic groups A, B1, B2, or D.

Detection, plasmid typing, sequencing and transferability of ESBL/AmpC genes

PCR assays were performed to assess the presence of ESBL/AmpC genes (*blaTEM*, *blaSHV*, *blaCTX-M*, *blaVEB*, *blaDHA*, and *blaCMY*) in the parental ESC-resistant *E. coli* isolates and in transconjugants or transformants, as previously described (334). All PCR products obtained by amplification from parental isolates were sequenced by Genewiz Europe (Takeley, UK). Sequence results were compared with those registered in databases using BLAST.

Conjugative mating experiments were carried out using sodium azide or rifampicin resistant *E. coli* K-12 J5-3 (F- proB22 metF63) as recipient strain, as previously described(334). Transconjugants were selected on Mac Conkey agar medium supplemented with ceftriaxone

(1 mg/L) and sodium azide (500 mg/L) or rifampicin (250 mg/L). For unsuccessful conjugative transfer, the entire plasmid content of parental ESC-resistant *E. coli* isolates was purified using plasmid DNA mini kit (Qiagen, Hilden, Germany) and electroporated into *E. coli* TOP10 (Life Technologies, Saint Aubin, France) as recipient strain. ESC-resistant *E. coli* transformants were selected using ceftriaxone at 1 mg/L. ESC resistance-conferring plasmids were extracted from transconjugants/transformants using Macherey–Nagel NucleoBond Xtra Midi plasmid purification kit (Hoerdtt, France) following the manufacturer's recommendations for high molecular weight plasmids. Plasmid incompatibility groups were determined using the PCR-based replicon typing (PBRT) method(191, 335). Subtyping of IncHI1 and IncI1 plasmids was performed using plasmid MLST (pMLST)(183, 336). IncHI1 Plasmids were further compared using restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis with EcoRI.

Metabolism of scFOSs conferred by ESBL/AmpC plasmids and detection of *fos* operon

The growth ability conferred by ESBL/AmpC plasmids using scFOS as the sole source of carbon was assessed in M9 minimal medium supplemented with 0.5% scFOS (Profeed P95; Beghin Meiji, France) and 0.01 mg/ml L-proline (Fisher) and 0.01 mg/ml L-methionine (Fisher) or 0.01 mg/ml L-leucine (Fisher) for *E. coli* K-12 J5-3 or TOP10 derivatives, respectively, as previously described (258). Transconjugants/transformants containing ESBL/AmpC plasmids were grown overnight at 37°C. *E. coli* isolate BEN2908 containing the chromosomally integrated *fos* operon and plasmid-free recipient strains were used as positive and negative control strains, respectively. M9 minimal medium supplemented with 0.2% Casamino Acids and either 0.2% glucose (Sigma) or without carbon source was used as a positive and negative control, respectively. The presence of *fos* genes was detected on plasmid DNA extracted from transconjugants/transformants, by PCR as previously described(258).

Results and Discussion

ESBL/AmpC-producing clinical *E. coli* isolates have been described in diseased or hospitalized horses in various countries in Europe (12, 13, 17, 252-254, 332). Previously, we estimated the prevalence of faecal carriage of ESC-resistant isolates in healthy horses in France(333). Sixteen out of 41 equine facilities (39%) harboured at least one horse carrying ESC-resistant *E. coli* isolates. Among 328 healthy adult horses individually analysed, the faecal carriage rate of ESC-resistant *E. coli* was 8.5% (28/328). Similar results have been reported from healthy horses sampled in 2008-2009 in the UK, whereas higher proportions were found in hospitalized horses in different studies(17, 18, 253). This occurrence

of ESC-resistant *E. coli* carriage at the horse level was similar to the proportion of ESC resistance of pathogenic *E. coli* reported in the annual report 2016 of the French surveillance network (<https://www.resapath.anses.fr/>). Interestingly, the antimicrobial therapy history did not reveal any treatment in the last 3 months before sampling for these 328 horses except one treated with penicillin for 5 days in this period. As described in the previous paper, the screening of pooled samples from 416 additional healthy horses permitted us to increase the bacterial collection to 50 non-redundant ESC-resistant *E. coli* isolates.

Phylogenetic characteristics of isolates

Most of the isolates belonged to phylogenetic group B1 (66%, n= 33/50), followed by group A (24%, n= 12/50) and group D (10%, n= 5/50). Moreover, none of the major *E. coli* virulence genes in livestock animals (*eae*, *stxA*, *stx2A*, *iutA*, *eltB*, *estA*, *estB*) were found (333), suggesting that they are commensal isolates. *E. coli* belonging to phylogenetic group B1 are commonly described as being commensal in herbivores (40). The present phylogroup distribution is similar to that recently described by Lupo et al. for clinical ESBL-producing *E. coli* from horses in France and Sweden(252). Macrorestriction analysis by XbaI-PFGE showed high genomic diversity (with a Dice similarity coefficient of < 80%) (Fig. 1). Nevertheless, 3 couples of ESC-resistant *E. coli* isolates shared the same (IDs AQC2-10-2 and AQE1-15-5) or related (IDs AQC2-10-1 and AQE1-6-R; AQC2-10-3 and AQE1-15-1) macrorestriction patterns, although they were isolated from distinct horses in different facilities. This suggested that clonal dissemination of ESC-resistant *E. coli* may occur between horses. These different breeding and riding centres were geographically close (in the same region, Aquitaine), however no information on exchange or common equine competition was available to establish a link between these horses. MLST analysis in recent studies of clinical ESBL-producing *E. coli* from horses have shown less diversity with an overwhelming contribution of major clonal complexes (CC-10, -641, -1250) spreading within equine clinics or at the country level (247, 252, 253).

Antimicrobial resistance, ESBL/AmpC genes, transferability, and plasmid typing

Among these ESC-resistant *E. coli* isolates, the ESBL gene *blaCTX-M-1* was predominant (n=34) followed by *blaCTX-M-2* (n=8) (Table 1 and Fig. 1). In addition, *blaCTX-M-14* and *blaSHV-12* were identified in two and five isolates, respectively. Only one isolate harboured the AmpC cephalosporinase gene *blaCMY-2*. Overall, these 50 commensal *E. coli* isolates were multidrug-resistant (MDR) with different additional non- β -lactam resistance against aminoglycosides, sulphonamides, trimethoprim, tetracycline and quinolones, except for 4 isolates resistant only to β -lactams (Table 1).

Forty-four isolates out of 50 were able to transfer their ESC-resistance phenotype to the *E. coli* recipient strains by conjugation. The conjugative transfer of the ESBL/AmpC genes *blaCTX-M-1* (28/34), *blaCTX-M-2* (8/8), *blaCTX-M-14* (2/2), *blaSHV-12* (5/5) and *blaCMY-2* (1/1) was confirmed by PCR and sequencing in all transconjugants. The entire plasmid content of the seven isolates that were unable to conjugate their ESC phenotype were electroporated into *E. coli* TOP10. ESBL-producing transformants positive for *blaCTX-M-1* were obtained for all parental isolates (Table 1). Co-transfer of additional non- β -lactam resistance phenotypes occurred, depending both on the ESBL/AmpC genes and the parental isolates (Table 1). Plasmid replicon typing indicated that the *blaCTX-M-1* and *blaCTX-M-2* genes were mainly located on conjugative IncHI1 plasmids (24/30) (Table 1). EcoRI-RFLP analysis of IncHI1 plasmids showed 6 clusters of identical restriction profiles suggesting horizontal transmission events of the same plasmid at three different scales (Fig. 2). Firstly, horizontal conjugative transfer of the IncHI1-pST2 plasmid carrying *blaCTX-M-1* was observed in different genetically-unrelated commensal *E. coli* isolates in the intestinal microbiota of horse (see horse ID NC5-9 and isolates NC5-9-B vs NC5-9-1 and NC5-9-R in Figs 1 and 2). Secondly, an IncHI1-pST9 plasmid carrying *blaCTX-M-1* was observed in phylogenetically unrelated commensal *E. coli* isolates in different horses from the same facility or in horses from different facilities, indicating cross-contamination between horses (Figs 1 and 2). Finally, slightly different restriction profiles and antimicrobial resistance phenotypes were sometimes observed (see NE5-19 isolates, Figs 1 and 2, table 1) suggesting the possible short-term evolution of the IncHI1-pST9 plasmid carrying *blaCTX-M-1* within the host, probably through antimicrobial resistance gene acquisition or loss. PCR mapping of IncHI1 plasmids confirmed the previously described presence of IS26-composite transposon and ISCR1-class 1 integron structures carrying the *blaCTX-M-1* and *blaCTX-M-2* genes, respectively (data not shown)(12, 217).

Sporadic occurrences of conjugative plasmids carrying *blaCTX-M* genes and belonging to other Inc groups, e.g. IncI1-pST3 and -pST87, and IncY were found in different equine facilities. In addition, four IncN-pST1 plasmids carrying *blaCTX-M-1* were identified in different horses from the same breeding stable (Table 1). Also, two horses carried the ESBL gene *blaSHV-12* located on conjugative IncX3 plasmids as recently described from wildlife and horses (247, 337). These *blaSHV-12*-IncX3 plasmids were harboured by several distinct *E. coli* isolates in each horse gut microbiota. Of note, one horse (AQC2-10) simultaneously harboured the ESBL genes *blaCTX-M-1* and *blaSHV-12*, located on IncY and IncX3 plasmids, respectively. Another horse harboured two different isolates positive for *blaCTX-M-1*, one on a IncI1-pST87 plasmid and the other on a multireplicon IncHI1-pST9/Y plasmid (Table 1).

In agreement with recent studies on diseased horses, the ESBL gene *blaCTX-M-1* was predominant in the horses of our study(12, 252, 253, 332). CTX-M-1 producers are also predominant in food-producing animals in several European countries(197). IncHI1 plasmids carrying *blaCTX-M-1/2* genes have been

reported in *E. coli* isolates from diseased horses in hospital settings in Belgium, the Netherlands, the Czech Republic, Germany, Sweden and France(12, 17, 252-254, 332). Nevertheless, our results demonstrate that other epidemic plasmids carrying *blaCTX-M-1*, i.e. IncI1-pST3 or IncN-pST1, as well as another ESBL-plasmid association (*blaSHV-12*-IncX3) are also harboured by commensal *E. coli* among healthy horses in France.

blaCTX-M IncHI1-pST9 plasmids confer the property of scFOS metabolism

The *fos* operon was initially characterized on the chromosomal genomic island AGI-3 in extraintestinal avian pathogenic *E. coli*(258). This operon is involved in the metabolism of prebiotic short chain fructooligosaccharides (scFOS) and was shown to play a major role in the initial stage of chicken intestinal colonization by *E. coli*(338). Recently, Dolejska et al. described the presence of the functional *fos* operon in IncHI1-pST9 plasmids pEQ in *E. coli* from diseased horses in the Czech Republic(217). In the present study, the *fos* operon was detected by PCR in all except one *blaCTX-M1/2*-IncHI1-pST9 plasmids (Table 1). All *E. coli* transconjugants/transformants carrying *fos*-positive IncHI1-pST9 plasmids were able to grow in M9 minimal medium supplemented with scFOS as the sole carbone source (Table 1), which was not the case for the different empty recipient *E. coli* strains corresponding to negative controls. This plasmid-encoded metabolic function may constitute an advantage for colonization of the intestinal microbiota of horses. Moreover, the use of scFOS as prebiotic additive in feed or as a treatment of digestive disorders for horses may also contribute to co-selection and maintenance of MDR IncHI1 plasmids in the absence of antibiotic selection pressure. However, this hypothesis warrants further investigations in controlled experimental settings or a cross-sectional study.

In conclusion, a significant occurrence of ESBL-producing *E. coli* was found in healthy horses in France. A large diversity of phylogenetic backgrounds of commensal *E. coli* was found but carrying specific *blaCTX-M* plasmids such as IncHI1-pST9 plasmids carrying both the ESBL genes *blaCTX-M1/2* and the *fos* operon, which is disseminated across Europe. Here, different examples argue on the horizontal conjugative transfer of these plasmids in vivo within the horse gut microbiota. Other plasmid-encoded functions than antimicrobial resistance such as scFOS metabolism may represent determinants for the spread of IncHI1 plasmids carrying *blaCTX-M-1* in horses. However, further investigations are needed to confirm their co-selection and maintenance through the use of scFOS. Overall, ESBL dissemination among horses in Europe and potentially worldwide is most likely facilitated by international horse movements associated with racing, breeding activities and hospitalization. Horses should be considered as a potential reservoir of ESBL/AmpC resistance genes. Thus, further surveillance of

antimicrobial resistance in the equine environment is necessary to reduce the dissemination of critically important resistances and to investigate the public health risks.

Acknowledgements

This work was supported by a research grant from “l’Institut Français du cheval et de l’équitation (IFCE, Fonds Eperon)”, public funds from the French National Institute of Agricultural Research (INRA Tours) and the OIE Reference Laboratory for *E. coli*. We would like to thank all involved veterinarian students for their crucial help in collecting samples and horse owners who took part in this study.

The authors declare no conflict of interests.

Tables and Figures

Tableau 1 : Characteristics of ESC-resistant *E. coli* strains from horses, France

Isolate ID ^a	Non β -lactam resistance phenotype of parental strain	Transferred ESBL/AmpC resistance gene	Plasmid replicon Inc group-pMLST ^b	Non β -lactam resistance phenotype transferred	ScFOS growth conferred by ESBL/ampC plasmids	<i>fos</i> metabolism operon
ABE1-40-B	GEN STR SPT SUL TMP TET NAL FLU CIP ENR	<i>bla</i> _{CTX-M-14}	I1-pST3 (CC3)	SUL TMP	-	-
ABE1-40-R	GEN KAN STR SUL TMP TET	<i>bla</i> _{CTX-M-2}	HI1-pST9	GEN KAN STR SUL TMP TET	+	+
ABE1-42-R	GEN KAN STR SUL TMP TET	<i>bla</i> _{CTX-M-2}	HI1-pST9	KAN STR SUL TMP TET	+	+

ABE1-6-R	SUL TMP	<i>bla</i> _{CTX-M-1}	I1-pST3 (CC3)	SUL TMP	-	-
ABE1-P2-CR	GEN KAN STR SUL TMP TET	<i>bla</i> _{CTX-M-2}	HI1	GEN KAN STR SUL TMP TET	+	+
ABE1-P2-R	GEN KAN STR SUL TMP TET	<i>bla</i> _{CTX-M-2}	HI1- pST9	GEN KAN STR SUL TMP TET	+	+
ABE1-P3-R	SUL TMP	<i>bla</i> _{CTX-M-1}	I1-pST3 (CC3)	SUL TMP	-	-
AQC2-10-1	GEN STR SUL TMP	<i>bla</i> _{CTX-M-1}	Y	GEN STR SUL TMP	-	-
AQC2-10-2	FLU ENR	<i>bla</i> _{SHV-12}	X3	None	-	-
AQC2-10-3	SUL TMP NAL FLU	<i>bla</i> _{SHV-12}	X3	None	-	-
AQC2-10-4	SUL TMP FLU ENR	<i>bla</i> _{SHV-12}	X3	None	-	-
AQC2-2-R	CHL GEN KAN STR SUL TMP TET	<i>bla</i> _{CTX-M-1}	HI1*	CHL GEN STR SUL TET TMP	+	+
AQC6-2-R	None	<i>bla</i> _{CMY-2}	I1-pST2 (CC2)	None	-	-
AQC6-4-R	CHL GEN KAN STR SUL TMP TET	<i>bla</i> _{CTX-M-1}	HI1- pST9	CHL GEN KAN STR SUL TMP TET	+	+
AQC6-7-B	CHL GEN KAN STR SUL TMP TET	<i>bla</i> _{CTX-M-1}	HI1- pST9*	CHL GEN KAN STR SUL TMP TET	+	+
AQC6-8-R	CHL GEN KAN STR SUL TMP TET	<i>bla</i> _{CTX-M-1}	HI1- pST9	CHL GEN KAN STR SUL TMP TET	+	+

AQC7-7-R	CHL GEN KAN STR SUL TMP TET	<i>bla</i> _{CTX-M-1}	HI1	CHL GEN KAN STR SUL TMP TET	+	+
AQE1-15-1	SUL TMP TET NAL FLU CIP ENR	<i>bla</i> _{SHV-12}	X3	SUL TMP TET FLU	-	-
AQE1-15-5	FLU CIP ENR	<i>bla</i> _{SHV-12}	X3	None	-	-
AQE1-6-R	GEN STR SUL TMP	<i>bla</i> _{CTX-M-1}	Y	GEN STR SUL TMP	-	-
AQE1-8-R	CHL GEN KAN SUL TMP TET	<i>bla</i> _{CTX-M-1}	HI1- pST9	CHL GEN KAN STR SUL TMP TET	+	+
AQE3-1-RC	SUL TMP	<i>bla</i> _{CTX-M-1}	N-pST1	None	-	-
AQE3-2-R	None	<i>bla</i> _{CTX-M-1}	N-pST1	None	-	-
AQE3-4-R	None	<i>bla</i> _{CTX-M-1}	N-pST1	None	-	-
AQE3-5-R	None	<i>bla</i> _{CTX-M-1}	N-pST1	None	-	-
AQE3-6-R	CHL GEN STR SUL TMP TET	<i>bla</i> _{CTX-M-1}	HI1- pST9	CHL GEN STR SUL TMP TET	+	+
AQE4-4-RO	CHL GEN KAN STR SPT SUL TMP TET	<i>bla</i> _{CTX-M-1}	HI1	CHL GEN KAN STR SUL TMP TET	+	+
AQE4-7-B	CHL GEN KAN STR SPT SUL TMP TET	<i>bla</i> _{CTX-M-1}	HI1- pST9	CHL GEN KAN STR SPT SUL TMP TET	+	+
AQE7-P1-R	CHL GEN STR SPT SUL TMP TET	<i>bla</i> _{CTX-M-1}	HI1	CHL GEN STR SUL TMP TET	+	+

NC0-4-RC	CHL GEN KAN STR SUL TMP TET	<i>bla</i> _{CTX-M-1}	HI1	CHL GEN KAN STR TMP TET	+	+
NC0-17-1	KAN STR SUL TMP TET	<i>bla</i> _{CTX-M-2}	HI1- pST9/Y	KAN STR SUL TMP TET	+	+
NC0-17-R	GEN KAN STR SUL TMP TET	<i>bla</i> _{CTX-M-2}	I1- pST87	SUL TMP	-	-
NC5-9-1	CHL GEN SPT STR SUL TMP TET	<i>bla</i> _{CTX-M-1}	HI1- pST2*	CHL GEN SUL TMP TET	-	-
NC5-9-B	CHL GEN STR SUL TMP TET	<i>bla</i> _{CTX-M-1}	HI1-ST2	CHL STR SUL TMP TET	-	-
NC5-9-R	CHL GEN STR SPT SUL TMP TET	<i>bla</i> _{CTX-M-1}	HI1- ST2*	CHL GEN STR SUL TET TMP	-	-
NE4-6-R	CHL GEN KAN STR SUL TMP TET	<i>bla</i> _{CTX-M-1}	HI1- pST9	CHL GEN TMP	+	+
NE5-19-CR	CHL GEN KAN STR SUL TET	<i>bla</i> _{CTX-M-1}	HI1- pST9	CHL GEN KAN STR SUL TET	+	+
NE5-19-R	CHL GEN KAN STR SUL TET	<i>bla</i> _{CTX-M-1}	HI1- pST9	CHL GEN KAN STR SUL TET	+	+
NE5-19-RO	CHL GEN STR SUL TET	<i>bla</i> _{CTX-M-1}	HI1- pST9	CHL GEN STR SUL TET	+	+
NE5-5-R	CHL GEN KAN STR SUL TMP TET	<i>bla</i> _{CTX-M-1}	HI1	CHL GEN KAN STR SUL TMP TET	+	+
PLE1-3-R	CHL STR SUL TMP TET	<i>bla</i> _{CTX-M-1}	I1- pST87	SUL TMP	-	-
PLE1-P1-R	CHL GEN STR SUL TET	<i>bla</i> _{CTX-M-1}	HI1*	CHL GEN STR SUL TET TMP	+	+

PLE2- 14-R	GEN STR SUL TMP FLU ENR	<i>bla</i> _{CTX-M-1}	NT*	GEN STR	-	-
PLE2- 14-RO	CHL GEN STR SUL TMP TET	<i>bla</i> _{CTX-M-1}	HI1- pST9	CHL GEN STR SUL TMP TET	-	-
PLE2- 33-1	GEN STR SUL TMP FLU ENR	<i>bla</i> _{CTX-M-1}	NT	GEN STR SUL TMP	+	+
PLE2- P1-R	GEN KAN STR SUL TMP TET	<i>bla</i> _{CTX-M-2}	HI1- pST9	KAN STR SUL TMP TET	+	+
PLE3- 5-CR	CHL GEN KAN STR SPT SUL TMP TET NAL CIP ENR	<i>bla</i> _{CTX-M-1}	HI1*	CHL GEN KAN STR SUL TET	+	+
PLE3- 5-R	KAN STR SUL TMP TET	<i>bla</i> _{CTX-M-2}	HI1	KAN STR SUL TMP TET	+	+
PLE3- 8-R	CHL GEN STR SUL TMP TET	<i>bla</i> _{CTX-M-1}	HI1- pST9	CHL GEN STR SUL TMP TET	+	+
PLE4- P1-R	GEN STR SUL TMP TET	<i>bla</i> _{CTX-M-14}	NT	GEN STR SUL TMP TET	-	-

^aIsolate ID contain all information relative to the origin of the isolates as follow XX(E/C)n-n-XX: The first letter or two first letters correspond to the French administrative regions (AB, Auvergne-Burgundy; AQ, Aquitaine; N, Normandy; PL, Pays-de-Loire). "En" or "Cn" correspond to the breeding facility (E) or equestrian centre (C) number. The horse number in the facility is indicated between dashes. The last letter or number is specific of the isolate, used when there are several isolates from the same horse.

^bNT, non-typeable. Asterisks indicate non-self-conjugative plasmids.

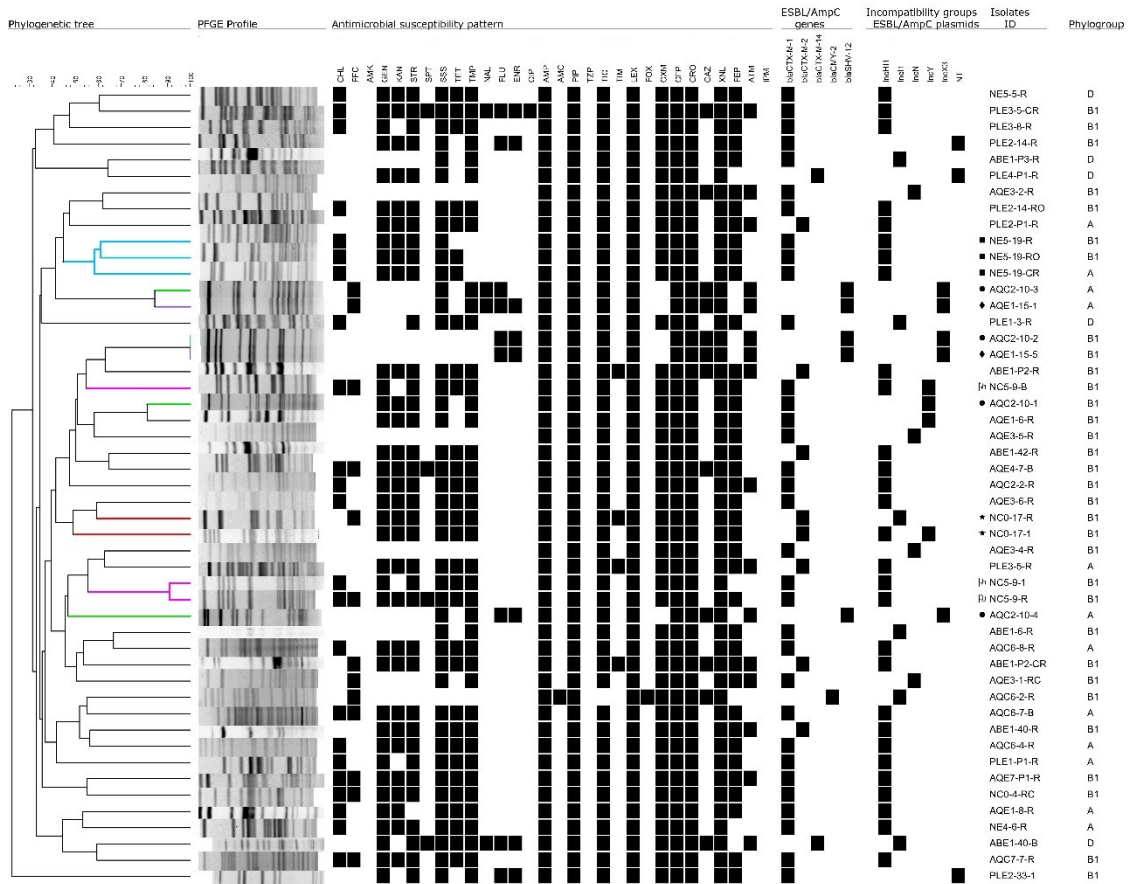


Figure 1 : Analysis of *Xba*I-PFGE patterns obtained from ESBL/AmpC-producing *E. coli* isolates. PFGE profiles were compared by using BioNumerics software version 7.6 (Applied Maths) with settings of 1.0% optimization and 1.0% tolerance. Isolate ID contains all information relative to the origin of the isolates as follows XX(E/C)n-n-XX: The first letter or two first letters correspond to the French administrative regions (AB, Auvergne-Burgundy; AQ, Aquitaine; N, Normandy; PL, Pays-de-Loire). “En” or “Cn” correspond to the breeding facility (E) or equestrian centre (C) number. The horse number in the facility is indicated between dashes. The last letter or number is specific for the isolate, used when there are several isolates from the same horse. Coloured tree branches and symbols before Isolate IDs correspond to isolates from the same horse. *E. coli* isolate AQE4-4-RO could not be restricted by *Xba*I-PFGE in repeated attempts, thus was excluded from the present analysis.

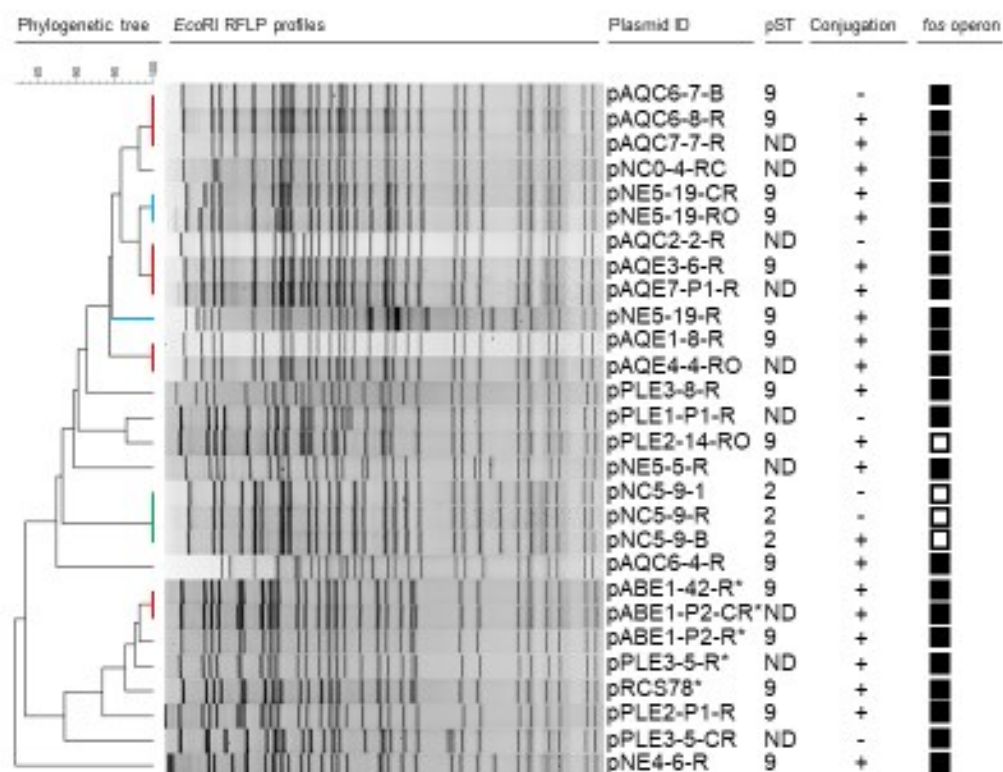


Figure 2 : Analysis of EcoRI-RFLP profiles of IncHI1 plasmids carrying *bla*CTX-M1/2 genes. Coloured tree branches correspond to plasmids from the same animal (blue and green) or distinct animals from the same facility as well as from different facilities (red).* IncHI1 plasmids carrying *bla*CTX-M-2. fos operon presence/absence, □/■. IncHI1-ST9 plasmid pRCS78 was previously described and added as control (complete sequence available, GenBank accession number LT985296) (4). DNA of IncHI1 plasmids from *E. coli* isolates ABE1-40-R, AQE4-7-B, and NC0-17-R could not be restricted by EcoRI in repeated attempts, thus was excluded from the present analysis.

ARTICLE 3 : Prevalence, risk factors, and characterization of multidrug resistant and ESBL/AmpC producing *Escherichia coli* in healthy horses in Quebec, Canada, in 2015-2016.

Auteurs et affiliations

Contribution de Maud de Lagarde à cet article

Pour cet article Maud de Lagarde a contribué majoritairement aux demandes de subventions, au devis de l'étude, à l'exécution des expérimentations, à la récolte et l'analyse des données ainsi qu'à la rédaction du manuscrit initial et sa révision.

Auteurs

Maud de Lagarde ¹, John M. Fairbrother ¹, and Julie Arsenault ²

Affiliation

¹OIE Reference Laboratory for *Escherichia coli*, Faculty of Veterinary Medicine, Université de Montréal, J2S 2M2 Saint-Hyacinthe, QC, Canada; john.morris.fairbrother@umontreal.ca

²Epidemiology of Zoonoses and Public Health Research Unit (GREZOSP), Faculty of Veterinary Medicine, Université de Montréal, J2S 2M2 Saint-Hyacinthe, QC, Canada; julie.arsenault@umontreal.ca

Journal de f publication

Cet article a été publié dans le journal *Animals* en mars 2020.

Résumé en français

Bien que l'antibiorésistance soit une menace grandissante en médecine équine, les données épidémiologiques et moléculaires restent limitées en Amérique du Nord. Nous avons évalué la prévalence et les facteurs de risque de l'excrétion de *E. coli* porteur de multirésistance et producteur de BLSE/AmpC chez des chevaux sains au Québec, Canada. Nous avons collecté des échantillons fécaux de 225 chevaux adultes en santé, répartis dans 32 écuries. Un questionnaire donnant des informations sur la régie de l'écurie et l'historique médical du cheval a été rempli pour chaque cheval.

Des *E. coli* indicateurs (collectés sans enrichissement) et spécifiques (collectés après enrichissement avec de la ceftriaxone) ont été testés pour la résistance aux antibiotiques. La présence de gènes de BLSE/AmpC a été déterminée par PCR. La prévalence des isolats non susceptibles aux antibiotiques testés et aux différentes familles d'antibiotiques a été estimée au niveau individuel et au niveau de l'écurie. Une régression logistique multivariée a été utilisée pour évaluer les facteurs de risque potentiels pour l'excrétion d'isolats MDR et porteur de BLSE/AmpC.

Le portage de *E. coli* multirésistant a été détecté dans 46.3% des chevaux. L'ampicilline, l'amoxicilline/acide clavulanique et la streptomycine étaient les antibiotiques qui présentaient le plus de non-susceptibilité. Des isolats porteurs de BLSE/AmpC ont été détectés dans 7.3% des chevaux. Le gène le plus souvent détecté était le *bla*_{CTX-M-1}, mais nous avons également détecté le *bla*_{CMY-2}.

Le nombre de personnes s'occupant des chevaux et la participation à un événement équestre dans les 3 derniers mois ont été identifiés comme des facteurs de risque de portage d'isolats multirésistants. La prévalence de chevaux porteurs de *E. coli* multirésistants ou producteur de BLSE/AmpC est notable au Québec. Nous avons identifié des facteurs de risque qui pourraient aider à développer des recommandations pour limiter leur dissémination.

Abstract

Simple Summary: Antimicrobial resistance has been recognised as a global threat by the WHO. ESBL/AmpC genes, responsible for cephalosporin resistance, are particularly worrisome. *Escherichia coli* is a ubiquitous bacterium. Most strains are commensal, although some can cause disease in humans and animals. Due to its genome plasticity, it is a perfect candidate to acquire resistance genes. We hypothesized that multidrug-resistant *E. coli* and *E. coli* resistant to cephalosporins are present in the fecal microbiota of healthy horses in Quebec. We characterised antimicrobial resistance, identified ESBL/AmpC genes and assessed potential risk factors for their presence. Fecal samples from 225 horses, distributed in 32 premises, were cultured for indicator *E. coli* (selected without enrichment) and specific *E. coli* (selected after enrichment with ceftriaxone). Of the 209 healthy horses in which *E. coli* were detected, 46.3% shed multidrug-resistant (resistant to three or more classes of antimicrobials tested) *E. coli*. Non-susceptibility was most frequently observed for ampicillin, amoxicillin/clavulanic acid or streptomycin. ESBL/AmpC genes were detected in *E. coli* from 7.3% of horses and 18.8% of

premises. The number of staff and equestrian event participation within the last three months were identified as risk factors for horses shedding multidrug-resistant *E. coli* isolates. The horse intestinal microbiota is a reservoir for ESBL/AmpC genes. The presence of ESBL/AmpC in horses is both a public and equine health concern, considering the close contact between horses and owners.

Abstract: Although antimicrobial resistance is an increasing threat in equine medicine, molecular and epidemiological data remain limited in North America. We assessed the prevalence of, and risk factors for, shedding multidrug-resistant (MDR) and extended-spectrum β -lactamase (ESBL) and/or AmpC β -lactamase-producing *E. coli* in healthy horses in Quebec, Canada. We collected fecal samples in 225 healthy adult horses from 32 premises. A questionnaire on facility management and horse medical history was completed for each horse. Indicator (without enrichment) and specific (following enrichment with ceftriaxone) *E. coli* were isolated and tested for antimicrobial susceptibility. The presence of ESBL/AmpC genes was determined by PCR. The prevalence of isolates that were non-susceptible to antimicrobials and to antimicrobial classes were estimated at the horse and the premises level. Multivariable logistic regression was used to assess potential risk factors for MDR and ESBL/AmpC isolates. The shedding of MDR *E. coli* was detected in 46.3% of horses. Non-susceptibility was most commonly observed to ampicillin, amoxicillin/clavulanic acid or streptomycin. ESBL/AmpC producing isolates were detected in 7.3% of horses. The most commonly identified ESBL/AmpC gene was *bla*_{CTX-M-1}, although we also identified *bla*_{CMY-2}. The number of staff and equestrian event participation were identified as risk factors for shedding MDR isolates. The prevalence of healthy horses harboring MDR or ESBL/AmpC genes isolates in their intestinal microbiota is noteworthy. We identified risk factors which could help to develop guidelines to preclude their spread.

Introduction

Antimicrobial resistance was reported by the World Health Organization (WHO) in 2014 as the largest current threat for global health (308). Equine medicine is also involved, indeed, the first bacteria resistant to antimicrobials in horses were reported in 1971, in Canada (339). Subsequently, the number of treatment failure reports due to antimicrobial resistance has increased (309, 310, 340). In Europe, several studies have reported that healthy horses can carry multidrug resistant (MDR) bacteria at a relatively high prevalence (39% to 44%) (18, 333) and some countries are setting up surveillance

monitoring (341). Nonetheless, molecular and epidemiological data in this species are still limited in North America. In the global approach to antimicrobial resistance recommended by the WHO, horses have been classified as companion animals, although they are also working animals and livestock and could contaminate their owner through direct contact, or even the general population via the food chain. Thus, horses have been overlooked in the general approach to antimicrobial resistance (8).

Escherichia coli is ubiquitous and mainly commensal in the intestinal microbiota of mammals. However, pathogenic strains have been recognized, mostly in human and in food-producing animals, and occasionally in horses (83). Due to its ubiquity, recurrent exposure to systemic (oral, intramuscular or intravenous) antimicrobial treatment and the fast evolution of its genome, this bacterium is considered by the Canadian Integrated Program for Integrated Surveillance System (CIPARS) as an excellent indicator for antimicrobial resistance surveillance (342).

One of the main mechanisms of resistance in *E. coli* is the production of extended spectrum β -lactamases (ESBL) and/or AmpC cephalosporinases (AmpC) (311), resulting in the hydrolyzation of the β -lactam ring, which is present in penicillins, cephalosporins and monobactams. β -lactamase genes (*bla*) have spread very effectively among numerous species of Gram-negative bacteria over the last 30 years (311), both in animals and in humans. In horses, phenotypic resistance to ceftiofur, a third-generation cephalosporin, has been reported in many clinical situations (343). *bla*_{CTX-M-1} is the ESBL resistance gene variant most often detected (155). However, other variants of CTX-M (i.e., *bla*_{CTX-M-2}, *bla*_{CTX-M-9}, *bla*_{CTX-M-14}, *bla*_{CTX-M-15}) have been recognized. *bla*_{CMY} and *bla*_{SHV-12} have also been identified (155). All of these variants have also been found in other animal species (155) and in humans (119). These genes spread mainly through plasmids, carrying multiple resistance genes. Thus, these plasmids convey resistance to other antimicrobial classes, promoting multidrug resistance (314). However, the resistance gene dissemination can also be enhanced through “high-risk” clones (313). An example of such a clone is the *E. coli* sequence-type ST410 (89), recently emerging as a public health concern in the human population.

Moreover, owning a horse has been demonstrated as a risk factor for the carriage of ESBL in people (315) in the Netherlands. Even though the author of this study nuanced these results by stating that horse owners often own other pets, and the Netherlands has a high population density which might not be representative of the situation of other countries, nevertheless, this study underlines the potential concern for human health. The colonization with ESBL-producing Enterobacteriaceae, in humans, has been associated with an increase in the length of hospitalization in ICU patients (344). New regulations restricting the use of antimicrobials such as fluoroquinolones and cephalosporins, classified as having the highest priority by the WHO and Health Canada (345, 346), to cases where the veterinarian can prove that there is no better alternative (347), came into effect in early 2019 in

veterinary medicine in Canada. Nevertheless, the use of ceftiofur will likely remain common in horses due to the lack of a better alternative, especially for neonatal sepsis and respiratory diseases in adults, possibly enhancing the dissemination of ESBL/AmpC genes.

No data are available on the presence of MDR or ESBL/AmpC-producing isolates in the healthy equine population in Quebec. Our objective was to estimate the prevalence of, and risk factors for, shedding MDR- and/or ESBL/AmpC-producing *E. coli* isolates in horses. We characterized potential ESBL/AmpC isolates for antimicrobial susceptibility and the presence of ESBL/AmpC-associated resistance genes.

Materials and Methods

2.1. Sampling and Data Collection

During the summer 2015, MDL sampled healthy horses from a convenience sample of premises owned by clients and located within a one-hour drive from the CHUV, a university veterinary hospital located in Saint Hyacinthe, Quebec, Canada. To increase the number of sampled horses, in April 2016, the 111 Quebec association of equine veterinary practitioners (AVEQ) members were invited to a conference introducing the project. This event took place in Saint Hyacinthe, Quebec, and was also given in a videoconference. The veterinarians were solicited to sample healthy horses in the stables they visited as part of their veterinary practice. To evaluate the number of targeted horses sampled we used the following equation

$$n = (Z^2 \times P(1-P)) / L^2$$

where n = the number of targeted horses ($n = 359$ horses), Z = the value from the normal distribution corresponding to the 95% confidence interval ($Z = 1.96$), and P = the expected prevalence of MDR *E. coli* in the healthy horse population which we extrapolated from a previous article in Great Britain (18) ($P = 0.37$), and L the desired precision ($L = 0.05$). Given the large size of the total horse population in Quebec (estimated at 129,000 individuals by Equine Canada in 2010), we have not adjusted the number of horses for a finite population. This figure does not consider the potential non-independence of the status of horses in the same premises.

Every participating veterinarian received a sampling kit, including 100 rectal swabs (BBL™ CultureSwab™ Plus, Becton Dickinson, France) and the material to ship the samples to the Ecl laboratory at 4 °C, within 48h of collection. Protocols were explained in detail in the kit. Each veterinarian could sample up to 10 horses per premise up to a maximum of 10 premises, until the overall target sample size was reached. Only horses over two years old and considered healthy by their owner were eligible for the study. We focused our study on adult horses because breeding does not take a huge place in equestrian activity in Quebec (around 1% of horse riders are interested in breeding

in Quebec according to the Cheval Quebec activity report in 2016 (<https://cheval.quebec/Rapport-annuel>)), therefore we expect that most contacts between people and horses during these activities are with adult horses. The sampled horses were not necessarily part of the veterinarian clientele. Each owner agreed to participate on a voluntary basis. The protocol was approved by the Université de Montréal Ethic Committee for use of animals (15-Rech-1800).

For each sampled horse, the owner and the recruiting veterinarian each completed a questionnaire online, through the SurveyMonkey web platform (<https://www.surveymonkey.com>). They were available in both French and English and are found in the supplementary data of this article (Appendix A and Appendix B). Questions were based on previously reported and suspected risk factors in the horse (289) and were related to the facility management and horse medical history. Each premise was geocoded based on its 6-digit postal code, performed in GeoPinpoint suite version 6.4 (DMTI Spatial).

2.2. Indicator Collection: Non-enriched Culture, Antimicrobial Susceptibility Testing, ESBL/AmpC Gene Identification, and Prevalence Estimation.

On reception at the Ecl Laboratory, rectal swabs were held in Luria-Bertani (LB) broth for a maximum of 15 min at room temperature, then 100 μ L of LB broth was transferred on MacConkey agar and incubated at 37 °C overnight. All lactose-positive colonies, up to a maximum of three, were selected for each rectal sample and cultured in LB broth then plated on MacConkey agar to ensure purity. Isolates were confirmed as *E. coli* by the presence of the *uidA* gene (320), as detected by PCR. Each sample and isolate were stored in 15% glycerol at -80 °C.

Isolates were tested for susceptibility to the 14 antimicrobial agents examined in the CIPARS using the disk-diffusion assay. We used the same disks and techniques as described for the indicator collection of our previous work (333).

When isolates were non-susceptible (intermediate or resistant) to 3rd generation cephalosporins, we looked for 5 β -lactamase resistance genes (*bla_{SHV}*, *bla_{TEM}*, *bla_{CMY-2}*, *bla_{OXA}*, *bla_{CTX-M}*) by multiplex PCR. We used the same DNA extraction, PCR protocols and CTX-M-variant identification protocols as described for the indicator collection of our previous work (333).

We estimated the prevalence and 95% confidence intervals of (1) horses shedding non-susceptible (i.e., resistant or intermediate) isolate(s) for each antimicrobial, and (2) horses shedding isolate(s) non-susceptible to ≥ 1 , 3, 5, 7 and 9 classes of antimicrobials. An isolate was considered MDR if non-susceptible to at least one agent in three or more antimicrobial classes (92). We used the same method of calculation (with adjustment for sampling weights and clustering within premises) and the same software as described for in the indicator collection of our previous work (333). We also estimated these prevalences and 95% confidence intervals at the premises level, as previously described (333);

for each outcome, a positive status was attributed when the premises housed at least one positive horse.

2.3. Potential ESBL/AmpC Producing *E. coli* Collection: Culture, Antimicrobial Susceptibility Testing, ESBL/AmpC and Virulence Gene Identification and Descriptive Statistics.

ESBL/AmpC-producing bacteria may be shed in small quantities in healthy individuals (324). To improve detection sensitivity and allow for a more accurate estimation of the proportion of positive horses, we carried out enrichment with ceftriaxone (324, 341). For each rectal swab suspension in LB broth, 1 mL was inoculated in 9mL of MacConkey broth containing 1 mg/L of ceftriaxone and incubated overnight at 37 °C. When bacterial growth was positive, 100 µL of MacConkey broth was inoculated on MacConkey agar containing 1 mg/L of ceftriaxone and incubated at 37 °C overnight. All isolates up to a maximum of five lactose-positive isolates per sample were selected. All isolates of this collection were confirmed as *E. coli* by the presence of the *uidA* gene (320) as detected by PCR and were tested for susceptibility to 14 antimicrobials, as described above. All isolates in this collection were systematically examined for the presence of five β-lactamase resistance genes (*bla_{SHV}*, *bla_{TEM}*, *bla_{CMY-2}*, *bla_{OXA}*, *bla_{CTX-M}*) by multiplex PCR (PCR and gene identification protocols are described above).

Descriptive statistics were used to present the non-susceptibility patterns of isolates from this collection. We estimated prevalence with 95% confidence intervals of horses shedding ESBL/AmpC isolates and of the premises housing these horses, using the same calculation method described above.

MDR and ESBL/AmpC: Risk Factors.

For the risk factor analyses, two outcome variables were investigated: MDR and ESBL/AmpC status for each horse. A positive MDR or ESBL/AmpC status was defined as the detection of at least one MDR or ESBL/AmpC isolate, respectively, for that horse. All potential risk factors from the questionnaire were categorized. Putative risk factors with $p < 0.20$ (Wald test) in univariable multilevel (facilities, horses) logistic regressions were selected for inclusion in a full multivariable multilevel model for each outcome. Pairwise associations between these selected variables were assessed by χ^2 test; in the presence of significant association ($p < 0.05$), only one of two correlated variables was kept based on the biological relevance with the outcome. The final multivariable model was refined by sequentially omitting variables with $p > 0.05$ (Wald test). Analyses were performed in MLwiN version 2.36 using 2nd order penalized quasi-likelihood estimation, with no extrabinomial variation permitted. The fit of the final model was evaluated by visual assessment of standardized residuals at the premise level against normal scores and against fixed part prediction.

Results

In 2015, MDL sampled 67 horses distributed in 10 premises. Following the conference, in April 2016, 14 equine practitioners agreed to participate in the study. Although samples were collected one year apart, the results are presented together as the sampling was similar and there was no modification in the equine practice in Quebec from 2015 to 2016.

A total of 225 horses were sampled, distributed in 32 premises, as illustrated in Figure 1. Between two and 12 horses were sampled in each premise, with a mean of seven horses sampled.

Among the sampled horses, 48% were geldings, 49% were female and 3% were stallions. The mean age was 12 years old with a range from 2 to 30 years old.

Indicator collection

E. coli isolates were detected in 209 (93%) of the 225 rectal swabs. A total of 609 *E. coli* isolates were selected from 209 samples, originating from the 32 premises.

The prevalence estimates of horses shedding non-susceptible isolates per antimicrobial and of the premises housing those horses are shown in Figure 2. Over 40% of horses shed isolates that were non-susceptible to ampicillin, streptomycin or amoxicillin + clavulanic acid. Over 60% of premises housed horses that shed isolates non-susceptible to streptomycin, nalidixic acid, folate pathway inhibitors (trimethoprim-sulfamethoxazole and sulfisoxazole), ampicillin, amoxicillin + clavulanic acid or tetracycline.

As illustrated in Figure 2, in this collection, non-susceptibility to third generation cephalosporins (ceftiofur and ceftriaxone), was observed in 12.8% of horses and 46.8% of premises. We did not identify any *bla* genes as tested by PCR in these isolates.

The prevalence estimate of non-susceptibility to nalidixic acid, a first-generation quinolone, was high (24.7% of horses and 59.4% of premises). In contrast, the estimated prevalence of non-susceptibility to ciprofloxacin, a fluoroquinolone, was relatively low (1.0% of horses and 6.3% of premises).

Prevalence estimates (%) of horses shedding isolates non-susceptible to $\geq 1, 3, 5, 7$ or 9 classes of antimicrobials and premises housing these horses, are summarized in Table 1. The prevalence of horses shedding isolates non-susceptible to at least one antimicrobial and MDR isolates were high

(80.0% and 46.3%, respectively). Of the 32 premises, 81.3% housed at least one horse shedding MDR isolates. In addition, 1.4% of horses shed isolates non-susceptible to nine classes of antimicrobials, and therefore had a potential for extensive resistance (92).

ESBL/AmpC Collection

A total of 7.3% [95% CI 0-17.6] of the 209 horses shed ESBL/AmpC isolates non-susceptible to ceftriaxone, therefore belonging to the ESBL/AmpC collection, and 18.8% [95% CI 4.5-33] of the 32 premises housed these horses.

Non-susceptibility pattern of the 74 isolates of this collection originating from the 17 positive horses, found in six premises, is shown in Figure 3. All isolates were non-susceptible to ampicillin and ceftriaxone, although three isolates presented susceptibility to ceftiofur and 60 isolates presented susceptibility to ceftiofur, a cephamycin, also considered as a second-generation cephalosporin (100).

Non-susceptibility to aminoglycosides (gentamicin and streptomycin), tetracycline, folate inhibitors (trimethoprim-sulfonamides, sulfizoxazole) and chloramphenicol were present in over 60% of the isolates.

A total of 54.1% of isolates were non-susceptible to a first-generation quinolone (nalidixic acid) and 20.3% of isolates were non-susceptible to ciprofloxacin, a fluoroquinolone, in this collection. These isolates were therefore non-susceptible to two families of antimicrobial classified as having the highest priority in human medicine by both Canadian Health and the WHO (345, 346).

The main ESBL genes identified were *bla*_{CTX-M-1} (43/74 tested isolates) and *bla*_{SHV} (15/74), four isolates carried a combination of *bla*_{CTX-M-1} and *bla*_{SHV}. Nine isolates carried the AmpC gene *bla*_{CMY-2}. In four isolates we could not detect tested ESBL/AmpC genes by PCR.

Risk Factors

A total of 13 potential risk factors were derived from the questionnaire (Table 2). Eleven were considered at the individual level and two were considered at the premise level.

Data with missing values, representing almost half of the dataset, were excluded from modelling.

A total of five risk factors were selected for multivariate modelling (all $p < 0.20$ in univariable logistic regressions) for the MDR outcome. The variable "The horse presented an infection" was then excluded as it was associated with "The horse has been medically treated within the last 3 months". The variable "Transportation within the last 3 months" was excluded because it was associated with "Participating in an equestrian event within the last 3 months".

According to the multivariate model, the odds of being an MDR horse were 3.5 times higher ($p = 0.03$) among the horses that had participated to an equestrian event within the last three months and 3.4 times higher ($p = 0.01$) if the horse was in a premise where the staff were composed of more than five persons (Table 3). Visual assessment of residuals at the premise level suggested that our model fitted the data.

Interaction between the two variables of the final multivariable model were checked but were not significant ($p = 0.41$, Wald test) and thus not kept in the model.

For the ESBL/AmpC outcome, considering the high percentage of missing data and low number of positive horses, no statistical modelling was performed.

Discussion

The present study illustrates that the fecal microbiota of healthy horses in Quebec, Canada, harbor MDR and ESBL/AmpC *E. coli* isolates. The prevalence of horses shedding ESBL/AmpC *E. coli* isolates (7.3%) is comparable to that which was detected phenotypically in the United Kingdom in 2012 (6.3%) (18). Nevertheless, at the premise level, it seems that the prevalence in Quebec (18.8%) is inferior to the prevalence reported in France (29.0%) (333). However, these regional differences in apparent prevalence might be related to a higher sensitivity in the detection of positive premises in the study in France, considering that in France we tested more horses per premise (between six and 36 horses per premises) and ESBL/AmpC isolates were detected by two enrichment methods. The prevalence we found in horses in Quebec contrasts with the 1% prevalence observed in Ontario among 188 healthy dogs in 2009 (348), although, even if the calculation methods are not the same, this is still lower than the 26.5% of fecal carriage of ESC-resistant Enterobacteriaceae in healthy dogs in Ontario in 2018 (349). The prevalence of horses shedding ESBL/AmpC *E. coli* isolates in Quebec is higher than that reported in Sable Island horses, where 1/508 horses shedding an ESBL gene (350) (*bla_{CTX-M-1}*) was found. This is not surprising because our horse population is in contact with the populations of other species in which ESBL/AmpC genes have been detected, such as pigs (22), poultry (351), cattle (352) and humans (353), underlining the importance of the one health approach (308, 354) to address the problem.

Our study reported the presence of isolates that are non-susceptible to nine classes of antimicrobial in an indicator collection of *E. coli* from horses for the first time to our knowledge, which is worrisome. Although these isolates may be commensals, it is possible that putative resistance genes are carried by mobile genetic elements, such as plasmids, and are therefore transmissible to potential pathogenic or zoonotic strains. The dissemination of extensive resistance to pathogenic strains could lead to an increased risk of complications in the treatment of infections caused by these strains.

Enrofloxacin, a fluoroquinolone, is classified as having a very high importance in human medicine (346) and is approved for veterinary use in equine medicine. Resistance to quinolones is known to be acquired and is mostly due to the apparition of chromosomal mutations, although resistance genes carried by plasmids have also been reported (355). Often, the chromosomal mutations appear consecutively and are localized on the genes *gyrA* and *parC* (coding for gyrase and topoisomerase, respectively, both involved in the DNA synthesis). The number of mutations is proportionate to the minimal inhibitory concentration (the more the higher). Hence, non-susceptibility to nalidixic acid is generally precursory for fluoroquinolone treatment failure (328). In the indicator collection, we detected 24.7% of horses and 59.4% of premises presenting a non-susceptibility to nalidixic acid, suggesting that enrofloxacin should be used with caution, to maintain its efficacy in horses in Quebec. In the ESBL/AmpC collection, we found 14 isolates presenting a non-susceptibility to both 3rd generation cephalosporin and fluoroquinolones. Even though these isolates are unlikely to be pathogenic, they still represent a risk of dissemination due to their high capacity to resist antimicrobial pressure. They could acquire virulence genes through the transfer of plasmids thus becoming a threat for public and/or equine health.

In our study, the predominant ESBL gene found was *bla*_{CTX-M-1}. ESBL of the CTX-M family have become a public health concern in the last two decades, their incidence and diversity having increased dramatically during this time and have overridden other ESBL variants such as *bla*_{TEM} and *bla*_{SHV} in gram negative bacteria (119). The *bla*_{CTX-M} encoded ESBL family is characterized by the ability to inhibit 3rd and 4th generation cephalosporins and monobactams, but not cephamycins and carbapenems. These ESBLs are also known to be susceptible to β -lactam inhibitors. However, no cephamycin or penicillin/ β -lactam inhibitor combinations are approved or used off-label (to the authors' knowledge) to treat horses. The predominance of *bla*_{CTX-M-1} suggests a global dissemination of this gene in the equine population both in Europe and in North America. The absence of other variants of *bla*_{CTX-M} in the Quebec horse population contrasts with the high diversity of *bla*_{CTX-M} found in the healthy equine population in France and throughout Europe (333). This suggests that the presence of this family of genes may have occurred later in North America than in Europe, and that the genes may not yet have had the time to diversify.

We detected the AmpC resistance gene *bla*_{CMY-2} in several horses. This gene has been frequently found in poultry and pigs, including in Quebec (22, 356). Although this gene has previously been identified in one healthy horse in France, the fact that we identified it in several healthy horses in Quebec suggests the possibility of AmpC gene spread between animal species. Indeed, horses can be in contact with other animal species, including dogs, cats, poultry among others, in the premises.

Even though we detected 12.8% of horses carrying isolates non-susceptible to 3rd generation cephalosporins in the indicator collection, none of these isolates carried the tested ESBL/AmpC genes, similar to what had been found in the indicator collection of our previous work (333). These findings suggest that other mechanisms of resistance to cephalosporins (for example, alteration of the protein binding protein) may be present in the population. These alternative mechanisms are less likely to spread through plasmids but could impact cephalosporin efficacy, and therefore could affect equine welfare. We also found four isolates of the ESBL/AmpC collection in which we could not identify a *bla* gene. This could indicate that other, less common, *bla* genes are present in the horse population.

Among the risk factors model selected for modelling, the correlation between the variable “The horse presented an infection” and “The horse has been medically treated within the last 3 months” was to be expected, because a horse with an infection is often treated for this infection. The medical treatment of the horse was considered more biologically relevant to influence the shedding of MDR *E. coli* rather than the infection itself. However, this variable was not retained in the final model, perhaps because of the absence of specific information about the type of treatment, which could include treatments other than antimicrobials.

A correlation between “Transportation within the last 3 months” and “Participating in an equestrian event within the last 3 months” was also observed, which was not surprising, as horses which participate in an equestrian event are often transported to the equestrian event. We chose to consider participation in the equestrian event because of the possibility of transmission of antimicrobial resistance genes inter- and intraspecies during the event.

To our knowledge, we demonstrated for the first time that participation in an equestrian event was a risk factor for shedding MDR isolates at the horse level. Considering the correlation between the horse participation in an equestrian event and transportation, this effect could also be driven by contacts occurring during transportation. Based on this association, we could suggest isolating horses that are participating in equestrian events or at least the implementation of appropriate biosecurity measures. As an example, limiting contact between these horses and horses that stay at home or handling horses that stayed at home before horses that travelled might be beneficial to limit antimicrobial gene dissemination. However, more longitudinal studies are needed to establish the duration of shedding, and therefore be more accurate in these recommendations.

Our results suggest that a higher number of persons taking care of horses daily increases the risk of detecting MDR isolates in the horse’s intestinal microbiota. We previously documented that this factor was associated with a higher risk of detecting ESBL/AmpC isolates in the healthy equine population in France (333). The fact that this variable was found to be significant in both studies is noteworthy.

Indeed, such information is easily obtained, and therefore could be helpful for elaborating guidelines to improve equine health. It could help equine veterinarians in defining “at-risk” equine populations and encourage the use of antimicrobial susceptibility testing in these populations.

The absence of a probability sampling method in our study might affect the representativeness of our prevalence estimate. The extrapolation of such estimate to the general equine population should be made cautiously, as the horses selected for our study are more likely representative of a subpopulation of horses under regular veterinary follow-up examination. Another limitation of our study is the recruitment of a smaller sample size of horses than planned, combined with a high percentage of missing data for the questionnaire among recruited horses (almost 50%), thus reducing the precision of the prevalence estimates and statistical power of the risk factor analyses. The low participation rate could be due to a lack of awareness of the importance of antimicrobial resistance in the equine industry. A higher proportion of missing values were present in horses shedding MDR isolates. This could be due to some regional differences and/or owner characteristics influencing both the risk of MDR and interest to participate in our study. The validity of our results depends on the absence of association between response rate and exposure to identified risk factors. Such association seems unlikely considering that the MDR status and associated risk factors were unknown for both horse owners and veterinarians at the time of data collection.

A valuable follow up to this study would be to sample the veterinarians and owners of these horses and see if there is a correlation between horses and horse handlers for the carriage of ESBL/AmpC producing *E. coli*. Another interesting follow up would be to repeat the study a few years after the regulations (see introduction) have been set up and see if these have made a difference.

Conclusions: In conclusion, we found a noteworthy prevalence of ESBL/AmpC genes and MDR isolates in the fecal microbiota of healthy horses in Quebec. Surveillance of ESBL/AmpC gene dissemination and the quantification of MDR isolates would be beneficial to characterize the nature and the extent of the risk they represent, with the aim of limiting their transmission between horses, but also to other species including humans and to the environment. The detection of risk factors for MDR shedding could be used to help equine veterinarians in managing at-risk populations.

Tables and Figures

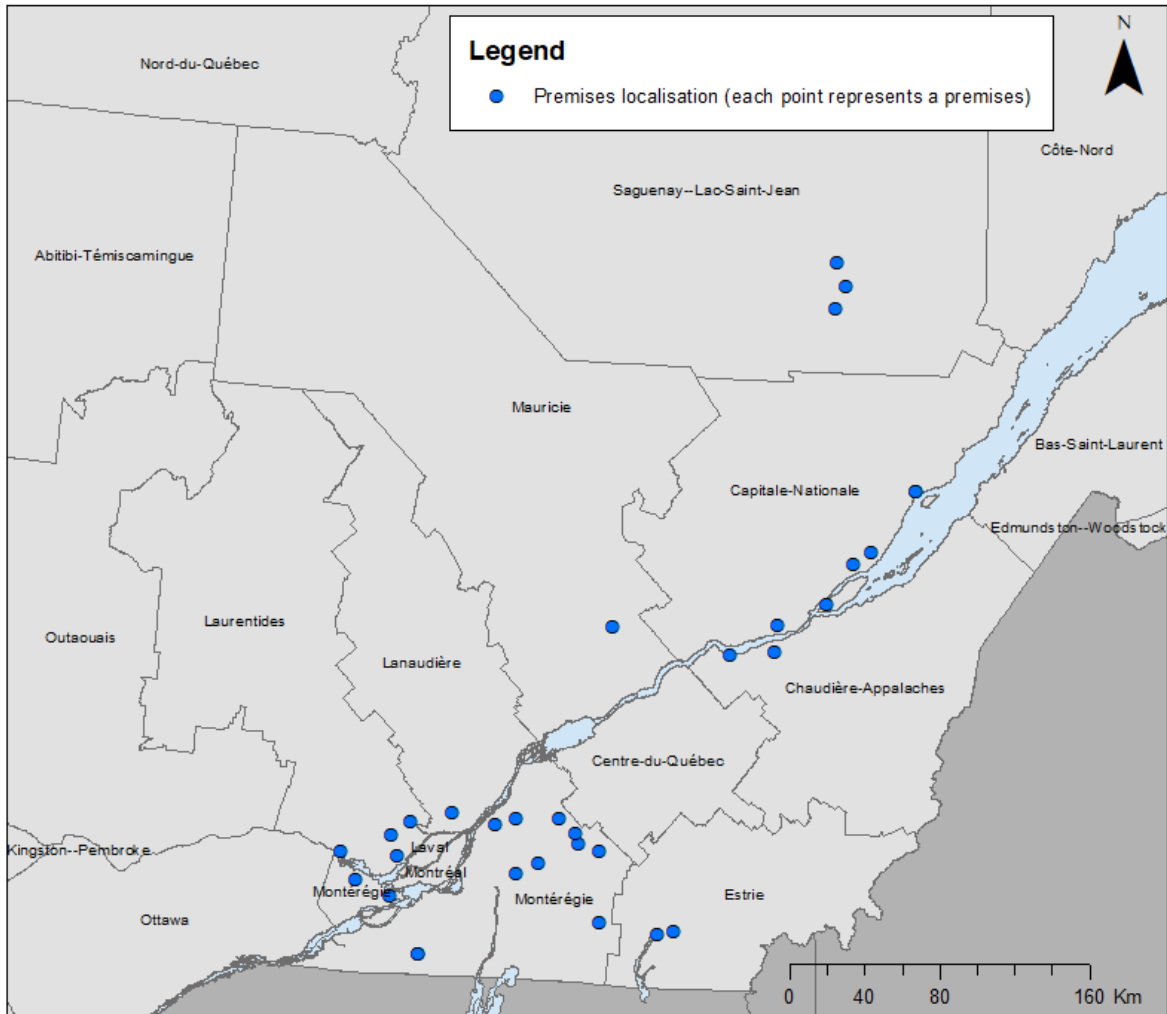


Figure 1 : Geographical distribution of the sampled premises (based on center point of their 6-digit postal code) over the administrative regions of the province of Quebec in a cross-sectional study of 209 healthy adult horses in 32 premises performed in 2015 and 2016. Two premises in Capitale-Nationale and two premises in Montérégie were very close, and therefore are overlapping on the map. Mapping was performed in ArcGIS version 10.6, using reference maps from Statistics Canada (2016 census).

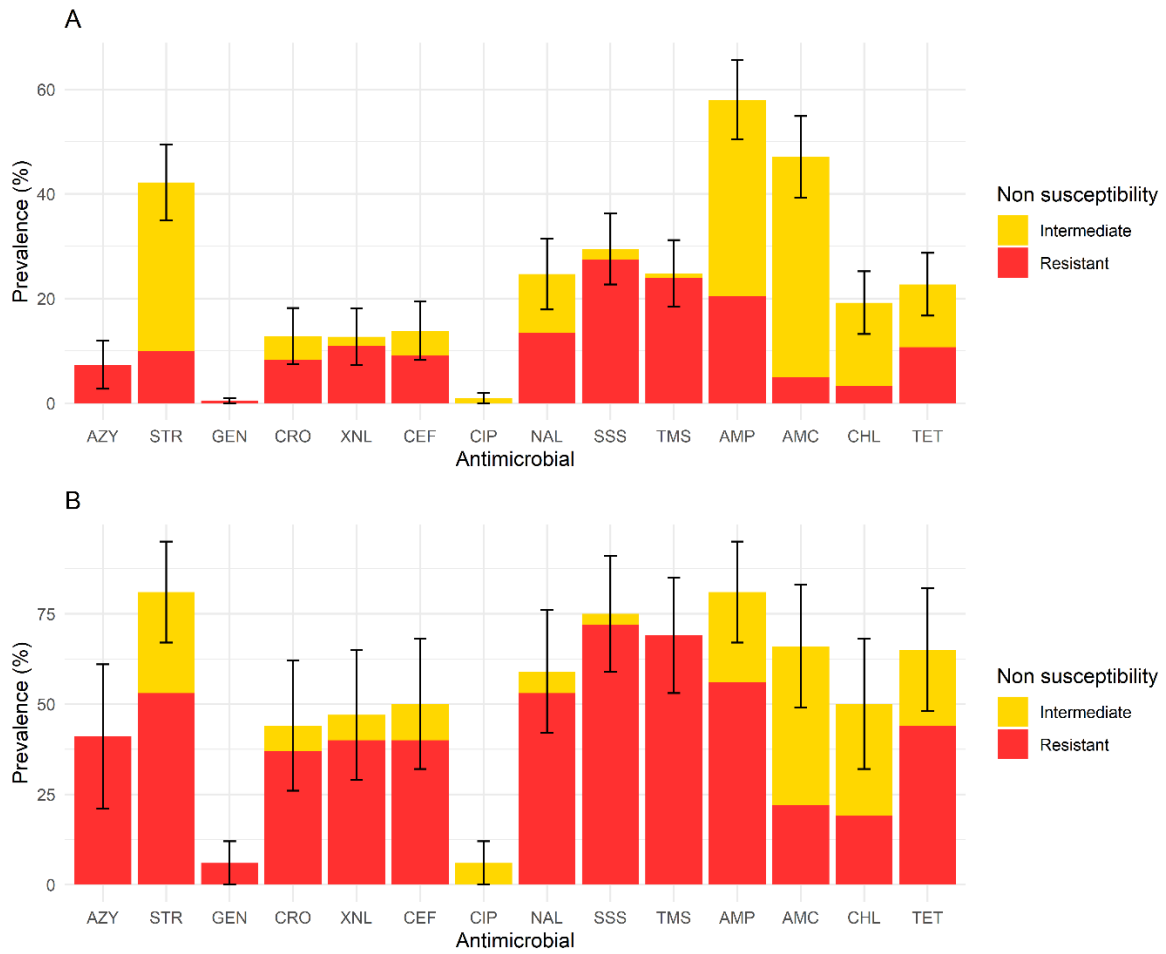


Figure 2 : Prevalence estimates (%) of non-susceptibility (yellow and red) for each antimicrobial, at the horse level (A), and at the premises level (B), in a cross-sectional study of 209 healthy adult horses, in 32 premises, performed in 2015 and 2016, in Quebec. Bars represent 95% confidence intervals for prevalence of non-susceptible isolates. The proportion of resistant isolates for each antimicrobial is presented in red. A total of 609 isolates were tested. Abbreviations: AZY = azithromycin, STR = streptomycin, GEN = gentamicin, CRO = ceftriaxone, XNL = ceftiofur, CEF = ceftiofur, CIP = ciprofloxacin, NAL = nalidixic acid, SSS = sulfisoxazole, TMS = trimethoprim–sulfamethoxazole, AMP = ampicillin, AMC = amoxicillin/clavulanic acid, CHL = chloramphenicol, TET = tetracycline.

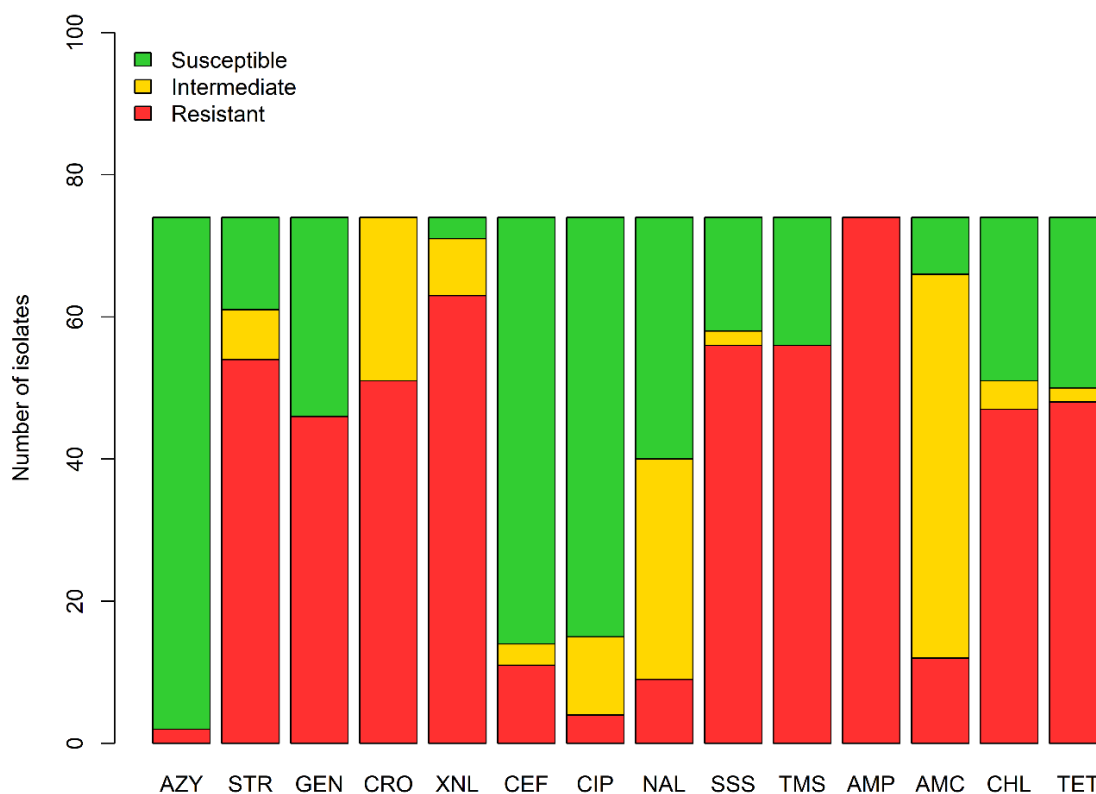


Figure 3 : Susceptibility profiles of *E. coli* isolates in the ESBL/AmpC collection, in a cross-sectional study performed on healthy adult horses, in Quebec in 2015 and 2016 (n = 74 isolates distributed in 17 horses among 6 premises). Abbreviations: AZY = azithromycin, STR = streptomycin, GEN = gentamicin, CRO = ceftriaxone, XNL = ceftiofur, CEF = ceftiofur, CIP = ciprofloxacin, NAL = nalidixic acid, SSS = sulfisoxazole, TMS = trimethoprim-sulfamethoxazole, AMP = ampicillin, AMC = amoxicillin/clavulanic acid, CHL = chloramphenicol, TET = tetracycline.

Tableau 1 : Prevalence estimates (%) with 95% confidence intervals (95% CI) of healthy adult horses shedding *E. coli* isolates that are non-susceptible to more than 1, 3, 5, 7 or 9 classes of antimicrobials and premises housing these horses based on the indicator collection results in a cross-sectional study of 209 horses in 32 premises in Quebec in 2015 and 2016 .Abbreviations: CI = confidence interval, MDR = multidrug-resistant.

Number of Resistant Antimicrobial Classes	Indicator Collection			
	Horse Level (n = 209)		Premises Level (n = 32)	
	%	95% CI	%	95% CI
≥1	80.0	69.8-90.2	96.9	90.5-100
≥ 3 (MDR)	46.3	34.5-58.0	81.3	67.0-95.5
≥ 5	15.3	8.5-22.3	53.1	34.8-71.4
≥ 7	3.9	1.5-6.2	25.0	9.1-40.9
≥ 9	1.4	0-3.2	9.4	0-20.1

Tableau 2 : Descriptive statistics and p-value (Wald test) from univariable multilevel logistic regression analyses of potential risk factors for MDR status in horses in a cross-sectional study performed on healthy adult horses, in Quebec, in 2015 and 2016. In bold are the factors that were retained for the multivariable analysis.

Putative Risk Factors	Number of Horses	% of Positive Horses	MDR- p-Value
Horse-level			
Transportation out of the horse's premises within the last 3 months			0.11
Yes	31	41.9	
No	69	29.0	
Participation to an equestrian event within the last 3 months			0.13
- Yes	19	57.9	
- No	92	29.3	
Housing			0.28
- Stable	46	39.1	
- Pasture ¹	64	29.7	
Activity			0.73
- Sport (competition)	39	43.6	
- Leisure	66	30.3	
- Reproduction	4	25.0	
The horse presents a chronic disease			0.47
- Yes	18	22.2	
- No	123	39.0	
The horse presented an infection (diagnosed by the veterinarian) within the last 3 months			0.03
- Yes	12	75.0	
- No	124	34.7	
The horse presented diarrhea within the last 3 months			0.91

- Yes	5	20.0	
- No	61	23.0	
The horse was hospitalized within the last 3 months			The model did not converge
- Yes	2	100	
- No	137	37.2	
The horse has undergone surgery within the last 3 months			The model did not converge
- Yes	1	100	
- No	137	38.0	
The horse has been medically treated within the last three months (all treatment considered)			0.02
- Yes	39	53.9	
- No	94	30.9	
The horse presented with colic within the last 3 months			0.81
- Yes	5	40	
- No	131	37.4	
<i>Premise-level</i>			
Total number of horses in the premises ²			0.26
- Less than 15	101	45.5	
- 15 and more	109	48.6	
Number of staff taking care of horses daily ³			0.01
- Less than 5 persons	68	23.5	
- 5 persons and more	38	47.4	

¹ Defined as a horse that stays on pasture at night and has a shelter in the pasture. ² Categorization was done *a posteriori*, based on the mean of the number of horses in the premises we sampled. ³ This variable was already categorized in the questionnaire.

Tableau 3 : Parameter estimates and odds ratios from a multivariable regression modelling MDR positive status at the horse level, based on the results of a cross-sectional study performed on 32 premises and 209 healthy adult horses, sampled in Quebec, in summers 2015 and 2016. The estimated variance at the premises level was 0.171 (standard error of 0.316).

Risk Factor for the Outcome	Odds ratios		
	Estimate	95% CI	<i>p</i>
The horse has participated in an equestrian event within the last three months (yes vs. no)	3.5	1.1, 11.1	0.03
Number of staff taking care of horses daily (5 persons and more vs. less than 5 persons)	3.4	1.3, 8.7	0.01

Enjeux et synthèse des principaux résultats dans la filière porcine.

Depuis le début de l'année 2014, une augmentation substantielle du nombre et de la sévérité des cas de diarrhée a été détectée dans la filière porcine au Québec. Ce phénomène semble être associé à un nouveau virotype, ETEC LT:STa:STb:F4, qui présente de la multirésistance, mais surtout une non-susceptibilité constante à l'enrofloxacin (antibiotique de la famille des fluoroquinolones). La nature clonale de ces isolats est possible et nécessite confirmation. L'enjeu dans cette filière consiste à caractériser des isolats responsables d'une problématique de terrain, afin d'apporter des solutions concrètes aux vétérinaires praticiens québécois.

Dans cette filière nous avons trouvé que plus de 90% des isolats d'*E. coli* entérotoxigènes (ETEC) détectés chez des cas de porcs malades soumis au laboratoire EcL de 2008 à 2016 au Québec, étaient multirésistants. Le virotype LT:STb:F4 prédominait jusqu'en 2014, puis a été dépassé par le virotype LT:STb:STa:F4. Un agrégat spatio-temporel d'isolats LT:STb:STa:F4 non susceptibles à l'enrofloxacin a été initialement détecté entre 04/2015 et 09/2016 au centre de la Montérégie. Grâce au séquençage du génome complet de 173 isolats, nous avons démontré la présence d'un clone ETEC:F4 non susceptible à l'enrofloxacin, à haut risque, qui se dissémine en Amérique du Nord depuis 2013. Les isolats appartenant à ce clone sont ST100, O149:H10, du phylogroupe A. Ils sont multirésistants, et sont associés à une pathogénicité et une virulence augmentée par rapport aux isolats détectés avant 2000.

Ce travail nous a également servi de base pour proposer deux définitions capitales qui manquaient de consensus dans la littérature actuelle : (i) la définition d'un « clone » bactérien établi à partir de la technique de phylogénie basée sur les SNPs et (ii) la définition de « clone à haut risque » adaptée au concept OneHealth.

ARTICLE 4 : A new multidrug-resistant Enterotoxigenic Escherichia coli Pulsed-Field Gel Electrophoresis cluster associated with enrofloxacin non-susceptibility in diseased pigs.

Auteurs et affiliations

Contribution de Maud de Lagarde à cet article

Pour cet article Maud de Lagarde a contribué majoritairement, à la récolte et l'analyse des données, à l'exécution des expérimentations, ainsi qu'à la rédaction du manuscrit initial et sa révision.

Auteurs

M. de Lagarde¹, DVM, ACVIM, G. Vanier¹, PhD, G. Desmarais¹, H-R. Kohan-Ghadr², PhD, J. Arsenault³, DVM, MSc, PhD, J. M. Fairbrother^{1,3}, BVSc, PhD.

Affiliations

¹ OIE Reference Laboratory for *Escherichia coli*, Faculty of Veterinary Medicine, Université de Montréal, Saint-Hyacinthe, QC, Canada.

² Michigan State University, Department of Obstetrics, Gynecology and Reproductive Biology, College of Human Medicine, Grand Rapids, Michigan, USA.

³ Swine and poultry infectious research center (CRIPA-FQRNT), and Groupe de recherche en épidémiologie des zoonoses et santé publique (GREZOSP), Faculty of Veterinary Medicine, Université de Montréal, Saint-Hyacinthe, QC, Canada.

Journal de Publication

Cet article a été publié en 2020 dans le *Journal of Applied Microbiology*.

Résumé en français

Le but de cet article était de décrire les tendances temporelles des différents pathotypes d'*E. coli* et des résistances aux antibiotiques détectés chez des cas de porcs malades soumis au

laboratoire Ecl de 2008 à 2016 au Québec, Canada et d'étudier la présence d'agrégats spatio-temporels et phylogénétiques.

Nous avons détectés 12 gènes codant pour des facteurs de virulence chez des *E. coli* pathogènes chez le porc par PCR et réalisé des antibiogrammes par la méthode des disques sur ces mêmes isolats. Les données cliniques et démographiques ont été saisies dans la base de données APZEC. ETEC :F4 était le pathotype prédominant parmi les 3773 cas soumis. Le virotype LT:STb:F4 prédominait jusqu'en 2014, puis a été dépassé par le virotype LT:STb:STa:F4. Au total, plus de 90% des isolats étaient multirésistants. Un agrégat spatio-temporel de LT:STb:STa:F4 non -susceptible à l'enrofloxacin a été détecté entre les mois d'avril 2015 et de septembre 2016. Une analyse PFGE de 137 isolats a révélé la présence d'un agrégat composé majoritairement de LT:STb:STa:F4 non -susceptible à l'enrofloxacin.

En conclusion, la base de données APZEC est utile pour mettre en évidence les tendances temporelles des différents pathotypes de *E. coli*. De plus, il est possible qu'un clone à haut risque se dissémine dans la population de ETEC :F4 pathogène chez le porc au Québec depuis 2015. La surveillance est essentielle pour identifier les nouveaux clones et développer des stratégies de lutte.

Abstract

Aims: Describe the temporal trends in *E. coli* pathotypes and antimicrobial resistance detected in isolates from diseased-pig cases submitted to the Ecl from 2008 to 2016, in Quebec, Canada, and investigate the presence of spatio-temporal and phylogenetic clusters.

Methods and Results: Detection of 12 genes coding for virulence factors in pathogenic *E. coli* in pigs by PCR and antimicrobial resistance standard disk diffusion assay were performed. Demographic and clinical data were entered in the Animal Pathogenic and Zoonotic *Escherichia coli* (APZEC) database. ETEC:F4 was the most prevalent pathovirotype among the 3773 cases submitted. The LT:STb:F4 virotype was predominant until 2014, then was overtaken by the LT:STb:STa:F4 virotype. More than 90% of the ETEC:F4 isolates were multidrug resistant. A spatio-temporal cluster of LT:STb:STa:F4 isolates non-susceptible to enrofloxacin was detected between 04/2015 and 09/2016. Pulsed-field gel electrophoresis analysis of 137 ETEC:F4 isolates revealed the presence of a cluster composed mainly of LT:STb:STa:F4 isolates non-susceptible to enrofloxacin.

Conclusions: The APZEC database was useful to highlight temporal trends in *E. coli* pathotypes. A high-risk ETEC:F4 clone might disseminate in the pig population in Quebec since 2015.

Significance and Impact of the Study: Surveillance is crucial to identify new clones and develop control strategies.

Introduction

With more than 7 million of pigs marketed in 2020, the Quebec porcine industry is the largest producer of pig meat in Canada, representing 30% of the total Canadian production. *Escherichia coli* is an important cause of a wide range of diseases in pigs, including neonatal and postweaning diarrhea (respectively ND and PWD) and edema disease, resulting in significant economic losses worldwide due to morbidity associated with excessive weight loss and mortality (20). Strains of the most important pathotype in pigs, the enterotoxigenic *E. coli* (ETEC), produce one or more enterotoxins, which act on the intestinal epithelial cells to induce the secretion of water and electrolytes into the intestinal lumen, causing diarrhea (20). The most important enterotoxins, which define ETEC, are the heat-labile toxin LT and the heat-stable toxins STa and STb. ETEC must be able to adhere to and colonise the intestinal mucosa to permit the release of sufficient levels of enterotoxin to result in the development of diarrhea. This adherence is mediated by hair-like structures on the bacterial surface, called fimbriae or pili. ETEC associated with neonatal diarrhea may produce one or more of the fimbriae F4 (K88), F5 (K99), F6 (897P), and F41 (20). ETEC associated with PWD most commonly produce F4 (K88) or F18 (F107) fimbriae (59). In swine, the neonatal and post weaning periods are critical for ETEC infections.

A second pathotype found in pigs with diarrhea is known as enteropathogenic *E. coli* (EPEC). These bacteria cause typical attaching and effacing lesions and possess a variant of the EPEC attaching effacing factor Eae or Intimin (20, 357).

Shiga toxin producing *E. coli* (STEC) produce one or more of a family of cytotoxins which are known collectively as Shiga toxins (Stx) or verotoxins (VT). In pigs, the most important STEC are those that cause edema disease. These strains produce the toxin variant Stx2e (VT2e) and the fimbriae F18. Certain isolates produce both Stx2e and enterotoxins, as well as the fimbriae F18. These isolates are associated more with PWD than edema disease (20). Such isolates are designated as ETEC/STEC hybrids (59, 358).

Identification of pathogenic *E. coli* based on the presence of virulence genes has permitted a more accurate diagnosis of diseases caused by these bacteria although there are few reports on the organisation of such data to monitor the trends in *E. coli* infections in diseased pigs. The Animal Pathogenic and Zoonotic *E. coli* (APZEC) database (apzec.ca) gathers information from the OIE Reference Laboratory for *Escherichia coli* (ECL), Canada. This integrated tool, designed by the ECL, permits the monitoring of the temporal trends of the different pathogenic *E. coli* detected at the laboratory, since 1990. Thus, in swine, in Quebec, most pathogenic *E. coli* detected in ND and PWD cases belong to one of the various virotypes comprising the ETEC pathotype and possess F4, which, collectively, has been designated the ETEC:F4 pathovirotype. Until 1995, isolates belonged predominantly to the virotype LT:STb:F4 (data not shown). Between 1995 and 2005, two clonal lineages of virotype LT:STb:STa:F4 emerged and were associated with an increase of severity of PWD (21). From 2006 to 2013, PWD was mostly associated with two other clonal lineages from the virotype LT:STb:F4 (23). Hence, predominant virotypes of the ETEC:F4 isolates detected in pigs with diarrhea in Quebec have varied with time.

Since 2014, the number of diarrhea cases submitted to the ECL for detection of pathogenic *E. coli* in pigs has increased in Quebec. This is of concern for porcine health, as these cases were often associated with fluoroquinolone (especially enrofloxacin, Baytril®) non-susceptible *E. coli* isolates. The therapeutic use of quinolones in porcine medicine seems to have resulted in the selection of resistant isolates (359). The presence of this resistance is of major concern for several reasons. Firstly, quinolones are classified as very highly important in human medicine by the WHO and Health Canada (97, 345). Secondly, their use has been associated with the emergence of “high-risk” clones such as the *E. coli* ST131 in the human population. “High-risk” clones are defined as the progeny of one bacterium through asexual multiplication having a global distribution and being associated with multidrug resistance and high virulence (88). In addition, they have a great capacity to disseminate from host to host and appear to be very successful vehicles for mobile genetic elements (MGE) (such as plasmids and integrons). In ETEC, it is recognized that virulence factors are usually plasmid mediated, and that some of the circulating plasmids also carry antimicrobial resistance genes, such as those encoding β -lactamases which also have a high importance in human medicine. Therefore, the presence of one or several high-risk clone(s) in the porcine population would present a potential risk for public and porcine health.

Based on our observations, we hypothesised that one or more new potential “high-risk” clonal lineage(s) have emerged in the porcine population, in Quebec, in recent years.

The main objective of this study was to describe the temporal trends in virotypes detected in diseased pigs in Quebec from 2008 to 2016 using the APZEC database and report the temporal trends of fluoroquinolone and multidrug resistance in these isolates. Additional aims were to investigate the presence of a spatio-temporal cluster of the ETEC isolates of the virotype LT:STb:STa:F4, associated with fluoroquinolone resistance, and to assess a potential phylogenetic relationship between ETEC:F4 isolates, based on their PFGE profile, to identify the presence of one or several potential “high-risk” clones in the porcine population.

Materials and Methods

Bacterial isolates and virulence gene detection.

Primary *E. coli* cultures were obtained from the intestinal contents or feces of pigs with intestinal disease submitted to the Laboratoire de Santé Animal (LSA) of the Ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation du Québec (MAPAQ) or the Diagnostic Service of the Faculté de médecine vétérinaire (FMV) of the Université de Montréal, or from fecal swabs collected by veterinary practitioners from diseased pigs and submitted to the FMV. The samples had originally been plated on both Tryptone soya agar (TSA) plates (Oxoid) with 5% sheep blood and MacConkey agar plates (Becton Dickinson) at 37°C. Then, samples were transferred to the Ecl and enriched overnight in Luria-Bertani (LB- Difco, Mississauga, ON, Canada) broth (Figure 1). Next, DNA was extracted from the LB culture by heat lysis, as previously described (321). Multiplex PCR was carried out at the Ecl for detection of the virulence genes which define the *E. coli* pathotypes commonly found in pigs: enterotoxigenic *E. coli* (ETEC) (*eltB*, *estA*, and *estB*), enteropathogenic *E. coli* (EPEC) (*eae*), shiga toxin-producing *E. coli* (STEC) (*stxA*, *stx2A*), and *faeG* and *fedA* genes encoding the fimbrial adhesins F4 (K88) and F18, respectively. When one or more pathotype-defining genes were identified in the sample, three colonies were selected, among lactose-positive and hemolytic colonies and resubmitted to culture enrichment in LB broth to obtain pure cultures. The three isolates were examined by multiplex PCR for the presence of the virulence genes which define the *E. coli* pathotypes commonly found in pigs, as above. Pathotype positive isolates were further examined by multiplex PCR for the presence of the genes *fanC* (K99), *fasA* (F6), *f41* (F41), *paa* (Paa), *aidA* (AIDA) and *astA* (EAST1), to determine the extended virotype. An ETEC or STEC

isolate was considered as a pathogenic agent if it possessed a fimbrial adhesin gene, or as a possible pathogenic agent if it did not possess any of these fimbrial adhesin genes. ECL protocols and the APZEC database are available online on <http://www.apzec.ca/en/Protocols> and www.apzec.ca respectively.

Antimicrobial susceptibility testing

One ETEC:F4 isolate per virotype and per case (see definition in next section) was randomly selected for antimicrobial susceptibility testing. These isolates were tested by the LSA (MAPAQ) or the Service Diagnostic de la Faculté de Médecine Vétérinaire for susceptibility to 10 antimicrobial agents using the disk-diffusion (Kirby-Bauer) assay as previously described (163). The following antimicrobial disks were used: apramycin (15µg), neomycin (30µg), gentamicin (10µg), streptomycin (10µg), ceftiofur (30µg), enrofloxacin (5µg), trimethoprim-sulfamethoxazole (1.25/23.75µg), ampicillin (10µg), florfenicol (30µg) and tetracycline (30µg). The generic *E. coli* ATCC® 25922 served as control. Veterinary CLSI 2015 clinical breakpoints (defined for animal pathogens) were used when available (360) ; otherwise, CLSI 2015 clinical breakpoints (defined for human pathogens) were used (361). Isolates were considered to be multidrug resistant (MDR) if they were non-susceptible (resistant or intermediate) to at least one antimicrobial in three or more classes of antimicrobials tested, as previously described (92).

The APZEC database.

The APZEC database is an information system developed in-house by the authors in the ECL at the Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Montréal. It comprises 3 major components: first, the back-end SQL server database, a robust relational database system to store the generated data, second, the front-end application developed using the Microsoft Visual Basic that provides graphical user interfaces (GUIs) to enter and forward the collected clinical and laboratory data to the back-end database server, finally, the web-based interface (<http://www.apzec.ca>) for data presentation, built using Visual Basic language and ASP.NET technology that contains Microsoft's framework and toolsets for building Web-based applications.

For each isolate, the virulence genes, antimicrobial resistance profile and information on the sampled animal (species, age and clinical signs) were entered weekly in the APZEC database using the front-end GUI application, resulting in an integrated profile. Since 2013, the

localisation of sampling site (6-digit postal code) has also been systematically captured in the database for each isolate.

A “case” was defined as a gathering of samples coming from the same farm on the same day, but not necessarily coming from the same animal. A “positive case” was defined as a case where a pathogenic agent or possible pathogenic agent was detected. A positive case for a specific pathovirotype was defined as a case with detection of one or more isolates from this pathovirotype. As several pathovirotypes may be associated with a case, a case can be positive for multiple pathovirotypes.

Descriptive statistical analysis

Based on the APZEC compiled results, the percentage of positive cases per pathovirotype was calculated per year among all cases from diseased pig samples submitted in Quebec from 2008 to 2016. Subsequently, the number of cases positive for each virotype among ETEC:F4 positive cases was determined per year using the same database. The number of isolates non-susceptible to enrofloxacin and the number of MDR isolates were presented per year and per virotype. Also, the number of non-susceptible isolates per antimicrobial among ETEC:F4 isolates was presented per year.

Space and time analysis of cases according to the detection of LT:STb:STa:F4 isolates non-susceptible to enrofloxacin

Enrofloxacin non-susceptibility was mostly associated with the virotype LT:STb:STa:F4 in our dataset (see results and Figure 4). Therefore, the Kulldorff space-time scan statistic was used to assess whether cases with detected LT:STb:STa:F4 isolates non-susceptible to enrofloxacin were randomly distributed, or if they were clustered in space and/or time (362). This test was performed with the software SaTScan 9.4.4 (available at <https://www.satscan.org/>). This analysis was performed at the case level and was limited to the 2013-2016 period based on availability of the postal code data. The day of sampling was used as the time unit. Each case was geolocated at the centroid of the 6-digit postal code area of the farm with GeoPinpoint™ Suite (DMTI Spatial Inc). The detection of an LT:STb:STa:F4 isolate non-susceptible to enrofloxacin in an APZEC case was considered as a case, all other APZEC cases were considered as controls. Therefore, a Bernoulli model was used with statistical significance determined using 999 permutations. The ArcGis10.3.1 software (ESRI) was used to map the results.

Phylogenetic analysis by Pulse-Field Gel Electrophoresis (PFGE)

A sample of 137 isolates from the LT:STb:STa:F4 or LT:STb:F4 virotype detected between 2013 and 2016 inclusively were randomly selected with probabilities proportional to the number of isolates detected for each year and virotype. These isolates were examined by PFGE using XbaI restriction enzyme as described by Pulsnet (239, 363). PFGE profiles were analyzed using Bionumerics 6.6 software (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgium). An additive tree was generated by the unweighted pair-group method using arithmetic (UPGMA) averages, based on the Dice similarity coefficient (optimization 1%; tolerance 1%). The following definitions were used (239): isolates with 95% of similarity were defined as a pulsotype and; isolates with 55% of similarity were defined as a PFGE cluster.

Results

Emergence of the virotype LT:STb:STa:F4 throughout the study period was associated with an increase in the proportion of cases with detection of isolates non-susceptible to enrofloxacin. Samples originating from a total of 3773 porcine cases were submitted to the Ecl Laboratory between 2008 and 2016. Overall, pathogenic and possible pathogenic *E. coli* isolates were identified in 1870 (49.6%) cases and 1903 (50.4%) cases were negative. The distribution of cases according to clinical signs is detailed in Table S1.

Among the pathogenic agents, ETEC:F4 was the predominant pathovirotype identified, with an increase of its detection from 10% to 23% of cases between 2012 and 2015 (Figure 2). Although less often identified, STEC:F18 was the second most predominant pathovirotype (between 4 and 6% of total cases throughout the study period). ETEC:F18 and ETEC:STEC:F18 were not predominant in Quebec during the study period (detected in less than 3% of cases). Among pathotypes considered as possible pathogenic agents, ETEC-positive cases were found the most frequently, in a relatively stable percentage of cases (between 9 and 16% of cases) each year through out the study period (Figure 2). EPEC cases oscillated around 5% each year during the study period and STEC-positive cases were identified rarely (less than 2% of the cases) except for the years 2011 and 2012 when almost 5% of the cases were STEC.

In total, during the study period, 692 ETEC:F4 isolates were identified in 611 cases (16% of all cases). Figure 3 illustrates the temporal trends in the number of cases with the different ETEC:F4 virotypes detected throughout the study period. The virotype LT:STb:STa:F4 was not frequently observed between 2008 and 2013. The number of cases positive for isolates of this virotype increased dramatically in 2014 and 2015. The frequency of cases positive for

LT:STb:F4, which indisputably predominated among ETEC:F4 positive cases before 2014 (with 78 cases representing 95% of cases positive for ETEC:F4 belonging to this virotype), decreased to become less than that of cases positive for LT:STb:STa:F4 after 2014 (between 33 and 35% of cases positive for ETEC:F4 isolates belonging to the LT:STb:F4 virotype in 2015 and 2016). Another virotype, STa:STb:F4, appeared in 2014 and its frequency seems to have increased subsequently.

Overall, the proportion of ETEC:F4 isolates non-susceptible to enrofloxacin increased over the study period (Figure 4) from 0% (0/64) in 2008 to 69% (77/112) in 2016. Most LT:STb:STa:F4 isolates, since their appearance in 2014, have been non-susceptible to enrofloxacin. In 2014, few LT:STb:F4 isolates were non-susceptible to enrofloxacin (19%) with this proportion increasing in subsequent years. In 2016, almost half (45%) of the LT:STb:F4 isolates were non-susceptible to enrofloxacin. Isolates belonging to the STa:STb:F4 virotype were predominantly sensitive to enrofloxacin (in 2016, 20% of STa:STb:F4 isolates were non-susceptible to enrofloxacin).

The results for the extended pathovirotypes (*fanC*, *fasA*, *f41*, *paa*, *aidA* and *astA*) are available in the supplemental data (TableS2).

Increase of multidrug resistance in ETEC: F4 isolates in diseased pigs in Quebec from 2008 to 2016.

For ETEC:F4 isolates of each virotype, the percentage of isolates non-susceptible to 3 classes of antimicrobial and more increased from 80% to 92% (Figure 5).

Possible extensively resistant isolates (resistant to 7 or 8 of the 8 tested antimicrobial classes) appeared in 2015 and 2016 for LT:STb:STa:F4 and LT:STb:F4 virotypes, respectively.

Temporal trends of ETEC:F4 isolates non-susceptible to the 9 other antimicrobials tested are described in the Figure S1.

Spatio-temporal cluster of LT:STb:STa:F4 non-susceptible to enrofloxacin occurred at the end of 2015.

One statistically significant spatio-temporal cluster was detected. The relative risk associated with this cluster was 2.33 (p-value<0.001) meaning that there were 2.33 times more cases (i.e. cases positive for an LT:STb:STa:F4 isolate non-susceptible to enrofloxacin) than controls in this area during the cluster time frame, which was from the 5th of April 2015 to the 9th of September 2016. The coordinates of the center of the cluster were 45.199529 N, 71.500486

W with a radius of 113.8km, roughly matching the center of the Montérégie region of the province of Quebec (Figure 6).

PFGE cluster (55% of similarity) of LT:STb:STa:F4 non-susceptible to enrofloxacin predominates since 2015 in Quebec.

A total of 137 isolates from 128 cases were typed by PFGE. They were grouped into 13 different clusters based on the PFGE profile as illustrated in Figure 7. Two isolates with less than 50% of similarity were assigned to the cluster 0 (in black).

The cluster 8 (yellow) was mainly composed of LT:STb:F4 isolates susceptible to enrofloxacin whereas the cluster 9 mostly included LT:STb:STa:F4 isolates non-susceptible to enrofloxacin. Together, they included 78/137 of the isolates. The cluster 6 (pale orange) is also of interest as it includes mainly (17/21) non-susceptible to enrofloxacin isolates.

As illustrated in Figures 7 and 8, isolates sampled in 2013 belonged mostly to cluster 8 (4/11 belonged to cluster 8, the 7 other isolates were dispatched in 6 other clusters). Only one isolate sampled in 2013 belonged to cluster 9. Among isolates sampled in 2015 and 2016, only 6/41 and 4/46, respectively, belonged to cluster 8, whereas many more belonged to cluster 9 (20/41 and 19/46 respectively). Geographic distribution of clusters 6 and 9 extended over the study period (Figure 8).

The isolates of cluster 9 were found in both neonatal and nursery pigs whereas those of group 8, except for one isolate, were found in nursery or grower pigs (Figure 7).

Forty six out of 52 isolates in cluster 9 manifested non-susceptibility to enrofloxacin, and of these 46, 11 isolates manifested both ceftiofur and enrofloxacin resistance.

Discussion

The main objective of this study was to describe the patterns of pathovirotypes and antimicrobial resistance of *E. coli* isolated from diseased pigs in Quebec from 2008 to 2016, using the APZEC database. Although it was predictable that ETEC:F4 would predominate as one of the main pathovirotypes isolated from cases of diarrhea in pigs (59), our results are notable as they highlight unique trends in Quebec. Indeed, in this province, ETEC:STEC:F18 and ETEC:F18 were not frequently identified, during this period of time, in cases of diarrhea in pigs. These data contrast with those of most other countries, where these F18 pathovirotypes are equally or more prevalent than ETEC:F4, illustrating geographical

variations (364-368). STa:STb:F4, which has been found in sick pigs in some European countries (364), appeared in Quebec only in 2014 and its frequency seems to have increased subsequently.

The presence of fimbriae-negative EPEC, ETEC and STEC, in more than half of pathologic cases, is notable. The possibility of false negative results for F4 (other fimbriae are tested in single PCR) due to multiplex PCR is unlikely, as the sensitivity of this test has been calculated to be 99.1% when compared with whole genome sequencing results regarding the presence of F4 fimbriae (data not shown). Although it is difficult to evaluate their clinical significance, it is possible that certain ETEC and STEC carry fimbriae that are not tested routinely. Considering the fast evolution of the *E. coli* genome (28), it is conceivable that new fimbrial genes have appeared. However, it would not be realistic (logistically and financially) to expect the detection of recently discovered genes in a diagnostic context. It is also conceivable that possible pathogenic pathotypes are opportunists or secondary pathogens, contributing to the development of disease in certain circumstances such as the presence of co-infection or other predisposing factors.

We observed an increase in the number of cases positive for LT:STb:STa:F4 isolates non-susceptible to enrofloxacin in 2013, which prevailed until the end of the study period and which was confirmed by the spatio-temporal cluster of such cases between April 2015 and September 2016. Likewise, an increase in fluoroquinolone non-susceptibility has also been described in pigs in Australia (167), in the United States of America (166) and especially in Japan (267) where clusters of ETEC/STEC non-susceptible to fluoroquinolones (based on the PFGE profile) have been recently reported to have emerged in pigs. Similarly, *E. coli* ST131, appeared concomitantly at several places in the world when it first emerged in the mid-2000's, and has subsequently spread widely (88). Non-susceptibility to enrofloxacin might be one of the characteristics which confer to these isolates a selective advantage compared to the other isolates (268). Data on quinolone use in pigs in Canada are scarce, indeed, in the Canadian Integrated Program for Antimicrobial Resistance surveillance (CIPARS) report, fluoroquinolone use is surprisingly reported as inexistent, although these data concern only grower-finisher pigs and do not provide information on use in farrowing barns or nurseries (342). However, it has been used off-label in Quebec since the 2000s to treat ND and PWD. This emergence of resistance to enrofloxacin is of great concern as fluoroquinolones are now classified as critical antimicrobials (97, 345).

The number of isolates resistant to ampicillin and tetracycline were consistently high over the years and the number of MDR isolates increased over the study period. This is consistent with the results of previous study (163), and it can be explained by the predominant role that penicillins and tetracyclines have in porcine industry in Canada to treat diseased pigs and the extensive use of chlortetracycline prophylactically (160, 161).

In this study we evaluated the phylogenetic relationship of ETEC:F4 isolates based on their PFGE profiles. We confirmed that the LT:STb:STa:F4 isolates are part of a cluster with 55% of similarity based on their PFGE profile. Isolates from this cluster seem to have emerged and spread through the Quebec territory in 2015 and 2016. This cluster also comprises some LT:STb:F4 non-susceptible isolates, collected in 2015 and 2016, suggesting that the *estA* gene may have been acquired horizontally and lost by certain isolates; however the change in the PFGE profiles should be minimal with the loss of one plasmid (369). The other possibility would be the concomitant emergence of another, closely related LT:STb:F4 strain. It should be noted that phylogenetic trees built on PFGE profiles with the UPGMA method are more reliable when isolates are minimally divergent (370). We performed this analysis to assess the possible presence of a “high-risk” clone, similar to the human ExPEC *E. coli* ST131. In contrast, the ETEC:F4 isolates were relatively diverse according to their PFGE profile, which, at first sight, does not support the “high-risk” clone hypothesis but suggests that virulence, fitness and antimicrobial resistance genes could be transferred through horizontal gene transfer (HGT). However, despite its relative unreliability due to HGT events and subjectivity (49), this approach has proven useful in the past, even when the Tenover criteria for relatedness (371) are not fulfilled. For example, it seems that Woodford et al. had already identified isolates from the “high-risk” clone *E. coli* ST131 as early as 2004 (372). This phylogenetic group was not recognized as such before 2008 (373), because based on phylogenetic relationships using PFGE, it only demonstrated 60% similarity. Although isolates for the spatio-temporal cluster and isolates belonging to the PFGE cluster 9 were not selected in the same way and therefore can not be compared, it is noticeable that in both analyses, isolates non-susceptible to enrofloxacin gained in importance in 2015.

The detection of a spatio-temporal cluster is noteworthy. The underlying reasons for the center of the Montérégie region having the highest incidence of cases positive for LT:STb:STa:F4 non-susceptible to enrofloxacin would need further investigation. The high density of swine farms, direct and indirect contacts between farms through pig movements

and people (such as veterinarians, transporters, etc...) visiting these farms and possibly antimicrobial prescriptions habit in this region are potential factors that could facilitate the dissemination or emergence of resistant isolates, but were not investigated in this study. After 2016, the spatio-temporal cluster was no longer detected, which does not mean that enrofloxacin non-susceptibility has disappeared but more likely that it has extended to other virotypes, particularly the LT:STb:F4 and to other geographical areas.

The main limitation of our study is that we have based our results on passive surveillance. The increase in LT:STb:STa:F4 isolate detection could have been biased by an increased of submissions of cases to the EcL due to the fact that we informed field veterinarians very early of the occurrence of enrofloxacin non-susceptibility. This may have encouraged veterinarians to submit more cases or some specific cases to detect antimicrobial resistance. For the spatio-temporal analysis, this bias was likely minimized by the fact that we used control isolates from the same database during the same period.

Our results reinforce the importance of regional surveillance programs to generate relevant data on the locally present pathovirotypes and virotypes, which is essential for the development of specific detection or prevention strategies, such as new diagnostic tests or specific vaccines. They also underline the importance of accurate identification of antimicrobial patterns associated with disease, to ensure the instigation of the most appropriate treatment (antimicrobial therapy) and prevention strategy (such as vaccines). To this purpose, the EcL developed the APZEC database. This platform primarily reports the presence of virulence genes, as detected by PCR, and antimicrobial resistance on a case based and isolate based level to highlight the temporal and spatial trends and allow correlations with the demographic data. Therefore, the APZEC database has been very useful to identify and monitor an emerging virotype/cluster. A potential improvement of this tool would be to integrate additional information such as the antimicrobial use in a systematic and standardized way.

In conclusion, the APZEC database has allowed the description of the temporal trends of *E. coli* pathotypes detected from diseased pigs, in Quebec, between 2008 to 2016. We highlighted the predominance of the ETEC:F4 pathovirotype, the emergence of the LT:STb:STa:F4 virotype and the occurrence of fluoroquinolone non-susceptibility. We have also identified a PFGE cluster composed mainly of LT:STb:STa:F4 ETEC isolates non-susceptible to enrofloxacin, in the porcine population in Quebec in 2015. Further investigation, especially

on molecular mechanisms of resistance to fluoroquinolones, are needed to determine the risk it might represent for porcine and public health. We consider the APZEC database to be a very powerful tool providing a framework for diagnostic and research laboratories to work together to improve animal health.

Tables and Figures

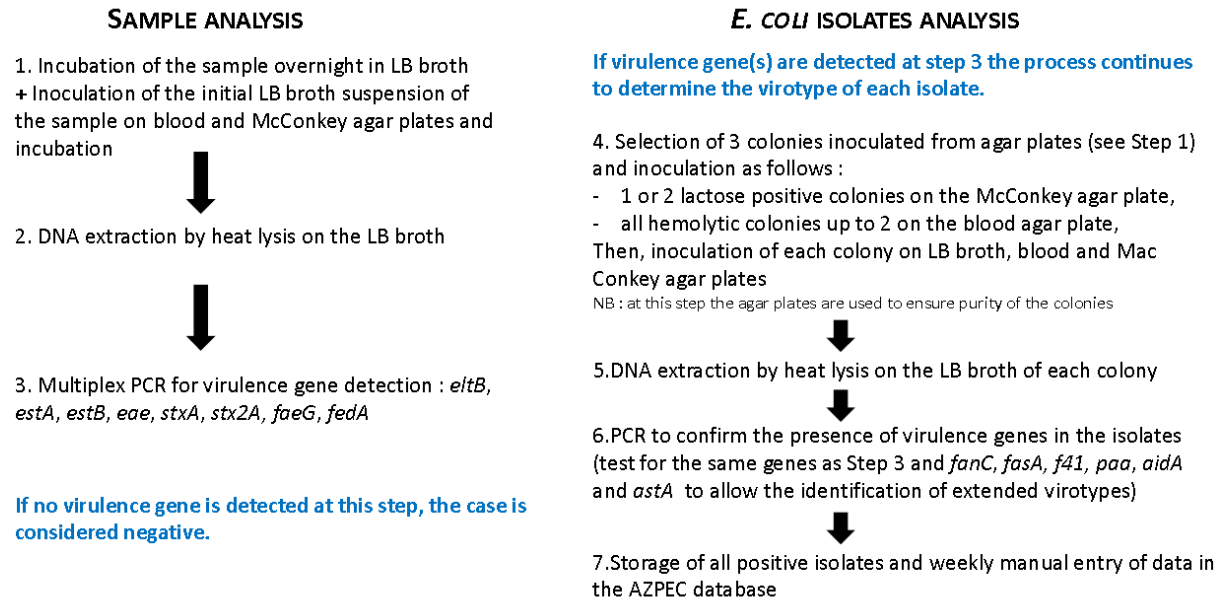


Figure 1 : Outline of the Ecl approach for the detection of the virulence genes which define the E. coli pathotypes commonly found in pigs. LB = Luria Bertani broth.

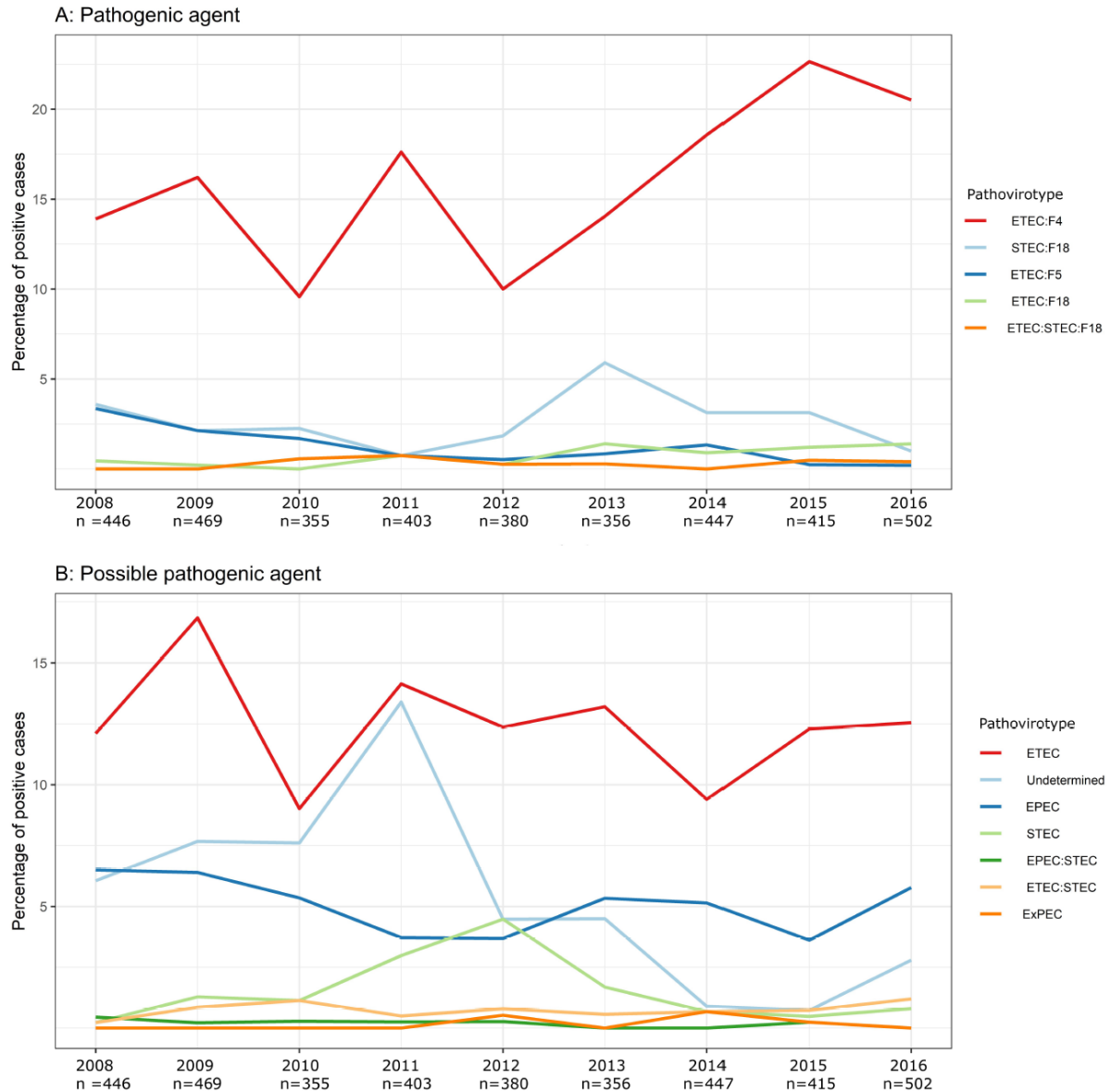


Figure 2 : Percentage of positive cases per pathovirotype in diseased pigs in Quebec among all cases submitted to the EcL from 2008 to 2016. The pathovirotypes were classified as pathogenic agents if they carried a colonisation factor (F4, F18 or F5) and as possible pathogenic agents if they carried only enterotoxins, shiga toxin or the *eae* gene.

Cases are defined as a gathering of samples coming from the same farm on the same day, but not necessarily from the same animal.

Undetermined: the sample possesses only fimbrial genes (and could represent a vaccinal strain).

During the study period there were 3773 cases and 1870 positive cases, including 89 mixed cases (i.e. several pathovirotypes per case)

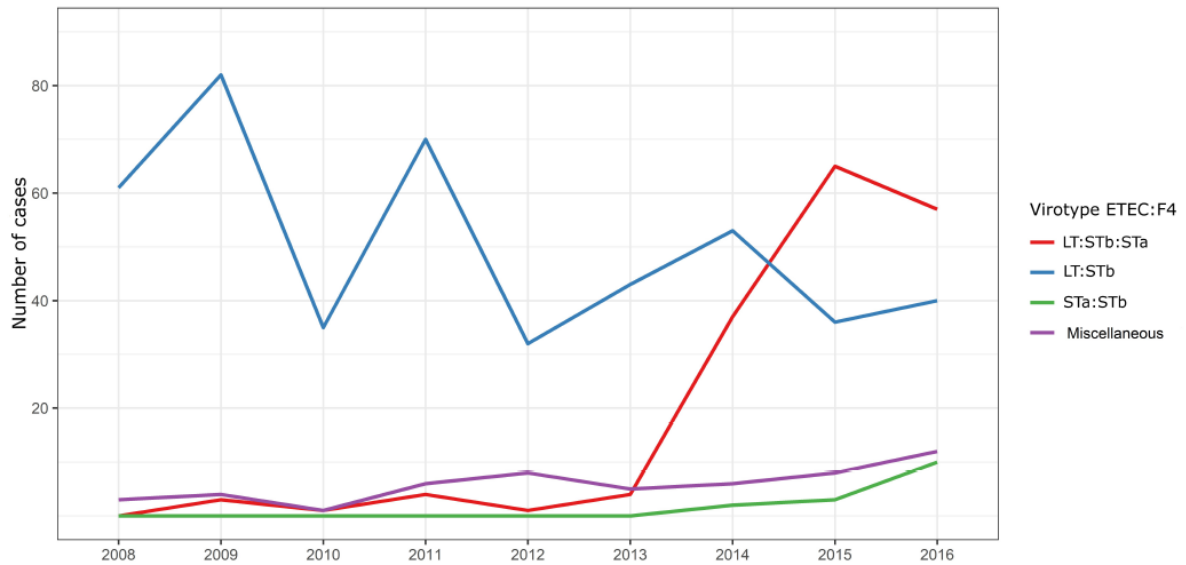


Figure 3 : Number of positive cases per virotype in diseased pigs in Quebec among ETEC:F4 cases submitted to the EcL from 2008 to 2016. During the study period there were 611 ETEC:F4 cases, including 81 mixed cases (i.e. several virotypes per case). Miscellaneous ETEC:F4 is a group of isolates carrying other combinations of enterotoxin genes.

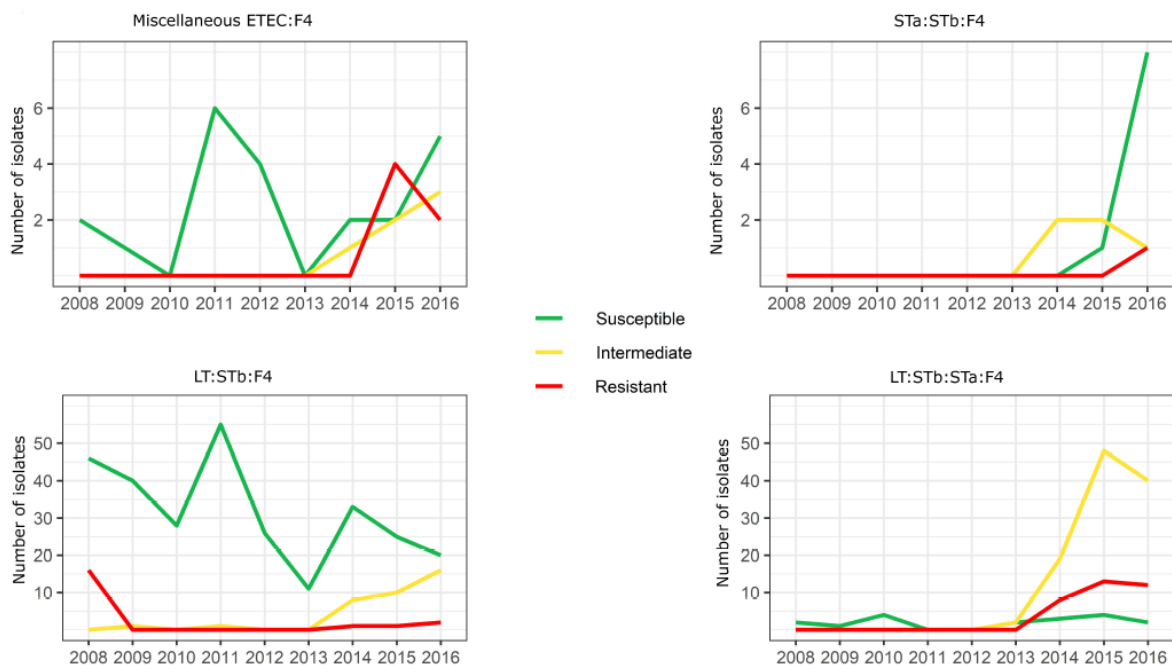


Figure 4 : Susceptibility to enrofloxacin in ETEC:F4 isolates from positive cases, classified by virotype, detected in samples from diseased pigs of Quebec submitted to the EcL from 2008 to 2016. Miscellaneous ETEC:F4 is a group of isolates carrying other combinations of enterotoxin genes. During the study period there were 692 ETEC:F4 isolates from 611 cases, including 81 cases with more than one isolate. Only one isolate per virotype was kept for each case.

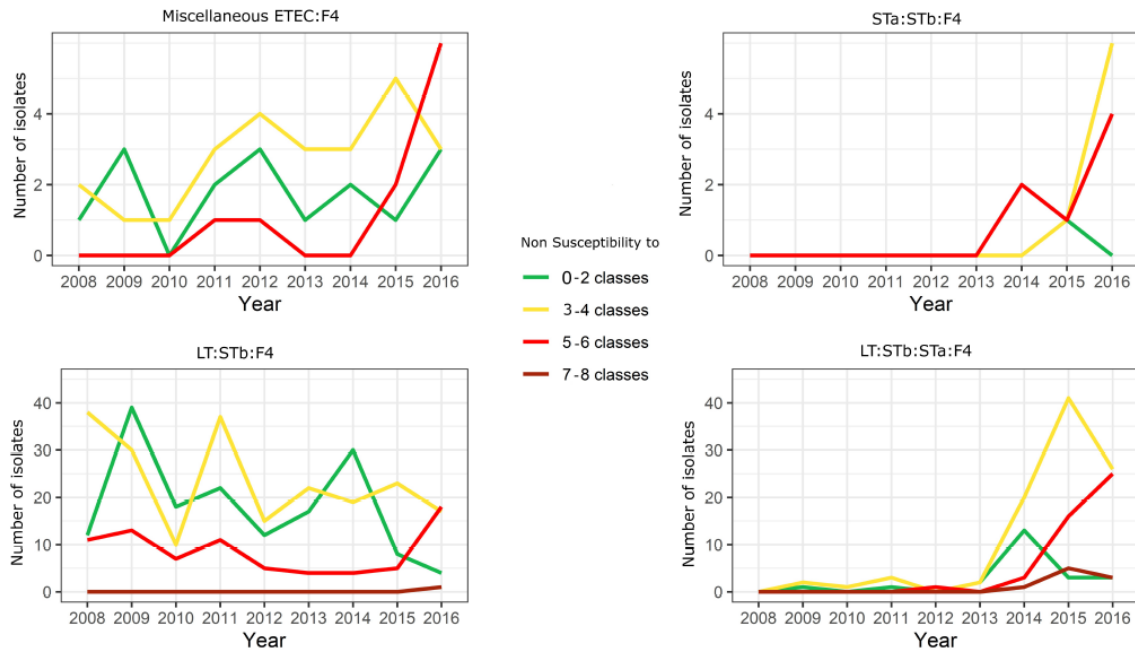


Figure 5 : Number of multidrug resistant ETEC:F4 isolates, classified by virotype, detected in samples from diseased pigs of Quebec submitted to the Ecl from 2008 to 2016. Miscellaneous ETEC:F4 is a group of isolates carrying all other combination of enterotoxin genes. During the study period there were 692 ETEC:F4 isolates from 611 cases, including 81 cases with more than one isolate. Only one isolate per virotype was kept for each case.

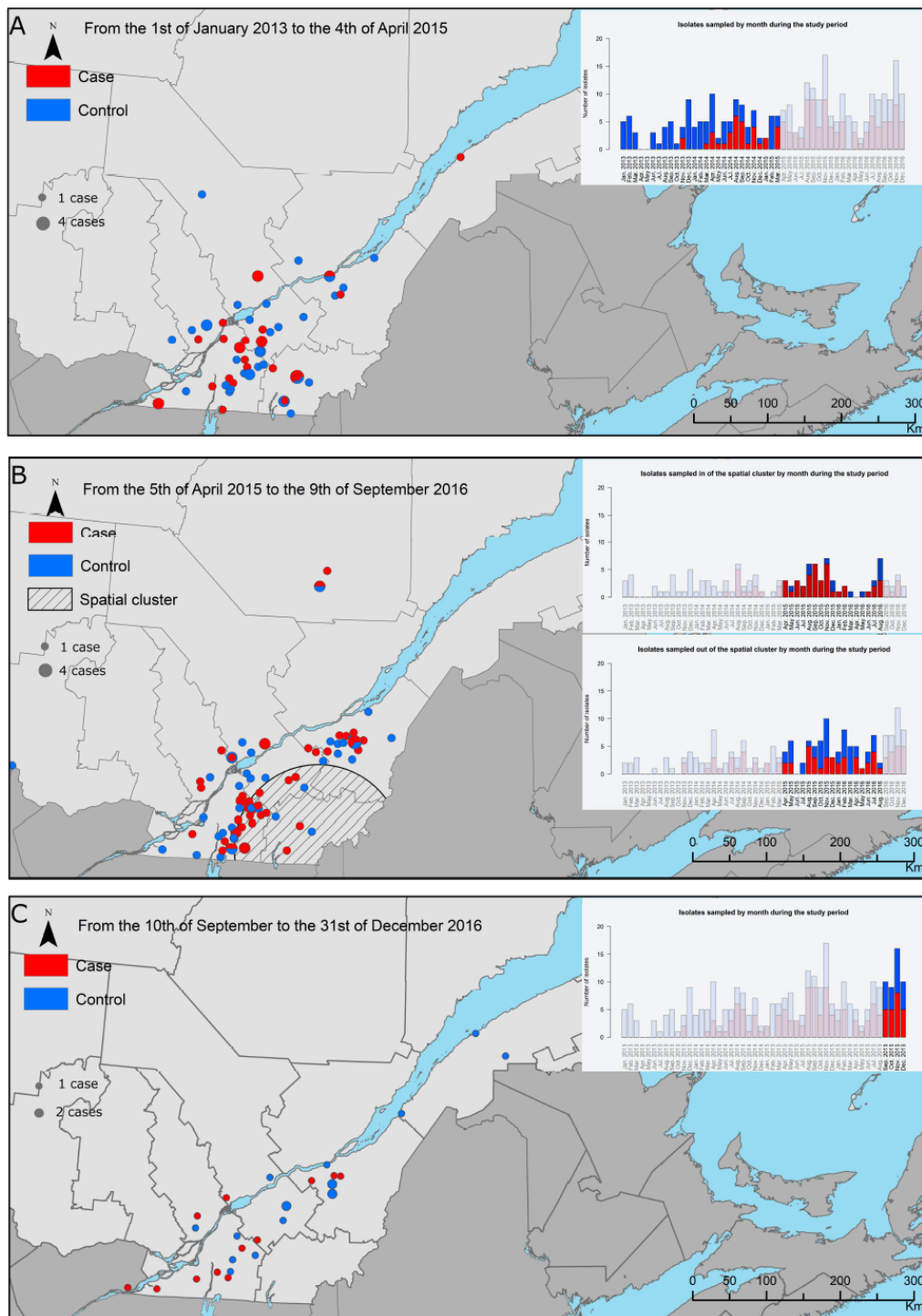


Figure 6 : Representation of the spatio-temporal cluster.

Geographical distribution of cases (in red) and control (in blue) in the province of Quebec, Canada, before (A), during (B) and after (C) the spatio-temporal cluster.

On each map, the graphic in the upper right indicates the temporal distribution of cases and controls sampled per month during the study period. The highlighted period is the period illustrated on the corresponding map.

On the map B, the striped circle indicates the spatial cluster, and the striped bars represent the cases sampled in the spatial cluster, whereas the unstriped bars represent the cases sampled out of the spatial cluster.

The size of the circles indicates the number of cases at this location.

In this analysis, a case is defined as an APZEC case positive for an ETEC:F4:LT:StA:StB isolate non-susceptible to enrofloxacin and a control is any other APZEC case.

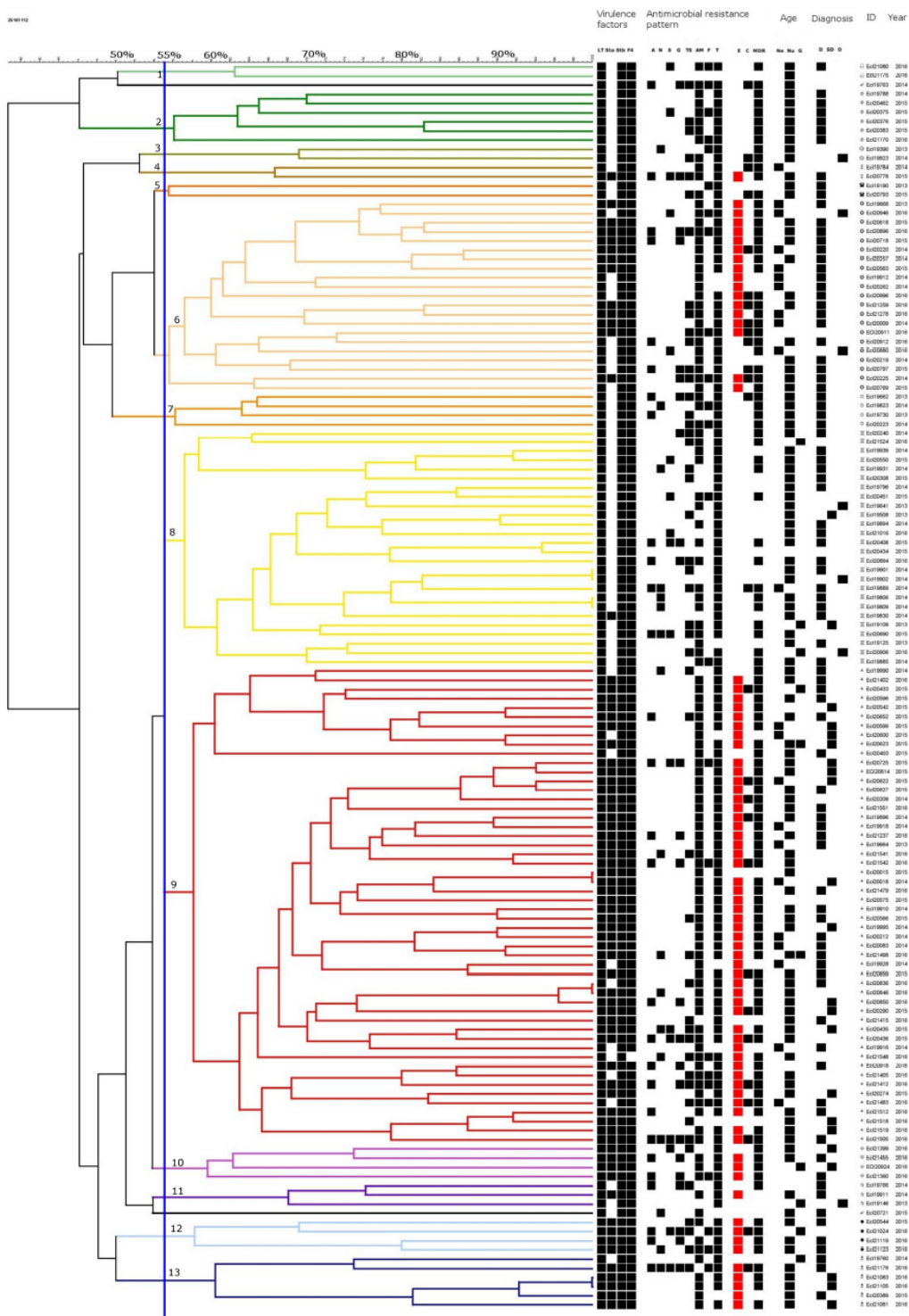


Figure 7 : Phylogenetic additive tree based on the PFGE profiles of ETEC:F4 isolates collected from 2013 to 2016 by the Ecl in diseased pigs in Quebec. D = Diarrhea, SD = Sudden Death, O = Other, Ne = Neonates, Nu = Nursery, G = Grower, ID = Identification, A = Apramycin, N = Neomycin, S = Spectinomycin, G = Gentamicin, TM = Trimethoprim Sulfisoxazole, AM = Ampicillin, T = Tetracycline, F = Florfenicol, E = Enrofloxacin (the squares are colored in red), C = Ceftiofur, MDR = Multidrug resistance.

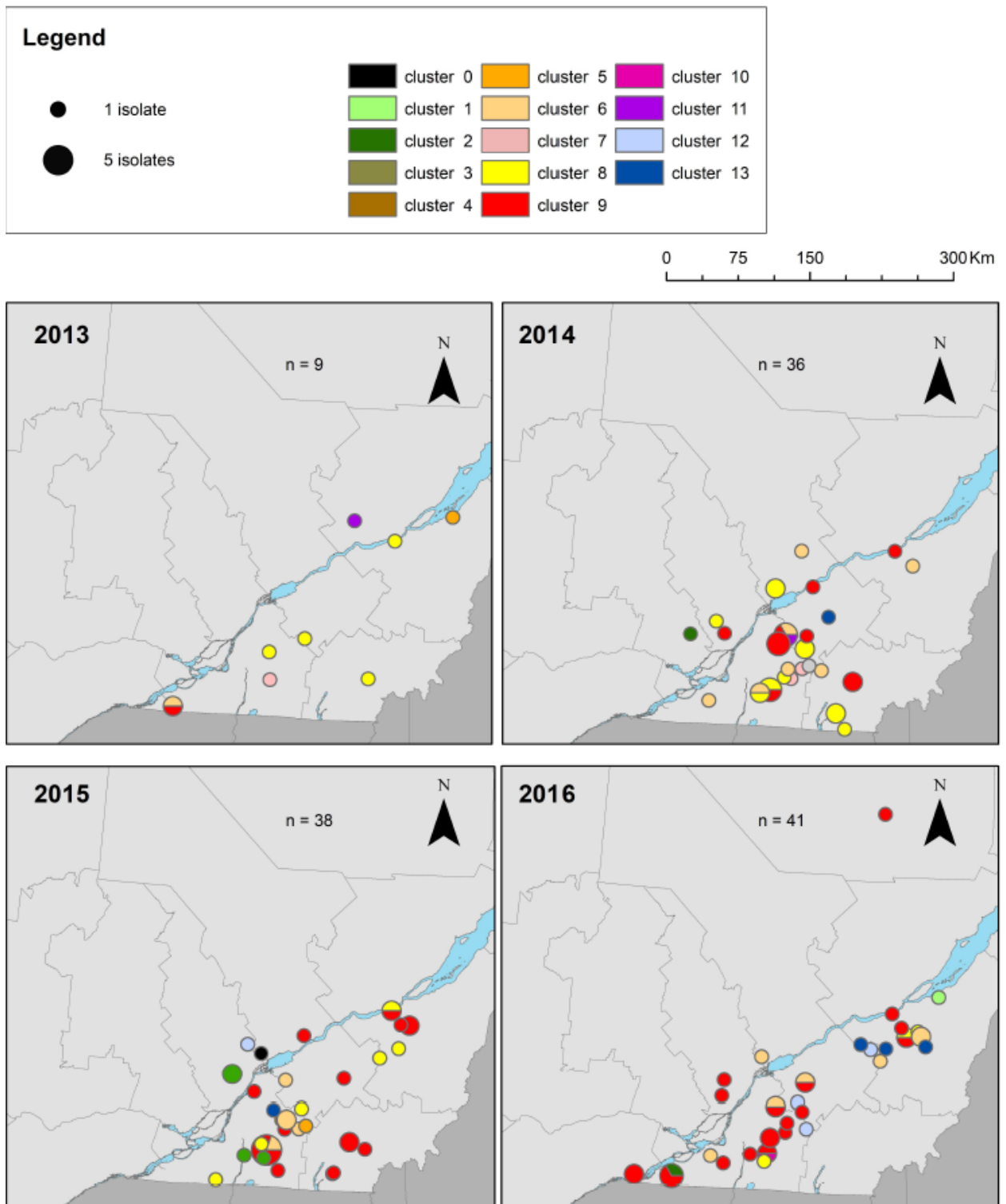


Figure 8 : Geographical distribution of isolates belonging to the PFGE clusters over the Quebec territory in 2013, 2014, 2015 and 2016 according to the Ecl database. The size of the circles is proportional to the number of isolates identified in the 6-digit zip code region.

Matériel supplémentaire



Figure S1 : Susceptibility to antimicrobials in ETEC:F4 isolates from positive cases, detected in samples from diseased pigs of Quebec submitted to the Ecl from 2008 to 2016.

Tableau S1 : Frequency of clinical signs in 3773 cases of diseased pigs in Quebec submitted to the EcL from 2008 to 2016. (when several clinical signs were present, the most severe one was attributed to the case).

Clinical signs	Number of cases (%)
Diarrhea	1661 (44)
Sudden death	490 (13)
Edema	188 (5)
Wasting	189 (5)
Respiratory symptoms	189 (5)
Other (abortion, septicemia, nervous symptoms, urinary symptoms)	151 (4)
Unknown	905 (24)

Table S2 : See Appendix C.
Complete profile of all isolates entered in the APZEC database between 2008 and 2016. Missing data are represented by *****

ARTICLE 5 : High Risk clone for antibiotic resistance dissemination: A proposal of revised criteria adapted to the OneHealth context with application to Enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) F4 associated with enrofloxacin non-susceptibility in the porcine population in North America.

Auteurs et affiliations

Contribution de Maud de Lagarde à cet article

Pour cet article Maud de Lagarde a contribué majoritairement, à la récolte et l'analyse des données, à l'exécution des expérimentations, ainsi qu'à la rédaction du manuscrit initial et sa révision.

Auteurs

M. de Lagarde¹, DVM, ACVIM, G. Vanier¹, PhD, J. Arsenault², DVM, MSc, PhD, J. M. Fairbrother^{1,3}, BVSc, PhD.

Affiliations

¹ OIE Reference Laboratory for *Escherichia coli*, Faculty of Veterinary Medicine, Université de Montréal, Saint-Hyacinthe, QC, Canada.

² Swine and poultry infectious research center (CRIPA-FQRNT), and Groupe de recherche en épidémiologie des zoonoses et santé publique (GREZOSP), Faculty of Veterinary Medicine, Université de Montréal, Saint-Hyacinthe, QC, Canada.

Journal de Publication

Cet article est a été soumis à un numero special de Antibiotics le 30 janvier 2021.

Résumé en français

Un agrégat d'isolats ETEC :F4, LT:STb:STa:F4 non-susceptibles à l'enrofloxacin partageant au moins 55% de similarité basé sur leur profil de PFGE a émergé en 2015 chez les porcs présentant une maladie au Québec. L'objectif de cette étude est de caractériser les isolats ETEC:F4 québécois, grâce à une approche génomique, pour évaluer la présence d'un clone à

haut risque dans la population porcine québécoise basé sur des critères révisés et adaptés aux bactéries pathogènes animales. Le génome complet de 183 isolats a été séquencé avec la technologie Illumina Mi-seq. Les gènes de virulence, de résistance et les réplicons ont été recherchés dans chaque isolat. Une analyse phylogénétique basée sur les SNPs a été réalisée. Les isolats de la lignée clonale ST100/O149 :H10 échantillonnés au Québec en 2013 et après ont aussi été comparés phylogénétiquement aux ETEC :F4 porcins échantillonnés en 2013 et plus tard dont le génome était disponible dans GenBank. Avant 2000, au Québec, les isolats ETEC : F4 étaient principalement du ST90, et appartenaient à différents sérotypes. Après 2000, les isolats étaient principalement des ST100/O149 :H10 et ne possédaient pas de gène *fimH*. La présence d'un clone ETEC :F4 à haut risque, non susceptible à l'enrofloxacin et circulant dans la population porcine nord-américaine a été démontrée. Les isolats appartenant à ce clone sont distribués largement sur le continent, sont multirésistants, possèdent des gènes de virulence spécifiques et ont été capables de persister plusieurs mois sur des fermes. Dans cet article, nous proposons (1) une nouvelle définition de clone basée sur la valeur de bootstrap, le nombre d'isolats par branche et la distance pairée entre deux isolats, comparée au nombre d'années séparant l'échantillonnage et (2) des critères révisés adaptés au concept OneHealth pour les clones à haut risque.

L'identification de ce type de clone dans les populations animales est cruciale afin d'affiner nos connaissances sur les conditions qui favorisent leur émergence et leur dissémination, de manière à pouvoir développer des stratégies de lutte.

Abstract

A cluster of enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) F4 isolates non-susceptible to enrofloxacin and sharing 55% of similarity based on their pulse field gel electrophoresis profile emerged in diseased pigs in Quebec in 2013. We propose a revised definition of a high risk clone adapted to the OneHealth context, and we characterize ETEC:F4 isolates to assess the presence of a high risk clone. The whole genomes of 183 ETEC:F4 strains isolated in Quebec from 1990 to 2018 were sequenced. The presence of virulence and resistance genes and replicons was examined in 173 isolates. Maximum likelihood phylogenetic trees were constructed based on SNP data and clones were identified using a set of predefined criteria. Strains belonging to the clonal lineage ST100/O149:H10 isolated in Quebec in 2013 or later were compared to ETEC:F4 whole genome sequences available in Genbank. Prior to 2000, ETEC:F4 isolates from pigs in

Quebec were mostly ST90 and belonged to several serotypes. After 2000, isolates were mostly ST100/O149:H10. In this article, we demonstrated the presence of an enrofloxacin-non-susceptible ETEC:F4 high risk clone based on revised criteria. This clone emerged in 2013, is multidrug resistant, have a widespread distribution over North America, was able to persist several months on farms and possess specific virulence genes. It is crucial to detect and characterize high risk clones in animal populations to increase our understanding of their emergence and their dissemination.

Introduction

It is now well recognized that antimicrobial resistance threatens environmental, animal and public health (1). The dissemination of antimicrobial resistance genes through human populations, animal populations and the environment is no longer subject for debate (175). There are several known mechanisms of such dissemination that can be broadly classified as horizontal gene transfer (HGT), mainly through mobile genetic elements, or clonal dissemination. The term “high risk clone” emerged around 2011 (374) and has been used to describe bacterial clones that enhance the dissemination of antibiotic resistance (375, 376). These clones represent a major concern not only because they pose a substantial challenge for the treatment of patients but also because they are very efficient vehicles for mobile genetic elements carrying antimicrobial genes, and therefore promote the spread of these genes. The dissemination of ST131-H30-Rx *Escherichia coli* causing mainly urinary tract infection and septicemia in humans, which is resistant to fluoroquinolones and 3rd generation cephalosporins, is one of the best examples of this problem (88). In its current definition, the term “high risk clone” is mainly adapted for human pathogens, whereas antimicrobial resistance should be addressed using a more global approach (377). Therefore, it may be timely to revisit the present criteria (313) and to adapt them to the OneHealth concept (378).

The factors driving the emergence and the dissemination capacity of high risk clones are not well understood. Some authors have hypothesised that fluoroquinolone resistance and consequently fluoroquinolone use have contributed to the selection and the spread of high risk clones (268, 269). Indeed, several fitness effects, particularly the speed of replication, have been associated with high resistance to fluoroquinolones (270) and have been demonstrated to confer growth advantage to several clones, particularly in extended-spectrum β -lactamase (ESBL) producing *E. coli* (379).

Enterotoxigenic *E. coli* (ETEC) causes diarrhea in piglets during the neonatal and post-weaning periods thus resulting in important economic loss for the swine industry (20). ETEC strains produce one or several enterotoxins, which induce the secretion by epithelial cells of water and electrolytes into the intestinal lumen. These ETEC strains colonise the intestinal mucosa via an adherence mediated by bacterial surface structures called fimbriae. ETEC associated with diarrhea in young pigs most commonly possess F4 (K88) or F18 fimbriae, although geographic variations have been reported (19). ETEC isolates are grouped into pathovirotypes based on the presence of the different fimbriae and one or more of the enterotoxins heat labile toxin (LT) and heat stable toxins (STa and STb). Pigs with diarrhea associated with ETEC have been commonly treated with ampicillin (alone or in combination with clavulanic acid), trimethoprim, sulfonamides, aminoglycosides (i.e. neomycin), ceftiofur, spectinomycin, or enrofloxacin, depending on the country (19). In a previous article, we reported the presence of a cluster of ETEC:F4 isolates sharing at least 55% of similarity based on their pulse field gel electrophoresis (PFGE) profile in diseased pigs in Quebec, which emerged in 2013 (380). Most of these isolates were LT:STb:STa:F4 and non-susceptible (intermediate or resistant) to enrofloxacin, an antimicrobial that has been used off-label in Quebec. In addition, fluoroquinolone non-susceptibility in *E. coli* isolated from diseased pigs has been observed in other countries (166, 267) and has been associated with enrofloxacin treatment previously in herds (381). Moreover, clonality has been demonstrated among ETEC isolates causing disease in pigs in the USA (382). Our hypothesis is that a high risk fluoroquinolone non-susceptible pathogenic ETEC clone has emerged in pigs in various countries, thus representing a threat for swine and public health. The objectives of this study were to (1) propose a new definition including revised criteria for a high risk clone adapted to the OneHealth context, (2) to further characterize ETEC:F4 isolates sampled in Quebec, using a genomic approach and (3) to compare these isolates with other ETEC:F4 worldwide both phylogenetically and with respect to the presence of virulence and antimicrobial resistance genes and mobile genetic elements, in order to assess the presence of a high risk clone based on well-defined criteria.

Detection and surveillance of these putative new clonal isolates is crucial to identify and develop control strategies in the field.

Materials and Methods

Proposal of criteria for a high risk clone in a One health context and application

A list of previously used criteria to define a high risk clone for antibiotic resistance dissemination in human medicine was established based on a literature review. This list was used as a starting point for discussion among the study members. These criteria were adapted to fulfill the gaps that the current definition could present for bacterial pathogens as regards to the OneHealth concept, which could include the addition, removal or updating of criteria. The proposed criteria were then applied to putative ETEC:F4 high-risk clones detected in the study.

Isolates selection

In a preliminary study, ETEC:F4 isolates, coming from diseased (mostly diarrhea or sudden death) pigs were examined by PFGE as described previously (363). These isolates were randomly selected from the Animal Pathogenic and Zoonotic *E. coli* (APZEC) database (<http://www.apzec.ca/>) (380) as follows: 90 isolates from between 1990 and 2012, and 46 or 47 isolates per year from 2013 to 2016 inclusively. A phylogenetic tree based on the PFGE profiles of these 274 isolates was generated using the UPGMA method. The tree was composed of 10 clusters using a 55% similarity cut-off. Between 45 and 55% of isolates were randomly selected from each cluster for whole genome sequencing, for a total of 183 isolates. To follow more recent trends, we also sequenced a random selection of ETEC:F4 isolates in the APZEC database from 2017 (n=24) and 2018 (n=23), that had not been included in the PFGE study.

Antimicrobial susceptibility

Antimicrobial susceptibility results were extracted from the APZEC database when available. Isolates had been tested for susceptibility to 10 antimicrobial agents using the disk-diffusion (Kirby-Bauer) assay, at either the Animal Health Laboratory of the Ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation du Québec (MAPAQ) or the Diagnostic Service of the Faculty of Veterinary Medicine, as previously described (163, 380). Isolates were considered to be multidrug resistant (MDR) if they were non-susceptible (resistant or intermediate) to at least one antimicrobial in three or more classes of antimicrobial tested (92).

DNA extraction, Library preparation and Whole genome sequencing

DNA was extracted from an overnight culture of each isolate in LB broth using the QIAamp DNA Mini Kit, and libraries were prepared using the Nextera XT DNA library prep Kit, according to the manufacturer's instructions. Isolates were sequenced using Illumina Miseq technology, generating 300 bp paired end reads from libraries. The mean total amount of quality filtered raw sequence was 212.7 MB (minimum 55.23 and maximum 608.49) per isolate and the mean coverage was 61x (minimum 16x and maximum 196x (TableS1)).

Quality assessment and assembly

The Galaxy (<https://usegalaxy.org/>) (383) platform was used for in-silico analysis. FastQC and MultiQC were used to evaluate the quality of raw data (384, 385). Short-read sequences were assembled using SPAdes (Galaxy Version 3.12.0+galaxy1) (386), and assembly quality was evaluated using Quast (Galaxy Version 5.0.2+galaxy1) (387). An assembly was rejected if the number of contigs was > 400, if the N50 was < 40000, or if the number of contigs was between 300 and 400 and the N50 < 50000.

MLST, serotype, phylogroup and fimH

MLST (46), O and H serotype (35) and the *fimH* subtype (388) were determined by analysis of generated FASTA files using the Center of Genomic Epidemiology (CGE) platform (<http://www.genomicepidemiology.org/>). The *fimH* gene is part of the *fim* operon, which encodes type 1 fimbriae found in most *E. coli* strains. The default parameters were used for each application. Phylogroups were determined with in-silico PCR using the Clermont Typing platform (<http://clermonttyping.iame-research.center/>) (389).

These parameters (MLST, serotype, phylogroup and *fimH* subtype) will be referred to as phylogenetic characteristics.

Virulence and resistance gene and replicon determination

To determine the presence of virulence and resistance genes and replicons, the blast option in Geneious Prime 2020.1.2 was used with a custom-made comprehensive database. To create this database, FASTA files from ARG-Annot (390), PlasmidFinder (192), VirulenceFinder (54), ResFinder (391, 392) and VirulenceFactorDataBase (VFDB) (393) were downloaded. For each individual database, we used the most recent version as of June 1st 2020. The comprehensive database (concatenate, makeblastdb) was then created using the Galaxy platform. Duplicate

genes were removed with the tool sRNAtoolbox (394). The SAS.9.4 software was used to filter the hits. Hits were eliminated if coverage was less than 60% and homology less than 90%. Then, for each isolate, the best hit for each gene or replicon was selected based on the following criterion, applied sequentially: maximum homology, maximum bit score, minimum e-value, maximum coverage and maximum length. These hits were considered to be present in the isolate.

The presence of chromosomal point mutations was determined using PointFinder on the CGE platform (392).

Phylogenetic analysis

Initial multiple alignment with the default parameters was performed using CSIphylogeny on the CGE platform (56). The oldest isolate non-susceptible to enrofloxacin was used as reference. The recombination signal (395) in the SNP output was eliminated using Gubbins (396) on the Galaxy platform (Galaxy Version 0.1.0). The maximum-likelihood phylogenetic tree was generated using FastTree v2.1.10 (Price et al., 2010) on the Galaxy platform. The SNP phylogenies were annotated with the relevant metadata using iTOL (<http://itol.embl.de>) (397).

A clonal lineage was defined as a gathering of isolates that belong to the same ST (MLST), the same serogroup, the same phylogroup and same *fimH* gene.

Clones were defined based on three criteria. Firstly, only branches from nodes with a bootstrap value of 1 were retained in the tree. Secondly, a candidate for a clone was only considered if the grouping included three or more isolates. Thirdly, the maximum number of SNPs between pairs of isolates within a group, defined as the SNP_{max} was $< M \times T \times P$ where M is the mutation rate of *E. coli*, which has been described as 3×10^{-6} per year per site (398), T is the number of years between two isolates and P is the number of positions analyzed in all genomes for each phylogenetic analysis. A sub-clone was defined as a clone (defined with the same criteria) within a clone.

Singletons were defined as unique isolates in terms of phylogenetic characteristics (MLST, serotype, *fimH* gene and phylogroup).

Mortality rate and stage of production.

Mortality associated with isolates was evaluated for all cases with a necropsy report available from the the Animal Health Laboratory, MAPAQ or the Diagnostic Service of the Faculté de médecine vétérinaire (FMV) of the Université de Montréal. A “case” was defined as a gathering of samples coming from the same farm on the same day, but not necessarily coming from the same animal (de Lagarde et al., 2020). Isolates belonging to several pathovirotypes may be found in one case; however, only one isolate belonging to a specific pathotype was selected from a particular case. Each necropsy report was reviewed blinded to the clonal lineage identified. The case was considered as being associated with mortality if the presence of one or more deaths on the farm was reported in the anamnesis or if the pig was submitted dead (either by natural causes or by euthanasia on the farm) for necropsy. Chi square tests were performed to compare the mortality risk between clonal lineages and between clones within the clonal lineage A (see results). When the global comparison with the chi square test was significant ($P < 0.05$), pairwise comparisons between clonal lineages were performed and the Bonferroni correction was applied. As there were few isolates in the clonal lineages D, E and F, these were merged into one category for the analysis.

The phase of production was extracted from the APZEC database for each case and categorized as lactation, weaning, and growing-finishing phase. Exact chi square tests were performed to determine if clonal lineages or clones within the clonal lineage A (see results) were significantly associated with one phase of production. When the global comparisons with the chi square test were significant ($P < 0.05$), pairwise comparisons between clonal lineages were performed and the Bonferroni correction was applied. We also merged isolates in the clonal lineages D, E and F into one category for this analysis.

The name and location (6-digit postal code) of the farm were also retrieved from the database to assess the persistence of isolates belonging to the same clone on a farm.

Selection of other whole genome sequence from Genbank.

To evaluate if isolates belonging to the clone detected in Quebec were also present in other parts of the world, the Enterobase database was searched (<https://enterobase.warwick.ac.uk/>) (399). As the clone A1 (see Figure 1 and results) seemed to have emerged in Quebec in 2013, the period of analysis was restricted to 2013-2018. The search criteria for isolates were as follows: sampled in 2013 or later, in swine, and determined

to be from the clonal lineage ETEC ST100, O149H10 and phylogroup A. All isolates corresponding to these criteria were selected and sequences were downloaded from GenBank when available. Phylogenetic analysis was performed as described above, including all isolates (those from Quebec in the present study and those found in GenBank) belonging to the clonal lineage A (see results) sampled from 2013 to 2018.

Results

Proposal of criteria and application to ETEC:F4 clone detected in pigs in Quebec

Until now, clones have qualified as being “high risk” when they have met 6 criteria : (i) worldwide spread, (ii) carriage of multiple antimicrobial characteristics, (iii) efficient colonisation and persistence in host, (iv) effective transmission, (v) increased pathogenicity and (vi) increased virulence causing recurrent infection (88, 400). Other important aspects, such as emergence of the pathogen, environmental persistence, and zoonotic transmission, were not included in these characteristics. Therefore, we propose a list of new criteria, presented in Table 1, to adapt the “high risk” clone definition to a OneHealth context. According to our revised criteria, a clone qualifies to be high risk for antibiotic resistance dissemination if (1) it is emergent, the definition of emergence of a pathogen is as described in Wang et al. (401) and is based on OIE recommendations ; (2) it carries multiple resistance genes associated with phenotypic resistance ; (3) it has a high capacity of dissemination, the definition of persistence was adapted from Falkow et al (402) and the concept of environmentally maintained source is described in Blackburn et al (403) ; (4) it is highly pathogenic. Definitions of these criteria are detailed in Table 1.

Identification of clonal lineage and clones

We sequenced a total of 183 isolates originating from diseased pigs in Quebec, Canada, between 1990 and 2018, randomly selected in each cluster of a preliminary PFGE study or from the APZEC database. After removing 10 isolates due to unsatisfactory raw data or assembling quality, 36 isolates from 1990 to 2012 as well as 21, 21, 22, 26, 24 and 23 isolates for each year from 2013 to 2018, respectively, were retained. The sequencing quality information about the 173 isolates is available in supplemental data TableS1.

A total of 3 366 150 positions were found in all analyzed genomes. The percentage of reference genome covered by all isolates was 61.95% with a reference genome size of

5 433 365 pb (ECL19664). After removal of the recombination signal with the Gubbins software, the total number of SNPs used to build the tree was 19 229. The resulting SNP tree of the 173 isolates is shown in Figure 1A. Based on the definitions above, 6 clonal lineages (A, B, C, D, E and F) and 6 clones (A1, A2, A3, A4, B1 and C1) were identified. One sub-clone within the clone A1, designated A1-sub was also detected. Two singletons were also identified (ECL01947 and ECL20395). The SNP_{max} of each group is presented in detail in FigureS1.

In the 1990s and the early 2000s, clonal lineages D, E and F were predominant (Figure 1A). Clonal lineage D was the oldest, 10/12 isolates being obtained between 1990 and 1995. All isolates (D, E and F) were from the phylogroup C, MSLT ST90 and presented the gene fimH54. However, isolates of the three clonal lineages belonged to different serotypes, respectively O149:H43, O149:H19 and O159:H19 and no clone was detected within these lineages according to the set of predefined criteria.

The predominant clonal lineage A, comprising 129/173 isolates, was first observed in 1995. Phylogeny of these 129 isolates has been enlarged and is presented in more detail in Figure1B. These 129 isolates are O149:H10, ST100, phylogroup A and possess no known fimH gene. Within this clonal lineage, 4 clones (A1, A2, A3 and A4) were identified. Isolates from the clones A2 and A3 were identified around the same period (1995 to 2014), prior to isolates from the clones A1 and A4. Isolates from the clone A1 were first observed in 2013 and have continued to be observed over the 5-year period until the end of the study. The subclone (A1-sub) was composed of isolates sampled between 2015 and 2018. Isolates belonging to the clone A4 were isolated during the same period as the clone A1 (between 2013 and 2018) but represent a much smaller proportion of isolates from the clonal lineage A.

The clonal lineage B/ clone B1, including 11 isolates, was first observed in 2009, and continued to be found until the end of the study period (Figure 1A). These isolates are O138:H10, ST100, phylogroup A and present no known fimH gene.

More recently, in the last 2 years of the study period, the clonal lineage C/clone C1, belonging to a new sequence type, has been observed. These isolates are O23:H37, ST772, phylogroup A and possess the gene fimH54.

In summary, ETEC:F4 isolates in Quebec in the early 1990s were predominantly ST90, belonging to 3 different serotypes and carrying the fimH54 gene. In the mid-1990s, isolates

belonging to ST100 appeared and became predominant. They belong to 2 main O serotypes and carry no *fimH* gene. The clonal lineage A (ST100/O149:H10) is the most widespread and is composed of several clones. In the late 2010s, isolates belonging to another clonal lineage have appeared. They belong to the ST772 and the serotype O23:H37 and constitute a clone.

Virulence gene profiles of the different clonal lineages.

The virulence gene profiles of the isolates were established based on the detection of these genes in the VirulenceFinder and VFDB databases. ETEC:F4 isolates of the same clonal lineage mostly belonged to the same virotype (Figure 1A and 1B). All isolates from clonal lineages D, E, F and B1 (apart from one in B1) were LT:STb:F4 and isolates from C1 were STa:STb:F4. Isolates from the clonal lineage A belonged to the virotype LT:STb:F4 except for isolates from clones A1 and A2 which possessed various combinations of enterotoxins, most isolates being LT:STb:STa:F4 (49/80 and 9/11 respectively).

Clonal lineage A differed from the other lineages by the absence of the group of genes coding for the siderophore Yersiniabactin (*irp*, *fyuA* and *ybt* family genes), by the presence of genes involved in the type VI secretion system (*aec* family genes) and the presence of genes coding for elements of the *E. coli* common pilus (ECP) and of the hemorrhagic *E. coli* pilus (HEP). Clonal lineage A was also distinguished by the presence of *ompA* (interacts with specific receptors for initiating the pathogenic process), *rpoS* (involved in the regulation of the stress response) and *tar/cheM* (involved in the chemotactic response) (Table 2 and Table S2). The *ehxA* gene encoding enterohemolysin (associated with haemolysin secretion) was detected in all isolates belonging to the clonal lineage C but in none of the isolates belonging to the other clonal lineages. The *iha* gene (encoding for a homologue adhesin (IrgA)), was detected in all isolates belonging to the clonal lineage B but in none of the isolates belonging to the other clonal lineages. The *lfpA* gene (encoding for a fimbrial major protein) was present in all isolates belonging to clonal lineages D, E and F but none of the isolates belonging to other clonal lineages. The porcine attaching-effacing associated gene (*paa*) was detected only in isolates belonging to the clonal lineage A. However, its presence was not systematic (83/129) and was not specific to a clone. There was no virulence gene identified exclusively in isolates belonging to a particular clone and in all isolates from this clone. All these data are available in Tables S3 and S4.

Resistance gene, MDR and replicon profiles of the different clonal lineages.

The resistance gene and replicon profiles of the isolates were established based on the detection of these genes in the ResFinder, PlasmidFinder and ARG-Annot databases. Isolates from clonal lineage E (n=10) were mostly non-susceptible to tetracycline (9/10) and ampicillin (7/10) and showed no or little non-susceptibility to enrofloxacin (0/10), cephalosporins (1/10), florfenicol (3/10), TMS (4/10) and aminoglycosides (5/10) (Figure 1B). Genes detected and likely responsible for these non-susceptibilities were tet(B) for tetracycline, bla_{TEM-1B} for ampicillin, cmlA1 or catA1 for florfenicol, sul1 and drf1 for TMS and aad or aph for aminoglycosides.

Half of the isolates from clonal lineage D (n=12) were non-susceptible to tetracycline (6/12), otherwise they were infrequently non-susceptible to ampicillin (2/12), enrofloxacin (0/12), cephalosporins (1/12), florfenicol (2/12) and TMS (2/12) and aminoglycosides (6/12) (Figure 1B). Genes detected and likely responsible for these non-susceptibilities were tet(A) or tet(B) for tetracycline, bla_{TEM-1B} for ampicillin, cmlA1 or catA1 for florfenicol, sul1 and drf1 for TMS, and aad for aminoglycosides (Tables S5 and S6). IncFIB and IncFII replicons were present in isolates from both clonal lineages D and E. However, the IncFIC replicon was only present in the clonal lineage E (Table S7). One isolate in D carried a bla_{IMP} (responsible for carbapenemase activity). (Table S8)

Isolates from clonal lineage B1 (n=11) were mostly non-susceptible to tetracycline (11/11), to TMS (11/11), to aminoglycosides (9/11) and to ampicillin (6/11) and infrequently non-susceptible to enrofloxacin (0/11), cephalosporins (5/11) and florfenicol (2/11). Genes detected and likely responsible for these non-susceptibilities were tet(A) and tet(M) for tetracycline, bla_{TEM-1B} for ampicillin, cmlA1 or catA1 for florfenicol, sul1 or sul2 and drf1 for TMS and aad or aph for aminoglycosides (Tables S5 and S6). The plasmid profile was also similar among B1 isolates with the presence of IncI1 and IncFIB (TableS7).

Isolates from clonal lineage A (n=129) were mostly non-susceptible to tetracycline (115/129) and to ampicillin (113/129). They were infrequently non-susceptible to TMS (55/129), to aminoglycosides (61/129), to cephalosporins (31/129) and to florfenicol (40/129). Concerning the enrofloxacin non-susceptibility there was a clear separation between isolates belonging to the clone A1, which were mostly non-susceptible (74/80) and those of the clonal lineage A

not belonging to the clone A1 which were very rarely non-susceptible (1/49). Therefore, isolates belonging to A1 were mostly MDR (71/80).

Isolates from the clonal lineage A carried two mutations, *parC* (E62K) and *gyrA* (N652H), classified as «unknown» (meaning that the phenotypic significance is not established) in ResFinder. All isolates from the clone A1 carried these two mutations as well as two other mutations in the *parC* (S80I) and *gyrA* (S83L) genes, classified as «known» in ResFinder (meaning that these mutations were associated with a non susceptible phenotype). Isolates from the clonal lineage A also carried the *tet(A)* (109/129) or the *tet(B)* (11/129) which confer tetracycline resistance (Figure 1B). The *tet(B)* gene was mainly present in isolates from the clone A4. Except for isolates from the clone A3, they also carried the *bla_{TEM-1}* (104/129) gene which confers ampicillin resistance. All A1 isolates carried the replicon FIB(K) which was found only in two other isolates within the clonal lineage A (one in the clone A2 and one in the isolates belonging to no clone (Table S7).

Isolates from the most recently occurring clonal lineage C1 (n=7) were all non-susceptible to tetracycline (7/7), to aminoglycosides (7/7) and to TMS (7/7), therefore they were all MDR. Moreover, they were mostly non-susceptible to florfenicol (6/7) and infrequently non-susceptible to enrofloxacin (1/7), cephalosporins (3/7) and ampicillin (3/7). Genes detected and likely responsible for these non-susceptibilities were *aah* gene for aminoglycosides, *tet(A)* for tetracycline resistance and *sul3* and *dfrA12* for TMS. It is noticeable that one of the isolates was non-susceptible to quinolones, although this isolate carried a *qnr* gene. Also, despite the presence of *cmlA1* (supposedly conferring resistance to phenicols) two of these isolates were susceptible to florfenicol. Two isolates carried the *bla_{CTX-M-1}* gene and were resistant to ceftiofur. The plasmid profile was also similar among C1 isolates, *IncFIB(K)* and (PB71) being always present.

Overall, the AmpC gene *bla_{CMY-2}* was detected in 23/173 isolates, belonging to clonal lineages A (22/23) and E (1/23). This gene was first detected in 2005. It is interesting to note that when the *bla_{CMY-2}* was present, the replicon *IncA/C* was also present, suggesting a link between them (data not shown). The ESBL gene *bla_{CTX-M-1}* was first detected in 2013 and was found in 15/173 isolates belonging to recent clonal lineages (A(9/15), B(4/15) and C(2/15)). However, neither *bla_{CMY-2}* nor *bla_{CTX-M-1}* was specific to a clone within the clonal lineage A.

Production phase of affected pigs, mortality rate and persistence on farm of isolates from the different clonal lineages.

Necropsy reports were available for 106 cases. Overall, mortality was observed in 47% of these cases. The risk of mortality was significantly ($P=0.003$) higher in cases infected with isolates from clonal lineage A (54%) compared to clonal lineage B (0%) but was not associated to other clonal lineages. Within clonal lineage A, no significant difference in the mortality risk was observed between cases infected with isolates from different clones ($P=0.09$) (see Tables S9 and S10).

Information on the phase of production of the pigs was available for 158 cases. Overall, most cases of ETEC:F4 infection (73%) were detected in pigs in the weaning phase in nurseries. No statistically significant association was found between clonal lineage and phase of production ($P=0.5$), nor between clones and phase of production within the clonal lineage A ($P=0.7$) (Tables S11 and S12).

In two farms, 2 isolates belonging to the clone A1 were identified 6 and 8 months apart, respectively. In both cases, the farms were housing two stages of production, and for both cases the first isolate was identified in the farrowing barn and the second isolate was identified in the nursery, strongly suggesting that the clone persisted on farm. The type of cleaning and rotation were not known for either farm. No other pair of isolates was sampled at different times on the same site, according to the available information.

Presence of isolates belonging to the clonal lineage A in North America.

Eighty-seven whole genome sequences in Enterobase were described as ETEC and ST100 isolated from diseased pigs between 2013 and 2018 and were available in Genbank. Among these, 7 were duplicates and were removed from our analysis. The 112 isolates belonging to the clonal lineage A and sampled in Quebec after 2013 and the 80 isolates identified in Enterobase were used for the second phylogenetic analysis. All the isolates described in Enterobase were confirmed to belong to the ST100, O149:H10 serotype, phylogroup A and to carry no *fimH* gene in silico. These isolates originated from various states of the USA except for one from a sample in Switzerland. The available metadata for these isolates are presented in Table S13.

A total of 3 675 678 positions were found in all analyzed genomes. The percentage of reference genome covered by all isolates was 67.65% with a size of reference genome of 5 433 365 pb (the same isolate was used as reference). After removal of the recombination signal the total number of SNPs used to build the tree was 3119. As expected, because isolates belonged to the same clonal lineage, the number of differing SNPs was low (min = 0, max = 1007, median =38), indicating that isolates were very similar. The resulting SNP tree of the 192 isolates is illustrated in Figure 2 and distance matrix is presented in Table S14.

Two clones were identified and designated as AI and AII and one subclone designated AI-sub. The clone AI (Figure2 and FigureS2) comprised 150 isolates, originating from both Canada and USA. All isolates from the clone AI and only isolates from the clone AI in the previous analysis belonged to the clone AI. The clone AII in this analysis comprised the same isolates as those of the clone A4 in the previous phylogenetic analysis.

Clone AI isolates possessed various combinations of enterotoxin virulence genes but were mainly LT:STb:STa:F4 (98/150). These virulence profiles and those identified in Table 2 did not differ between isolates of clone AI and those of the clonal lineage A.

All isolates from clone AI carried a mutation in each of the *parC* and *gyrA* genes (S80I and S83L respectively), classified as «known» in ResFinder, and a mutation in each of the *parC* and *gyrA* genes (E62K and N652H, respectively), classified as «unknown» in ResFinder. In 16 isolates, an additional mutation was detected in the *gyrA* gene (Figure 2 and Figure S3). Fourteen of these 16 isolates were sampled in the USA and 2/16 in Quebec. Most of the clone AI isolates also carried *bla*_{TEM-1} (142/150) and *tet*(A) (134/150) conferring ampicillin and tetracycline resistance respectively; however, susceptibility phenotype results were not present in the metadata available in Enterobase.

In the isolates sampled in the USA, the AmpC gene *bla*_{CMY-2} was detected in 16/80 isolates and the ESBL gene *bla*_{CTX-M-1} was detected in only 1/80 isolates. The AI isolates also carried replicons of the incompatibility group FIB (TableS7).

Application of the criteria for “high risk” clone to the clones AI, A2, A3, A4, C1 and B1. As illustrated in Table 3, the clone AI emerged in 2013, is multidrug resistant and carry several genes associated with multidrug resistance, has disseminated efficiently throughout North America and is associated with severe diarrhea and/or sudden death. Therefore, the clone AI

qualifies as a high risk clone. Other clones in the clonal lineage A (A2, A3, A4) are not consistently MDR and did not disseminate as efficiently as the clone A1. The clone B1 is not consistently MDR and does not predominate currently. The clone C1 emerged around the year 2014, is MDR and pathogenic. Until now, there is no proof that it has disseminated throughout North America.

Discussion

The main objective of this study was to determine if enrofloxacin-non-susceptible ETEC:F4 isolates from diseased pigs (380) belong to a high risk clone. The term “high risk clone” needed to be redefined in the context of our study. In fact, the definition of a high risk clone based on previously described criteria (88, 400) was not perfectly adapted to the global approach recommended by the WHO.

Our analytical approach permitted us to examine the phylogenetic variation of ETEC:F4 isolates from diseased pigs with time in Quebec. Prior to 2000, ETEC:F4 isolates were mostly ST90 and belonged to several serotypes. On the other hand, after 2000, isolates were mostly ST100, belonging to only one serotype, O149:H10, and carrying no *fimH* gene. We designated these isolates as the clonal lineage A. In addition, within this clonal lineage we identified several clones and subclones using two different phylogenetic analyses. As the clone A1 of the second analysis included all isolates from the clone A1 of the first analysis, we will use the designation clone A1 to refer to the isolates from both analyses. In the next paragraphs we will discuss each revised criterion for a high risk clone and its application to the clone A1.

We demonstrated that the clone A1 appeared in 2013 and became predominant in 2015 (data from this study and (380)), consequently meeting the emergence criteria (cf Table 1). The clonality of ETEC isolates from various states of the USA and belonging to clonal lineage A had already been demonstrated (382). In addition, we demonstrated the international distribution of the clone A1, as it is also present in Canada, at least in the province of Quebec. Thus, we demonstrated that isolates of the clone A1 spread in Canada and in the USA, possibly via the frequent displacement of pigs between the two countries. As an illustration, in 2015, Canada exported almost 6 million live hogs to the USA for feeding or harvest and imported 528 million pounds of USA pork meat (<https://www.pork.org/facts/stats/canadian-statistics/>). A wider

distribution of this clone was difficult to assess, as whole genome sequences of *E. coli* from other continents were not available in Enterobase within the study period. Indeed, the common use of whole genome sequencing has occurred later in veterinary medicine than in human medicine, due mainly to its high cost. Consequently, veterinary isolates are less frequently available in databases. In particular, it would have been very interesting to include sequences from isolates in Japan where PFGE-based cluster lineages demonstrating fluoroquinolone non-susceptibility have been reported (267). This wide distribution is the result of a wide capacity of dissemination (cf Table1). Yet, this capacity of dissemination can be driven by several means. In our definition of a high risk clone, we wished to include all factors of importance that could increase the likelihood of clonal dissemination to human and/or animal populations, to match as many field situations as possible. Therefore, we established three inherent sub-criteria. These criteria were grouped as the observed persistence of a clone in a population may be the result of a high transmissibility among hosts, of a high persistence in colonized individuals (especially if asymptomatic) and/or from recurrent exposure to a contaminated environment and/or other host species, and thus it may be difficult to disentangle their individual impacts. Our data suggests that the clone AI might persist on certain farms for 6 months or longer. It is a good illustration of a situation where both environmental persistence and transmission between pigs on the farm may have occurred. Whichever scenario(s) is/are at stake, the clone is still a risk for the swine health and therefore is considered a high risk clone in a OneHealth context. Nevertheless, these characteristics should be investigated further to determine which mechanism(s) is/are involved to develop fighting strategies. As an example, if persistence in the environment is the main mechanism involved in transmission between batches of pigs, protocols including efficient disinfection should be advised to farms that harbor the clone. On the other hand, if the transmissibility between animals is high, vaccination may be advised. This distinction could not be made with the design of our study. To summarize, the clone AI has a great capacity of dissemination through either high infectivity or environmental persistence or both and as a result has been identified throughout a large territory and therefore fulfils our third criterion to be a high risk clone.

It is noteworthy that isolates from the clones A2, A3 and A4 did not spread as widely as the clone AI. We believe that the sequence of events, first the acquisition of a higher pathogenicity

(isolates from the clone A2 and A3 were identified prior to isolates from AI) then the acquisition of the resistance to fluoroquinolone, was required to lead to the clone AI being qualified as high risk. It is not known if the acquisition of fluoroquinolone resistance alone would have allowed the resulting clone to spread as efficiently as the clone AI through increased fitness mechanisms (270).

To assess the risk for public health, another characteristic that needs to be evaluated in a OneHealth context is the potential zoonotic transmission, which was acknowledged in the multiplicity of sources sub-criterion. Indeed, an animal population could be a reservoir for a clone that does not endanger the host population but could threaten public health, such as the Shiga-toxin producing *E. coli* O157:H7. In our case, zoonotic transmission was not evaluated but is very unlikely as ETEC: F4 are usually not pathogenic for humans.

Most isolates belonging to the clone AI were MDR, therefore fulfilling the second criterion (Table 1). Indeed, most isolates presented non susceptibility to enrofloxacin, tetracycline and ampicillin. Enrofloxacin non susceptibility was driven by at least 2 mutations in *parC* (S801 and E62K) and 2 mutations in *gyrA* (S83L and N652H). In 16 isolates, mostly from the USA, an additional mutation in the *gyrA* gene was detected. The mutation *parC* E62K was detected in all our isolates, and has been described in the literature as a “real” mutation (404) although not unanimously (405). As it was present in all our isolates (including those from the USA), and as isolates only possessing this mutation were susceptible to fluoroquinolones, we considered this mutation as clinically not relevant. The *gyrA* N652H mutation, classified as «unknown» in ResFinder, was present in all isolates from the clonal lineage A (from USA and from Quebec). It is not described in the literature to the authors’ knowledge. Both mutations should be further investigated for MIC levels to evaluate their possible role in sequential acquisition of clinically significant resistance to fluoroquinolones. Ampicillin and tetracycline resistance were driven by *bla*_{TEM-1} (142/150) and *tet(A)* (134/150) respectively. In addition, isolates belonging to the clone AI were associated with several plasmids such as the IncFIB(K) replicon. This plasmid family has been described as “an epidemic plasmid” (406) and is largely associated with specific resistance genes in *Enterobacteriaceae* (314).

*Bla*_{CMY-2} is the predominant ESBL/AmpC gene in the ETEC:F4 of swine origin (39/192 isolates) compared to the *bla*_{CTX-M-1} (16/192). However, *bla*_{CTX-M-1} was mostly identified in isolates from Quebec (15/16). The monitoring of this tendency must be pursued to determine if the *bla*_{CTX-}

M family is overtaking the rest of the ESBL/AmpC genes in animal populations in North America, as happened in Europe (119). Nevertheless, the presence of ESBL/AmpC genes in 31 isolates belonging to the clone AI is concerning as the presence of these genes results in a great capacity to disseminate, thus conferring on the clone another “fitness” advantage. Hence, a subclone carrying systematically such a gene could emerge in the near future, as has occurred for ST131-H30-Rx (49).

Our evaluation of clinical severity was based on retrospective evaluation of non-standardized necropsy reports, which is imperfect. However, it was our only means of evaluating objectively the clinical aspects of increased pathogenicity. We limited our evaluation to one criterion: death of affected pigs on the farm. Although the clone AI itself was not associated with a higher proportion of death in pigs on the farm compared to other isolates within the clonal lineage A, greater mortality was associated with isolates in the clonal lineage A than that observed with other clonal lineages. Thus, this clone also fulfills the pathogenicity criteria (Table 1). The presence of genes coding for different pili (ECP and HEP) or for T6SS and the presence of known virulence factors such as *ompA* are likely to contribute to an increase in pathogenicity of this clonal lineage. Indeed, each of these elements are known key virulence factors. ECP plays a dual role in early-stage biofilm development and host cell recognition (407). HCP mediates invasion of epithelial cells or interbacterial connections leading to biofilm formation (408). T6SS is a multi-protein complex dedicated to the delivery of toxins (409). Finally, despite its conservation throughout evolution among pathogenic and non-pathogenic bacteria, *ompA* interacts with specific receptors for initiating the pathogenic process in some Gram-negative bacterial infections (410). However, the presence of these genes alone is not enough to prove that they are responsible for the increased pathogenicity. Further functional studies are needed to ensure the role of each of these elements.

The definition of a clone, in itself, remains a challenge for all microbiologists. The definition of a bacterial clone, based on whole genome sequencing (WGS) data, should not only be based on a fixed number of SNPs. In the current context, where WGS is being increasingly used due to decreased costs, the analytical approaches used in different studies are still subject to a great lack of homogeneity and standardisation because of the many possibilities that they offer. The definition of a clone that we propose, based on the bootstrap values, the number of isolates in the branch and number of SNP differences in relation to the mutation risk

adjusted for the period between sampling of isolates, allow reproducibility and minimise over-interpretation of the data. Nevertheless, these criteria are debatable. Firstly, the mutation rate is not constant between bacterial species or even across time within the same species. It is known, particularly in *E. coli*, to depend on the level of stress due to evolution pressure (411). However, we needed to determine a fixed mutation rate to establish a SNP cut-off which was based on *E. coli* variability during an outbreak (398). Secondly, the bootstrap value of 1 is very stringent. However, considering the large number of isolates taken into consideration in the study, we chose to be strict to enforce the robustness of our analysis. In another context, for example if fewer isolates are available for the phylogenetic analysis, a bootstrap value of 0.99 or 0.95 might also have been acceptable. Thirdly, we fixed the minimal number of isolates per branch at three to reduce the likelihood of a grouping only due to chance. Finally, although the lag of time between the detection of isolates was taken into account in the definition of a cluster, it could not be considered in the maximum-likelihood approach used to create the phylogeny tree, which represents a limitation.

As observed with all laboratory techniques, there is an inherent error rate associated with whole genome sequencing. However, this is difficult to evaluate considering all the steps of analysis involved in establishing a phylogenetic tree, including the sequencing itself, assembling, multiple alignment, recombination signal removal, or tree building. We evaluated the error rate of our pipeline based on a total of four isolates that were duplicated (for 2 isolates there were 2 duplicates, for one isolate there were 3 duplicates and for 1 isolate there were 4 duplicates). We observed that the error rate was very variable depending on the quality of the raw data. However, for the mean quality of our data, we estimate the error rate to be from 30 to 60 SNP between two duplicates (data not shown). This number strengthens our finding that isolates belonging to the designated clone AI are very similar, because the SNPs we did detect could be related to this measured error rate.

Although our data demonstrate the capacity of WGS to refine the analysis for detecting clones, they also show that the combination of MLST and serotype data can accurately discriminate clonal lineages. On the other hand, when we compared these results to those obtained with PFGE in our previous study, we observed that only two thirds of the isolates analysed with both methods were classified correctly by the PFGE when the cut-off of 55% of similarity was used to define a cluster (380). Price et al found a similar misclassification for the *E. coli* ST131

(49). Although PFGE has proven useful in the past, we feel that the use of this method should be limited to specific situations such as outbreak investigations and its results interpreted with great caution, and that PFGE should be replaced by WGS as much as possible.

An additional clone C1, comprising isolates belonging to ST772 and serogroup O23 and having a specific virotype STa:STb:F4 infrequently described in Quebec previously (380), was first observed in 2016. As all these isolates are MDR (non susceptible to tetracycline, TMS and one antimicrobial in the aminoglycoside category), they should be monitored during the coming years to evaluate if they could develop into a high risk clone and represent a threat for porcine health in Quebec and in North America. The absence of quinolone non susceptibility is of note and might represent a fitness disadvantage for this clone.

In this article, we have proposed an adaptation of the high risk clone definition to the OneHealth concept. Based on this definition, we demonstrated the presence of a high-risk enrofloxacin-non-susceptible ETEC:F4 clone circulating in the pig population in North America. This clone was determined using three well-defined criteria applied to a WGS phylogenetic tree to ensure replicability. The surveillance of this clone and other potential emerging clones is essential. Hence, we need to identify this type of clone to increase our understanding of the conditions that promote their emergence and their dissemination, to implement fighting strategies on the field.

Tables and Figures

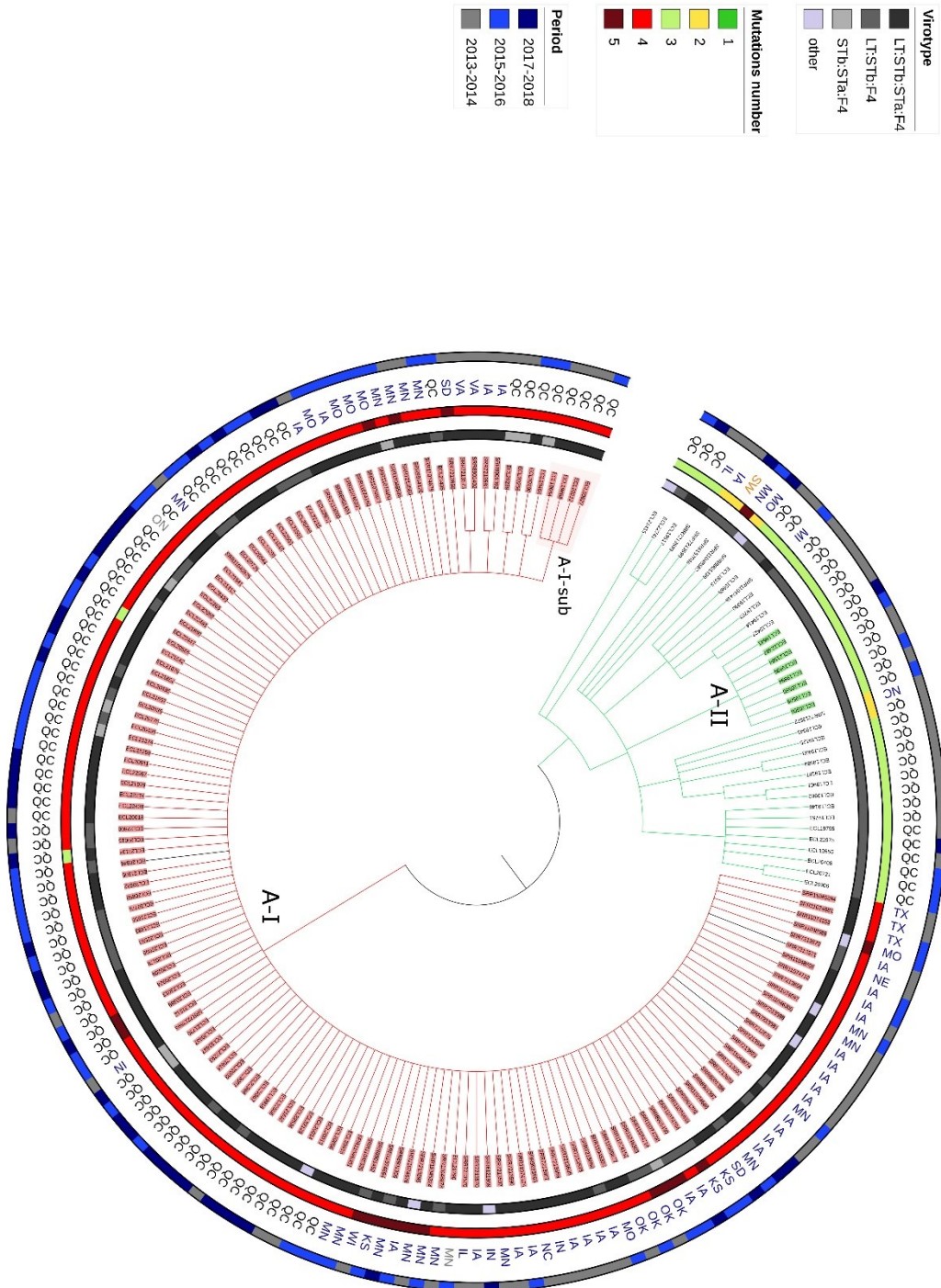


Figure 2: Circular Tree based on SNP phylogeny. The length of the branches are not proportionate to the phylogenetic distance. All isolates belong to the clonal lineage A (ST100-O149H10-phylogroupA-no *fimH* gene) and originated from 2013 or after. Each branch with a bootstrap value under 1 was collapsed. QC = Quebec, SW = Switzerland, MN (in grey) = Manitoba, ON = Ontario, MI = Michigan, MN (in blue) = Minnesota. MO = Missouri, NC = North Carolina, TX = Texas, IA = Iowa, KS = Kansas, WI = Wisconsin, IN = Indiana, IL = Illinois, OK = Oklahoma, NE = Nebraska, SD = South Dakota, VA = Virginia. The 3 isolates colored in black are the three outsiders (more than 70 SNPs of differences in the pairwise distance comparison). The identification name for each isolate belonging to a clone is highlighted in a specific color. Circles represent the proportion of the age of the pigs within each corresponding branch.

Table 1 : Definition of criteria for determination of a high risk bacterial clone in the context of the OneHealth concept.

Criterion	Definition and mean of measurement	Application to ETEC:F4 clone AI detected in pigs in Quebec
1/Emergence	The clone is newly recognized, newly evolved or has occurred previously but shows an increase in incidence or expansion in geographical, host or vector range.	The clone AI emerged in North America in 2013.
2/Carriage of multiple antimicrobial characteristics	The clone conveys multiple resistance genes associated with phenotypic multidrug resistance. The resistance genes can be carried by mobile genetic elements or by the chromosome (and then results from mutations) or both.	The clone AI carries at least the genes <i>tet(A)</i> and the <i>bla_{TEM-1}</i> which are associated with phenotypic resistance to tetracyclines and penicillins respectively. Several replicons such as the IncFII have been identified in the clone AI. Moreover, the it also carries <i>parC</i> and <i>gyrA</i> mutations responsible for non-susceptibility to fluoroquinolones.
3/High capacity of dissemination through one or a combination of the following characteristics:	The clone is likely to disseminate due to:	The clone AI has been detected in at least one province of Canada as well as in many states of the USA.
- 3a/ High infectivity	- High probability of transmission following exposure to an infected host or environmental source and/or	The clone AI has been observed in different batches of pigs on the same farm for 6 months.
- 3b/ Long-term persistence	- Long-term persistence and shedding in colonized individuals and/or	
- 3c/ Multiplicity of sources	- Presence of the pathogen in multiple animal species and/or in environmentally maintained source.	
4/High Pathogenicity	The clone can cause severe disease in animals or/and in humans.	The clone AI is associated with a higher risk of mortality that observed for other clonal lineages.

Tableau 2 : Virulence genes (detected from VirulenceFinder of VFDB databases), identified exclusively in the clonal lineage and in all isolates from this clonal lineage.

Clonal lineage	Genes									
	Enterohemolysin (<i>ehxA</i>)	Fimbrial major protein (<i>IfpA</i>)	Adhesin (<i>Iha</i>)	Siderophore Yersinia bactin *	Type VI secretion system *	<i>E. coli</i> Comma Pilus (ECP) *	Hemorrhagic <i>E. coli</i> pilus (HEP)*	<i>ompA</i> outer membrane protein A	<i>rpoS</i> sigma S (sigma 38) factor	<i>tar/cheM</i> methyl-accepting chemotaxis protein II [peritrichous flagella]
A (ST100/O149)	Absent	Absent	Present	Absent	Present	Present	Present	Present	Present	Present
B ST772/O23	Present	Absent	Absent	Present	Absent	Absent	Absent	Absent	Absent	Absent
C ST100/O138	Absent	Absent	Present	Present	Absent	Absent	Absent	Absent	Absent	Absent
D ST90/O149H 19	Absent	Present	Absent	Present	Absent	Absent	Absent	Absent	Absent	Absent
E ST90/O157	Absent	Present	Absent	Present	Absent	Absent	Absent	Absent	Absent	Absent
F ST90/O149H 43	Absent	Present	Absent	Present	Absent	Absent	Absent	Absent	Absent	Absent

*See Table S1 for the complete list of genes.

Table 3 : Revised criteria for high risk clone applied to the clones identifies in our study.

Criteria/Clone	A1	A2	A3	A4	B1	C1
Emergence	yes	no	no	no	no	yes
Multidrug resistance	yes	no	no	no	no	yes
Potent dissemination	yes	no	no	no	no	no
Pathogenicity	yes	yes	yes	yes	yes	yes

Matériel supplémentaire

Branch number, with a bootstrap value of 1 and containing 3 isolates or more. See figure below	Maximum nb of years between to isolates sampling date	Nombre de SNP max	Name of the associated clone
1	7	504	
2	23	796	
3	10	150	
4	4	60	
5	2	13	C1
6	9	34	B1
7	23	401	
8	5	48	A1
9	3	10	A1-sub
10	5	168	
11	5	26	A4
12	18	93	A3
13	3	31	
14	23	112	A2
15	3	37	

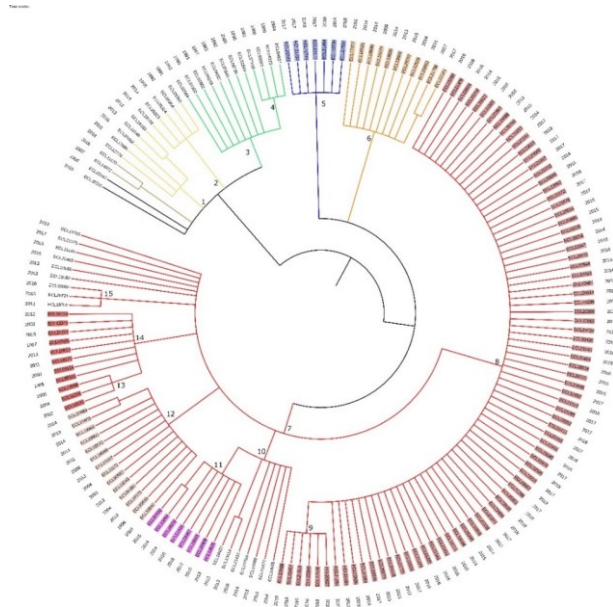


Figure S1 : Number of maximum SNPs in relation to the number of years between two isolates within each branch tree with a bootstrap value of one and composed of 3 isolates and more. The bolded branches in the table are considered as clones. In this phylogenetic analysis the number of SNP per year should not exceed 10 ($MxP = 3 \times 10^{-6} \times 3 \ 366 \ 150$).

Branch number, with a bootstrap value of 1 and containing 3 isolates or more. See figure below	Maximum nb of years between to isolates sampling date	Nombre de SNP max	Name of the associated clone
1	5	Except three outsiders that have been colored in black, and 16 isolates that presents 65 SNPs of difference with one isolate. 55 for 134 isolates (the distance matrix is available in supplemental data Table S10)	A-I
2	2	0	A-I-sub
3	4	62	
4	2	68	
5	2	188	
6	5	41	A-II
7	3	132	
8	4	129	
9	5	>200	

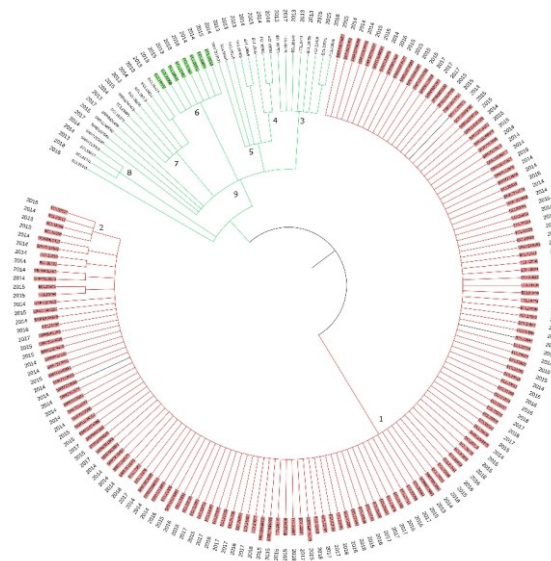


Figure S2: Number of maximum SNPs in relation to the number of years between two isolates within each branch tree with a bootstrap value of one and composed of 3 isolates and more. The bolded branches in the table are considered as clones. In this phylogenetic analysis the number of SNP per year should not exceed 11 ($MxP = 3 \times 10^{-6} \times 3\ 675\ 678$).

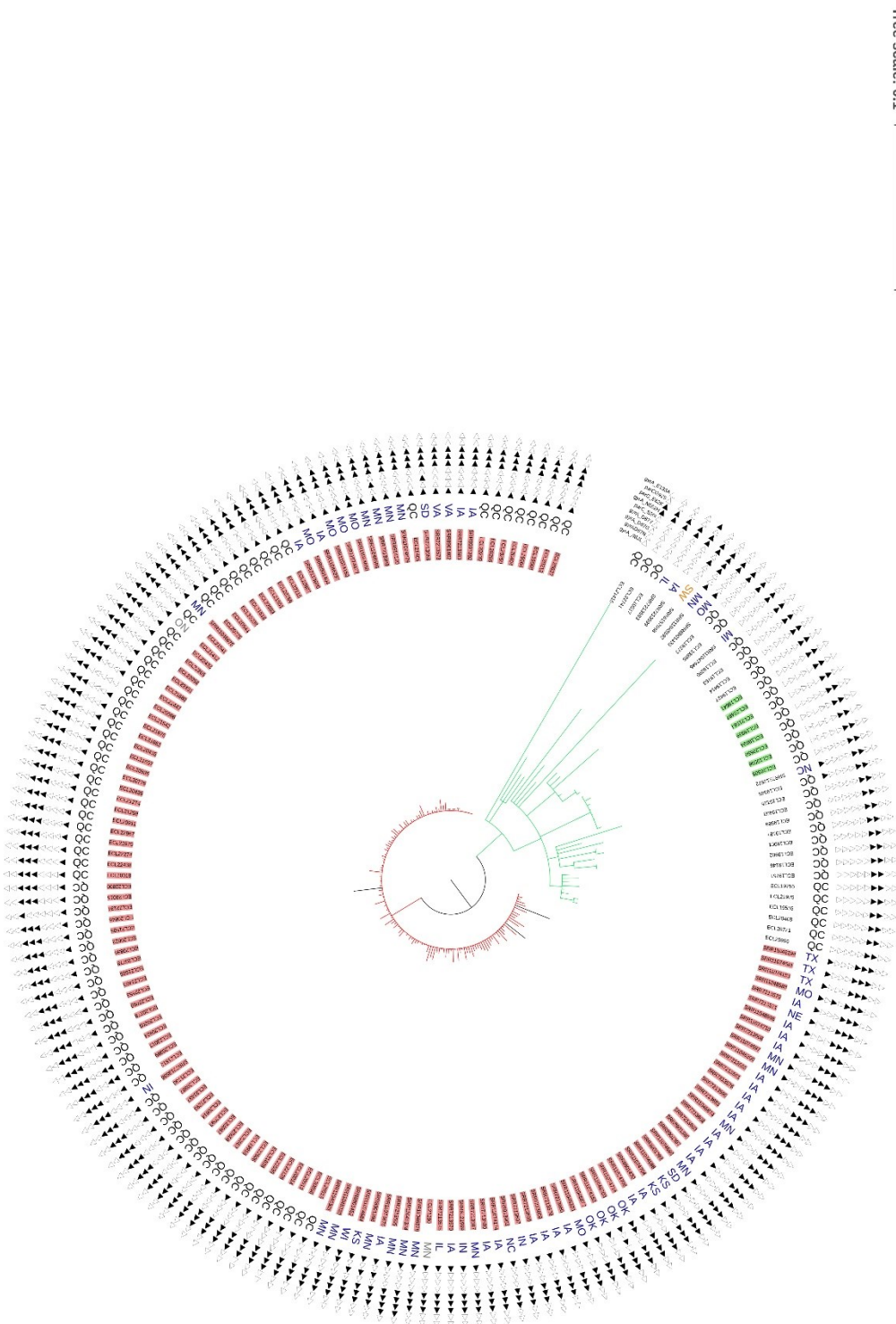


Figure S3 : Circular Tree based on SNP phylogeny. The length of the branches are proportionate to the phylogenetic distance. All isolates belong to the clonal lineage A (ST100-O149H10-phylogroupA-no *fimH* gene) and originate from 2013 or after. The 3 isolates colored in black are the three outsiders (more than 70 SNPs of differences in the pairwise distance comparison). QC = Quebec, SW = Switzerland, MN (in grey) = Manitoba, ON = Ontario, MI = Michigan, MN (in blue) = Minnesota. MO = Missouri, NC = North Carolina, TX = Texas, IA = Iowa, KS = Kansas, WI = Wisconsin, IN = Indiana, IL = Illinois, OK = Oklahoma, NE = Nebraska, SD = South Dakota, VA = Virginia. Each isolates' label belonging to a clone is highlighted in a specific color. Circle represent the proportion of the age of the pigs within each corresponding branch.

Tableau S1 : Disponible dans l'appendix 4.

Tableau S2 : Details of the genes absent (highlighted in gray) of present (not highlighted) in the isolates belonging to the clonal lineage A, classified by function. The nomenclature is the same used in the VFDB database.

Group of genes	Genes Description
Siderophore Yersiniabactin	VFG048572 (A225_2991) iron aquisition regulator (YbtA,AraC-like,required for transcription of FyuA/psn,Irp2) [Yersiniabactin (CVF851)] [Klebsiella oxytoca E718]
	VFG048595 (A225_2997) iron aquisition outermembrane yersiniabactin receptor (FyuA,Psni,pesticin receptor) [Yersiniabactin (CVF851)] [Klebsiella oxytoca E718]
	VFG048597 (A79E_1701) FyuA, Psn, pesticin receptor [Yersiniabactin (CVF851)] [Klebsiella pneumoniae subsp. pneumoniae 1084]
	VFG048593 (A79E_1702) iron aquisition 2,3-dihydroxybenzoate-AMP ligase [Yersiniabactin (CVF851)] [Klebsiella pneumoniae subsp. pneumoniae 1084]
	VFG048589 (A79E_1703) YbtT [Yersiniabactin (CVF851)] [Klebsiella pneumoniae subsp. pneumoniae 1084]
	VFG048585 (A79E_1704) irp3 [Yersiniabactin (CVF851)] [Klebsiella pneumoniae subsp. pneumoniae 1084]
	VFG048581 (A79E_1705) irp1 [Yersiniabactin (CVF851)] [Klebsiella pneumoniae subsp. pneumoniae 1084]
	VFG048578 (A79E_1706) irp2 [Yersiniabactin (CVF851)] [Klebsiella pneumoniae subsp. pneumoniae 1084]
	VFG048574 (A79E_1707) iron aquisition regulator [Yersiniabactin (CVF851)] [Klebsiella pneumoniae subsp. pneumoniae 1084]
	VFG048570 (A79E_1708) iron siderophore ABC transporter permease/ATPase [Yersiniabactin (CVF851)] [Klebsiella pneumoniae subsp. pneumoniae 1084]
	VFG048566 (A79E_1709) inner membrane ABC-transporter YbtQ [Yersiniabactin (CVF851)] [Klebsiella pneumoniae subsp. pneumoniae 1084]
	VFG048562 (A79E_1710) signal transducer [Yersiniabactin (CVF851)] [Klebsiella pneumoniae subsp. pneumoniae 1084]
	VFG048558 (A79E_1711) Salicylate synthetase [Yersiniabactin (CVF851)] [Klebsiella pneumoniae subsp. pneumoniae 1084]
	VFG045839 (EC958_2289) putative peptide synthetase-like protein [Yersiniabactin siderophore (CVF458)] [Escherichia coli O25b:H4-ST131]
	VFG045840 (EC958_2290) HMWP1 nonribosomal peptide/polyketide synthase [Yersiniabactin siderophore (CVF458)] [Escherichia coli O25b:H4-ST131]
	VFG046108 (ECVR50_2112) putative cytoplasmic transmembrane protein [Yersiniabactin siderophore (CVF458)] [Escherichia coli VR50]
	VFG046109 (ECVR50_2113) putative ABC transporter protein [Yersiniabactin siderophore (CVF458)] [Escherichia coli VR50]

VFG046110 (ECVR50_2114) putative inner membrane ABC-transporter [Yersiniabactin siderophore (CVF458)] [Escherichia coli VR50]
VFG046112 (ECVR50_2116) yersiniabactin biosynthetic protein [Yersiniabactin siderophore (CVF458)] [Escherichia coli VR50]
VFG046113 (ECVR50_2117) yersiniabactin biosynthetic protein [Yersiniabactin siderophore (CVF458)] [Escherichia coli VR50]
VFG046114 (ECVR50_2118) yersiniabactin biosynthetic protein YbtU [Yersiniabactin siderophore (CVF458)] [Escherichia coli VR50]
VFG046116 (ECVR50_2120) yersiniabactin siderophore biosynthetic protein YbtE [Yersiniabactin siderophore (CVF458)] [Escherichia coli VR50]
VFG046117 (ECVR50_2121) pesticin receptor precursor [Yersiniabactin siderophore (CVF458)] [Escherichia coli VR50]
VFG048573 (KOX_20625) transcriptional regulator [Yersiniabactin (CVF851)] [Klebsiella oxytoca KCTC 1686]
VFG048596 (KOX_20660) Yersiniabactin/pesticin outer membrane receptor (IRPC) [Yersiniabactin (CVF851)] [Klebsiella oxytoca KCTC 1686]
VFG048559 (KPHS_34610) salicylate synthase Irp9 [Yersiniabactin (CVF851)] [Klebsiella pneumoniae subsp. pneumoniae HS11286]
VFG048563 (KPHS_34620) MFS superfamily transporter signal transducer [Yersiniabactin (CVF851)] [Klebsiella pneumoniae subsp. pneumoniae HS11286]
VFG048567 (KPHS_34630) permease and ATP-binding protein of yersiniabactin-iron ABC transporter YbtQ [Yersiniabactin (CVF851)] [Klebsiella pneumoniae subsp. pneumoniae HS11286]
VFG048571 (KPHS_34640) lipoprotein inner membrane ABC-transporter [Yersiniabactin (CVF851)] [Klebsiella pneumoniae subsp. pneumoniae HS11286]
VFG048575 (KPHS_34650) AraC-type transcriptional regulator [Yersiniabactin (CVF851)] [Klebsiella pneumoniae subsp. pneumoniae HS11286]
VFG048579 (KPHS_34660) High-molecular-weight nonribosomal peptide/polyketide synthetase 2 (HMWP2) [Yersiniabactin (CVF851)] [Klebsiella pneumoniae subsp. pneumoniae HS11286]
VFG048582 (KPHS_34670) High-molecular-weight nonribosomal peptide/polyketide synthetase 1 (HMWP1) [Yersiniabactin (CVF851)] [Klebsiella pneumoniae subsp. pneumoniae HS11286]
VFG048586 (KPHS_34680) irp3 protein, yersiniabactin siderophore biosynthetic protein [Yersiniabactin (CVF851)] [Klebsiella pneumoniae subsp. pneumoniae HS11286]
VFG048590 (KPHS_34690) putative thioesterase YbtT [Yersiniabactin (CVF851)] [Klebsiella pneumoniae subsp. pneumoniae HS11286]
VFG048594 (KPHS_34700) yersiniabactin siderophore biosynthetic protein [Yersiniabactin (CVF851)] [Klebsiella pneumoniae subsp. pneumoniae HS11286]
VFG000358_gb NP_405467_ (fyuA) pesticin/yersiniabactin receptor protein [Yersiniabactin (VF0136)] [Yersinia pestis CO92]
VFG034109_gi:410482038_ (irp1) High-molecular-weight nonribosomal peptide/polyketide synthetase 1 (HMWP1) [Yersiniabactin siderophore (CVF458)] [Escherichia coli O104:H4 str. 2009EL-2050]

	VFG034095_gi:218695586_ (irp2) High-molecular-weight nonribosomal peptide/polyketide synthetase 2 (HMWP2) [Yersiniabactin siderophore (CVF458)] [Escherichia coli 55989]
Type VI secretion system (T6SS)	<p>VFG035777_gi:386612391_ (aec18) hypothetical protein [ACE T6SS (CVF736)] [Escherichia coli UMNK88]</p> <p>VFG035745_gi:260842457_ (aec19) hypothetical protein [ACE T6SS (CVF736)] [Escherichia coli O103:H2 str. 12009]</p> <p>VFG035704_gi:386612388_ (aec22) hypothetical protein [ACE T6SS (CVF736)] [Escherichia coli UMNK88]</p> <p>VFG035680_gi:386612387_ (aec23) hypothetical protein [ACE T6SS (CVF736)] [Escherichia coli UMNK88]</p> <p>VFG035655_gi:386612386_ (aec24) hypothetical protein [ACE T6SS (CVF736)] [Escherichia coli UMNK88]</p> <p>VFG035629_gi:386612385_ (aec25) hypothetical protein [ACE T6SS (CVF736)] [Escherichia coli UMNK88]</p> <p>VFG035604_gi:386612384_ (aec26) hypothetical protein [ACE T6SS (CVF736)] [Escherichia coli UMNK88]</p> <p>VFG035578_gi:386612383_ (aec27/clpV) ATP-dependent chaperone protein ClpB [ACE T6SS (CVF736)] [Escherichia coli UMNK88]</p> <p>VFG035552_gi:386612382_ (aec28) hypothetical protein [ACE T6SS (CVF736)] [Escherichia coli UMNK88]</p> <p>VFG035526_gi:386612381_ (aec29) hypothetical protein [ACE T6SS (CVF736)] [Escherichia coli UMNK88]</p> <p>VFG035502_gi:386612379_ (aec30) type VI secretion protein IcmFhypothetical protein [ACE T6SS (CVF736)] [Escherichia coli UMNK88]</p> <p>VFG035475_gi:218693681_ (aec31) hypothetical protein [ACE T6SS (CVF736)] [Escherichia coli 55989]</p> <p>VFG035444_gi:260866361_ (aec32) Hcp-like protein [ACE T6SS (CVF736)] [Escherichia coli O111:H- str. 11128]</p> <p>VFG001444_gb AAG10151_ (aslA) putative arylsulfatase [AslA (VF0238)] [Escherichia coli O18:K1:H7 str. RS218]</p>
<i>E. coli</i> common pilus (ECP)	<p>VFG041051_gi:15799916_ (vgrG) hypothetical protein [EHS (SS185)] [Escherichia coli O157:H7 str. EDL933]</p> <p>VFG002417_gb NP_286006_ (yagV/ecpE) <i>E. coli</i> common pilus chaperone EcpE [ECP (VF0404)] [Escherichia coli O157:H7 str. EDL933]</p> <p>VFG002416_gb NP_286007_ (yagW/ecpD) polymerized tip adhesin of ECP fibers [ECP (VF0404)] [Escherichia coli O157:H7 str. EDL933]</p> <p>VFG002415_gb NP_286008_ (yagX/ecpC) <i>E. coli</i> common pilus usher EcpC [ECP (VF0404)] [Escherichia coli O157:H7 str. EDL933]</p> <p>VFG002412_gb NP_286009_ (yagY/ecpB) <i>E. coli</i> common pilus chaperone EcpB [ECP (VF0404)] [Escherichia coli O157:H7 str. EDL933]</p>

	<p>VFG002414_gb NP_286010_ (yagZ/ecpA) E. coli common pilus structural subunit EcpA [ECP (VF0404)] [Escherichia coli O157:H7 str. EDL933]</p> <p>VFG042404_gi:15804987_ (ycbF) putative pili assembly chaperone [E. coli YcbQ laminin-binding fimbriae (ELF) (AI005)] [Escherichia coli O157:H7 str. EDL933]</p> <p>VFG042398_gi:15800799_ (ycbQ) fimbrial-like protein [E. coli YcbQ laminin-binding fimbriae (ELF) (AI005)] [Escherichia coli O157:H7 str. EDL933]</p> <p>VFG045887 (ycbR) periplasmic pilin chaperone [E. coli laminin-binding fimbriae (ELF) (CVF824)] [Escherichia coli O103:H2 str. 12009]</p> <p>VFG045904 (ycbS) putative outer membrane usher protein [E. coli laminin-binding fimbriae (ELF) (CVF824)] [Escherichia coli O111:H- str. 11128]</p> <p>VFG045923 (ycbT) fimbrial-like adhesin protein [E. coli laminin-binding fimbriae (ELF) (CVF824)] [Escherichia coli O103:H2 str. 12009]</p> <p>VFG042402_gi:15800802_ (ycbU) hypothetical protein [E. coli YcbQ laminin-binding fimbriae (ELF) (AI005)] [Escherichia coli O157:H7 str. EDL933]</p> <p>VFG042403_gi:15800803_ (ycbV) putative fimbrial-like protein [E. coli YcbQ laminin-binding fimbriae (ELF) (AI005)] [Escherichia coli O157:H7 str. EDL933]</p> <p>VFG045770 (yijP) protein YijP [Invasion of brain endothelial cells (Ibes) (CVF429)] [Escherichia coli O25b:H4-ST131]</p>
Hemorrhagic <i>E. coli</i> pilus (HEP)	<p>VFG045936 (ppdD) prepilin peptidase-dependent protein D [Hemorrhagic E. coli pilus (HCP) (CVF825)] [Escherichia coli VR50]</p> <p>VFG045948 (ppdD/hcpA) putative major pilin subunit [Hemorrhagic E. coli pilus (HCP) (CVF825)] [Escherichia coli O111:H- str. 11128]</p>

Tableaux S3 à S14 : disponibles dans l'appendice 4.

DISCUSSION et CONCLUSIONS

La résistance aux antibiotiques est l'une des menaces les plus importantes qui pèsent sur la santé humaine et animale à l'heure actuelle. Lors la 71e session de l'assemblée générale des Nations Unies en 2016, pour la première fois, les chefs d'État se sont entendus sur une approche commune de lutte contre les causes de la résistance aux antibiotiques en médecine humaine et vétérinaire ainsi que dans l'élevage des animaux de production. Cette approche commune exige une collaboration multidisciplinaire d'envergure. En effet, comme nous l'avons vu tout au long de cette thèse, chaque filière requiert une approche spécifique, nécessitant une connaissance précise des enjeux impliqués dans chaque situation. Pourtant, il est également important de mettre les connaissances obtenues en perspective, afin de pouvoir, si possible, les appliquer de manière plus générale.

Clones et clone à haut risque.

Depuis quelques années, les mégadonnées (traduction française de « big data ») et l'intelligence artificielle ont transformé radicalement nombre de disciplines scientifiques. La microbiologie ne fait pas exception (412). Les données de SGC et leur analyse ont bouleversé l'étude des bactéries. Toutefois, cette révolution vient avec plusieurs questions qui pour l'instant restent sans réponse. Par exemple, la définition d'un clone, qui se pose quelle que soit la technique d'analyse, devient particulièrement complexe avec une approche aussi discriminante que l'analyse du nombre de SNPs basée sur le SGC. La détermination d'un seuil de SNPs pour décréter que deux isolats sont clonaux doit être objectivée à partir de critères prédéterminés, ce qui permet la reproductibilité et la comparabilité entre les études (89, 90). Cependant, aucune proposition consensuelle n'existe dans la littérature, à l'heure actuelle. Afin de bien comprendre les enjeux de cette définition et de cette technique, il faut revenir sur plusieurs points. Premièrement, par définition, les isolats appartenant à un même clone ne sont pas parfaitement identiques, mais descendent d'un isolat commun à un instant précis. Pour déterminer si des isolats appartiennent à un clone, il faut donc tenir compte à la fois du nombre d'années entre la détection de deux isolats et du taux de mutation, qui est difficile à

évaluer puisqu'il dépend des conditions environnementales, dans lesquelles se trouvent les bactéries. Deuxièmement, il faut tenir compte des limites de la technique employée pour les caractériser. L'analyse phylogénétique basée sur la comparaison du nombre de SNP à partir des données de SGC est composée de nombreuses étapes : (1) la production des données brutes, (2) l'assemblage, (3) l'alignement multiple, (4) l'élimination du signal de recombinaison et (5) la production de l'arbre phylogénétique (le plus souvent avec la méthode de maximum de vraisemblance). A chacune de ces étapes, des erreurs et/ou des estimations doivent être prises en compte afin de pouvoir analyser l'arbre final avec le plus de justesse possible. Ainsi, le (fameux) nombre de SNPs qui différencie deux isolats, dans une analyse phylogénétique, est dépendant, à la fois, de la qualité du séquençage (1) et de l'assemblage (2), mais aussi du nombre de SNPs sur lequel l'analyse phylogénétique est basée (3 et 4). Ce dernier chiffre est aussi dépendant de la taille et de la proximité génétique du génome de référence avec les souches analysées. D'autre part, l'analyse finale de l'arbre phylogénétique doit aussi prendre en compte la valeur de bootstrap qui correspond à la fréquence (pourcentage de fois) où la branche associée a été retrouvée au cours des itérations (classiquement 999 itérations) lors de la construction de l'arbre avec la méthode de maximum de vraisemblance. Cette valeur permet de juger de la robustesse de chaque branche.

À partir de cette réflexion, dans l'article 5, nous avons proposé une définition basée sur le nombre d'isolats (≥ 3) dans un groupe, la valeur de bootstrap (=1) et le nombre maximal de SNPs/année de différence entre chaque paire d'isolats retrouvée dans chaque groupe. Cette définition nous a paru plus adaptée à la technique que d'autres définitions basées sur le nombre de SNPs brut (89) même si elle est évidemment sujette à discussion. Les différents critères sont discutés dans l'article 5. Cette définition n'est pas seulement applicable au ETEC chez le porc, elle peut être adaptée à tous les *E. coli* mais aussi à d'autres bactéries, à condition de pouvoir évaluer le taux de mutation de la bactérie. Elle est donc un exemple de mise en perspective des données afin de les appliquer de manière plus générale. Pour nous, elle représente un aboutissement essentiel de ce travail de thèse.

Il est notable que d'autres méthodes d'analyses phylogénétiques basées sur les données de séquençage existent (413, 414). Par exemple, des techniques de calcul bayésien auraient pu être utilisées dans notre article 5, afin de définir le clone. Cette approche nous aurait permis de considérer le temps entre l'isolement de deux isolats, cependant les logiciels nécessaires

(Beauty et BEAST) sont encore très instables ce qui pose des problèmes de reproductibilité des calculs(414).

La définition de clone à haut risque dans un contexte OneHealth a également fait l'objet d'une réflexion lors de l'écriture de l'article 5. Jusqu'à présent, le terme clone à haut risque était employé dans la littérature surtout dans un contexte de médecine humaine. Les critères pour les définir étaient basés principalement sur quelques articles (88, 374, 400). Cependant, certains de ces critères pouvaient apparaître flous et mal adaptés à la médecine vétérinaire et en particulier au contexte OneHealth. À titre d'exemple, l'aspect zoonotique et la persistance dans l'environnement des clones n'étaient pas mentionnés. Les 5 critères que nous proposons pour définir un clone à haut risque prennent en compte plusieurs aspects épidémiologiques et microbiologiques importants. Ils sont évidemment imparfaits et sont discutés dans l'article 5.

Dissémination clonale et dissémination plasmidique

D'après ces nouvelles définitions, nous avons démontré l'apparition et la dissémination d'un nouveau clone à haut risque d'ETEC:F4 pathogène chez le porc en Amérique du Nord (États-Unis et Canada). Nous avons confirmé, pour la première fois, que les clones à haut risque de *E. coli* existent aussi dans les populations animales. Cette découverte renouvelle la preuve de l'importance des programmes de surveillance au niveau vétérinaire. L'importance du clone AI (cf article 5) a décliné fortement dans les années 2019 et 2020, puisque le nombre d'isolats non susceptibles aux fluoroquinolones détectés par le laboratoire ECL a fortement diminué (données disponibles dans les rapports du MAPAQ 2019 et 2020). Il est possible que la prise de conscience précoce du phénomène, au Québec, ait permis de limiter l'expansion du clone, du moins localement. En effet, le laboratoire ECL a communiqué dès 2014 avec les différents intervenants (vétérinaires et éleveurs) de la filière porcine par l'intermédiaire du MAPAQ pour informer de la présence d'une telle résistance dans les isolats ETEC :F4. Cette prise de conscience a probablement limité l'utilisation de l'enrofloxacin sur le terrain et de ce fait atténué l'avantage évolutif que la résistance à cet antibiotique représentait pour le clone. C'est un exemple très représentatif de l'importance de la communication entre les chercheurs

et les cliniciens, et des actions qui peuvent être prises en temps réel sur le terrain. La poursuite des études phylogénétiques dans les prochaines années afin de savoir si le clone a également perdu de l'importance aux États-Unis est essentielle pour la filière porcine nord-américaine. De plus, la présence du clone ailleurs en Amérique du Nord, par exemple au Mexique, ou en Amérique du Sud devrait être recherchée dans des études futures. Ce type d'étude à grande échelle permettrait peut-être d'étudier des facteurs favorisant la dissémination des clones de ce type.

D'un point de vue évolutif, il serait légitime de penser que la virulence et la résistance sont des mécanismes d'adaptation similaires afin d'améliorer la survie bactérienne, l'un favorisant la persistance dans l'hôte et l'autre permettant de résister à la pression antibiotique. En revanche, dans notre étude, c'est l'acquisition de plusieurs mutations dans les gènes *parC* et *gyrA* pour l'un des isolats ETEC :F4 de la lignée A (ST100, O149H10), qui semble avoir créé un avantage permettant la dissémination du clone AI. En effet, l'acquisition au préalable, de plusieurs mécanismes de virulence, par exemple le système de sécrétion de type VI, n'a pas été suffisante pour permettre la diffusion efficace d'un clone. Dans notre cas, c'est donc bien la résistance aux fluoroquinolones qui a déclenché l'émergence du clone à haut risque AI (cf article 5). Cette information est compatible avec la littérature actuelle puisque qu'il a été démontré que les mutations dans les gènes de la topoisomérase et de la gyrase confèrent aux bactéries plusieurs avantages évolutifs (268, 415, 416). En revanche, pour être qualifié d'à haut risque, un clone doit également présenter une pathogénicité augmentée (cf article 5). Les premières étapes d'acquisition des différents mécanismes de virulence ont donc probablement été nécessaires (mais pas suffisantes) à la formation du clone AI.

Le clone ST772, O23H37, dont les isolats appartiennent tous au virotype STa:STb:F4 semble, quant à lui, avoir pris de l'importance au cours des années 2019 et 2020 (données disponibles dans les rapports du MAPAQ 2019 et 2020). Ce clone est MDR, puisqu'il est résistant à la tétracycline, au TMS aux aminoglycosides et majoritairement (5/7) au florfenicol, mais il reste toutefois susceptible à l'enrofloxacin. Une analyse rapide de la base de données Enterobase (non mentionnée dans l'article 5) a démontré l'absence d'isolat appartenant à cette lignée clonale ailleurs dans le monde avant 2018. Il serait intéressant de répéter cette analyse (à la fois sur les isolats québécois et sur les isolats disponibles dans Enterobase) dans les prochaines

années afin de savoir s'il a pris de l'importance, malgré le fait qu'il ne soit pas résistant aux fluoroquinolones.

L'importance de la dissémination plasmidique des gènes de résistance parmi les ETEC :F4 porcins au Québec sera l'objet d'une étude ultérieure. À cette fin, 12 isolats parmi les 173 de l'article 5 ont été sélectionnés, afin de représenter tous les groupes de réplicons identifiés avec Resfinder et tous les gènes de BLSE/AmpC. Ces isolats ont été séquencés avec la technologie PacBio et des assemblages hybrides ont été réalisés. L'analyse des plasmides est encore en cours.

Dans la filière équine, nous avons démontré à la fois l'absence de dissémination clonale parmi les *E. coli* fécaux commensaux et le rôle prédominant du plasmide InCHI1 dans la dissémination des gènes *bla*_{CTX-M-1/2} au sein du microbiote des chevaux sains en France. Ce plasmide porte l'opéron *fos*, responsable du métabolisme des oligosaccharides à courte chaîne, favorisant possiblement la colonisation de l'intestin de l'hôte (258). Il a été retrouvé dans le microbiote des chevaux sains ailleurs en Europe (217, 252). Sa présence au Québec n'a pas pu être déterminée pour des raisons logistiques et surtout financières, mais devrait être envisagée comme prochaine étape dans les investigations au sein de la filière équine. Cette information permettrait de savoir si le plasmide InCHI1 est présent seulement en Europe ou si l'association plasmide/opéron *fos/bla*_{CTX-M-1/2} est spécifique de l'espèce équine. En effet, comme on l'a vu dans la revue de littérature, *E. coli* semble avoir un rôle moins pathogène chez le cheval que dans d'autres espèces animales. Il est possible de penser que l'intestin du cheval a développé des mécanismes particuliers qui lui confèrent une tolérance spécifique à cet organisme.

L'importance du rôle des plasmides dans la dissémination des gènes de résistance a poussé les chercheurs à développer des stratégies pour prévenir leur transfert. Les cibles visées sont la réplication du plasmide, le transfert à proprement parler et les mécanismes de maintenance des plasmides (417). À titre d'exemple, les acides gras synthétiques tels que l'acide tanzawaique démontrent des propriétés prometteuses d'inhibition de la conjugaison (418) malgré une certaine toxicité cellulaire qui doit encore être maîtrisée. En revanche, ces recherches en sont encore à leurs balbutiements et de nombreux problèmes doivent être résolus, tels que la spécificité des types de plasmides visés, la rapidité d'action et le mode de délivrance à l'hôte. Elles posent aussi toute une série de questions d'innocuité vis-à-vis du microbiome, qui doivent être résolues avant leur utilisation.

Résistance aux antibiotiques phénotypiques et génotypiques

Résistance et multirésistance

Nous avons caractérisé pour la première fois les résistances phénotypiques ainsi que les gènes de BLSE/AmpC présents dans le microbiote de deux populations de chevaux sains (France et Québec). Les résistances phénotypiques les plus importantes identifiées dans les deux populations sont similaires, à savoir l'ampicilline, l'association amoxicilline/acide clavulanique et la streptomycine. De plus, également dans les deux populations, environ 45% des chevaux sont porteurs de *E. coli* multirésistants.

Il est notable que les associations pénicilline/inhibiteur de β -lactamases et la streptomycine ne sont pas (ou très peu) utilisées chez le cheval. Ces résistances ne peuvent donc pas s'expliquer par l'utilisation des antibiotiques dans cette espèce. Dans la filière porcine, en revanche, 90% des isolats ETEC :F4 étudiés présentent de la multirésistance et les antibiotiques les plus touchés sont la tétracycline, l'ampicilline et le triméthoprime-sulfisoxazole. Ces résistances s'expliquent bien par la fréquence d'utilisation de ces antibiotiques dans la filière porcine. Il est possible que les résistances trouvées chez les *E. coli* commensaux (ici prélevés chez les chevaux) soient plus représentatives des antibiotiques utilisés en général sur le territoire. Les résistances trouvées chez des bactéries pathogènes (ici les ETEC :F4) seraient plus représentatives des antibiotiques utilisés couramment dans la filière spécifique.

Les BLSE/AmpC et carbapénémases.

Dans la filière équine, l'identification des différents gènes de BLSE/AmpC dans les deux localités a montré que la diversité des BLSE est plus élevée en France, où nous avons identifié 3 variantes différentes de *bla*_{CTX-M} alors que seulement *bla*_{CTX-M-1} a été identifié au Québec. Plusieurs hypothèses peuvent expliquer cette différence. La première est que le *bla*_{CTX-M-1} est arrivé plus tard en Amérique du Nord et n'a pas encore eu le temps de se diversifier. Pour vérifier cette hypothèse, il faudrait répéter une étude similaire dans quelques années pour évaluer la capacité de la variante *bla*_{CTX-M-1} à se diversifier au Québec. La deuxième hypothèse est que les chevaux, dans la population française, sont plus sujets à être transportés à travers les différents pays européens et donc sont soumis à plus de contacts avec d'autres chevaux.

Cette hypothèse est soutenue par le fait que les différentes variantes de *bla_{CTX-M}* sont retrouvées dans le microbiote des chevaux des différents pays d'Europe (217, 252).

Environ 20% des isolats ETEC :F4, dont nous avons étudié les séquences génomiques, portaient au moins un gène de BLSE/AmpC. La prédominance du gène *bla_{CMY-2}* (38/254) concorde avec ce qui avait déjà été trouvé au Québec (22). En revanche, on sait qu'il existe beaucoup de variations géographiques dans l'espèce porcine (cf tableau 8 de la revue de littérature de cet ouvrage). Globalement, 18/254 isolats portaient le *bla_{CTX-M-1}*. Ces isolats sont majoritairement récents, c'est-à-dire isolés après 2015. Il est possible que la famille des gènes de *bla_{CTX-M}* soit en train de prendre une place prédominante dans les populations animales au Québec, à l'instar de l'Europe (119). Les recherches doivent être poursuivies pour confirmer cette hypothèse.

Il est possible que la détection des différentes variantes des *bla* soit influencée par la méthode de sélection des isolats. Dans l'étude chez le cheval, les enrichissements ont été réalisés avec la ceftriaxone. Il existe très peu d'étude permettant d'évaluer l'efficacité de chaque céphalosporine pour détecter le portage des différents gènes de BLSE/AmpC (341). Cependant, certaines céphalosporines pourraient orienter la sélection de certains types de gènes de BLSE/AmpC. Ainsi, plusieurs enrichissements avec des céphalosporines différentes seraient nécessaires pour identifier une plus grande variété de gènes BLSE/AmpC dans les échantillons. En revanche, la différence de variation des *bla*, observée entre les deux populations équines à l'étude ne peut pas s'expliquer par une différence de méthodologie. Cependant, il est possible que l'utilisation d'une seule molécule pour la sélection de nos isolats ait limité notre capacité de détection de la diversité des isolats portant des gènes BLSE/AmpC présents dans les échantillons. Afin de pallier cette limite, il aurait été possible d'utiliser plusieurs céphalosporines en parallèle pour l'enrichissement ou de réaliser des analyses métagénomiques, c'est-à-dire de réaliser l'analyse génomique directement sur les échantillons (419).

En France, tous les isolats testés étaient susceptibles à l'imipénème. Nous n'avons pas identifié de gènes *bla_{OXA}* dans nos isolats, ni en France, ni au Québec, suggérant que cette problématique ne représente pas encore une réelle menace dans cette filière, dans ces deux localités. En revanche, les autres gènes de carbapénèmases n'ont pas été recherchés. Pour les études à venir, il serait judicieux d'inclure la détection de ces gènes afin de ne pas sous-estimer leur présence et leur prévalence. Chez le porc, il est notable qu'un seul gène de

carbapénémase, le *bla_{IMP-64}*, ait été identifié dans un isolat ETEC:F4 ST90 datant de 2011. La susceptibilité phénotypique à cette famille d'antibiotique n'a pas été testée. Cependant, cet isolat est le seul des ST90 à être résistant aux céphalosporines de 3^e génération et il est parmi ceux qui avaient le plus grand nombre de réplicons. Il est fortement possible qu'il ait acquis un plasmide portant ce gène, mais que cette résistance n'apportant pas d'avantage évolutif (les carbapénèmes ne sont pas utilisés dans la filière porcine), il a probablement été perdu rapidement. En résumé, nos résultats dans les deux filières confirment qu'actuellement les résistances aux carbapénèmes ne semblent pas un problème dans les populations animales. En revanche l'augmentation des résistances aux céphalosporines force les cliniciens vétérinaires, en particulier chez les animaux de compagnie, à utiliser les carbapénèmes (420), y compris chez les chevaux (421, 422). Des alternatives aux carbapénèmes et en particulier à l'imipénème doivent être trouvées, afin de limiter l'émergence de leur résistance dans les populations animales (423, 424).

La résistance aux fluoroquinolones

La résistance aux quinolones est un problème depuis que l'acide nalidixique a été introduit en médecine humaine il y a un peu plus de 40 ans. Les résultats obtenus dans les deux filières concernant cette résistance sont très différents. Dans la filière équine en France et au Québec, chez les *E. coli* commensaux, la résistance aux fluoroquinolones est relativement rare. Compte tenu de cette tendance, nous n'avons pas recherché les gènes ou les mutations responsables de cette résistance. En revanche, aucun des plasmides identifiés dans l'article 2 (cf tableau 1 de l'article 2) ne semblait porter de gènes de résistance aux quinolones puisque cette résistance n'a pas été transférée. Il est donc fortement probable que les mécanismes sous-jacents à cette résistance soient d'origine chromosomique. Pour la filière porcine, les mécanismes de la résistance ont été bien établis et les mutations des gènes *parC* et *gyrA* identifiés. Ces mutations, ainsi que l'avantage évolutif qu'elles ont provoqué, ont été discutées dans les détails (cf article 5). Deux isolats seulement (un en provenance du Québec et un en provenance des États-Unis) portaient des gènes plasmidiques *qnr*. Ces gènes ne semblent donc pas être une problématique importante dans cette filière en Amérique du Nord.

Remarques sur la résistance à la colistine.

La colistine est une polymyxine (polymyxine E). Elle est très active contre les bactéries Gram négatives. En médecine vétérinaire, elle est utilisée depuis des décennies. Plus récemment, l'intérêt pour cette molécule est réapparu en médecine humaine. Elle représente dans certains cas, la seule option thérapeutique (425) pour traiter des infections urinaires ou des chocs septiques causés par de pathogènes multirésistants. Initialement, la résistance à la colistine était causée seulement par des mécanismes chromosomiques. En particulier, la mutation des gènes *pmrA* et *pmrB* ainsi que le gène *Pho*, induisant un remodelage du LPS et une diminution de l'efficacité de la liaison de l'antibiotique et la paroi externe des bactéries Gram négatives (426). En 2015, cependant, une résistance à la colistine d'origine plasmidique a été rapportée, induite par le gène *mcr-1* (427), chez des *E. coli* d'origine porcine en Chine. Depuis cette publication, ce gène a été détecté à travers le monde, plus exactement dans 47 pays (428), dans plusieurs espèces animales, y compris l'espèce humaine (429-432). La prévalence globale de cette résistance semble être autour de 5%, avec des variations régionales (428). La Chine est le pays qui rapporte le plus de bactéries positives pour le gène *mcr*. La quasi-absence des gènes plasmidiques de résistance à la colistine (*mcr*) dans les isolats ETEC :F4 que nous avons étudiés (seulement un isolat provenant des États-Unis) contraste avec l'étendue de leur présence et leur capacité de dissémination en Asie et en Europe (433). Cependant, elle concorde avec le fait que les gènes *mcr-1* et *2* n'ont pas été retrouvés chez des poulets au Canada (87). Dans le rapport du PICRA de 2016, l'utilisation de la colistine dans la filière porcine n'est pas mentionnée dans les antibiotiques utilisés chez les porcs en engraissement (au même titre que l'enrofloxacin) au Canada et est répertoriée dans la catégorie « autres catégories d'antibiotiques » en ce qui concerne les kilogrammes d'antibiotiques vendus chez les animaux en 2014. Ce qui signifie qu'elle n'a pas été vendue en quantité suffisante pour créer une catégorie à part entière. D'après ce rapport, cet antibiotique est donc relativement peu utilisé dans la filière porcine, en tout cas en engraissement, au Canada. Les données sur les autres stades de production ne sont pas disponibles. Cependant, au Canada, cet antibiotique n'a pas d'autorisation de mise sur le marché en médecine vétérinaire (434), ce qui pourrait expliquer la rareté des gènes *mcr* identifiés dans les isolats de notre étude. La résistance phénotypique et la présence des gènes *mcr-1/2* ont été également été recherchés chez les isolats équins porteurs de BLSE/AmpC en

France et au Québec (ces données n'ont pas été présentées). Aucune résistance phénotypique ou gènes *mcr* n'ont été détectés dans ces isolats.

Les facteurs de risque

Les facteurs de risque d'excrétion de *E. coli* MDR ou porteur de BLSE/AmpC que nous avons identifiés dans la filière équine, à savoir le nombre de personnes s'occupant des chevaux, le fait d'avoir reçu des traitements médicaux ou encore le fait d'avoir participé à un évènement équestre, pourraient servir à établir des recommandations afin de limiter la dissémination. D'autres facteurs, tels que le genre et l'âge, ont été identifiés chez le cheval dans des études postérieures à la nôtre (435). Ces facteurs n'ont pas été testés dans notre étude, mais il serait intéressant de les inclure dans des études futures. D'autres paramètres sont à prendre en compte pour l'élaboration de recommandations, dont le plus important est la longueur de la période d'excrétion, mais aussi le risque de transmission des chevaux aux humains et inversement, tel que déjà mentionné dans l'article 1 de cet ouvrage.

Le fait que les facteurs de risque identifiés dans nos études en France et au Québec étaient différents s'explique probablement par les différences de méthodologie. En France, nous avons évalué les facteurs de risque au niveau de l'écurie, alors qu'au Québec, nous avons utilisé l'individu. En effet, l'étude française était intégrée dans une étude plus large visant à déterminer également la présence de résistance aux antiparasitaires (318). Il est cependant très intéressant de remarquer que dans les deux études, lorsque le nombre de personnes qui s'occupent des chevaux est supérieur à 5, les chevaux sont plus susceptibles de porter des *E. coli* soit MDR, soit porteurs de BLSE/AmpC. Le fait que ce critère ait été identifié dans les deux études lui donne beaucoup de crédibilité. Il est aussi particulièrement intéressant puisque les écuries de ce type sont facilement identifiables. Le vétérinaire praticien pourrait donc utiliser ce critère pour prioriser les cas où l'antibiogramme est demandé (bien que du point de vue de l'auteur, l'antibiogramme ait une utilité en tout temps, il est compréhensible que sur le terrain, il ne soit pas demandé à chaque analyse bactériologique).

Dans la filière porcine, nous avons mis en évidence que les isolats LT:STa:STb:F4 non susceptibles à l'enrofloxacin étaient identifiés plus fréquemment au centre de la Montérégie entre septembre 2015 et avril 2016 et qu'un clone à haut risque s'est disséminé chez le porc en Amérique du Nord. Comme présenté dans l'appendice 5 de cet ouvrage, une étude des

facteurs de dissémination du clone a été réalisée rétrospectivement pour les années 2017-2018. Cette étude n'a pas mis en évidence de facteurs de dissémination. Elle portait sur les 48 isolats de cette période qui avaient été séquencés. Cette faible taille d'échantillon a réduit la puissance statistique, limitant la capacité à identifier des facteurs de risque. Une étude de ces facteurs à plus grande échelle n'a pas pu être réalisée dans le cadre de ce travail pour des raisons logistiques, mais devrait être envisagée. L'identification de facteurs favorisant la dispersion des résistances, au sein d'un même troupeau ou entre les fermes et même entre les différents endroits (régions, provinces, pays), nous permettrait peut-être de limiter cette dissémination. Il existe probablement des facteurs environnementaux (436), géographiques et écologiques, tels que les cours d'eau, les vents, les contacts avec les animaux sauvages (c.-à-d. oiseaux migrateurs) (437) ou l'épandage du lisier qui favorisent la dissémination. Ces facteurs devraient également être pris en compte. L'obtention de ce type d'information de façon fiable exigerait des études d'épidémiologie moléculaire longitudinales approfondies, basées sur le séquençage du génome, une excellente connaissance de la filière, et une expertise en modélisation robuste. Cependant, ces études seraient particulièrement utiles pour la lutte contre la dissémination des résistances. En effet, on peut facilement imaginer que l'adhésion à un même réseau de production ou de transport, l'utilisation des services du même vétérinaire ou du même abattoir pourraient jouer un rôle important dans la circulation des gènes de résistance. Malheureusement, pour l'instant, ce type d'étude est rare dans la littérature même si elle commence à voir le jour (438-441), mais elles peuvent encore manquer de précision dans la détermination des liens phylogénétiques entre les isolats.

Retombées et recommandations.

Les termes « clone » et « clone à haut risque dans un contexte OneHealth » ont été définis avec des critères précis, basés sur une revue de littérature et une réflexion. Pour le terme clone, la définition est applicable aux analyses phylogénétiques basées sur le nombre de SNPs, mais la définition peut être adaptée à d'autres techniques utilisant les données de SGC, telle que le cgMLST. Ces deux définitions manquaient de clarté dans la littérature. Elles sont pourtant essentielles à la bonne interprétation des articles incluant des analyses phylogénétiques basées sur les données de séquençage complet.

Dans la filière porcine, la démonstration de la présence d'un clone à haut risque ETEC :F4 dans la population porcine en Amérique du Nord est capitale. Elle permet de mettre en évidence l'importance des études visant à surveiller les variations de résistance aux antibiotiques dans cette filière et de tirer la sonnette d'alarme en ce qui concerne l'utilisation des fluoroquinolones chez les animaux de production.

Dans la filière équine, nos travaux ont permis d'établir un point de comparaison pour les études futures, en termes de prévalence de *E. coli* MDR et porteurs de BLSE/AmpC excrétés par des chevaux sains en France et au Québec. Cette information sera très utile à la communauté scientifique afin de pouvoir évaluer les variations de ces prévalences ainsi que l'effet des actions prises, telle que la réglementation instaurée au Québec en février 2019, interdisant l'utilisation d'antibiotiques de catégorie I (dans la classification de Santé Canada) en médecine vétérinaire à moins de prouver (à l'aide d'un antibiogramme) qu'il n'y a pas d'autre alternative. Les facteurs de risque que nous avons identifiés peuvent servir de guide pour les vétérinaires de terrain pour prioriser la réalisation d'antibiogramme chez certains chevaux considérés comme plus à risque, tels que les chevaux qui vont en compétition et qui ont été transportés.

Conclusion

En conclusion, nos résultats démontrent que les mécanismes de résistance et de dissémination des gènes de résistance peuvent être très différents selon l'espèce animale étudiée. Chez le cheval, la dissémination au sein des *E. coli* commensaux se fait majoritairement par l'intermédiaire de plasmides. Parmi ces plasmides, celui qui prédomine, du moins en Europe, est le plasmide IncHI1-ST9 qui transporte des gènes des BLSE et un opéron *fos* qui pourrait favoriser la colonisation des isolats dans le colon de l'hôte. Dans la filière porcine, nos résultats suggèrent que les ETEC les plus adaptés à leur environnement, à la fois en termes de résistance aux antibiotiques (en particulier ceux qui présentent de la non-susceptibilité aux fluoroquinolones), mais aussi de virulence, sont capables de se disséminer de manière clonale. Ces différences de mécanismes sont probablement dues à l'usage spécifique des antibiotiques qui est fait dans chaque filière et aussi des échanges possibles avec les divers protagonistes en contact avec les animaux.

Ce travail démontre donc à la fois l'ampleur de la résistance aux antibiotiques dans ces deux filières, mais aussi l'étendue du défi à relever pour juguler le phénomène à l'échelle internationale. En effet, afin de respecter l'approche OneHealth, recommandée par l'Organisation mondiale de la santé pour traiter le problème de l'antibiorésistance, il est essentiel d'avoir une image spécifique de chaque filière, afin d'adapter les recommandations pour limiter la dissémination des gènes, des plasmides ou des clones efficacement.

REFERENCE

1. Academies CoC. When antibiotics fail. The Expert Panel on the Potential Socio-Economic Impacts of Antimicrobial Resistance in Canada. 2019; Council of Canadian Academies.
2. O'Neill J. Tackling drug-resistant infections globally: final report and recommendations. London: Wellcome Trust & HM Government. 2016.
3. Richman DD. Antiviral drug resistance. *Antiviral Res.* 2006;71(2-3):117-21.
4. Revie NM, Iyer KR, Robbins N, Cowen LE. Antifungal drug resistance: evolution, mechanisms and impact. *Curr Opin Microbiol.* 2018;45:70-6.
5. Sangster N, Batterham P, Chapman HD, Duraisingh M, Le Jambre L, Shirley M, et al. Resistance to antiparasitic drugs: the role of molecular diagnosis. *Int J Parasitol.* 2002;32(5):637-53.
6. Nolte O. Antimicrobial resistance in the 21st century: a multifaceted challenge. *Protein Pept Lett.* 2014;21(4):330-5.
7. Randall L, Horton R, Chanter J, Lemma F, Evans S. A decline in the occurrence of Extended-spectrum β -Lactamase (ESBL)-producing *Escherichia coli* in retail chicken meat in the UK between 2013 and 2018. *J Appl Microbiol.* 2020(Online ahead of print).
8. Maddox TW, Clegg PD, Williams NJ, Pinchbeck GL. Antimicrobial resistance in bacteria from horses: Epidemiology of antimicrobial resistance. *Equine Vet J.* 2015;47(6):756-65.
9. SAVRM. Swedish Veterinary Antimicrobial Resistance Monitoring. The National Veterinary Institute (SVA) Uppsala; 2011.
10. Toombs-Ruane LJ, Riley CB, Kendall AT, Hill KE, Benschop J, Rosanowski SM. Antimicrobial susceptibility of bacteria isolated from neonatal foal samples submitted to a New Zealand veterinary pathology laboratory (2004 to 2013). *N Z Vet J.* 2016;64(2):107-11.
11. Dunowska M, Morley PS, Traub-Dargatz JL, Hyatt DR, Dargatz DA. Impact of hospitalization and antimicrobial drug administration on antimicrobial susceptibility patterns of commensal *Escherichia coli* isolated from the feces of horses. *J Am Vet Med Assoc.* 2006;228(12):1909-17.
12. Smet A, Boyen F, Flahou B, Doublet B, Praud K, Martens A, et al. Emergence of CTX-M-2-producing *Escherichia coli* in diseased horses: evidence of genetic exchanges of bla(CTX-M-2) linked to ISCR1. *J Antimicrob Chemother.* 2012;67(5):1289-91.
13. Damborg P, Marskar P, Baptiste KE, Guardabassi L. Faecal shedding of CTX-M-producing *Escherichia coli* in horses receiving broad-spectrum antimicrobial prophylaxis after hospital admission. *Vet Microbiol.* 2012;154(3-4):298-304.
14. Schmiedel J, Falgenhauer L, Domann E, Bauerfeind R, Prenger-Berninghoff E, Imirzalioglu C, et al. Multiresistant extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* from humans, companion animals and horses in central Hesse, Germany. *BMC Microbiol.* 2014;14:187.
15. Rankin SC, Whichard JM, Joyce K, Stephens L, O'Shea K, Aceto H, et al. Detection of a bla(SHV) extended-spectrum {beta}-lactamase in *Salmonella enterica* serovar Newport MDR-AmpC. *J Clin Microbiol.* 2005;43(11):5792-3.
16. Gibson JS, Cobbold RN, Trott DJ. Characterization of multidrug-resistant *Escherichia coli* isolated from extraintestinal clinical infections in animals. *J Med Microbiol.* 2010;59(Pt 5):592-8.

17. Dolejska M, Duskova E, Rybarikova J, Janoszowska D, Roubalova E, Dibdakova K, et al. Plasmids carrying *bla*_{CTX-M-1} and *qnr* genes in *Escherichia coli* isolates from an equine clinic and a horseback riding centre. *J Antimicrob Chemother.* 2011;66(4):757-64.
18. Maddox TW, Clegg PD, Diggle PJ, Wedley AL, Dawson S, Pinchbeck GL, et al. Cross-sectional study of antimicrobial-resistant bacteria in horses. Part 1: Prevalence of antimicrobial-resistant *Escherichia coli* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Equine Vet J.* 2012;44(3):289-96.
19. Luppi A. Swine enteric colibacillosis: diagnosis, therapy and antimicrobial resistance. *Porcine Health Manag.* 2017;3:16.
20. Gyles CL, Prescott JF, Songer JG, Thoen CO. Pathogenesis of bacterial infections in animals, 4th Edition. Blackwell Publishing ed: John Wiley & Sons; 2010.
21. Noamani BN, Fairbrother JM, Gyles CL. Virulence genes of O149 enterotoxigenic *Escherichia coli* from outbreaks of postweaning diarrhea in pigs. *Vet Microbiol.* 2003;97(1-2):87-101.
22. Jahanbakhsh S, Letellier A, Fairbrother JM. Circulating of CMY-2 beta-lactamase gene in weaned pigs and their environment in a commercial farm and the effect of feed supplementation with a clay mineral. *J Appl Microbiol.* 2016;121(1):136-48.
23. Jahanbakhsh S, Smith MG, Kohan-Ghadr HR, Letellier A, Abraham S, Trott DJ, et al. Dynamics of extended-spectrum cephalosporin resistance in pathogenic *Escherichia coli* isolated from diseased pigs in Quebec, Canada. *Int J Antimicrob Agents.* 2016;48(2):194-202.
24. Poirel L, Madec JY, Lupo A, Schink AK, Kieffer N, Nordmann P, et al. Antimicrobial Resistance in *Escherichia coli*. *Microbiol Spectr.* 2018;6(4).
25. European Food Safety Authority EFSA, European Centre for Disease Prevention and Control ECDC. The European Union summary report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2015. *EFSA Journal* 2017. 2017;15((2)):212p.
26. Escherich T. The intestinal bacteria of the neonate and breastfed infant. *Reviews*; 1988.
27. Jang J, Hur HG, Sadowsky MJ, Byappanahalli MN, Yan T, Ishii S. Environmental *Escherichia coli*: ecology and public health implications-a review. *J Appl Microbiol.* 2017;123(3):570-81.
28. Blount ZD. The unexhausted potential of *E. coli*. *Elife.* 2015;4.
29. Vogt SL, Pena-Diaz J, Finlay BB. Chemical communication in the gut: Effects of microbiota-generated metabolites on gastrointestinal bacterial pathogens. *Anaerobe.* 2015;34:106-15.
30. Bergthorsson U, Ochman H. Distribution of chromosome length variation in natural isolates of *Escherichia coli*. *Mol Biol Evol.* 1998;15(1):6-16.
31. Kaper JB, Nataro JP, Mobley HL. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol.* 2004;2(2):123-40.
32. Kauffmann F. The serology of the coli group. *The Journal of Immunology.* 1947;57(1):71-100.
33. Kolenda R, Burdukiewicz M, Schierack P. A systematic review and meta-analysis of the epidemiology of pathogenic *Escherichia coli* of calves and the role of calves as reservoirs for human pathogenic *E. coli*. *Front Cell Infect Microbiol.* 2015;5:23.
34. Fratamico PM, DebRoy C, Liu Y, Needleman DS, Baranzoni GM, Feng P. Advances in Molecular Serotyping and Subtyping of *Escherichia coli*. *Front Microbiol.* 2016;7:644.

35. Joensen KG, Tetzschner AM, Iguchi A, Aarestrup FM, Scheutz F. Rapid and easy in silico serotyping of *Escherichia coli* isolates by use of whole-genome sequencing data. *J Clin Microbiol.* 2015;53(8):2410-26.
36. Herzer PJ, Inouye S, Inouye M, Whittam TS. Phylogenetic distribution of branched RNA-linked multicopy single-stranded DNA among natural isolates of *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 1990;172(11):6175-81.
37. Clermont O, Bonacorsi S, Bingen E. Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. *Appl Environ Microbiol.* 2000;66(10):4555-8.
38. Ochman H, Selander RK. Standard reference strains of *Escherichia coli* from natural populations. *J Bacteriol.* 1984;157(2):690-3.
39. Clermont O, Christenson JK, Denamur E, Gordon DM. The Clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: improvement of specificity and detection of new phylogroups. *Environ Microbiol Rep.* 2013;5(1):58-65.
40. Tenaillon O, Skurnik D, Picard B, Denamur E. The population genetics of commensal *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol.* 2010;8(3):207-17.
41. Escobar-Paramo P, Le Menac'h A, Le Gall T, Amorin C, Gouriou S, Picard B, et al. Identification of forces shaping the commensal *Escherichia coli* genetic structure by comparing animal and human isolates. *Environ Microbiol.* 2006;8(11):1975-84.
42. Beghain J, Bridier-Nahmias A, Le Nagard H, Denamur E, Clermont O. ClermonTyping: an easy-to-use and accurate in silico method for *Escherichia* genus strain phylotyping. *Microb Genom.* 2018;4(7).
43. Maiden MC, Bygraves JA, Feil E, Morelli G, Russell JE, Urwin R, et al. Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95(6):3140-5.
44. Wirth T, Falush D, Lan R, Colles F, Mensa P, Wieler LH, et al. Sex and virulence in *Escherichia coli*: an evolutionary perspective. *Mol Microbiol.* 2006;60(5):1136-51.
45. Jaureguy F, Landraud L, Passet V, Diancourt L, Frapy E, Guigon G, et al. Phylogenetic and genomic diversity of human bacteremic *Escherichia coli* strains. *BMC Genomics.* 2008;9:560.
46. Larsen MV, Cosentino S, Rasmussen S, Friis C, Hasman H, Marvig RL, et al. Multilocus sequence typing of total-genome-sequenced bacteria. *J Clin Microbiol.* 2012;50(4):1355-61.
47. Swaminathan B, Barrett TJ, Hunter SB, Tauxe RV, Force CDCPT. PulseNet: the molecular subtyping network for foodborne bacterial disease surveillance, United States. *Emerg Infect Dis.* 2001;7(3):382-9.
48. Goering RV. Pulsed field gel electrophoresis: a review of application and interpretation in the molecular epidemiology of infectious disease. *Infect Genet Evol.* 2010;10(7):866-75.
49. Price LB, Johnson JR, Aziz M, Clabots C, Johnston B, Tchesnokova V, et al. The epidemic of extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Escherichia coli* ST131 is driven by a single highly pathogenic subclone, H30-Rx. *MBio.* 2013;4(6):e00377-13.
50. Goering RV. Pulsed field gel electrophoresis: a review of application and interpretation in the molecular epidemiology of infectious disease. *Infect Genet Evol.* 2010;10(7):866-75.
51. Carleton HA, Gerner-Smidt P. Whole-genome sequencing is taking over foodborne disease surveillance. *Microbe.* 2016;11:311-7.
52. Salipante SJ, Roach DJ, Kitzman JO, Snyder MW, Stackhouse B, Butler-Wu SM, et al. Large-scale genomic sequencing of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strains. *Genome Res.* 2015;25(1):119-28.

53. Holt KE, Parkhill J, Mazzoni CJ, Roumagnac P, Weill FX, Goodhead I, et al. High-throughput sequencing provides insights into genome variation and evolution in *Salmonella* Typhi. *Nat Genet.* 2008;40(8):987-93.
54. Joensen KG, Scheutz F, Lund O, Hasman H, Kaas RS, Nielsen EM, et al. Real-time whole-genome sequencing for routine typing, surveillance, and outbreak detection of verotoxigenic *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol.* 2014;52(5):1501-10.
55. Timme RE, Rand H, Shumway M, Trees EK, Simmons M, Agarwala R, et al. Benchmark datasets for phylogenomic pipeline validation, applications for foodborne pathogen surveillance. *PeerJ.* 2017;5:e3893.
56. Kaas RS, Leekitcharoenphon P, Aarestrup FM, Lund O. Solving the problem of comparing whole bacterial genomes across different sequencing platforms. *PLoS One.* 2014;9(8).
57. Dekker JP, Frank KM. Next-Generation Epidemiology: Using Real-Time Core Genome Multilocus Sequence Typing To Support Infection Control Policy. *J Clin Microbiol.* 2016;54(12):2850-3.
58. Kluytmans-van den Bergh MF, Rossen JW, Bruijning-Verhagen PC, Bonten MJ, Friedrich AW, Vandenbroucke-Grauls CM, et al. Whole-Genome Multilocus Sequence Typing of Extended-Spectrum-Beta-Lactamase-Producing Enterobacteriaceae. *J Clin Microbiol.* 2016;54(12):2919-27.
59. Dubreuil JD, Isaacson RE, Schifferli DM. Animal Enterotoxigenic *Escherichia coli*. *EcoSal Plus.* 2016;7(1).
60. Blanco J, Blanco M, Garabal JI, González EA. Enterotoxins, colonization factors and serotypes of enterotoxigenic *Escherichia coli* from humans and animals. *Microbiologia.* 1991;7(2):57-73.
61. Xia P, Song Y, Zou Y, Yang Y, Zhu G. F4+ enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) adhesion mediated by the major fimbrial subunit FaeG. *J Basic Microbiol.* 2015;55(9):1118-24.
62. Sarrazin E, Bertschinger HU. Role of fimbriae F18 for actively acquired immunity against porcine enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Vet Microbiol.* 1997;54(2):133-44.
63. Nagy B, Fekete PZ. Enterotoxigenic *Escherichia coli* in veterinary medicine. *Int J Med Microbiol.* 2005;295(6-7):443-54.
64. Turner SM, Scott-Tucker A, Cooper LM, Henderson IR. Weapons of mass destruction: virulence factors of the global killer enterotoxigenic *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett.* 2006;263(1):10-20.
65. Betley M, Miller V, Mekalanos J. Genetics of bacterial enterotoxins. *Annual Reviews in Microbiology.* 1986;40(1):577-605.
66. Gyles C. L, Fairbrother J. M. *Escherichia Coli*. *Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals* 4th edition 2010. p. 267-308.
67. Hampson D, Fu Z, Robertson I. Investigation of the source of haemolytic *Escherichia coli* infecting weaned pigs. *Epidemiol Infect.* 1987;99(1):149-53.
68. Kausche F, Dean E, Arp L, Samuel J, Moon H. An experimental model for subclinical edema disease (*Escherichia coli* enterotoxemia) manifest as vascular necrosis in pigs. *Am J Vet Res.* 1992;53(3):281.
69. Wathes C, Miller B, Bourne F. Cold stress and post-weaning diarrhoea in piglets inoculated orally or by aerosol. *Animal Science.* 1989;49(3):483-96.
70. Rhouma M, Fairbrother JM, Beaudry F, Letellier A. Post weaning diarrhea in pigs: risk factors and non-colistin-based control strategies. *Acta Vet Scand.* 2017;59(1):31.
71. Fairbrother JM, Nadeau É. Colibacillosis. *Diseases of swine.* 2019:807-34.

72. Tzipori S, Chandler D, Smith M. The clinical manifestation and pathogenesis of enteritis associated with rotavirus and enterotoxigenic *Escherichia coli* infections in domestic animals. *Prog Food Nutr Sci.* 1983;7(3-4):193.
73. Cecconi M, Evans L, Levy M, Rhodes A. Sepsis and septic shock. *Lancet.* 2018;392(10141):75-87.
74. Sellon DC, Long M. *Equine Infectious Diseases E-Book: Elsevier Health Sciences; 2013.*
75. Russell CM, Axon JE, Blishen A, Begg AP. Blood culture isolates and antimicrobial sensitivities from 427 critically ill neonatal foals. *Aust Vet J.* 2008;86(7):266-71.
76. Sanchez LC, Giguere S, Lester GD. Factors associated with survival of neonatal foals with bacteremia and racing performance of surviving Thoroughbreds: 423 cases (1982-2007). *J Am Vet Med Assoc.* 2008;233(9):1446-52.
77. Frye MA. Pathophysiology, diagnosis, and management of urinary tract infection in horses. *Vet Clin North Am Equine Pract.* 2006;22(2):497-517.
78. MacLeay JM, Kohn CW. Results of quantitative cultures of urine by free catch and catheterization from healthy adult horses. *J Vet Intern Med.* 1998;12(2):76-8.
79. Reid G, Sobel JD. Bacterial adherence in the pathogenesis of urinary tract infection: a review. *Rev Infect Dis.* 1987;9(3):470-87.
80. Albiñá A, Baverud V, Magnusson U. Uterine microbiology and antimicrobial susceptibility in isolated bacteria from mares with fertility problems. *Acta Vet Scand.* 2003;44(3-4):121-9.
81. Davis HA, Stanton MB, Thungrat K, Boothe DM. Uterine bacterial isolates from mares and their resistance to antimicrobials: 8,296 cases (2003-2008). *J Am Vet Med Assoc.* 2013;242(7):977-83.
82. Rebordao MR, Carneiro C, Alexandre-Pires G, Brito P, Pereira C, Nunes T, et al. Neutrophil extracellular traps formation by bacteria causing endometritis in the mare. *J Reprod Immunol.* 2014;106:41-9.
83. DebRoy C, Roberts E, Jayarao BM, Brooks JW. Bronchopneumonia associated with extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* in a horse. *J Vet Diagn Invest.* 2008;20(5):661-4.
84. Holland RE, Schmidt A, Sriranganathan N, Grimes SD, Wilson RA, Brown CM, et al. Characterization of *Escherichia coli* isolated from foals. *Vet Microbiol.* 1996;48(3-4):243-55.
85. Holland RE, Grimes SD, Walker RD, Wilson RA. Experimental inoculation of foals and pigs with an enterotoxigenic *E. coli* isolated from a foal. *Vet Microbiol.* 1996;52(3-4):249-57.
86. van Duijkeren E, van Asten AJ, Gaastra W. Characterization of *Escherichia coli* isolated from adult horses with and without enteritis. *Vet Q.* 2000;22(3):162-6.
87. Vounba P, Rhouma M, Arsenault J, Bada Alambédji R, Fravallo P, Fairbrother JM. Prevalence of colistin resistance and *mcr-1/mcr-2* genes in extended-spectrum β -lactamase/AmpC-producing *Escherichia coli* isolated from chickens in Canada, Senegal and Vietnam. *J Glob Antimicrob Resist.* 2019;19:222-7.
88. Mathers AJ, Peirano G, Pitout JD. Chapter Four-*Escherichia coli* ST131: The Quintessential Example of an International Multiresistant High-Risk Clone. *Adv Appl Microbiol.* 2015;90:109-54.
89. Roer L, Overballe-Petersen S, Hansen F, Schonning K, Wang M, Roder BL, et al. *Escherichia coli* Sequence Type 410 Is Causing New International High-Risk Clones. *mSphere.* 2018;3(4).
90. de Been M, Lanza VF, de Toro M, Scharringa J, Dohmen W, Du Y, et al. Dissemination of cephalosporin resistance genes between *Escherichia coli* strains from farm animals and humans by specific plasmid lineages. *PLoS Genet.* 2014;10(12):e1004776.

91. Falagas ME, Koletsis PK, Bliziotis IA. The diversity of definitions of multidrug-resistant (MDR) and pandrug-resistant (PDR) *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*. *J Med Microbiol*. 2006;55(Pt 12):1619-29.
92. Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG, et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect*. 2012;18(3):268-81.
93. Sweeney MT, Lubbers BV, Schwarz S, Watts JL. Applying definitions for multidrug resistance, extensive drug resistance and pandrug resistance to clinically significant livestock and companion animal bacterial pathogens. *J Antimicrob Chemother*. 2018;73(6):1460-3.
94. Kahlmeter G. Breakpoints for intravenously used cephalosporins in Enterobacteriaceae—EUCAST and CLSI breakpoints. *Clin Microbiol Infect*. 2008;14(s1):169-74.
95. Kahlmeter G, Brown DF, Goldstein FW, MacGowan AP, Mouton JW, Österlund A, et al. European harmonization of MIC breakpoints for antimicrobial susceptibility testing of bacteria. *J Antimicrob Chemother*. 2003;52(2):145-8.
96. CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Twenty-second Informational Supplement. 2012;M100-S22(CLSI, Wayne, PA, USA).
97. World Health Organization. Critically important antimicrobials for human medicine. 2019.
98. Agency EM. Categorisation of antibiotics in the European Union. 2019.
99. Bush K, Bradford PA. β -Lactams and β -Lactamase Inhibitors: An Overview. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2016;6(8).
100. Giguère S, Prescott JF, Dowling PM. Antimicrobial therapy in veterinary medicine: John Wiley & Sons; 2013.
101. Prescott JF, Dowling PM. Antimicrobial therapy in veterinary medicine: John Wiley & Sons; 2013.
102. Angelescu M, Apostol A. [Cefepime (maxipime), large spectrum 4th generation cephalosporin, resistant to beta-lactamases]. *Chirurgia (Bucharest, Romania)*. 2001;96(6):547-52.
103. Greko C. Reflection paper on the use of third and fourth generation cephalosporins in food producing animals in the European Union: development of resistance and impact on human and animal health. *J Vet Pharmacol Ther*. 2009;32(6):515-33.
104. Mehta D, Sharma AK. Cephalosporins: A review on imperative class of antibiotics. *Inventi Rapid: Molecular Pharmacology*. 2016;1:1-6.
105. Rasmussen BA, Bush K. Carbapenem-hydrolyzing beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother*. 1997;41(2):223.
106. Nordmann P, Naas T, Poirel L. Global spread of Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Emerg Infect Dis*. 2011;17(10):1791-8.
107. Shimada E, Miyamoto T, Hatoya S. Isolation of metallo- β -lactamase-producing *Acinetobacter lwoffii* from three dogs and a cat. *J Jpn Vet Med Assoc*. 2012;65:365-9.
108. Adams RJ, Mathys DA, Mollenkopf DF, Whittle A, Daniels JB, Wittum TE. Carbapenemase-Producing *Aeromonas veronii* Disseminated in the Environment of an Equine Specialty Hospital. *Vector Borne Zoonotic Dis*. 2017;17(6):439-42.
109. Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA. A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother*. 1995;39(6):1211-33.

110. Jacoby GA. Mechanisms of resistance to quinolones. *Clin Infect Dis*. 2005;41(Supplement_2):S120-S6.
111. Nakamura S, Nakamura M, Kojima T, Yoshida H. *gyrA* and *gyrB* mutations in quinolone-resistant strains of *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1989;33(2):254-5.
112. Ambler RP. The structure of beta-lactamases. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 1980;289(1036):321-31.
113. Silveira MC, Azevedo da Silva R, Faria da Mota F, Catanho M, Jardim R, R Guimarães AC, et al. Systematic Identification and Classification of β -Lactamases Based on Sequence Similarity Criteria: β -Lactamase Annotation. *Evol Bioinform Online*. 2018;14.
114. Livermore DM. Defining an extended-spectrum beta-lactamase. *Clin Microbiol Infect*. 2008;14 Suppl 1:3-10.
115. Jacoby GA, Medeiros AA. More extended-spectrum beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother*. 1991;35(9):1697-704.
116. Tzouvelekis LS, Tzelepi E, Tassios PT, Legakis NJ. CTX-M-type beta-lactamases: an emerging group of extended-spectrum enzymes. *Int J Antimicrob Agents*. 2000;14(2):137-42.
117. Bauernfeind A, Stemplinger I, Jungwirth R, Mangold P, Amann S, Akalin E, et al. Characterization of beta-lactamase gene *bla*PER-2, which encodes an extended-spectrum class A beta-lactamase. *Antimicrob Agents Chemother*. 1996;40(3):616-20.
118. Poirel L, Naas T, Guibert M, Chaibi EB, Labia R, Nordmann P. Molecular and biochemical characterization of VEB-1, a novel class A extended-spectrum beta-lactamase encoded by an *Escherichia coli* integron gene. *Antimicrob Agents Chemother*. 1999;43(3):573-81.
119. Cantón R, González-Alba J, Galán J. CTX-M enzymes: origin and diffusion. *Front Microbiol* 2012;(3)(11):Epub.
120. Pitout JD, Hossain A, Hanson ND. Phenotypic and molecular detection of CTX-M-beta-lactamases produced by *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. *J Clin Microbiol*. 2004;42(12):5715-21.
121. Bauernfeind A, Grimm H, Schweighart S. A new plasmidic cefotaximase in a clinical isolate of *Escherichia coli*. *Infection*. 1990;18(5):294-8.
122. Bauernfeind A, Schweighart S, Grimm H. A new plasmidic cefotaximase in a clinical isolate of *Escherichia coli*. *Infection*. 1990;18(5):294-8.
123. Walther-Rasmussen J, Høiby N. Plasmid-borne AmpC β -lactamases. *Can J Microbiol*. 2002;48(6):479-93.
124. Jacoby GA. AmpC beta-lactamases. *Clin Microbiol Rev*. 2009;22(1):161-82, Table of Contents.
125. Martin LC, Weir EK, Poppe C, Reid-Smith RJ, Boerlin P. Characterization of *bla*CMY-2 plasmids in *Salmonella* and *Escherichia coli* isolates from food animals in Canada. *Appl Environ Microbiol*. 2012;78(4):1285-7.
126. Lartigue MF, Poirel L, Aubert D, Nordmann P. In vitro analysis of ISEcp1B-mediated mobilization of naturally occurring beta-lactamase gene *bla*CTX-M of *Kluyvera ascorbata*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006;50(4):1282-6.
127. Tzouvelekis LS, Markogiannakis A, Psychogiou M, Tassios PT, Daikos GL. Carbapenemases in *Klebsiella pneumoniae* and other Enterobacteriaceae: an evolving crisis of global dimensions. *Clin Microbiol Rev*. 2012;25(4):682-707.
128. Poirel L, Heritier C, Tolun V, Nordmann P. Emergence of oxacillinase-mediated resistance to imipenem in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004;48(1):15-22.

129. Lee JH, Bae IK, Lee SH. New definitions of extended-spectrum beta-lactamase conferring worldwide emerging antibiotic resistance. *Med Res Rev.* 2012;32(1):216-32.
130. Wayne P. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) performance standards for antimicrobial disk diffusion susceptibility tests 19th ed. approved standard. CLSI document M100-S19. 2009:29.
131. Giske CG, Sundsfjord AS, Kahlmeter G, Woodford N, Nordmann P, Paterson DL, et al. Redefining extended-spectrum beta-lactamases: balancing science and clinical need. *J Antimicrob Chemother.* 2009;63(1):1-4.
132. Malouin F, Bryan LE. Modification of penicillin-binding proteins as mechanisms of beta-lactam resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* 1986;30(1):1-5.
133. Viveiros M, Dupont M, Rodrigues L, Couto I, Davin-Regli A, Martins M, et al. Antibiotic stress, genetic response and altered permeability of *E. coli*. *PLoS One.* 2007;2(4):e365.
134. Wenzel RP, Sahm DF, Thornsberry C, Draghi DC, Jones ME, Karlowsky JA. In vitro susceptibilities of gram-negative bacteria isolated from hospitalized patients in four European countries, Canada, and the United States in 2000-2001 to expanded-spectrum cephalosporins and comparator antimicrobials: implications for therapy. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003;47(10):3089-98.
135. Wang H, Dzink-Fox JL, Chen M, Levy SB. Genetic characterization of highly fluoroquinolone-resistant clinical *Escherichia coli* strains from China: role of *acrR* mutations. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001;45(5):1515-21.
136. Barnard FM, Maxwell A. Interaction between DNA gyrase and quinolones: effects of alanine mutations at GyrA subunit residues Ser(83) and Asp(87). *Antimicrob Agents Chemother.* 2001;45(7):1994-2000.
137. Willmott CJ, Maxwell A. A single point mutation in the DNA gyrase A protein greatly reduces binding of fluoroquinolones to the gyrase-DNA complex. *Antimicrob Agents Chemother.* 1993;37(1):126-7.
138. Ince D, Hooper DC. Quinolone resistance due to reduced target enzyme expression. *J Bacteriol.* 2003;185(23):6883-92.
139. Komp Lindgren P, Karlsson A, Hughes D. Mutation rate and evolution of fluoroquinolone resistance in *Escherichia coli* isolates from patients with urinary tract infections. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003;47(10):3222-32.
140. Ambler JE, Pinney RJ. Positive R plasmid mutator effect on chromosomal mutation to nalidixic acid resistance in nalidixic acid-exposed cultures of *Escherichia coli*. *J Antimicrob Chemother.* 1995;35(5):603-9.
141. Goldsmith M, Sarov-Blat L, Livneh Z. Plasmid-encoded MucB protein is a DNA polymerase (pol RI) specialized for lesion bypass in the presence of MucA', RecA, and SSB. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97(21):11227-31.
142. Riesenfeld C, Everett M, Piddock LJ, Hall BG. Adaptive mutations produce resistance to ciprofloxacin. *Antimicrob Agents Chemother.* 1997;41(9):2059-60.
143. Cohen SP, McMurry LM, Hooper DC, Wolfson JS, Levy SB. Cross-resistance to fluoroquinolones in multiple-antibiotic-resistant (Mar) *Escherichia coli* selected by tetracycline or chloramphenicol: decreased drug accumulation associated with membrane changes in addition to OmpF reduction. *Antimicrob Agents Chemother.* 1989;33(8):1318-25.
144. Alekshun MN, Levy SB. Regulation of chromosomally mediated multiple antibiotic resistance: the *mar* regulon. *Antimicrob Agents Chemother.* 1997;41(10):2067-75.
145. Martinez-Martinez L, Pascual A, Jacoby GA. Quinolone resistance from a transferable plasmid. *Lancet.* 1998;351(9105):797-9.

146. Tran JH, Jacoby GA. Mechanism of plasmid-mediated quinolone resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(8):5638-42.
147. Tran JH, Jacoby GA, Hooper DC. Interaction of the plasmid-encoded quinolone resistance protein Qnr with *Escherichia coli* DNA gyrase. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005;49(1):118-25.
148. Wang M, Tran JH, Jacoby GA, Zhang Y, Wang F, Hooper DC. Plasmid-mediated quinolone resistance in clinical isolates of *Escherichia coli* from Shanghai, China. *Antimicrob Agents Chemother*. 2003;47(7):2242-8.
149. Robicsek A, Strahilevitz J, Jacoby GA, Macielag M, Abbanat D, Park CH, et al. Fluoroquinolone-modifying enzyme: a new adaptation of a common aminoglycoside acetyltransferase. *Nat Med*. 2006;12(1):83-8.
150. Maurice F, Broutin I, Podglajen I, Benas P, Collatz E, Dardel F. Enzyme structural plasticity and the emergence of broad-spectrum antibiotic resistance. *EMBO Rep*. 2008;9(4):344-9.
151. Vetting MW, Park CH, Hegde SS, Jacoby GA, Hooper DC, Blanchard JS. Mechanistic and structural analysis of aminoglycoside N-acetyltransferase AAC(6')-Ib and its bifunctional, fluoroquinolone-active AAC(6')-Ib-cr variant. *Biochemistry*. 2008;47(37):9825-35.
152. Yamane K, Wachino J, Suzuki S, Kimura K, Shibata N, Kato H, et al. New plasmid-mediated fluoroquinolone efflux pump, QepA, found in an *Escherichia coli* clinical isolate. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007;51(9):3354-60.
153. Robinson IH. The human-horse relationship: how much do we know? *Equine Vet J Suppl*. 1999(28):42-5.
154. Endenburg N. Perceptions and attitudes towards horses in European societies. *Equine Vet J Suppl*. 1999(28):38-41.
155. Ewers C, Bethe A, Semmler T, Guenther S, Wieler LH. Extended-spectrum beta-lactamase-producing and AmpC-producing *Escherichia coli* from livestock and companion animals, and their putative impact on public health: a global perspective. *Clin Microbiol Infect*. 2012;18(7):646-55.
156. Weese JS, Baptiste KE, Baverud V, Toutain P-L. Guidelines for antimicrobial use in horses. *Guide to antimicrobial use in animals*. 2008:161-82.
157. Anses. Suivi des ventes de médicaments vétérinaires contenant des antibiotiques en France en 2014. In: Lyon et Ploufragan-Plouzané-Niort France, editor. 2015. p. 44.
158. Weese JS. Antimicrobial use and antimicrobial resistance in horses. *Equine Vet J*. 2015;47(6):747-9.
159. Malo A, Cluzel C, Labrecque O, Beauchamp G, Lavoie J-P, Leclere M. Evolution of in vitro antimicrobial resistance in an equine hospital over 3 decades. *The Canadian Veterinary Journal*. 2016;57(7):747.
160. Glass-Kaastra SK, Pearl DL, Reid-Smith RJ, McEwen B, McEwen SA, Amezcua R, et al. Describing antimicrobial use and reported treatment efficacy in Ontario swine using the Ontario Swine Veterinary-based Surveillance program. *BMC Vet Res*. 2013;9:238.
161. Kim L, Gray JT, Harmon BG, Jones RD, Fedorka-Cray PJ. Susceptibility of *Escherichia coli* from growing piglets receiving antimicrobial feed additives. *Foodborne Pathogens & Disease*. 2005;2(4):304-16.
162. CIPARS. The Canadian Integrated Program for Antimicrobial Resistance Surveillance (CIPARS) Report 2018. In: Public Health Agency Canada, editor. 2018.

163. Jahanbakhsh S, Kabore KP, Fravallo P, Letellier A, Fairbrother JM. Impact of medicated feed along with clay mineral supplementation on *Escherichia coli* resistance to antimicrobial agents in pigs after weaning in field conditions. *Res Vet Sci.* 2015;102:72-9.
164. CIPARS The Canadian Integrated Program for Antimicrobial Resistance Surveillance. The Canadian Integrated Program for Antimicrobial Resistance Surveillance (CIPARS) Report 2016. In: Public Health Agency Canada, editor. 2016.
165. Zhang P, Shen Z, Zhang C, Song L, Wang B, Shang J, et al. Surveillance of antimicrobial resistance among *Escherichia coli* from chicken and swine, China, 2008-2015. *Vet Microbiol.* 2017;203:49-55.
166. Jiang F, Wu Z, Zheng Y, Frana TS, Sahin O, Zhang Q, et al. Genotypes and Antimicrobial Susceptibility Profiles of Hemolytic *Escherichia coli* from Diarrheic Piglets. *Foodborne Pathog Dis.* 2019;16(2):94-103.
167. Abraham S, Jordan D, Wong HS, Johnson JR, Toleman MA, Wakeham DL, et al. First detection of extended-spectrum cephalosporin- and fluoroquinolone-resistant *Escherichia coli* in Australian food-producing animals. *Glob Antimicrob Resist.* 2015;3(4):273-7.
168. Kaspersen H, Urdahl AM, Simm R, Slette-meås JS, Lagesen K, Norström M. Occurrence of quinolone resistant *E. coli* originating from different animal species in Norway. *Vet Microbiol.* 2018;217:25-31.
169. Kindle P, Zurfluh K, Nüesch-Inderbilen M, von Ah S, Sidler X, Stephan R, et al. Phenotypic and genotypic characteristics of *Escherichia coli* with non-susceptibility to quinolones isolated from environmental samples on pig farms. *Porcine health management.* 2019;5:9.
170. Gogarten JP, Doolittle WF, Lawrence JG. Prokaryotic Evolution in Light of Gene Transfer. *Mol Biol Evol.* 2002;19(12):2226-38.
171. Snyder L, Peters J, Henkins T, Champness W. Molecular genetics of bacteria: Asm Press Washington, DC; 2013.
172. Pachauri S. Recombination. In: Vonk J, Shackelford T, editors. *Encyclopedia of Animal Cognition and Behavior.* Cham: Springer International Publishing; 2019. p. 1-5.
173. Partridge SR, Kwong SM, Firth N, Jensen SO. Mobile Genetic Elements Associated with Antimicrobial Resistance. *Clin Microbiol Rev.* 2018;31(4).
174. Gyles C, Boerlin P. Horizontally Transferred Genetic Elements and Their Role in Pathogenesis of Bacterial Disease. *Vet Pathol.* 2013;51(2):328-40.
175. Hu Y, Yang X, Li J, Lv N, Liu F, Wu J, et al. The Bacterial Mobile Resistome Transfer Network Connecting the Animal and Human Microbiomes. *Appl Environ Microbiol.* 2016;82(22):6672-81.
176. von Wintersdorff CJ, Penders J, van Niekerk JM, Mills ND, Majumder S, van Alphen LB, et al. Dissemination of Antimicrobial Resistance in Microbial Ecosystems through Horizontal Gene Transfer. *Front Microbiol.* 2016;7:173.
177. Barlow M, Hall BG. Phylogenetic analysis shows that the OXA beta-lactamase genes have been on plasmids for millions of years. *J Mol Evol.* 2002;55(3):314-21.
178. Griffith F. The Significance of Pneumococcal Types. *J Hyg (Lond).* 1928;27(2):113-59.
179. Hotchkiss RD. Transfer of penicillin resistance in pneumococci by the desoxyribonucleate derived from resistant cultures. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 1951;16:457-61.
180. Alexander HE, Hahn E, Leidy G. On the specificity of the desoxyribonucleic acid which induces streptomycin resistance in *Hemophilus*. *J Exp Med.* 1956;104(3):305-20.

181. Johnston C, Martin B, Fichant G, Polard P, Claverys JP. Bacterial transformation: distribution, shared mechanisms and divergent control. *Nat Rev Microbiol.* 2014;12(3):181-96.
182. Prudhomme M, Attaiech L, Sanchez G, Martin B, Claverys JP. Antibiotic stress induces genetic transformability in the human pathogen *Streptococcus pneumoniae*. *Science.* 2006;313(5783):89-92.
183. Phan M-D, Kidgell C, Nair S, Holt KE, Turner AK, Hinds J, et al. Variation in *Salmonella enterica* serovar typhi IncHI1 plasmids during the global spread of resistant typhoid fever. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009;53(2):716-27.
184. Dale JW, Park SF. *Molecular genetics of bacteria* Chapter 4: John Wiley & Sons; 2013.
185. Lederberg J, Tatum EL. Sex in bacteria; genetic studies, 1945-1952. *Science.* 1953;118(3059):169-75.
186. Fernandez-Gonzalez E, de Paz HD, Alperi A, Agundez L, Faustmann M, Sangari FJ, et al. Transfer of R388 derivatives by a pathogenesis-associated type IV secretion system into both bacteria and human cells. *J Bacteriol.* 2011;193(22):6257-65.
187. Ilangovan A, Connery S, Waksman G. Structural biology of the Gram-negative bacterial conjugation systems. *Trends Microbiol.* 2015;23(5):301-10.
188. Orlek A, Stoesser N, Anjum MF, Doumith M, Ellington MJ, Peto T, et al. Plasmid Classification in an Era of Whole-Genome Sequencing: Application in Studies of Antibiotic Resistance Epidemiology. *Front Microbiol.* 2017;8:182.
189. Conlan S, Thomas PJ, Deming C, Park M, Lau AF, Dekker JP, et al. Single-molecule sequencing to track plasmid diversity of hospital-associated carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Sci Transl Med.* 2014;6(254):254.
190. Schweizer C, Bischoff P, Bender J, Kola A, Gastmeier P, Hummel M, et al. Plasmid-Mediated Transmission of KPC-2 Carbapenemase in Enterobacteriaceae in Critically Ill Patients. *Front Microbiol.* 2019;10(276).
191. Carattoli A, Bertini A, Villa L, Falbo V, Hopkins KL, Threlfall EJ. Identification of plasmids by PCR-based replicon typing. *J Microbiol Methods.* 2005;63(3):219-28.
192. Carattoli A, Zankari E, Garcia-Fernandez A, Larsen MV, Lund O, Villa L, et al. PlasmidFinder and pMLST: in silico detection and typing of plasmids. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014;02412-14.
193. Chabbert YA, Scavizzi MR, Witchitz JL, Gerbaud GR, Bouanchaud DH. Incompatibility groups and the classification of *fi* - resistance factors. *J Bacteriol.* 1972;112(2):666-75.
194. Harmer CJ, Hall RM. pRMH760, a precursor of A/C(2) plasmids carrying *bla*CMY and *bla*NDM genes. *Microb Drug Resist.* 2014;20(5):416-23.
195. Call DR, Singer RS, Meng D, Broschat SL, Orfe LH, Anderson JM, et al. *bla*CMY-2-positive IncA/C plasmids from *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* are a distinct component of a larger lineage of plasmids. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010;54(2):590-6.
196. Ho PL, Lo WU, Chan J, Cheung YY, Chow KH, Yam WC, et al. pIMP-PH114 carrying *bla*IMP-4 in a *Klebsiella pneumoniae* strain is closely related to other multidrug-resistant IncA/C2 plasmids. *Curr Microbiol.* 2014;68(2):227-32.
197. Rozwandowicz M, Brouwer MSM, Fischer J, Wagenaar JA, Gonzalez-Zorn B, Guerra B, et al. Plasmids carrying antimicrobial resistance genes in Enterobacteriaceae. *J Antimicrob Chemother.* 2018;73(5):1121-37.
198. Poirel L, Villa L, Bertini A, Pitout JD, Nordmann P, Carattoli A. Expanded-spectrum beta-lactamase and plasmid-mediated quinolone resistance. *Emerg Infect Dis.* 2007;13(5):803-5.

199. Brouwer MS, Tagg KA, Mevius DJ, Iredell JR, Bossers A, Smith HE, et al. Incl shufflons: Assembly issues in the next-generation sequencing era. *Plasmid*. 2015;80:111-7.
200. Johnson TJ, Shepard SM, Rivet B, Danzeisen JL, Carattoli A. Comparative genomics and phylogeny of the Incl1 plasmids: a common plasmid type among porcine enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Plasmid*. 2011;66(3):144-51.
201. Leverstein-van Hall MA, Dierikx CM, Cohen Stuart J, Voets GM, van den Munckhof MP, van Essen-Zandbergen A, et al. Dutch patients, retail chicken meat and poultry share the same ESBL genes, plasmids and strains. *Clin Microbiol Infect*. 2011;17(6):873-80.
202. Wang J, Stephan R, Power K, Yan Q, Hachler H, Fanning S. Nucleotide sequences of 16 transmissible plasmids identified in nine multidrug-resistant *Escherichia coli* isolates expressing an ESBL phenotype isolated from food-producing animals and healthy humans. *J Antimicrob Chemother*. 2014;69(10):2658-68.
203. Lv L, Partridge SR, He L, Zeng Z, He D, Ye J, et al. Genetic characterization of Incl2 plasmids carrying blaCTX-M-55 spreading in both pets and food animals in China. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013;57(6):2824-7.
204. Tijet N, Sheth PM, Lastovetska O, Chung C, Patel SN, Melano RG. Molecular characterization of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC)-producing Enterobacteriaceae in Ontario, Canada, 2008-2011. *PLoS One*. 2014;9(12):e116421.
205. Suzuki S, Ohnishi M, Kawanishi M, Akiba M, Kuroda M. Investigation of a plasmid genome database for colistin-resistance gene mcr-1. *Lancet Infect Dis*. 2016;16(3):284-5.
206. Tijet N, Faccone D, Rapoport M, Seah C, Pasteran F, Ceriana P, et al. Molecular characteristics of mcr-1-carrying plasmids and new mcr-1 variant recovered from polyclonal clinical *Escherichia coli* from Argentina and Canada. *PLoS One*. 2017;12(7):e0180347.
207. Marcadé G, Deschamps C, Boyd A, Gautier V, Picard B, Branger C, et al. Replicon typing of plasmids in *Escherichia coli* producing extended-spectrum β -lactamases. *J Antimicrob Chemother*. 2008;63(1):67-71.
208. Pallecchi L, Riccobono E, Sennati S, Mantella A, Bartalesi F, Trigoso C, et al. Characterization of small ColE-like plasmids mediating widespread dissemination of the qnrB19 gene in commensal enterobacteria. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010;54(2):678-82.
209. Cao V, Lambert T, Courvalin P. ColE1-like plasmid pIP843 of *Klebsiella pneumoniae* encoding extended-spectrum beta-lactamase CTX-M-17. *Antimicrob Agents Chemother*. 2002;46(5):1212-7.
210. Carattoli A, Villa L, Feudi C, Curcio L, Orsini S, Luppi A, et al. Novel plasmid-mediated colistin resistance mcr-4 gene in *Salmonella* and *Escherichia coli*, Italy 2013, Spain and Belgium, 2015 to 2016. *Euro Surveill*. 2017;22(31).
211. Gilmour MW, Thomson NR, Sanders M, Parkhill J, Taylor DE. The complete nucleotide sequence of the resistance plasmid R478: defining the backbone components of incompatibility group H conjugative plasmids through comparative genomics. *Plasmid*. 2004;52(3):182-202.
212. Phan MD, Wain J. IncHI plasmids, a dynamic link between resistance and pathogenicity. *J Infect Dev Ctries*. 2008;2(4):272-8.
213. Egervarn M, Borjesson S, Byfors S, Finn M, Kaipe C, Englund S, et al. *Escherichia coli* with extended-spectrum beta-lactamases or transferable AmpC beta-lactamases and *Salmonella* on meat imported into Sweden. *Int J Food Microbiol*. 2014;171:8-14.

214. Dierikx C, van Essen-Zandbergen A, Veldman K, Smith H, Mevius D. Increased detection of extended spectrum beta-lactamase producing *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* isolates from poultry. *Vet Microbiol.* 2010;145(3-4):273-8.
215. Alonso G, Bruzual I, Campos J, Rodriguez-Lemoine V. Cloning and characterization of a replicon region of the IncHII plasmid pHH1457. *FEMS Microbiol Lett.* 1999;179(2):361-6.
216. Falgenhauer L, Waezsada SE, Yao Y, Imirzalioglu C, Kasbohrer A, Roesler U, et al. Colistin resistance gene *mcr-1* in extended-spectrum beta-lactamase-producing and carbapenemase-producing Gram-negative bacteria in Germany. *Lancet Infect Dis.* 2016;16(3):282-3.
217. Dolejska M, Villa L, Minoia M, Guardabassi L, Carattoli A. Complete sequences of IncH11 plasmids carrying *bla*CTX-M-1 and *qnrS1* in equine *Escherichia coli* provide new insights into plasmid evolution. *J Antimicrob Chemother.* 2014;69(9):2388-93.
218. Carattoli A. Plasmids and the spread of resistance. *Int J Med Microbiol.* 2013;303(6-7):298-304.
219. Osborn AM, da Silva Tatley FM, Steyn LM, Pickup RW, Saunders JR. Mosaic plasmids and mosaic replicons: evolutionary lessons from the analysis of genetic diversity in IncFII-related replicons. *Microbiology.* 2000;146 (Pt 9):2267-75.
220. Garcillan-Barcia MP, Francia MV, de la Cruz F. The diversity of conjugative relaxases and its application in plasmid classification. *FEMS Microbiol Rev.* 2009;33(3):657-87.
221. Francia MV, Varsaki A, Garcillán-Barcia MP, Latorre A, Drainas C, de la Cruz F. A classification scheme for mobilization regions of bacterial plasmids. *FEMS Microbiol Rev.* 2004;28(1):79-100.
222. Siguier P, Gagnevin L, Chandler M. The new IS1595 family, its relation to IS1 and the frontier between insertion sequences and transposons. *Res Microbiol.* 2009;160(3):232-41.
223. Bourque G, Burns KH, Gehring M, Gorbunova V, Seluanov A, Hammell M, et al. Ten things you should know about transposable elements. *Genome Biol.* 2018;19(1):1-12.
224. Escudero JA, Loot C, Nivina A, Mazel D. The Integron: Adaptation On Demand. *Microbiol Spectr.* 2015;3(2):MDNA3-0019-2014.
225. Partridge SR, Tsafnat G, Coiera E, Iredell JR. Gene cassettes and cassette arrays in mobile resistance integrons. *FEMS Microbiol Rev.* 2009;33(4):757-84.
226. Colavecchio A, Cadieux B, Lo A, Goodridge LD. Bacteriophages Contribute to the Spread of Antibiotic Resistance Genes among Foodborne Pathogens of the Enterobacteriaceae Family - A Review. *Front Microbiol.* 2017;8:1108.
227. Ubukata K, Konno M, Fujii R. Transduction of drug resistance to tetracycline, chloramphenicol, macrolides, lincomycin and clindamycin with phages induced from *Streptococcus pyogenes*. *J Antibiot (Tokyo).* 1975;28(9):681-8.
228. Billard-Pomares T, Fouteau S, Jacquet ME, Roche D, Barbe V, Castellanos M, et al. Characterization of a P1-like bacteriophage carrying an SHV-2 extended-spectrum beta-lactamase from an *Escherichia coli* strain. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014;58(11):6550-7.
229. Schmieger H, Schicklmaier P. Transduction of multiple drug resistance of *Salmonella enterica* serovar typhimurium DT104. *FEMS Microbiol Lett.* 1999;170(1):251-6.
230. Colomer-Lluch M, Jofre J, Muniesa M. Antibiotic resistance genes in the bacteriophage DNA fraction of environmental samples. *PLoS One.* 2011;6(3):e17549.
231. Modi SR, Lee HH, Spina CS, Collins JJ. Antibiotic treatment expands the resistance reservoir and ecological network of the phage metagenome. *Nature.* 2013;499(7457):219-22.

232. Colomer-Lluch M, Calero-Caceres W, Jebri S, Hmaied F, Muniesa M, Jofre J. Antibiotic resistance genes in bacterial and bacteriophage fractions of Tunisian and Spanish wastewaters as markers to compare the antibiotic resistance patterns in each population. *Environ Int.* 2014;73:167-75.
233. Calero-Caceres W, Melgarejo A, Colomer-Lluch M, Stoll C, Lucena F, Jofre J, et al. Sludge as a potential important source of antibiotic resistance genes in both the bacterial and bacteriophage fractions. *Environ Sci Technol.* 2014;48(13):7602-11.
234. Colomer-Lluch M, Imamovic L, Jofre J, Muniesa M. Bacteriophages carrying antibiotic resistance genes in fecal waste from cattle, pigs, and poultry. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011;55(10):4908-11.
235. Quiros P, Colomer-Lluch M, Martinez-Castillo A, Miro E, Argente M, Jofre J, et al. Antibiotic resistance genes in the bacteriophage DNA fraction of human fecal samples. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014;58(1):606-9.
236. Mazaheri Nezhad Fard R, Barton MD, Heuzenroeder MW. Bacteriophage-mediated transduction of antibiotic resistance in enterococci. *Lett Appl Microbiol.* 2011;52(6):559-64.
237. McDaniel LD, Young E, Delaney J, Ruhnau F, Ritchie KB, Paul JH. High frequency of horizontal gene transfer in the oceans. *Science.* 2010;330(6000):50.
238. van Belkum A, Tassios PT, Dijkshoorn L, Haeggman S, Cookson B, Fry NK, et al. Guidelines for the validation and application of typing methods for use in bacterial epidemiology. *Clin Microbiol Infect.* 2007;13 Suppl 3:1-46.
239. Vounba P, Yaghoubia K, Ndiaye C, Arsenault J, Fairbrother JM, Alambedji RB. Molecular Characterization of *Escherichia coli* Isolated from Chickens with Colibacillosis in Senegal. *Foodborne Pathog Dis.* 2018(Published online).
240. Coque TM, Novais A, Carattoli A, Poirel L, Pitout J, Peixe L, et al. Dissemination of clonally related *Escherichia coli* strains expressing extended-spectrum beta-lactamase CTX-M-15. *Emerg Infect Dis.* 2008;14(2):195-200.
241. Nicolas-Chanoine MH, Blanco J, Leflon-Guibout V, Demarty R, Alonso MP, Canica MM, et al. Intercontinental emergence of *Escherichia coli* clone O25:H4-ST131 producing CTX-M-15. *J Antimicrob Chemother.* 2008;61(2):273-81.
242. Nicolas-Chanoine MH, Bertrand X, Madec JY. *Escherichia coli* ST131, an intriguing clonal group. *Clin Microbiol Rev.* 2014;27(3):543-74.
243. Canton R, Coque TM. The CTX-M beta-lactamase pandemic. *Curr Opin Microbiol.* 2006;9(5):466-75.
244. Canton R, Novais A, Valverde A, Machado E, Peixe L, Baquero F, et al. Prevalence and spread of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in Europe. *Clin Microbiol Infect.* 2008;14 Suppl 1:144-53.
245. Wolny-Koladka K, Lenart-Boron A. Antimicrobial resistance and the presence of extended-spectrum beta-lactamase genes in *Escherichia coli* isolated from the environment of horse riding centers. *Environ Sci Pollut Res Int.* 2018;25(22):21789-800.
246. Ewers C, Bethe A, Stamm I, Grobbel M, Kopp PA, Guerra B, et al. CTX-M-15-D-ST648 *Escherichia coli* from companion animals and horses: another pandemic clone combining multiresistance and extraintestinal virulence? *J Antimicrob Chemother.* 2014;69(5):1224-30.
247. Sadikalay S, Reynaud Y, Guyomard-Rabenirina S, Falord M, Ducat C, Fabre L, et al. High genetic diversity of extended-spectrum beta-lactamases producing *Escherichia coli* in feces of horses. *Vet Microbiol.* 2018;219:117-22.

248. Gray JT, Hungerford LL, Fedorka-Cray PJ, Headrick ML. Extended-spectrum-cephalosporin resistance in *Salmonella enterica* isolates of animal origin. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004;48(8):3179-81.
249. Hopkins KL, Liebana E, Villa L, Batchelor M, Threlfall EJ, Carattoli A. Replicon typing of plasmids carrying CTX-M or CMY beta-lactamases circulating among *Salmonella* and *Escherichia coli* isolates. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006;50(9):3203-6.
250. Smet A, Boyen F, Pasmans F, Butaye P, Martens A, Nemeč A, et al. OXA-23-producing *Acinetobacter* species from horses: a public health hazard? *J Antimicrob Chemother*. 2012;67(12):3009-10.
251. Chung YS, Song JW, Kim DH, Shin S, Park YK, Yang SJ, et al. Isolation and characterization of antimicrobial-resistant *E. coli* from national horse racetracks and private horse-riding courses in Korea. *J Vet Sci*. 2013:199-206.
252. Lupo A, Haenni M, Saras E, Gradin J, Madec J-Y, Börjesson S. Is bla(CTX-M-1) Riding the Same Plasmid Among Horses in Sweden and France? *Microbial drug resistance (Larchmont, NY)*. 2018:10.1089/mdr.2017.0412.
253. Apostolakos I, Franz E, van Hoek AHAM, Florijn A, Veenman C, Sloet-van Oldruitenborgh-Oosterbaan MM, et al. Occurrence and molecular characteristics of ESBL/AmpC-producing *Escherichia coli* in faecal samples from horses in an equine clinic. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2017;72(7):1915-21.
254. Jakobsen L, Bortolaia V, Bielak E, Moodley A, Olsen SS, Hansen DS, et al. Limited similarity between plasmids encoding CTX-M-1 β -lactamase in *Escherichia coli* from humans, pigs, cattle, organic poultry layers and horses in Denmark. *Journal of global antimicrobial resistance*. 2015;3(2):132-6.
255. Zurfluh K, Jakobi G, Stephan R, Hächler H, Nüesch-Inderbinen M. Replicon typing of plasmids carrying blaCTX-M-1 in Enterobacteriaceae of animal, environmental and human origin. *Front Microbiol*. 2014;5:555.
256. Parvez S, Khan AU. Hospital sewage water: a reservoir for variants of New Delhi metallo- β -lactamase (NDM)-and extended-spectrum β -lactamase (ESBL)-producing Enterobacteriaceae. *Int J Antimicrob Agents*. 2018;51(1):82-8.
257. Rayamajhi N, Cha SB, Shin SW, Jung BY, Lim S-K, Yoo HS. Plasmid typing and resistance profiling of *Escherichia fergusonii* and other Enterobacteriaceae isolates from South Korean farm animals. *Appl Environ Microbiol*. 2011;77(9):3163-6.
258. Schouler C, Taki A, Chouikha I, Moulin-Schouleur M, Gilot P. A genomic island of an extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* Strain enables the metabolism of fructooligosaccharides, which improves intestinal colonization. *J Bacteriol*. 2009;191(1):388-93.
259. Cummings KJ, Perkins GA, Khatibzadeh SM, Warnick LD, Aprea VA, Altier C. Antimicrobial resistance trends among *Salmonella* isolates obtained from horses in the northeastern United States (2001-2013). *American journal of veterinary research*. 2016;77(5):505-13.
260. Johns IC, Adams EL. Trends in antimicrobial resistance in equine bacterial isolates: 1999-2012. *The Veterinary record*. 2015;176(13):334-.
261. Lupo A, Saras E, Madec J-Y, Haenni M. Emergence of bla CTX-M-55 associated with fosA, rmtB and mcr gene variants in *Escherichia coli* from various animal species in France. *J Antimicrob Chemother*. 2018;73(4):867-72.

262. Vieira DC, Lima WG, de Paiva MC. Plasmid-mediated quinolone resistance (PMQR) among Enterobacteriales in Latin America: a systematic review. *Mol Biol Rep.* 2020;47(2):1471-83.
263. Zhu Y, Dong W, Ma J, Yuan L, Hejair HM, Pan Z, et al. Characterization and virulence clustering analysis of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* isolated from swine in China. *BMC Vet Res.* 2017;13(1):94.
264. Lee WC, Yeh KS. Characteristics of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* isolated from fecal samples of piglets with diarrhea in central and southern Taiwan in 2015. *BMC Vet Res.* 2017;13(1):66.
265. Wyrsh E, Roy Chowdhury P, Abraham S, Santos J, Darling AE, Charles IG, et al. Comparative genomic analysis of a multiple antimicrobial resistant enterotoxigenic *E. coli* O157 lineage from Australian pigs. *BMC Genomics.* 2015;16:165.
266. Abraham S, Trott DJ, Jordan D, Gordon DM, Groves MD, Fairbrother JM, et al. Phylogenetic and molecular insights into the evolution of multidrug-resistant porcine enterotoxigenic *Escherichia coli* in Australia. *Int J Antimicrob Agents.* 2014;44(2):105-11.
267. Kusumoto M, Hikoda Y, Fujii Y, Murata M, Miyoshi H, Ogura Y, et al. Emergence of a Multidrug-Resistant Shiga Toxin-Producing Enterotoxigenic *Escherichia coli* Lineage in Diseased Swine in Japan. *J Clin Microbiol.* 2016;54(4):1074-81.
268. Fuzi M, Rodriguez Bano J, Toth A. Global Evolution of Pathogenic Bacteria With Extensive Use of Fluoroquinolone Agents. *Front Microbiol.* 2020;11:271.
269. Johnson JR, Johnston B, Kuskowski MA, Sokurenko EV, Tchesnokova V. Intensity and mechanisms of fluoroquinolone resistance within the H30 and H30Rx subclones of *Escherichia coli* sequence type 131 compared with other fluoroquinolone-resistant *E. coli*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015;59(8):4471-80.
270. Marcusson LL, Fridmodt-Moller N, Hughes D. Interplay in the selection of fluoroquinolone resistance and bacterial fitness. *PLoS Pathog.* 2009;5(8):e1000541.
271. Wu B, Qi Q, Zhang X, Cai Y, Yu G, Lv J, et al. Dissemination of *Escherichia coli* carrying plasmid-mediated quinolone resistance (PMQR) genes from swine farms to surroundings. *The Science of the total environment.* 2019;665:33-40.
272. Yeh J-C, Lo D-Y, Chang S-K, Chou C-C, Kuo H-C. Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance in *Escherichia coli* isolated from diseased animals in Taiwan. *The Journal of veterinary medical science.* 2017;79(4):730-5.
273. Hu YS, Shin S, Park YH, Park KT. Prevalence and Mechanism of Fluoroquinolone Resistance in *Escherichia coli* Isolated from Swine Feces in Korea. *J Food Prot.* 2017;80(7):1145-51.
274. Todorović D, Velhner M, Grego E, Vidanović D, Milanov D, Krnjaić D, et al. Molecular Characterization of Multidrug-Resistant *Escherichia coli* Isolates from Bovine Clinical Mastitis and Pigs in the Vojvodina Province, Serbia. *Microbial drug resistance (Larchmont, NY).* 2018;24(1):95-103.
275. Zurfluh K, Cernela N, Stephan R. Quinolone resistance mechanisms among extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing *Escherichia coli* isolated from farm animals in Switzerland. *Schweiz Arch Tierheilkd.* 2015;157(1):59-62.
276. Engl C. Noise in bacterial gene expression. *Biochem Soc Trans.* 2019;47(1):209-17.
277. Wales AD, Davies RH. Co-Selection of Resistance to Antibiotics, Biocides and Heavy Metals, and Its Relevance to Foodborne Pathogens. *Antibiotics (Basel, Switzerland).* 2015;4(4):567-604.

278. Husnik F, McCutcheon JP. Functional horizontal gene transfer from bacteria to eukaryotes. *Nature Reviews Microbiology*. 2018;16(2):67-79.
279. Murphy CP, Carson C, Smith BA, Chapman B, Marrotte J, McCann M, et al. Factors potentially linked with the occurrence of antimicrobial resistance in selected bacteria from cattle, chickens and pigs: A scoping review of publications for use in modelling of antimicrobial resistance (IAM.AMR Project). *Zoonoses Public Health*. 2018;65(8):957-71.
280. Ukah UV, Glass M, Avery B, Daignault D, Mulvey MR, Reid-Smith RJ, et al. Risk factors for acquisition of multidrug-resistant *Escherichia coli* and development of community-acquired urinary tract infections. *Epidemiol Infect*. 2018;146(1):46-57.
281. Trageser LA, Wittum TE, Funk JA, Winokur PL, Rajala-Schultz PJ. Association between ceftiofur use and isolation of *Escherichia coli* with reduced susceptibility to ceftriaxone from fecal samples of dairy cows. *Am J Vet Res*. 2006;67(10):1696-700.
282. Saputra S, Jordan D, Mitchell T, Wong HS, Abraham RJ, Kidsley A, et al. Antimicrobial resistance in clinical *Escherichia coli* isolated from companion animals in Australia. *Vet Microbiol*. 2017;211:43-50.
283. Simoneit C, Burow E, Tenhagen BA, Kasbohrer A. Oral administration of antimicrobials increase antimicrobial resistance in *E. coli* from chicken--a systematic review. *Prev Vet Med*. 2015;118(1):1-7.
284. Burow E, Simoneit C, Tenhagen BA, Kasbohrer A. Oral antimicrobials increase antimicrobial resistance in porcine *E. coli*--a systematic review. *Prev Vet Med*. 2014;113(4):364-75.
285. Kanwar N, Scott HM, Norby B, Loneragan GH, Vinasco J, Cottell JL, et al. Impact of treatment strategies on cephalosporin and tetracycline resistance gene quantities in the bovine fecal metagenome. *Sci Rep*. 2014;4:5100.
286. Leflon-Guibout V, Ternat G, Heym B, Nicolas-Chanoine MH. Exposure to co-amoxiclav as a risk factor for co-amoxiclav-resistant *Escherichia coli* urinary tract infection. *J Antimicrob Chemother*. 2002;49(2):367-71.
287. SanMiguel AJ, Meisel JS, Horwinski J, Zheng Q, Grice EA. Topical antimicrobial treatments can elicit shifts to resident skin bacterial communities and reduce colonization by *Staphylococcus aureus* competitors. *Antimicrob Agents Chemother*. 2017;61(9):e00774-17.
288. Johns I, Verheyen K, Good L, Rycroft A. Antimicrobial resistance in faecal *Escherichia coli* isolates from horses treated with antimicrobials: a longitudinal study in hospitalised and non-hospitalised horses. *Vet Microbiol*. 2012;159(3-4):381-9.
289. Maddox TW, Pinchbeck GL, Clegg PD, Wedley AL, Dawson S, Williams NJ. Cross-sectional study of antimicrobial-resistant bacteria in horses. Part 2: Risk factors for faecal carriage of antimicrobial-resistant *Escherichia coli* in horses. *Equine Vet J*. 2012;44(3):297-303.
290. Burow E, Simoneit C, Tenhagen B-A, Käsbohrer A. Oral antimicrobials increase antimicrobial resistance in porcine *E. coli*--A systematic review. *Preventive veterinary medicine*. 2014;113(4):364-75.
291. Agency EM. Sales of veterinary antimicrobial agents in 30 European countries in 2015. *European Surveillance of Veterinary Antimicrobial Consumption*; 2017.
292. Rosengren LB, Waldner CL, Reid-Smith RJ, Dowling PM, Harding JC. Associations between feed and water antimicrobial use in farrow-to-finish swine herds and antimicrobial resistance of fecal *Escherichia coli* from grow-finish pigs. *Microb Drug Resist*. 2007;13(4):261-69.

293. Vieira AR, Houe H, Wegener HC, Lo Fo Wong DM, Emborg HD. Association between tetracycline consumption and tetracycline resistance in *Escherichia coli* from healthy Danish slaughter pigs. *Foodborne Pathog Dis.* 2009;6(1):99-109.
294. Taylor NM, Clifton-Hadley FA, Wales AD, Ridley A, Davies RH. Farm-level risk factors for fluoroquinolone resistance in *E. coli* and thermophilic *Campylobacter* spp. on finisher pig farms. *Epidemiol Infect.* 2009;137(8):1121-34.
295. Taylor NM, Davies RH, Ridley A, Clouting C, Wales AD, Clifton-Hadley FA. A survey of fluoroquinolone resistance in *Escherichia coli* and thermophilic *Campylobacter* spp. on poultry and pig farms in Great Britain. *J Appl Microbiol.* 2008;105(5):1421-31.
296. Lutz EA, McCarty MJ, Mollenkopf DF, Funk JA, Gebreyes WA, Wittum TE. Ceftiofur use in finishing swine barns and the recovery of fecal *Escherichia coli* or *Salmonella* spp. resistant to ceftriaxone. *Foodborne Pathog Dis.* 2011;8(11):1229-34.
297. Mathew AG, Arnett DB, Cullen P, Ebner PD. Characterization of resistance patterns and detection of apramycin resistance genes in *Escherichia coli* isolated from swine exposed to various environmental conditions. *Int J Food Microbiol.* 2003;89(1):11-20.
298. Langlois BE, Dawson KA, Stahly TS, Cromwell GL. Antibiotic resistance of fecal coliforms from swine fed subtherapeutic and therapeutic levels of chlortetracycline. *J Anim Sci.* 1984;58(3):666-74.
299. Akwar HT, Poppe C, Wilson J, Reid-Smith RJ, Dyck M, Waddington J, et al. Associations of antimicrobial uses with antimicrobial resistance of fecal *Escherichia coli* from pigs on 47 farrow-to-finish farms in Ontario and British Columbia. *Can J Vet Res.* 2008;72(2):202-10.
300. Dunlop RH, McEwen SA, Meek AH, Clarke RC, Black WD, Friendship RM. Associations among antimicrobial drug treatments and antimicrobial resistance of fecal *Escherichia coli* of swine on 34 farrow-to-finish farms in Ontario, Canada. *Prev Vet Med.* 1998;34(4):283-305.
301. Mathew AG, Jackson F, Saxton AM. Effects of antibiotic regimens on resistance of *Escherichia coli* and *Salmonella* serovar Typhimurium in swine. *Journal of Swine Health and Production.* 2002;10(1):7-13.
302. Wagner BA, Straw BE, Fedorka-Cray PJ, Dargatz DA. Effect of antimicrobial dosage regimen on *Salmonella* and *Escherichia coli* isolates from feeder swine. *Appl Environ Microbiol.* 2008;74(6):1731-9.
303. Alali WQ, Scott HM, Harvey RB, Norby B, Lawhorn DB, Pillai SD. Longitudinal study of antimicrobial resistance among *Escherichia coli* isolates from integrated multisite cohorts of humans and swine. *Appl Environ Microbiol.* 2008;74(12):3672-81.
304. Dewulf J, Catry B, Timmerman T, Opsomer G, de Kruif A, Maes D. Tetracycline-resistance in lactose-positive enteric coliforms originating from Belgian fattening pigs: degree of resistance, multiple resistance and risk factors. *Prev Vet Med.* 2007;78(3-4):339-51.
305. Akwar HT, Poppe C, Wilson J, Reid-Smith RJ, Dyck M, Waddington J, et al. Prevalence and patterns of antimicrobial resistance of fecal *Escherichia coli* among pigs on 47 farrow-to-finish farms with different in-feed medication policies in Ontario and British Columbia. *Can J Vet Res.* 2008;72(2):195-201.
306. Varga C, Rajic A, McFall ME, Reid-Smith RJ, Deckert AE, Checkley SL, et al. Associations between reported on-farm antimicrobial use practices and observed antimicrobial resistance in generic fecal *Escherichia coli* isolated from Alberta finishing swine farms. *Prev Vet Med.* 2009;88(3):185-92.
307. Alali WQ, Scott HM, Christian KL, Fajt VR, Harvey RB, Lawhorn DB. Relationship between level of antibiotic use and resistance among *Escherichia coli* isolates from integrated multi-site cohorts of humans and swine. *Prev Vet Med.* 2009;90(3-4):160-7.

308. World Health Organization. Antimicrobial resistance: global report on surveillance. . World Health Organization; 2014. Report No.: 9241564741.
309. van Spijk J, Schmitt S, Schoster A. Infections caused by multidrug-resistant bacteria in an equine hospital (2012–2015). *Equine Veterinary Education*. 2017:Epub.
310. Jokisalo J, Bryan J, Legget B, Abbott Y, Katz L. Multiple-drug resistant *Acinetobacter baumannii* bronchopneumonia in a colt following intensive care treatment. *Equine Veterinary Education*. 2010;22(6):281-6.
311. Rubin JE, Pitout JD. Extended-spectrum beta-lactamase, carbapenemase and AmpC producing *Enterobacteriaceae* in companion animals. *Vet Microbiol*. 2014;170(1-2):10-8.
312. Chevance A, Moulin G. Suivi des ventes de médicaments vétérinaires contenant des antibiotiques en France en 2013. Volumes et estimation de l'exposition des animaux aux antibiotiques. 2014.
313. Mathers AJ, Peirano G, Pitout JD. The role of epidemic resistance plasmids and international high-risk clones in the spread of multidrug-resistant *Enterobacteriaceae*. *Clin Microbiol Rev*. 2015;28(3):565-91.
314. Carattoli A. Plasmids in Gram negatives: molecular typing of resistance plasmids. *Int J Med Microbiol*. 2011;301(8):654-8.
315. Huijbers PM, de Kraker M, Graat EA, van Hoek AH, van Santen MG, de Jong MC, et al. Prevalence of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in humans living in municipalities with high and low broiler density. *Clin Microbiol Infect*. 2013;19(6):E256-9.
316. Yang Y, Zhang A, Lei C, Wang H, Guan Z, Xu C, et al. Characteristics of plasmids coharboring 16S rRNA methylases, CTX-M, and virulence factors in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates from chickens in China. *Foodborne Pathog Dis*. 2015;12(11):873-80.
317. Van Duijkeren E, Van Asten A, Gaastra W. Characterization of *Escherichia coli* isolated from adult horses with and without enteritis. *Vet Q*. 2000;22(3):162-6.
318. Salle G, Cortet J, Bois I, Dubes C, Guyot-Sionest Q, Larrieu C, et al. Risk factor analysis of equine strongyle resistance to anthelmintics. *Int J Parasitol Drugs Drug Resist*. 2017;7(3):407-15.
319. Traub WH, Raymond EA, Linehan J. Identification of *Enterobacteriaceae* in the clinical microbiology laboratory. *Appl Microbiol*. 1970;20(3):303-8.
320. Martins MT, Rivera IG, Clark DL, Stewart MH, Wolfe RL, Olson BH. Distribution of *uidA* gene sequences in *Escherichia coli* isolates in water sources and comparison with the expression of beta-glucuronidase activity in 4-methylumbelliferyl-beta-D-glucuronide media. *Appl Environ Microbiol*. 1993;59(7):2271-6.
321. Maluta RP, Fairbrother JM, Stella AE, Rigobelo EC, Martinez R, de Avila FA. Potentially pathogenic *Escherichia coli* in healthy, pasture-raised sheep on farms and at the abattoir in Brazil. *Vet Microbiol*. 2014;169(1-2):89-95.
322. Mataseje L, Bryce E, Roscoe D, Boyd D, Embree J, Gravel D, et al. Carbapenem-resistant gram-negative bacilli in Canada 2009–10: results from the Canadian Nosocomial Infection Surveillance program (CNISP). *Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2012;67(6):1359-67.
323. Borgogna TR, Borgogna JL, Mielke JA, Brown CJ, Top EM, Botts RT, et al. High Diversity of CTX-M Extended-Spectrum beta-Lactamases in municipal wastewater and urban Wetlands. *Microb Drug Resist*. 2016;22(4):312-20.
324. Agero Y, Aarestrup FM, Pedersen K, Seyfarth AM, Struve T, Hasman H. Prevalence of extended-spectrum cephalosporinase (ESC)-producing *Escherichia coli* in Danish slaughter

- pigs and retail meat identified by selective enrichment and association with cephalosporin usage. *J Antimicrob Chemother.* 2012;67(3):582-8.
325. Hammerum AM, Larsen J, Andersen VD, Lester CH, Skovgaard Skytte TS, Hansen F, et al. Characterization of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing *Escherichia coli* obtained from Danish pigs, pig farmers and their families from farms with high or no consumption of third- or fourth-generation cephalosporins. *J Antimicrob Chemother.* 2014;69(10):2650-7.
326. Adams RJ, Kim SS, Mollenkopf DF, Mathys DA, Schuenemann GM, Daniels JB, et al. Antimicrobial-resistant *Enterobacteriaceae* recovered from companion animal and livestock environments. *Zoonoses Public Health.* 2018;Aug((5)):519-27.
327. Dierikx CM, van Duijkeren E, Schoormans AH, van Essen-Zandbergen A, Veldman K, Kant A, et al. Occurrence and characteristics of extended-spectrum-beta-lactamase- and AmpC-producing clinical isolates derived from companion animals and horses. *J Antimicrob Chemother.* 2012;67(6):1368-74.
328. Robert J, Cambau E, Grenet K, Trystram D, Pean Y, Fievet MH, et al. Trends in quinolone susceptibility of *Enterobacteriaceae* among inpatients of a large university hospital: 1992-98. *Clin Microbiol Infect.* 2001;7(10):553-61.
329. Andersson DI, Hughes D. Antibiotic resistance and its cost: is it possible to reverse resistance? *Nat Rev Microbiol.* 2010;8(4):260-71.
330. Woerther PL, Burdet C, Chachaty E, Andremont A. Trends in human fecal carriage of extended-spectrum beta-lactamases in the community: toward the globalization of CTX-M. *Clin Microbiol Rev.* 2013;26(4):744-58.
331. EFSA. The European Union summary report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2015. *EFSA Journal.* 2017;15:4694.
332. Walther B, Klein KS, Barton AK, Semmler T, Huber C, Wolf SA, et al. Extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing *Escherichia coli* and *Acinetobacter baumannii* among horses entering a veterinary teaching hospital: The contemporary "Trojan Horse". *PLoS One.* 2018;13(1):e0191873.
333. de Lagarde M, Larrieu C, Praud K, Schouler C, Doublet B, Salle G, et al. Prevalence, risk factors, and characterization of multidrug resistant and extended spectrum beta-lactamase/AmpC beta-lactamase producing *Escherichia coli* in healthy horses in France in 2015. *J Vet Intern Med.* 2019;33(2):902-11.
334. Doublet B, Praud K, Nguyen-Ho-Bao T, Argudín MA, Bertrand S, Butaye P, et al. Extended-spectrum β -lactamase-and AmpC β -lactamase-producing D-tartrate-positive *Salmonella enterica* serovar Paratyphi B from broilers and human patients in Belgium, 2008–10. *J Antimicrob Chemother.* 2014;69(5):1257-64.
335. Carloni E, Andreoni F, Omiccioli E, Villa L, Magnani M, Carattoli A. Comparative analysis of the standard PCR-Based Replicon Typing (PBRT) with the commercial PBRT-KIT. *Plasmid.* 2017;90:10-4.
336. Cain AK, Hall RM. Evolution of IncHI1 plasmids: two distinct lineages. *Plasmid.* 2013;70(2):201-8.
337. Dobiasova H, Dolejska M. Prevalence and diversity of IncX plasmids carrying fluoroquinolone and β -lactam resistance genes in *Escherichia coli* originating from diverse sources and geographical areas. *J Antimicrob Chemother.* 2016;71(8):2118-24.
338. Porcheron G, Kut E, Canepa S, Maurel MC, Schouler C. Regulation of fructooligosaccharide metabolism in an extra-intestinal pathogenic *Escherichia coli* strain. *Mol Microbiol.* 2011;81(3):717-33.

339. Hariharan H, Barnum DA, Mitchell WR. Drug resistance among pathogenic bacteria from animals in Ontario. *Can J Comp Med.* 1974;38(3):213-21.
340. Giguere S, Berghaus LJ, Willingham-Lane JM. Antimicrobial Resistance in *Rhodococcus equi*. *Microbiol Spectr.* 2017;5(5).
341. Aarestrup FM, Hasman H, Veldman K, Mevius D. Evaluation of eight different cephalosporins for detection of cephalosporin resistance in *Salmonella enterica* and *Escherichia coli*. *Microb Drug Resist.* 2010;16(4):253-61.
342. Government of Canada. Canadian Antimicrobial resistance surveillance systeme - Report. In: Public Health Agency Canada, editor. <http://publications.gc.ca/pub?id=9.512584&sl=12016>.
343. Johns IC, Adams EL. Trends in antimicrobial resistance in equine bacterial isolates: 1999-2012. *Vet Rec.* 2015;176(13):334.
344. Barbier F, Pommier C, Essaïed W, Garrouste-Orgeas M, Schwebel C, Ruckly S, et al. Colonization and infection with extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae in ICU patients: what impact on outcomes and carbapenem exposure? *The Journal of antimicrobial chemotherapy.* 2016;71(4):1088-97.
345. Health Canada. Categorization of Antimicrobial Drugs Based on Importance in Human Medicine. In: <https://www.canada.ca/en/health-canada/services/drugs-health-products/veterinary-drugs/antimicrobial-resistance/categorization-antimicrobial-drugs-based-importance-human-medicine.html>, editor. 2009.
346. World Health Organization. Critically important antimicrobials for human medicine: ranking of antimicrobial agents for risk management of antimicrobial resistance due to non-human use. 2017.
347. Decret 1110-2018. Loi sur la protection des animaux (chapitre P-42), (2018).
348. Murphy C, Reid-Smith RJ, Prescott JF, Bonnett BN, Poppe C, Boerlin P, et al. Occurrence of antimicrobial resistant bacteria in healthy dogs and cats presented to private veterinary hospitals in southern Ontario: A preliminary study. *Can Vet J.* 2009;50(10):1047-53.
349. Zhang PLC, Shen X, Chalmers G, Reid-Smith RJ, Slavic D, Dick H, et al. Prevalence and mechanisms of extended-spectrum cephalosporin resistance in clinical and fecal Enterobacteriaceae isolates from dogs in Ontario, Canada. *Vet Microbiol.* 2018;213:82-8.
350. Timonin ME, Poissant J, McLoughlin PD, Hedlin CE, Rubin JE. A survey of the antimicrobial susceptibility of *Escherichia coli* isolated from Sable Island horses. *Can J Microbiol.* 2017;63(3):246-51.
351. Verrette L, Fairbrother JM, Boulianne M. Effect of Cessation of Ceftiofur and Substitution with Lincomycin-Spectinomycin on Extended-Spectrum-beta-Lactamase/AmpC Genes and Multidrug Resistance in *Escherichia coli* from a Canadian Broiler Production Pyramid. *Appl Environ Microbiol.* 2019;85(13).
352. Allen KJ, Poppe C. Occurrence and characterization of resistance to extended-spectrum cephalosporins mediated by beta-lactamase CMY-2 in *Salmonella* isolated from food-producing animals in Canada. *Can J Vet Res.* 2002;66(3):137-44.
353. Peirano G, Costello M, Pitout JD. Molecular characteristics of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* from the Chicago area: high prevalence of ST131 producing CTX-M-15 in community hospitals. *Int J Antimicrob Agents.* 2010;36(1):19-23.
354. WHO (World Health Organisation). One Health [<https://www.who.int/features/qa/one-health/en/>]. 2017 [cited <https://www.who.int/features/qa/one-health/en/>]. <https://www.who.int/features/qa/one-health/en/>.

<https://www.who.int/features/qa/one-health/en/>. [https://www.who.int/features/qa/one-health/en/]. Available from: <https://www.who.int/features/qa/one-health/en/>.

355. Jacoby GA. Mechanisms of resistance to quinolones. *Clin Infect Dis*. 2005;41 Suppl 2:S120-6.
356. Aslam M, Checkley S, Avery B, Chalmers G, Bohaychuk V, Gensler G, et al. Phenotypic and genetic characterization of antimicrobial resistance in *Salmonella* serovars isolated from retail meats in Alberta, Canada. *Food Microbiol*. 2012;32(1):110-7.
357. Zimmerman JJ, Karriker LA, Ramirez A, Schwartz KJ, Stevenson GW, Zhang J. *Diseases of swine*, 11th edition. Hoboken NJ. ed: John Wiley & Sons, Inc; 2019.
358. Nyholm O, Halkilahti J, Wiklund G, Okeke U, Paulin L, Auvinen P, et al. Comparative Genomics and Characterization of Hybrid Shigatoxigenic and Enterotoxigenic *Escherichia coli* (STEC/ETEC) Strains. *PLoS One*. 2015;10(8):e0135936-e.
359. Hoelzer K, Wong N, Thomas J, Talkington K, Jungman E, Coukell A. Antimicrobial drug use in food-producing animals and associated human health risks: what, and how strong, is the evidence? *BMC Vet Res*. 2017;13(1):211.
360. CLSI. Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals—third edition. CLSI supplement VET01S. 2015(Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute).
361. CLSI. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: twenty-fifth informational supplement. CLSI document M100-S25. 2015(Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute).
362. Kulldorff M. A spatial scan statistic. *Communications in Statistics - Theory and Methods*. 1997;26(6):1481-96.
363. Ribot EM, Fair MA, Gautom R, Cameron DN, Hunter SB, Swaminathan B, et al. Standardization of pulsed-field gel electrophoresis protocols for the subtyping of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, and *Shigella* for PulseNet. *Foodborne Pathog Dis*. 2006;3(1):59-67.
364. Luppi A, Gibellini M, Gin T, Vangroenweghe F, Vandenbroucke V, Bauerfeind R, et al. Prevalence of virulence factors in enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated from pigs with post-weaning diarrhoea in Europe. *Porcine Health Manag*. 2016;2:20.
365. Do KH, Byun JW, Lee WK. Prevalence of O-serogroups, virulence genes, and F18 antigenic variants in *Escherichia coli* isolated from weaned piglets with diarrhea in Korea during 2008-2016. *J Vet Sci*. 2019;20(1):43-50.
366. Yang GY, Guo L, Su JH, Zhu YH, Jiao LG, Wang JF. Frequency of Diarrheagenic Virulence Genes and Characteristics in *Escherichia coli* Isolates from Pigs with Diarrhea in China. *Microorganisms*. 2019;7(9).
367. Bessone FA, Bessone G, Marini S, Conde MB, Alustiza FE, Zielinski G. Presence and characterization of *Escherichia coli* virulence genes isolated from diseased pigs in the central region of Argentina. *Veterinary world*. 2017;10(8):939-45.
368. Van Breda LK, Dhungyel OP, Ginn AN, Iredell JR, Ward MP. Pre- and post-weaning scours in southeastern Australia: A survey of 22 commercial pig herds and characterisation of *Escherichia coli* isolates. *PLoS One*. 2017;12(3):e0172528.
369. Barton BM, Harding GP, Zuccarelli AJ. A general method for detecting and sizing large plasmids. *Anal Biochem*. 1995;226(2):235-40.
370. Hillis DM, Huelsenbeck JP, Cunningham CW. Application and accuracy of molecular phylogenies. *Science*. 1994;264(5159):671-7.

371. Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol.* 1995;33(9):2233.
372. Woodford N, Ward ME, Kaufmann ME, Turton J, Fagan EJ, James D, et al. Community and hospital spread of *Escherichia coli* producing CTX-M extended-spectrum beta-lactamases in the UK. *J Antimicrob Chemother.* 2004;54(4):735-43.
373. Lau SH, Kaufmann ME, Livermore DM, Woodford N, Willshaw GA, Cheasty T, et al. UK epidemic *Escherichia coli* strains A-E, with CTX-M-15 beta-lactamase, all belong to the international O25:H4-ST131 clone. *J Antimicrob Chemother.* 2008;62(6):1241-4.
374. Baquero F, Coque TM. Multilevel population genetics in antibiotic resistance. *FEMS Microbiol Rev.* 2011;35(5):705-6.
375. Willems RJ, Hanage WP, Bessen DE, Feil EJ. Population biology of Gram-positive pathogens: high-risk clones for dissemination of antibiotic resistance. *FEMS Microbiol Rev.* 2011;35(5):872-900.
376. Woodford N, Turton JF, Livermore DM. Multiresistant Gram-negative bacteria: the role of high-risk clones in the dissemination of antibiotic resistance. *FEMS Microbiol Rev.* 2011;35(5):736-55.
377. World Health Organization. Antimicrobial resistance: global report on surveillance: World Health Organization; 2014.
378. Shomaker S. OneHealth: A Paradigm for Interdisciplinary Collaboration. *Acad Med.* 2014.
379. Johnson JR, Porter SB, Thuras P, Johnson TJ, Price LB, Tchesnokova V, et al. Greater Ciprofloxacin Tolerance as a Possible Selectable Phenotype Underlying the Pandemic Spread of the H30 Subclone of *Escherichia coli* Sequence Type 131. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015;59(11):7132.
380. de Lagarde M, Vanier G, Desmarais G, Kohan-Ghadr HR, Arsenault J, Fairbrother JM. A new multidrug-resistant Enterotoxigenic *Escherichia coli* Pulsed-Field Gel Electrophoresis cluster associated with enrofloxacin non-susceptibility in diseased pigs. *J Appl Microbiol.* 2020.
381. Kaspersen H, Urdahl AM, Grontvedt CA, Gulliksen SM, Tesfamichael B, Slette-meas JS, et al. *Actinobacillus pleuropneumoniae* Eradication with Enrofloxacin May Lead to Dissemination and Long-Term Persistence of Quinolone Resistant *Escherichia coli* in Pig Herds. *Antibiotics (Basel).* 2020;9(12).
382. Hayer SS, Lim S, Hong S, Elnekave E, Johnson T, Rovira A, et al. Genetic Determinants of Resistance to Extended-Spectrum Cephalosporin and Fluoroquinolone in *Escherichia coli* Isolated from Diseased Pigs in the United States. *mSphere.* 2020;5(5).
383. Afgan E, Baker D, Van den Beek M, Blankenberg D, Bouvier D, Čech M, et al. The Galaxy platform for accessible, reproducible and collaborative biomedical analyses: 2016 update. *Nucleic Acids Res.* 2016;44(W1):W3-W10.
384. Andrews S. FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data. Babraham Bioinformatics, Babraham Institute, Cambridge, United Kingdom; 2010.
385. Ewels P, Magnusson M, Lundin S, Källner M. MultiQC: summarize analysis results for multiple tools and samples in a single report. *Bioinformatics.* 2016;32(19):3047-8.
386. Bankevich A, Nurk S, Antipov D, Gurevich AA, Dvorkin M, Kulikov AS, et al. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *J Comput Biol.* 2012;19(5):455-77.
387. Mikheenko A, Prjibelski A, Saveliev V, Antipov D, Gurevich A. Versatile genome assembly evaluation with QUAST-LG. *Bioinformatics* 34: i142–i150. 2018.

388. Roer L, Tchesnokova V, Allesøe R, Muradova M, Chattopadhyay S, Ahrenfeldt J, et al. Development of a Web Tool for Escherichia coli Subtyping Based on fimH Alleles. *J Clin Microbiol*. 2017;55(8):2538-43.
389. Beghain J, Bridier-Nahmias A, Le Nagard H, Denamur E, Clermont O. ClermonTyping: an easy-to-use and accurate in silico method for Escherichia genus strain phylotyping. *Microbial genomics*. 2018;4(7).
390. Gupta SK, Padmanabhan BR, Diene SM, Lopez-Rojas R, Kempf M, Landraud L, et al. ARG-ANNOT, a New Bioinformatic Tool To Discover Antibiotic Resistance Genes in Bacterial Genomes. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014;58(1):212-20.
391. Zankari E, Hasman H, Cosentino S, Vestergaard M, Rasmussen S, Lund O, et al. Identification of acquired antimicrobial resistance genes. *J Antimicrob Chemother*. 2012;67(11):2640-4.
392. Bortolaia V, Kaas RS, Ruppe E, Roberts MC, Schwarz S, Cattoir V, et al. ResFinder 4.0 for predictions of phenotypes from genotypes. *J Antimicrob Chemother*. 2020.
393. Inouye M, Dashnow H, Raven LA, Schultz MB, Pope BJ, Tomita T, et al. SRST2: Rapid genomic surveillance for public health and hospital microbiology labs. *Genome Med*. 2014;6(11):90.
394. Aparicio-Puerta E, Lebrón R, Rueda A, Gómez-Martín C, Giannoukakos S, Jaspez D, et al. sRNAbench and sRNAtoolbox 2019: intuitive fast small RNA profiling and differential expression. *Nucleic Acids Res*. 2019;47(W1):W530-W5.
395. Croucher NJ, Harris SR, Grad YH, Hanage WP. Bacterial genomes in epidemiology--present and future. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2013;368(1614):20120202.
396. Croucher NJ, Page AJ, Connor TR, Delaney AJ, Keane JA, Bentley SD, et al. Rapid phylogenetic analysis of large samples of recombinant bacterial whole genome sequences using Gubbins. *Nucleic Acids Res*. 2014;43(3):e15-e.
397. Letunic I, Bork P. Interactive tree of life (iTOL) v3: an online tool for the display and annotation of phylogenetic and other trees. *Nucleic Acids Res*. 2016;44(W1):W242-W5.
398. Grad YH, Lipsitch M, Feldgarden M, Arachchi HM, Cerqueira GC, FitzGerald M, et al. Genomic epidemiology of the Escherichia coli O104: H4 outbreaks in Europe, 2011. *Proceedings of the national academy of sciences*. 2012;109(8):3065-70.
399. Zhou Z, Alikhan NF, Mohamed K, Fan Y, Agama Study G, Achtman M. The Enterobase user's guide, with case studies on Salmonella transmissions, Yersinia pestis phylogeny, and Escherichia core genomic diversity. *Genome Res*. 2020;30(1):138-52.
400. Baquero F, Tedim AP, Coque TM. Antibiotic resistance shaping multi-level population biology of bacteria. *Front Microbiol*. 2013;4:15.
401. Wang L, Crameri G. Emerging zoonotic viral diseases. *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)*. 2014;33:569-81.
402. Falkow S. Is Persistent Bacterial Infection Good for Your Health? *Cell*. 2006;124(4):699-702.
403. Blackburn JK, Ganz HH, Ponciano JM, Turner WC, Ryan SJ, Kamath P, et al. Modeling R(0) for Pathogens with Environmental Transmission: Animal Movements, Pathogen Populations, and Local Infectious Zones. *Int J Environ Res Public Health*. 2019;16(6).
404. Vingopoulou EI, Siarkou VI, Batzias G, Kaltsogianni F, Sianou E, Tzavaras I, et al. Emergence and maintenance of multidrug-resistant Escherichia coli of canine origin harbouring a bla_{CMY-2}-IncI1/ST65 plasmid and topoisomerase mutations. *J Antimicrob Chemother*. 2014;69(8):2076-80.

405. van der Putten BCL, Remondini D, Pasquini G, Janes VA, Matamoros S, Schultsz C. Quantifying the contribution of four resistance mechanisms to ciprofloxacin MIC in *Escherichia coli*: a systematic review. *J Antimicrob Chemother.* 2018;74(2):298-310.
406. Carattoli A. Resistance plasmid families in Enterobacteriaceae. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009;53(6):2227-38.
407. Garnett JA, Martínez-Santos VI, Saldaña Z, Pape T, Hawthorne W, Chan J, et al. Structural insights into the biogenesis and biofilm formation by the *Escherichia coli* common pilus. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 2012;109(10):3950-5.
408. Xicohtencatl-Cortes J, Monteiro-Neto V, Saldaña Z, Ledesma MA, Puente JL, Girón JA. The Type 4 Pili of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 Are Multipurpose Structures with Pathogenic Attributes. *J Bacteriol.* 2009;191(1):411-21.
409. Journet L, Cascales E. The type VI secretion system in *Escherichia coli* and related species. 2016.
410. Krishnan S, Prasadarao NV. Outer membrane protein A and OprF: versatile roles in Gram-negative bacterial infections. *FEBS J.* 2012;279(6):919-31.
411. Sniegowski PD, Gerrish PJ, Lenski RE. Evolution of high mutation rates in experimental populations of *E. coli*. *Nature.* 1997;387(6634):703-5.
412. Deurenberg RH, Bathoorn E, Chlebowicz MA, Couto N, Ferdous M, Garcia-Cobos S, et al. Application of next generation sequencing in clinical microbiology and infection prevention. *J Biotechnol.* 2017;243:16-24.
413. Schurch AC, Arredondo-Alonso S, Willems RJL, Goering RV. Whole genome sequencing options for bacterial strain typing and epidemiologic analysis based on single nucleotide polymorphism versus gene-by-gene-based approaches. *Clin Microbiol Infect.* 2018;24(4):350-4.
414. Drummond AJ, Suchard MA, Xie D, Rambaut A. Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. *Mol Biol Evol.* 2012;29(8):1969-73.
415. Fuzi M. Dissimilar Fitness Associated with Resistance to Fluoroquinolones Influences Clonal Dynamics of Various Multiresistant Bacteria. *Front Microbiol.* 2016;7:1017.
416. Fűzi M. Has the use of fluoroquinolones facilitated the widespread dissemination of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and extended-spectrum β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in the healthcare setting? *Acta Microbiol Immunol Hung.* 2014;61(4):399-405.
417. Williams JJ, Hergenrother PJ. Exposing plasmids as the Achilles' heel of drug-resistant bacteria. *Curr Opin Chem Biol.* 2008;12(4):389-99.
418. Getino M, Fernandez-Lopez R, Palencia-Gandara C, Campos-Gomez J, Sanchez-Lopez JM, Martinez M, et al. Tanzawaic Acids, a Chemically Novel Set of Bacterial Conjugation Inhibitors. *PLoS One.* 2016;11(1):e0148098.
419. Ngara TR, Zhang H. Recent Advances in Function-based Metagenomic Screening. *Genomics Proteomics Bioinformatics.* 2018;16(6):405-15.
420. Smith A, Wayne AS, Fellman CL, Rosenbaum MH. Usage patterns of carbapenem antimicrobials in dogs and cats at a veterinary tertiary care hospital. *J Vet Intern Med.* 2019;33(4):1677-85.
421. Kock R, Daniels-Haardt I, Becker K, Mellmann A, Friedrich AW, Mevius D, et al. Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae in wildlife, food-producing, and companion animals: a systematic review. *Clin Microbiol Infect.* 2018;24(12):1241-50.

422. Wang H, Li X, Liu BT. Occurrence and characterization of KPC-2-producing ST11 *Klebsiella pneumoniae* isolate and NDM-5-producing *Escherichia coli* isolate from the same horse of equestrian clubs in China. *Transbound Emerg Dis*. 2020.
423. Gentilini F, Turba ME, Pasquali F, Mion D, Romagnoli N, Zambon E, et al. Hospitalized Pets as a Source of Carbapenem-Resistance. *Front Microbiol*. 2018;9:2872.
424. Köck R, Daniels-Haardt I, Becker K, Mellmann A, Friedrich AW, Mevius D, et al. Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae in wildlife, food-producing, and companion animals: a systematic review. *Clin Microbiol Infect*. 2018;24(12):1241-50.
425. Nation RL, Garonzik SM, Thamlikitkul V, Giamarellos-Bourboulis EJ, Forrest A, Paterson DL, et al. Dosing Guidance for Intravenous Colistin in Critically Ill Patients. *Clin Infect Dis*. 2017;64(5):565-71.
426. Olaitan AO, Morand S, Rolain JM. Mechanisms of polymyxin resistance: acquired and intrinsic resistance in bacteria. *Front Microbiol*. 2014;5.
427. Liu YY, Wang Y, Walsh TR, Yi LX, Zhang R, Spencer J, et al. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. *Lancet Infect Dis*. 2016;16(2):161-8.
428. Elbediwi M, Li Y, Paudyal N, Pan H, Li XL, Xie SH, et al. Global Burden of Colistin-Resistant Bacteria: Mobilized Colistin Resistance Genes Study (1980-2018). *Microorganisms*. 2019;7(10).
429. Kempf I, Jouy E, Chauvin C. Colistin use and colistin resistance in bacteria from animals. *Int J Antimicrob Agents*. 2016;48(6):598-606.
430. Jeannot K, Bolard A, Plesiat P. Resistance to polymyxins in Gram-negative organisms. *Int J Antimicrob Agents*. 2017;49(5):526-35.
431. Juhasz E, Ivan M, Pinter E, Pongracz J, Kristof K. Colistin resistance among blood culture isolates at a tertiary care centre in Hungary. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*. 2017;11:167-70.
432. Stoesser N, Mathers AJ, Moore CE, Day NPJ, Crook DW. Colistin resistance gene *mcr-1* and *pHNSHP45* plasmid in human isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. *Lancet Infect Dis*. 2016;16(3):285-6.
433. Wang R, van Dorp L, Shaw LP, Bradley P, Wang Q, Wang X, et al. The global distribution and spread of the mobilized colistin resistance gene *mcr-1*. *Nature communications*. 2018;9(1):1179.
434. Rhouma M, Beaudry F, Letellier A. Resistance to colistin: what is the fate for this antibiotic in pig production? *Int J Antimicrob Agents*. 2016;48(2):119-26.
435. Shnaiderman-Torban A, Navon-Venezia S, Dor Z, Paitan Y, Arielly H, Ahmad WA, et al. Extended-Spectrum β -lactamase-Producing Enterobacteriaceae Shedding in Farm Horses Versus Hospitalized Horses: Prevalence and Risk Factors. *Animals (Basel)*. 2020;10(2):282.
436. Waseem H, Williams MR, Jameel S, Hashsham SA. Antimicrobial Resistance in the Environment. *Water Environ Res*. 2018;90(10):865-84.
437. Arnold KE, Williams NJ, Bennett M. 'Disperse abroad in the land': the role of wildlife in the dissemination of antimicrobial resistance. *Biol Lett*. 2016;12(8).
438. Pornsukarom S, Thakur S. Horizontal Dissemination of Antimicrobial Resistance Determinants in Multiple *Salmonella* Serotypes following Isolation from the Commercial Swine Operation Environment after Manure Application. *Appl Environ Microbiol*. 2017;83(20).
439. Pornsukarom S, Thakur S. Assessing the Impact of Manure Application in Commercial Swine Farms on the Transmission of Antimicrobial Resistant *Salmonella* in the Environment. *PLoS One*. 2016;11(10):e0164621.

440. Thakur KK, Revie CW, Hurnik D, Poljak Z, Sanchez J. Analysis of Swine Movement in Four Canadian Regions: Network Structure and Implications for Disease Spread. *Transbound Emerg Dis.* 2016;63(1):e14-26.
441. Kumar D, Pornsukarom S, Sivaraman GK, Thakur S. Environmental Dissemination of Multidrug Methicillin-Resistant *Staphylococcus sciuri* After Application of Manure from Commercial Swine Production Systems. *Foodborne Pathog Dis.* 2018;15(4):210-7.
442. Garcia-Menino I, Diaz-Jimenez D, Garcia V, de Toro M, Flament-Simon SC, Blanco J, et al. Genomic Characterization of Prevalent *mcr-1*, *mcr-4*, and *mcr-5* *Escherichia coli* Within Swine Enteric Colibacillosis in Spain. *Front Microbiol.* 2019;10:2469.
443. Garcia-Menino I, Garcia V, Mora A, Diaz-Jimenez D, Flament-Simon SC, Alonso MP, et al. Swine Enteric Colibacillosis in Spain: Pathogenic Potential of *mcr-1* ST10 and ST131 *E. coli* Isolates. *Front Microbiol.* 2018;9:2659.
444. Irrgang A, Tenhagen BA, Pauly N, Schmoeger S, Kaesbohrer A, Hammerl JA. Characterization of VIM-1-Producing *E. coli* Isolated From a German Fattening Pig Farm by an Improved Isolation Procedure. *Front Microbiol.* 2019;10:2256.
445. Gundran RS, Cardenio PA, Salvador RT, Sison FB, Benigno CC, Kreasukon K, et al. Prevalence, Antibiogram, and Resistance Profile of Extended-Spectrum beta-Lactamase-Producing *Escherichia coli* Isolates from Pig Farms in Luzon, Philippines. *Microb Drug Resist.* 2019.
446. Fournier C, Aires-de-Sousa M, Nordmann P, Poirel L. Occurrence of CTX-M-15 and MCR-1-producing Enterobacterales in pigs, Portugal; evidences of direct links with antibiotic selective pressure. *Int J Antimicrob Agents.* 2020:Published online.
447. Puii LH, Dutta TK, Roychoudhury P, Kylla H, Chakraborty S, Mandakini R, et al. Extended spectrum beta-lactamase producing Shiga-toxin producing-*Escherichia coli* in piglets, humans and water sources in North East region of India. *Lett Appl Microbiol.* 2019;69(5):373-8.
448. Seenama C, Thamlikitkul V, Rattawongjirakul P. Multilocus sequence typing and *bla* ESBL characterization of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* isolated from healthy humans and swine in Northern Thailand. *Infect Drug Resist.* 2019;12:2201-14.
449. Shafiq M, Huang J, Ur Rahman S, Shah JM, Chen L, Gao Y, et al. High incidence of multidrug-resistant *Escherichia coli* coharboring *mcr-1* and *bla* CTX-M-15 recovered from pigs. *Infect Drug Resist.* 2019;12:2135-49.
450. VinodhKumar OR, Singh BR, Sinha DK, Pruthvishree BS, Tamta S, Dubal ZB, et al. Risk factor analysis, antimicrobial resistance and pathotyping of *Escherichia coli* associated with pre- and post-weaning piglet diarrhoea in organised farms, India. *Epidemiol Infect.* 2019;147:e174.
451. Zou H, Zheng B, Sun M, Ottoson J, Li Y, Berglund B, et al. Evaluating Dissemination Mechanisms of Antibiotic-Resistant Bacteria in Rural Environments in China by Using CTX-M-Producing *Escherichia coli* as an Indicator. *Microb Drug Resist.* 2019;25(7):975-84.
452. Faccone D, Moredo FA, Giacoboni GI, Albornoz E, Alarcon L, Nievas VF, et al. Multidrug-resistant *Escherichia coli* harbouring *mcr-1* and *bla*CTX-M genes isolated from swine in Argentina. *J Glob Antimicrob Resist.* 2019;18:160-2.
453. Manageiro V, Clemente L, Romao R, Silva C, Vieira L, Ferreira E, et al. IncX4 Plasmid Carrying the New *mcr-1.9* Gene Variant in a CTX-M-8-Producing *Escherichia coli* Isolate Recovered From Swine. *Front Microbiol.* 2019;10:367.
454. Clemente L, Manageiro V, Correia I, Amaro A, Albuquerque T, Themudo P, et al. Revealing *mcr-1*-positive ESBL-producing *Escherichia coli* strains among Enterobacteriaceae

from food-producing animals (bovine, swine and poultry) and meat (bovine and swine), Portugal, 2010-2015. *Int J Food Microbiol.* 2019;296:37-42.

455. Mobasser G, Teh CSJ, Ooi PT, Tan SC, Thong KL. Molecular Characterization of Multidrug-Resistant and Extended-Spectrum Beta-Lactamase-Producing *Klebsiella pneumoniae* Isolated from Swine Farms in Malaysia. *Microb Drug Resist.* 2019;25(7):1087-98.

456. Elnekave E, Hong SL, Lim S, Hayer SS, Boxrud D, Taylor AJ, et al. Circulation of Plasmids Harboring Resistance Genes to Quinolones and/or Extended-Spectrum Cephalosporins in Multiple *Salmonella enterica* Serotypes from Swine in the United States. *Antimicrob Agents Chemother.* 2019;63(4).

457. Aasmae B, Hakkinen L, Kaart T, Kalmus P. Antimicrobial resistance of *Escherichia coli* and *Enterococcus* spp. isolated from Estonian cattle and swine from 2010 to 2015. *Acta Vet Scand.* 2019;61(1):5.

458. Miguela-Villoldo P, Hernandez M, Moreno MA, Rodriguez-Lazaro D, Quesada A, Dominguez L, et al. Carbapenemase-Producing *Elizabethkingia Meningoseptica* from Healthy Pigs Associated with Colistin Use in Spain. *Antibiotics (Basel).* 2019;8(3).

459. Atterby C, Osbjør K, Tepper V, Rajala E, Hernandez J, Seng S, et al. Carriage of carbapenemase- and extended-spectrum cephalosporinase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in humans and livestock in rural Cambodia; gender and age differences and detection of blaOXA-48 in humans. *Zoonoses Public Health.* 2019;66(6):603-17.

460. Ceccarelli D, Kant A, van Essen-Zandbergen A, Dierikx C, Hordijk J, Wit B, et al. Diversity of Plasmids and Genes Encoding Resistance to Extended Spectrum Cephalosporins in Commensal *Escherichia coli* From Dutch Livestock in 2007-2017. *Front Microbiol.* 2019;10:76.

461. Yang F, Zhang K, Zhi S, Li J, Tian X, Gu Y, et al. High prevalence and dissemination of beta-lactamase genes in swine farms in northern China. *Sci Total Environ.* 2019;651(Pt 2):2507-13.

462. Lucas P, Jouy E, Le Devendec L, de Boisseson C, Perrin-Guyomard A, Jove T, et al. Characterization of plasmids harboring blaCTX-M genes in *Escherichia coli* from French pigs. *Vet Microbiol.* 2018;224:100-6.

463. Hille K, Felski M, Ruddat I, Woydt J, Schmid A, Friese A, et al. Association of farm-related factors with characteristics profiles of extended-spectrum beta-lactamase- / plasmid-mediated AmpC beta-lactamase-producing *Escherichia coli* isolates from German livestock farms. *Vet Microbiol.* 2018;223:93-9.

464. Dandachi I, Fayad E, El-Bazzal B, Daoud Z, Rolain JM. Prevalence of Extended-Spectrum Beta-Lactamase-Producing Gram-Negative Bacilli and Emergence of mcr-1 Colistin Resistance Gene in Lebanese Swine Farms. *Microb Drug Resist.* 2019;25(2):233-40.

465. Liu X, Liu H, Wang L, Peng Q, Li Y, Zhou H, et al. Molecular Characterization of Extended-Spectrum beta-Lactamase-Producing Multidrug Resistant *Escherichia coli* From Swine in Northwest China. *Front Microbiol.* 2018;9:1756.

466. Muller A, Jansen W, Grabowski NT, Monecke S, Ehrlich R, Kehrenberg C. ESBL- and AmpC-producing *Escherichia coli* from legally and illegally imported meat: Characterization of isolates brought into the EU from third countries. *Int J Food Microbiol.* 2018;283:52-8.

467. Brisola MC, Crecencio RB, Bitner DS, Frigo A, Rampazzo L, Stefani LM, et al. *Escherichia coli* used as a biomarker of antimicrobial resistance in pig farms of Southern Brazil. *Sci Total Environ.* 2019;647:362-8.

468. Barilli E, Bacci C, StellaVilla Z, Merialdi G, D'Incau M, Brindani F, et al. Antimicrobial resistance, biofilm synthesis and virulence genes in *Salmonella* isolated from pigs bred on intensive farms. *Ital J Food Saf.* 2018;7(2):7223.

469. Lalruatdiki A, Dutta TK, Roychoudhury P, Subudhi PK. Extended-spectrum beta-lactamases producing multidrug resistance *Escherichia coli*, *Salmonella* and *Klebsiella pneumoniae* in pig population of Assam and Meghalaya, India. *Vet World*. 2018;11(6):868-73.
470. Irrgang A, Hammerl JA, Falgenhauer L, Guiral E, Schmoger S, Imirzalioglu C, et al. Diversity of CTX-M-1-producing *E. coli* from German food samples and genetic diversity of the blaCTX-M-1 region on Inc11 ST3 plasmids. *Vet Microbiol*. 2018;221:98-104.
471. Founou LL, Founou RC, Allam M, Ismail A, Essack SY. Draft genome sequences of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacter aerogenes* isolated from swine and human. *J Glob Antimicrob Resist*. 2018;14:70-1.
472. Chah KF, Ugwu IC, Okpala A, Adamu KY, Alonso CA, Ceballos S, et al. Detection and molecular characterisation of extended-spectrum beta-lactamase-producing enteric bacteria from pigs and chickens in Nsukka, Nigeria. *J Glob Antimicrob Resist*. 2018;15:36-40.
473. Biasino W, De Zutter L, Garcia-Graells C, Uyttendaele M, Botteldoorn N, Gowda T, et al. Quantification, distribution and diversity of ESBL/AmpC-producing *Escherichia coli* on freshly slaughtered pig carcasses. *Int J Food Microbiol*. 2018;281:32-5.
474. Dang STT, Bortolaia V, Tran NT, Le HQ, Dalsgaard A. Cephalosporin-resistant *Escherichia coli* isolated from farm workers and pigs in northern Vietnam. *Trop Med Int Health*. 2018;23(4):415-24.
475. McLellan JE, Pitcher JI, Ballard SA, Grabsch EA, Bell JM, Barton M, et al. Superbugs in the supermarket? Assessing the rate of contamination with third-generation cephalosporin-resistant gram-negative bacteria in fresh Australian pork and chicken. *Antimicrob Resist Infect Control*. 2018;7:30.

APPENDICES

Appendice 1 : Questionnaire de l'Article 1.

Questionnaire d'enquête sur les bio-résistances dans la filière équine

I. Description de la structure

A. Code structure : _____

B. Activités

- Elevage
Ecurie de compétition
Pension équestre
Centre équestre
Autre

C. Animaux présents

1. Nombre de chevaux présents en permanence ?

a) *Foals* : _____

b) *Yearlings* : _____

c) *Etalons* : _____

d) *Juments* : _____

2. Quel est le type racial des chevaux inclus dans l'étude ?

3. Depuis combien de temps des chevaux sont-ils présents sur le site ?

- Moins de 2 ans
Entre 2 et 5 ans
Plus de 5 ans

4. Mouvements d'animaux sur le site (entrées/sorties)

- Plusieurs fois par mois toute l'année
Plusieurs fois / mois à certaines périodes Précisez la(es) saison(s) : _____
Moins d'une fois / mois
Exceptionnellement
Jamais

5. Durée moyenne de séjour des animaux en pension ?

6. D'autres espèces animales sont-elles présentes sur le site?

Précisez espèce(s) et nombre : _____

7. Des espèces sauvages sont-elles susceptibles d'accéder au site ?

- Ruminants sauvages (cerf, chevreuil)
Sangliers
Autres, précisez : _____

D. Personnel présent

1. Combien de personnes manipulent les chevaux (manipuler se définit ici comme ayant des contacts directs avec le cheval plus d'une fois par semaine):

- 1 personne
Entre 1 et 5 personnes
Plus de 5 personnes

- Centre équestre : précisez la taille du personnel permanent : _____
- 2. Le personnel présent est-il également en contact avec d'autres animaux ?**
Précisez espèces et nombre : _____
- 3. Vous et/ou des membres de votre personnel sont-ils en contact avec des personnes travaillant en milieu hospitalier (médecin, maisons de retraites médicalisées, infirmier...)?**
- Oui, des patients humains
- Oui, des patients animaux précisez l'(es) espèce(s) animale(s) _____
- Non
- Ne sait pas

4. Vous et/ou des membres de votre personnel se sont-ils rendus (à votre connaissance)

a) dans une clinique vétérinaire ?

- non, pas dans les trois derniers mois
- oui, à des fins personnelles moins de 10 fois dans les trois dernier mois
- oui, à des fins personnelles, plus de 10 fois dans les trois derniers mois
- oui, à des fins professionnelles moins de 10 fois dans les trois dernier mois
- oui, à des fins professionnelles, plus de 10 fois dans les trois derniers mois
- ne sait pas

b) dans un hôpital ou une clinique (patients humains) ?

- non, pas dans les trois derniers mois
- oui, moins de 10 fois dans les trois dernier mois
- oui, plus de 10 fois dans les trois derniers mois
- ne sait pas

II. Description et gestion du pâturage

A. Vos chevaux ont-ils accès à des surfaces en herbe ?

- Oui
- Non

B. Si oui, quel est le temps de pâture ?

- Permanent
- Saisonnier Précisez les mois : _____
- Quelques semaines en période de repos
- Quelques heures par jour
- Occasionnellement

C. Quelle surface est destinée au pâturage des chevaux ? : _____

D. Combien de parcelles sont disponibles ? : _____

E. De quel type de prairie s'agit-il ? :

- Prairies permanentes
- Prairies cultivées
- Rythme des remises en culture : _____
- Pâturages communautaires
- Nombre et espèces concernées : _____

Autres: _____

F. A quel rythme effectuez-vous une rotation entre parcelles ?

- Jamais

- Annuelle
Deux fois/an
Mensuelle
Après la vermifugation

G. Ramassez-vous les crottins sur les prairies ?

- Non
Oui, rarement
Oui, de façon mensuelle
Oui, toutes les deux semaines
Oui, toutes les semaines
Oui, plusieurs fois par semaine

H. Les animaux ont accès à un point d'eau. Il s'agit :

- D'un abreuvoir automatique
D'une réserve d'eau limitée (à quelques centaines de litres)
a) Fréquence de nettoyage : _____
D'une mare permanente
D'une rivière

I. Appliquez-vous des stratégies de pâturage mixte avec d'autres espèces animales ?

- Non
Oui, en système alternant (chevaux puis une autre espèce)
Oui, en système simultané (chevaux mélangés avec une autre espèce)
Précisez la ou les espèce(s) animale(s) : _____

J. Des fumiers ou lisiers sont-ils épandus sur vos prairies ?

- Oui
Non

K. Des boues sont-elles épandues sur vos prairies ?

- Oui
Non

Si oui, indiquez l'origine : _____

L. Si oui, de quelles espèces proviennent-ils ?

- Equins de la structure
Equins, d'autres élevages
Bovins de la structure
Bovins, d'autres élevages

III. Description et gestion des écuries

A. Les chevaux prélevés sont tenus (plusieurs réponses possibles):

- dans un box
- dans une stabulation libre
- attaché dans une stalle
- au pâturage
- autre, précisez _____

B. A quelle fréquence réalisez-vous le curage des installations ?

- Une fois par jour
- Plusieurs fois par semaine
- Une fois par semaine
- Moins d'une fois par semaine
- Ne s'applique pas (pâturage...)
- Autre, précisez _____

C. Les écuries sont désinfectées

- Une fois / an
- Plus souvent
- Pas de désinfection

D. Comment gérez-vous les oxyures et les gastérophiles ?

- Rien de spécifique ; Gestion via les antiparasitaires uniquement
- Nettoyage de la région péri-anale
- Élimination mécanique des œufs de gastérophiles

IV. Médecine préventive et gestion sanitaire des équidés

A. A quelle fréquence appelez-vous votre vétérinaire?

- Plus d'une fois par mois
- Entre 3 et 12 fois par an
- Une à deux fois par an
- Moins d'une fois par an

B. Quel est le niveau de spécialisation de votre vétérinaire ?

- Spécialiste en médecine équine
- Non spécialiste mais expérimenté
- Non spécialiste

C. En cas de problèmes, dans quels délais appelez-vous votre vétérinaire ?

- Dès qu'un problème se pose
- J'essaie de gérer certaines affections moi-même avant d'appeler
- J'appelle très rarement, je gère les problèmes moi-même

D. Consultez-vous plusieurs cliniques vétérinaires ?

- Non, une seule
- Oui, pour avoir plusieurs avis
- Oui, pour bénéficier de différentes compétences

Autre : _____

E. Quel protocole vaccinal mettez-vous en place dans votre structure pour les chevaux ?

Tétanos	oui <input type="checkbox"/>	non <input type="checkbox"/>	je ne sais pas <input type="checkbox"/>
Rage	oui <input type="checkbox"/>	non <input type="checkbox"/>	je ne sais pas <input type="checkbox"/>
Rhinopneumonie	oui <input type="checkbox"/>	non <input type="checkbox"/>	je ne sais pas <input type="checkbox"/>
Influenza (= grippe)	oui <input type="checkbox"/>	non <input type="checkbox"/>	je ne sais pas <input type="checkbox"/>

Autre : _____

F. Lors de l'introduction de nouveaux chevaux sur votre structure, que faites-vous ?

Une quarantaine	<input type="checkbox"/>
Une sérologie	<input type="checkbox"/>
Une coproscopie	<input type="checkbox"/>
Une vermifugation	<input type="checkbox"/>
Une coproscopie de contrôle après vermifugation	<input type="checkbox"/>
Demande de conseil à votre vétérinaire	<input type="checkbox"/>
Rien	<input type="checkbox"/>

G. A combien estimez-vous les frais vétérinaires annuels sur votre structure ?

<100€ / cheval/ an	<input type="checkbox"/>	
100 - 200€ / cheval/ an	<input type="checkbox"/>	
200€ - 400€ / cheval/ an	<input type="checkbox"/>	
500€ - 600€ / cheval/ an	<input type="checkbox"/>	
>600€/cheval/an	<input type="checkbox"/>	
Ce montant est :	estimé <input type="checkbox"/>	calculé sur la base des factures <input type="checkbox"/>

H. Quelles sont les trois affections les plus problématiques dans votre structure (infectieux ou non)?

1. _____
2. _____
3. _____

I. Disposez-vous d'une pharmacie à usage vétérinaire pour les chevaux sur votre structure ?

Oui
Non

J. Si oui, que contient cette pharmacie ?

K. En dehors du vétérinaire, qui est prend la décision d'utiliser des antibiotiques ?

- Le directeur de la structure seulement
- Tout le personnel de la structure
- Autre

L. En dehors du vétérinaire, qui administre les antibiotiques ?

- Le directeur de la structure seulement
- Tout le personnel de la structure
- Autre

M. Dans le cas où vous administrez vous-même des antibiotiques, précisez la molécule employée le plus souvent, la voie d'injection et la fréquence de traitement

N. Avec certains produits, éprouvez-vous des difficultés à administrer la totalité du traitement antibiotique lorsque les injections se répètent plusieurs jours ?

- Oui, souvent
- Oui, parfois
- Jamais

O. Comment gérez-vous les antibiotiques entamés une fois le traitement terminé ?

- Vous les conservez dans la pharmacie de l'élevage
- Vous les éliminez
- Vous les ramenez à votre vétérinaire/pharmacien

P. Dans quels cas administrez-vous des antibiotiques sans l'avis préalable de votre vétérinaire?

- Souvent, vous vous sentez autonome dans de nombreuses situations
- Parfois, pour des affections fréquentes que vous reconnaissez
- Précisez les affections : _____

- Pour maintenir mes chevaux en état
- Suite à des cas de verminose clinique
- Par sécurité
- Je ne sais pas
- Parce que mon vétérinaire me l'a conseillé
- Autre : _____

C. Faites-vous appel à votre vétérinaire pour établir une stratégie de gestion du parasitisme ?

- Oui
- Non

D. Lors d'un traitement, comment adaptez-vous la dose ?

- Par une estimation du poids individuelle
- Même dose pour tous les animaux d'un même groupe

E. Lors d'un traitement (antibiotique ou anthelminthique), comment estimez-vous le poids du cheval ?

- Balance de pesée
- Mètre ruban
- A l'œil

F. Enregistrez-vous les vermifugations réalisées (date, molécule) ?

- Oui
- Non

G. Où achetez-vous votre vermifuge ?

- Chez votre vétérinaire
- Sur internet Si oui, quel site ? _____
- Chez votre pharmacien

Dans ce cas, votre pharmacien vous réclame-t-il une ordonnance ? Oui Non

H. Avez-vous recours à des analyses coproscopiques ?

- Non
- Oui, avant la vermifugation
- Oui, après la vermifugation
- Oui, avant et après la vermifugation

VI. Questions d'ordre général

A. Pensez-vous que la résistance aux antibiotiques soit un problème dans la filière équine ?

- Oui
- Non

B. Quelle importance donnez-vous aux parasites ?

- Problème d'ordre mineur, bien géré par la vermifugation

- Importance modérée, quelques cas de verminoses cliniques
Problème récurrent, malgré des vermifugations répétées

C. Avant ce projet, aviez-vous déjà entendu parler de résistance aux anthelminthiques (vermifuges) ?

- Oui
Non

Si oui, par l'intermédiaire de quelle source ? : _____

D. Comment qualifieriez-vous votre relation avec le vétérinaire ?

- Très bonne
Cordiale
Mauvaise

E. Quelle source d'information privilégiez-vous pour la gestion des parasites? (classement de 0, pas important, à 5, le plus important)

- Recommandations de votre vétérinaire _____
Recommandations d'autres intervenants techniques _____
Expérience personnelle _____
Etat général des chevaux _____
Examens coproscopiques _____
Communications/Présentations spécifiques _____
Revue techniques _____
Sites internet et forums _____
Autres éleveurs _____
Autre : _____

F. Souhaiteriez-vous plus d'informations et de conseils vis-à-vis des plans de vermifugation ?

- Oui
Non

VII. Historique médical des chevaux inclus dans l'étude

A. Ces chevaux ont-ils subi des traitements médicaux dans les trois mois précédant le prélèvement?

- Oui
Non

1. Si oui, de quel type?

a) Antibiotiques

précisez le type de produit et le temps de traitement :

b) Autres

précisez le type de produit et le temps de traitement :

B. Ces chevaux ont-ils été hospitalisés dans les trois derniers mois

Oui
Non

1. Si oui pour quelle raison (diagnostic ou autre)?

C. Ces chevaux ont-ils fait l'objet d'une chirurgie dans les trois derniers mois

Oui
Non

Si oui, précisez :

Lieu de la chirurgie	Type de chirurgie
Hôpital/clinique vétérinaire <input type="checkbox"/>	Convenance <input type="checkbox"/>
	Orthopédique <input type="checkbox"/>
Sur le terrain <input type="checkbox"/>	Abdominale (autre que en urgence) <input type="checkbox"/>
	Coliques (en urgence) <input type="checkbox"/>
	Autre, précisez <input type="checkbox"/>

Appendice 2 : Questionnaire de l'Article 2

Version en français.

Antibiorésistance Cheval Propriétaire



Présentation du projet : Antibiorésistance chez le cheval au Canada

Contexte :

L'antibiorésistance concerne aussi la médecine équine ! Elle pourrait être responsable de la perte d'efficacité de certaines molécules telle que le ceftiofur (Excenel). Les acteurs de la filière équine doivent collaborer, pour perpétuer l'efficacité de cette molécule. D'autant, qu'elle est d'intérêt public car la résistance au ceftiofur est responsable d'une résistance croisée avec la ceftriaxone, antibiotique de choix dans le traitement des salmonelloses infantile

E. coli subit une pression antimicrobienne à chaque antibiothérapie, ce qui en fait un candidat parfait pour devenir un réservoir de gènes d'antibiorésistance. Un mécanisme de résistance de E. coli est la production de β -lactamases, induisant l'inhibition des β -lactames (pénicillines, céphalosporines).

La flore microbienne intestinale des chevaux représente-t-elle un réservoir de gènes de résistances ? Pour répondre, nous voulons déterminer la prévalence et les facteurs de risque de l'excrétion rectale d'E. coli multirésistant, chez le cheval, au Canada. Ces données permettraient évaluer l'impact de cette espèce dans la propagation de l'antibiorésistance. La connaissance des facteurs de risque associés à l'excrétion rectale est cruciale pour cibler les populations à risque, établir des stratégies pour diminuer la prévalence de l'antibiorésistance et élaborer des recommandations d'utilisation d'antibiotiques.

Nous vous remercions de participer à cette étude. Ce questionnaire peut vous paraître long mais il est très important pour nous que vous preniez le temps de le lire et de le remplir avec attention, de manière à pouvoir interpréter les données le plus précisément possible. Si certaines questions vous semblent confuses ou qu'il manque des possibilités de réponses faites le nous savoir à l'adresse suivante : maud.de.lagarde@umontreal.ca avec comme objet du mail : modifications questionnaire E coli.

Encore une fois MERCI pour votre temps !!!

Antibiorésistance Cheval Propriétaire



Formulaire de consentement

Titre du projet :

Prévalence et facteurs de risque de l'excrétion fécale de souches E. coli produisant des β -lactamases et de souches multirésistantes dans la population équine canadienne.

Objectifs :

Déterminer si la population équine représente un réservoir de souche de E. coli produisant des β -lactamases et de souches multirésistantes.

Evaluer les facteurs de risque associés à l'excrétion fécale de souche de E. coli produisant des β -lactamases et des souches multirésistantes.

Manipulation :

Prélèvement d'un écouvillon rectal.

Risques et inconvénients :

Le projet ne comporte aucun risque ou inconvénient pour les chevaux.

Durée prévue de la participation volontaire et retrait de la participation :

La participation de mon animal à cette étude est volontaire et je peux le retirer en tout temps sans préjudice.

Confidentialité :

Les informations collectées durant cette étude seront confidentielles et ne seront pas utilisées pour d'autres fins. Ces résultats seront transmis à votre vétérinaire (qui a pris le prélèvement) et pourraient être publiés dans un journal scientifique.

1. Acceptation : À la lumière des informations présentées dans ce document, j'accepte que mon (mes) cheval (chevaux) participe à la présente étude.

Antibiorésistance Cheval Propriétaire



Identification

* 2. Adresse du propriétaire (ces coordonnées restent confidentielles, elles vous sont demandées en cas de besoin pour vous recontacter si certaines réponses demandent des précisions)

Nom

Code postal

Adresse e-mail

Téléphone

3. Nom du cheval :

4. Vétérinaire ayant réalisé le prélèvement ?

Nom

Code postal

5. Coordonnées du vétérinaire traitant (si autre que vétérinaire qui a réalisé le prélèvement)

Nom

Code postal

Téléphone

6. Etes vous allé(e) dans un hôpital vétérinaire dans les trois derniers mois (pour votre cheval ou pour un autre animal) à des fins personnelles?

non

oui, précisez le nombre de fois

7. Etes vous allé(e) dans un hôpital vétérinaire dans les trois derniers mois à des fins professionnelles?

non

oui, précisez le nombre de fois

8. Etes vous allé(e) dans un hôpital humain dans les trois derniers mois à des fins personnelles?

non

oui, précisez le nombre de fois

9. Etes vous allé(e) dans un hôpital humain dans les trois derniers mois à des fins professionnelles?

non

oui, précisez le nombre

10. Etes vous en contact avec des personnes malades dans votre métier?

non

oui

11. Etes vous en contact avec des animaux malades dans votre métier?

non

oui, précisez l'espèce animale



Localisation

12. Adresse de l'écurie où loge votre cheval la majorité du temps

Nom	<input type="text"/>
Adresse	<input type="text"/>
Adresse 2	<input type="text"/>
Ville	<input type="text"/>
État/Province	<input type="text"/>
Code postal	<input type="text"/>
Pays	<input type="text"/>
Téléphone	<input type="text"/>

Antibiorésistance Cheval Propriétaire



Signalement du cheval

13. Depuis combien de temps avez vous votre cheval?

14. Quel age a votre cheval (ne mettre que le nombre en année)

15. Quel est le sexe de votre cheval?

- Male non castré
- Hongre
- Femelle
- Femelle castrée

16. Vous estimez le poids de votre cheval

- moins de 100kg (200 lbs)
- entre 100 et 400 kg (201 - 900 lbs)
- entre 400 et 600 kg (90-1300 lbs)
- plus de 600 kg (plus de 1301 lbs)

17. Quelle est la race de votre cheval

- Cheval de selle (Warmblood)
- Quarter Horse et famille
- Course (Trotteur ou Thoroughbred)
- Chevaux lourd (Belge, Clydesdale, Percheron)
- Canadien, Frison
- Poney (incluant les chevaux miniature)
- Croisé (Appendix, etc...)
- Autre, Précisez

18. Quelle est l'activité principale de votre cheval (au moment du prélèvement)

- Compétition classique (CSO, dressage, complet, endurance, niveau national et au dessus)
- Compétition classique (CSO, dressage, complet, endurance, niveau provincial et au dessous)
- Compétition western (niveau national et au dessus)
- Compétition western (niveau provincial et en dessous)
- Cheval d'école
- Course
- Attelage
- Reproduction
- Pas au travail
- Autre (veuillez préciser)

19. Votre cheval a t il participé à des événements équestre dans les trois derniers mois?


- non
- oui
- je ne sais pas

20. Si oui, précisez

	Lieu	Date	Nombre de participants	Type d'évènement
Évènement 1	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
Évènement 2	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
Évènement 3	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
Évènement 4	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
Évènement 5	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
Évènement 6	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
Évènement 7	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
Évènement 8	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
Évènement 9	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
Évènement 10	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>

Remarque : Si votre cheval a participé à plus de 10 événements équestres dans les trois derniers mois, remplir les 10 lignes avec les 10 derniers événements et le nombre total d'événements :

Antibiorésistance Cheval Propriétaire




LABORATOIRE DE RÉFÉRENCE POUR
ESCHERICHIA COLI

ECL

Université de Montréal

OIE Laboratoire de référence de l'OIE
pour Escherichia coli



Régie de votre cheval

Remarque : si votre cheval n'est pas prélevé dans son habitat habituel veuillez répondre aux questions sur son habitat habituel.

Les questions de l'hébergement et de l'alimentation concernent la manière la plus fréquente au moment du prélèvement.

21. Votre cheval est hébergé (le plus fréquemment)

- Dans un box
- Dans une stabulation libre
- Attaché dans une stalle
- Dans un pâturage
- Autre (veuillez préciser)

22. Si votre cheval a accès à un enclos dehors (mais ne vit pas au pâturage), précisez la fréquence :

- Une fois par jour
- Plusieurs fois par semaine
- Une fois par semaine et moins

23. Si votre cheval a accès à un enclos dehors (mais ne vit pas au pâturage), précisez avec quels autres animaux :

- Avec d'autres chevaux
- Seul (mon cheval est le seul à aller dans ce pâturage)
- Seul (mais d'autres chevaux utilisent ce pâturage)
- Avec d'autres animaux, précisez l'espèce

24. La litière de votre cheval se compose (le plus souvent) de

- Paille
- Copeau
- Mon cheval vit au pâturage (pas de litière)
- Autre (veuillez préciser)

25. Avez-vous utilisé des produits ou méthodes de contrôle de la vermine dans votre écurie dans les trois derniers mois?

- non
- oui, présence de chats dans l'écurie
- oui (veuillez préciser le type de produit si possible si vous ne la connaissez pas écrire "je ne sais pas")

26. Votre cheval est hébergé (en contact direct = possibilité de se toucher) le plus souvent (plusieurs réponses possibles):

- Seul
- Avec d'autres chevaux
- Avec d'autres animaux (veuillez préciser l'espèce)

27. L'habitat de votre cheval est nettoyé, le plus souvent (nettoyé se définit ici comme au minimum l'élimination des fumiers):

- deux fois pas jour
- une fois par jour
- plusieurs fois par semaine
- une fois par semaine
- Moins d'une fois par semaine
- Mon cheval est au pâturage qui n'est pas nettoyé
- Autre (veuillez préciser)

28. Votre cheval mange du foin

- oui
- non

29. Votre cheval mange du grain

- non
- oui (veuillez préciser le type de moulée si vous le connaissez si vous ne le connaissez pas écrire "je ne sais pas")

30. Votre cheval à accès à l'eau (indiquer la source d'abreuvement la plus courante dans chacune des situations)?

	Par abreuvoir automatique	Par abreuvoir manuel (seaux)	3. Par une source d'eau en contact direct avec l'environnement (exemple : puits, ruisseau, autres)
Dans son habitat le plus habituel	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
Dans son enclos (s'il a accès à un enclos mais ne vit pas au pâturage)	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>

31. Votre cheval a-t-il subi des modifications dans son alimentation dans les trois derniers mois?

- Non
- Modification de la moulée
- Modification du foin
- Autre (veuillez préciser le type de modification ex : ajout de complémentent)

32. A quelle fréquence votre cheval travaille-t-il (travail se défini comme étant monté, longé ou attelé)?

- Ne travaille pas
- Moins d'une fois par semaine
- Une fois par semaine
- Plusieurs fois par semaine

33. Votre cheval a-t-il été transporté dans les trois dernier mois?

- oui
- non
- je ne sais pas

34. Si oui, précisez les lieux (code postal) vers où le cheval a été transporté / la date (estimation du nombre de jours écoulé entre le transport et le prélèvement) / la durée de transport (en minutes)

Transport 1 lieu (code postal)

Transport 1 (nombre de jours écoulé entre le transport et le prélèvement)

Transport 1 (en minutes)	<input type="text"/>
Transport 2 lieu (code postal)	<input type="text"/>
Transport 2 (nombre de jours écoulé entre le transport et le prélèvement)	<input type="text"/>
Transport 2 (en minutes)	<input type="text"/>
Transport 3 lieu (code postal)	<input type="text"/>
Transport 3 (nombre de jours écoulé entre le transport et le prélèvement)	<input type="text"/>
Transport 3 (en minutes)	<input type="text"/>
Transport 4 lieu (code postal)	<input type="text"/>
Transport 4 (nombre de jours écoulé entre le transport et le prélèvement)	<input type="text"/>
Transport 4 (en minutes)	<input type="text"/>
Transport 5 lieu (code postal)	<input type="text"/>
Transport 5 (nombre de jours écoulé entre le transport et le prélèvement)	<input type="text"/>
Transport 5 (en minutes)	<input type="text"/>
Transport 6 lieu (code postal)	<input type="text"/>
Transport 6 (nombre de jours écoulé entre le transport et le prélèvement)	<input type="text"/>
Transport 6 (en minutes)	<input type="text"/>
Transport 7 lieu (code postal)	<input type="text"/>
Transport 7 (nombre de jours écoulé entre le transport et le prélèvement)	<input type="text"/>

Transport 7 (en minutes)

Transport 8 lieu (code postal)

Transport 8 (nombre de jours écoulé entre le transport et le prélèvement)

Transport 8 (en minutes)

Transport 9 lieu (code postal)

Transport 9 (nombre de jours écoulé entre le transport et le prélèvement)

Transport 9 (en minutes)

Transport 10 lieu (code postal)

Transport 10 (nombre de jours écoulé entre le transport et le prélèvement)

Transport 10 (en minutes)

Si votre cheval a été transporté plus de 10 fois dans les trois derniers mois, remplir les 10 lignes avec les 10 derniers transport et le nombre total de transport :

35. Combien de personnes manipulent votre cheval en moyenne par jour (manipuler se définit ici comme ayant des contacts directs avec le cheval plus d'une fois par semaine):

- 1 personne
- Entre 1 et 5 personnes
- Plus de 5 personnes

36. Combien d'animaux habitent dans le même établissement (ici établissement se définit comme l'écurie ou la ferme globale et pas simplement le bâtiment) que votre cheval?

	Nombre
Chevaux	<input type="text"/>
Anes	<input type="text"/>
Vaches	<input type="text"/>
Moutons	<input type="text"/>
Chèvres	<input type="text"/>
Cochons	<input type="text"/>
Volailles	<input type="text"/>
Chiens	<input type="text"/>
Chats	<input type="text"/>
Camélidés	<input type="text"/>

Autre, précisez le nombre et l'espèce

37. Est-ce que certains des animaux sur la ferme ont été traités avec des antibiotiques dans les trois derniers mois

- oui
- non
- je ne sais pas

38. Si vous avez répondu oui à la question 37, veuillez préciser le nombre et le type d'animaux ainsi que le type de traitement si possible

Antibiotique1, espèce et nombre d'animaux traités

Antibiotique1, nom (idéalement molécule, sinon mettre le nom du produit)

Antibiotique1, voie d'administration (orale, intramusculaire)

Antibiotique1, dose

Antibiotique1, durée de traitement (si connu)

Antibiotique2, espèce et nombre d'animaux traités

Antibiotique2, nom (idéalement molécule, sinon mettre le nom du produit)

Antibiotique2, voie d'administration (orale, intramusculaire)

Antibiotique2, dose

Antibiotique2, durée de traitement (si connu)

Antibiotique3, espèce et nombre d'animaux traités

Antibiotique3, nom (idéalement molécule, sinon mettre le nom du produit)

Antibiotique3, voie d'administration (orale, intramusculaire)

Antibiotique3, dose

Antibiotique3, durée de traitement (si connu)

si plus de trois antibiotiques ont été utilisés remplir les informations ici

je ne sais pas

39. Votre cheval a-t-il été en contact avec un/des animal/animaux (cheval ou autres espèce) hospitalisé(s) dans les trois dernier mois?

- oui
 non
 je ne sais pas

40. Si vous avez répondu oui à la question 40, veuillez préciser :

	Nombre	Type de contact
Cheval	<input type="text"/>	<input type="text"/>
Ane	<input type="text"/>	<input type="text"/>
Vache	<input type="text"/>	<input type="text"/>
Mouton	<input type="text"/>	<input type="text"/>
Chèvre	<input type="text"/>	<input type="text"/>
Cochon	<input type="text"/>	<input type="text"/>
Volaille	<input type="text"/>	<input type="text"/>
Chien	<input type="text"/>	<input type="text"/>
Chat	<input type="text"/>	<input type="text"/>
Camélidés	<input type="text"/>	<input type="text"/>
Je ne sais pas	<input type="text"/>	<input type="text"/>

Autre (veuillez préciser l'espèce le nombre d'animaux et le type de contact, si connus)

Antibiorésistance Cheval Propriétaire

LABORATOIRE DE RÉFÉRENCE POUR ESCHERICHIA COLI

ECL

Université de Montréal

Oie Laboratoire de référence de l'OIE pour Escherichia coli



Les informations demandées dans cette page concernent les trois derniers mois précédant le prélèvement.

Courage vous avez bientôt terminé!!!

41. Votre cheval a-t-il été sujet à des soins vétérinaires (autre que vaccins, vermifuge, soins dentaires) dans les trois derniers mois?

- oui
 non
 je ne sais pas

42. Votre cheval est-il vacciné contre les maladie suivantes

	OUI / NON / Je ne sais pas	Date
Tétanos	<input type="text"/>	<input type="text"/>
Rage	<input type="text"/>	<input type="text"/>
Herpes (= EHV1 EHV4 = Rhinopneumonie)	<input type="text"/>	<input type="text"/>
Influenza (= grippe)	<input type="text"/>	<input type="text"/>
West Nile	<input type="text"/>	<input type="text"/>
Encéphalites	<input type="text"/>	<input type="text"/>
Potomac horse fever	<input type="text"/>	<input type="text"/>
Gourme	<input type="text"/>	<input type="text"/>
Botulisme	<input type="text"/>	<input type="text"/>

Autre (veuillez préciser)

43. Quand votre cheval a-t-il été vermifugé pour la dernière fois?

- Il n'est pas vermifugé
- Il y a moins de 1 mois
- Il y a entre un et trois mois
- Il y a plus de trois mois
- Je ne sais pas

44. Si votre cheval est vermifugé, précisez avec quel produit il a été vermifugé la dernière fois?

- Exodus Paste
- Panacur
- Pipérazine 34
- Strongid
- Super Pip-Zine
- Worm Clear
- Quest
- Quest plus
- Anthelicide Eq
- Je ne sais pas
- Autre (veuillez préciser)

45. Votre cheval a-t-il subi des traitements médicaux non administrés par votre vétérinaire dans les trois mois précédant le prélèvement?

- oui
- non
- je ne sais pas

46. Si vous avez répondu oui à la question 49, veuillez préciser

Antibiotique1 nom
(idéalement molécule,
sinon mettre le nom du
produit)

Antibiotique1 (voie
d'administration (orale ou
intramusculaire))

Antibiotique1 dose	<input type="text"/>
Antibiotique1 durée du traitement.	<input type="text"/>
Antibiotique2 nom (idéalement molécule, sinon mettre le nom du produit)	<input type="text"/>
Antibiotique2 (voie d'administration (orale ou intramusculaire))	<input type="text"/>
Antibiotique2 dose	<input type="text"/>
Antibiotique2 durée du traitement.	<input type="text"/>
Autre médicament 1 nom (idéalement molécule, sinon mettre le nom du produit)	<input type="text"/>
Autre médicament 1 (voie d'administration (orale ou intramusculaire))	<input type="text"/>
Autre médicament 1 dose	<input type="text"/>
Autre médicament 1 durée du traitement.	<input type="text"/>
Autre médicament 2 nom (idéalement molécule, sinon mettre le nom du produit)	<input type="text"/>
Autre médicament 2 (voie d'administration (orale ou intramusculaire))	<input type="text"/>
Autre médicament 2 dose	<input type="text"/>
Autre médicament 2 durée du traitement.	<input type="text"/>
Si d'autres médicaments ont été utilisés, précisez les détails ici	<input type="text"/>
je ne sais pas	<input type="text"/>

47. Votre cheval a-t-il reçu des soins dentaires au cours des trois derniers mois?

- oui
- non
- je ne sais pas

Version en anglais

Multidrug resistance Horses Owner



The image contains a logo on the left and a photograph of two horses on the right. The logo includes the text 'LABORATOIRE DE RÉFÉRENCE POUR ESCHERICHIA COLI', 'ECL', 'Université de Montréal', and 'OIE Laboratoire de référence de l'OIE pour Escherichia coli'. The photograph shows two horses, one in the foreground and one slightly behind it, both looking towards the camera.

Project presentation : Multidrug resistance in horses in Canada

Context:

Multidrug resistance concerns equine medicine also!

Equine practitioners have to face antimicrobial treatment failure more frequently. This jeopardizes equine health and raises questions concerning environmental contamination and transmission to horse handlers.

Escherichia coli is an intestinal bacterium, mainly harmless, although certain strains may become dangerous. It is widely found in the digestive tracts of all mammals, and is subject to selection pressure during every antimicrobial treatment even if not the targeted bacterial species. It is, therefore, a perfect candidate to become a reservoir of antimicrobial resistance.

One of the main resistance mechanisms of E. coli is β -lactamase production, resulting in the inhibition of an essential antimicrobial class, the β -lactams.

Ceftiofur (Excenel®) is a β -lactam. In Canada, resistance to ceftiofur has developed, due to its extensive use in the meat production industry. In equine medicine, ceftiofur is well tolerated and the new long acting product is very convenient for use in the field. This could facilitate resistance dissemination. Stakeholders in the Equine industry need to maintain the usefulness of this molecule.

Moreover, Ceftiofur resistance is of public health interest as it is responsible for cross resistance to ceftriaxone, the treatment of choice for a certain type of severe, sometimes fatal, diarrhea in children.

The objective of our study is to determine if the normal microflora of horses might represent a reservoir of resistance and play a role in persistence and transmission.

Such data will be useful to elaborate new adapted antimicrobial use guidelines, to improve equine health taking public health into account.

We thank you for your participation to this study. This survey may seem long, however it is very important that you take the time to fill it up with great attention, in order to get data as accurate as possible. Thus we will be able to interpret the results as thoroughly as possible.

If you have any remarks about the questions, or the available answers, please let us know, and we will bring the necessary corrections. Please send an e-mail to maud.de.lagarde@umontreal.ca with the object : survey e coli horse.

Once again : THANK YOU for your time !!!

Multidrug resistance Horses Owner



LABORATOIRE
DE RÉFÉRENCE POUR
ESCHERICHIA COLI

ECL

Université
de Montréal

OIE Laboratoire de référence de l'OIE
pour Escherichia coli



Consent form

Project's title : Prevalence of β -lactamase producing, and multi drug -resistant Escherichia coli AND evaluation of risk factors for fecal shedding of these isolates in the equine population in Canada.

Objectives :

Determine if the healthy equine population represents a reservoir of β -lactamase-producing and multidrug resistant E. coli.

Evaluate risk factors associated with fecal shedding of β -lactamase-producing or multidrug-resistant E. coli.

Provide an easily accessible and integrated tool to monitor antimicrobial resistance of clinical E. coli isolates from animals.

Manipulation :

Rectal swab sampling.

Risks and inconveniences for horses :

The sampling represents no risks or inconveniences for the horses.

Time of participation and withdrawal :

My animal's participation to this study is voluntary, and I can withdraw him/her anytime without harm.

Confidentiality :

The informations gathered during this study are confidential and will not be used to other ends.

The results will be communicated to the veterinarian who collected the sample, and may be used to be published in a scientific journal.

1. Consent : In the light of the above informations, I agree that my horse/mare participate to the present study.



Multidrug resistance Horses Owner



Identification

2. Owner adress

Name	<input type="text"/>
Adress	<input type="text"/>
Adress 2	<input type="text"/>
city	<input type="text"/>
State/Province	<input type="text"/>
Zip code	<input type="text"/>
Country	<input type="text"/>
e-mail Adress	<input type="text"/>
Phone	<input type="text"/>

3. Name of the horse (from now on, we will speak about horse regardless of the sex of your animal).

4. Vet who has realised the sampling

Name	<input type="text"/>
Zip Code	<input type="text"/>

5. Treating vet (if different from the above)

Name

Zip Code

Téléphone

6. Have you been to a vet hospital within the last three months for personal reasons?

no, not within the last three months

yes, please specify how many times

7. Have you been to a human hospital within the last three months for professional reasons?

no, not within the last three months

yes, please specify how many times

8. Have you been to a human hospital for personal reasons, within the last three months

no

yes, please specify how many times

9. Have you been to a human hospital for professional reasons, within the last three months

non

yes, please specify how many times

10. Are you in contact with sick people in your job?

no

yes

11. Are you in contact with sick animals in your job?

no

yes, please specify the animal species

Multidrug resistance Horses Owner



LABORATOIRE DE RÉFÉRENCE POUR
ECL
ESCHERICHIA COLI

Université **U**
de Montréal

OIE Laboratoire de référence de l'OIE
pour Escherichia coli



Location

12. Stable address where your horse stay most of the time

Name	<input type="text"/>
Society	<input type="text"/>
Adress	<input type="text"/>
Adress	<input type="text"/>
City	<input type="text"/>
State/Province	<input type="text"/>
Zip Code	<input type="text"/>
Country	<input type="text"/>
Phone	<input type="text"/>

Multidrug resistance Horses Owner



Horse's Signalment

13. For how long have you owned your horse?

14. How old is your horse (in years)

15. What sex is your horse?

- Stallion
- Gelding
- Female
- Female castrated

16. What is your estimation of the weight of your horse

- less than 100kg (200lbs)
- between 100 and 400 kg (201 to 900 lbs)
- between 400 and 600 kg (901 to 1300) lbs
- more than 600 kg (1301lbs)

17. What is the breed of your horse

- Warmblood
- Quarter Horse and other
- Race (Standardbred or Thoroughbred)
- Draft Horse (Belgium, Clydesdale, Percheron)
- Canadian, Frisian
- Pony (including miniature horses)
- Cross breed (Appendix, etc...)
- Other, specify

18. What is the main activity of your horse

- Classical competition (jumper, dressage, cross-country, endurance (national level and above)
- Classical competition (jumper, dressage, cross-country, endurance (provincial level and below)
- Western competition (national level and above)
- Western competition (provincial level and below)
- Leisure horse
- School horse
- Race
- Carriage
- Reproduction
- Not at work
- Other, specify

19. Did your horse take part to equestrian events within the last three months?

- no
- yes
- I do not know

20. If yes, please specify

	Location	Date	Number of participant	Type of event
Event 1	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
Event 2	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
Event 3	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
Event 4	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
Event 5	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
Event 6	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
Event 7	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
Event 8	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
Event 9	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
Event 10	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>

If the horse have participated to more than 10 events, within the last three months, please, fill the ten last events, and specify the total number of events here.

Multidrug resistance Horses Owner

LABORATOIRE DE RÉFÉRENCE POUR
ESCHERICHIA COLI

ECL

Université 
de Montréal

Oie Laboratoire de référence de l'OIE
pour *Escherichia coli*



Management of the horse

If the horse was not sampled in his usual stable, please answer the question concerning the usual stable.

The following questions concerns the most frequent way, at the time of the sampling.

21. Your horse is housed

- in an individual loose box
- in a stabling
- tied in a stall
- in a pasture
- Other, specify

22. If your horse has access to a pen, but does not live in a pasture, specify the frequency

- Once a day
- Several times a week
- Once a week and less

23. If your horse has acces to a pen, but does not live in a pasture, specify the other animals he is in contact with in the pen

- Other horses
- Alone (my horse is the only one to have access to this pen)
- Alone (but other horses have access to this pen)
- With other animals, specify the species

24. Your horse's bedding is

- Straw
- Shavings
- Pasture (no specific bedding)
- Other, specify

25. Did you use methods or products to control the vermin in your stable, within the last three month?

- no
- yes, we have cats
- yes, specify the type of product, orif you do not know, write "I don't know".

26. Your horse is housed :

- alone
- With other horses (possibility of direct contact)
- With other animals (possibility of direct contact), please specify the species

27. Your horse's housing is cleaned (at least withdrawal of the manure)

- twice a day
- once a day
- several times a week
- once a week
- less than once a week
- my horse is in a pasture that is not cleaned
- other, specify

28. Your horse eats hay

- yes
- no

29. Your horse eats stock feed

- no
- yes, please specify the type, if you know it, otherwise write I do not know

30. Your horse has access to water (indicate the most common water source in each situation, answer only when it is relevant)

	Automatic drinking trough	Bucket	Environmental water source
In his usual housing	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
In his pen (if he does not live in his pasture)	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>

31. Did your horse's feed was modified within the last three months?

- No
- Stock feed modification
- Hay modification
- Other, please specify the type of modification (i.e :complement addition)

32. How many times does your horse work (here work is defined by either ridden, lunged or harnessed)

- Does not work
- less than once a week
- Once a week
- Several times a week

33. Did you horse was transported within the last three months

- yes
- no
- I do not know

34. If yes, please specify the location (zip code) where the horse was transported, the date (number of days between transportation and sampling), and the time of transport in minutes

Transport 1 (location zip code)

Transport 1 (number of days between transportation and sampling)

Transport 1 (time of transport in minutes)

Transport 2 (location zip code)	<input type="text"/>
Transport 2 (number of days between transportation and sampling)	<input type="text"/>
Transport 2 (time of transport in minutes)	<input type="text"/>
Transport 3 (location zip code)	<input type="text"/>
Transport 3 (number of days between transportation and sampling)	<input type="text"/>
Transport 3 (time of transport in minutes)	<input type="text"/>
Transport 4 (location zip code)	<input type="text"/>
Transport 4 (number of days between transportation and sampling)	<input type="text"/>
Transport 4 (time of transport in minutes)	<input type="text"/>
Transport 5 (location zip code)	<input type="text"/>
Transport 5 (number of days between transportation and sampling)	<input type="text"/>
Transport 5 (time of transport in minutes)	<input type="text"/>
Transport 6 (location zip code)	<input type="text"/>
Transport 6 (number of days between transportation and sampling)	<input type="text"/>
Transport 6 (time of transport in minutes)	<input type="text"/>
Transport 7 (location zip code)	<input type="text"/>
Transport 7 (number of days between transportation and sampling)	<input type="text"/>

Transport 7 (time of transport in minutes)

Transport 8 (location zip code)

Transport 8 (number of days between transportation and sampling)

Transport 8 (time of transport in minutes)

Transport 9 (location zip code)

Transport 9 (number of days between transportation and sampling)

Transport 9 (time of transport in minutes)

Transport 10 (location zip code)

Transport 10 (number of days between transportation and sampling)

Transport 10 (time of transport in minutes)

If your horse was transported more than ten times within the last three months, please give the informations for the last ten trips, and write the number total of trip here :

35. How many poeple handle your horse (handle is defined as having direct contact more than once a week)

- 1 person
- Between 1 et 5 persons
- More than 5 persons

36. How many animals are housed in the same facility (facility is the stable or farm, not the building) that your horse?

	Number
Horses	<input type="text"/>
Donkeys	<input type="text"/>
Cows	<input type="text"/>
Sheeps	<input type="text"/>
Goats	<input type="text"/>
Pigs	<input type="text"/>
Poultry	<input type="text"/>
Dogs	<input type="text"/>
Cats	<input type="text"/>
Camelids	<input type="text"/>
Other	<input type="text"/>

37. Have some of these animals been treated with antimicrobials within the last three months?

- yes
- no
- I don't know

38. If you answered yes to the question 37, please specify the treatment if possible

Antimicrobial 1, species and number of treated animal

Antimicrobial 1, administration route (oral, intramuscular)

Antimicrobial 1, dosage

Antimicrobial 1, treatment duration (if known)

Antimicrobial 2, species and number of treated animal

Antimicrobial 2, administration route (oral, intramuscular)

Antimicrobial 2, dosage

Antimicrobial 2, treatment duration (if known)

Antimicrobial 3, species and number of treated animal

Antimicrobial 3, administration route (oral, intramuscular)

Antimicrobial 3, dosage

Antimicrobial 3, treatment duration (if known)

If more than 3 antimicrobials have been used, please specify the rest of the information here

I do not know

39. Have your horse been in contact (direct or housed in the same facility) with a hospitalised animal?

- yes
- no
- I do not know

40. If you answered yes to the question 39, please specify the species

	number	Contact type
Horse	<input type="text"/>	<input type="text"/>
Donkey	<input type="text"/>	<input type="text"/>
Cow	<input type="text"/>	<input type="text"/>
Sheep	<input type="text"/>	<input type="text"/>
Goat	<input type="text"/>	<input type="text"/>
Pig	<input type="text"/>	<input type="text"/>
Poultry	<input type="text"/>	<input type="text"/>
Dog	<input type="text"/>	<input type="text"/>
Cat	<input type="text"/>	<input type="text"/>
Camelids	<input type="text"/>	<input type="text"/>
I do not know	<input type="text"/>	<input type="text"/>

Other, please specify the species, the number and the contact

Multidrug resistance Horses Owner





Preventive medicine

The questions concerns the last three months.

Keep going, the questionnaire is almost done!!!

41. Have your horse had vet care (other than vaccines, dental care and deworming) in the last three months?

- yes
- no
- I do not know

42. Is your horse vaccinated against the following?

	Answer	Date
Tetanus	<input type="text"/>	<input type="text"/>
Rabies	<input type="text"/>	<input type="text"/>
Herpes (= EHV1 EHV4 = Rhinopneumonia)	<input type="text"/>	<input type="text"/>
Influenza (= flu)	<input type="text"/>	<input type="text"/>
West Nile	<input type="text"/>	<input type="text"/>
Encéphalitis	<input type="text"/>	<input type="text"/>
Potomac horse fever	<input type="text"/>	<input type="text"/>
Strangles	<input type="text"/>	<input type="text"/>
Botulism	<input type="text"/>	<input type="text"/>

Other, please specify the vaccine and the date if possible

43. When was your horse dewormed for the last time

- not dewormed
- Less than a month ago
- between one and three months ago
- more than three months ago
- I do not know

44. If your horse was dewormed, specify the product used the last time if possible

- Exodus Paste
- Panacur
- Pipérazine 34
- Strongid
- Super Pip-Zine
- Worm Clear
- Quest
- Quest plus
- Anthelicide Eq
- I do not know
- Other, please specify

45. Has your horse had medical treatment (not prescribed by a vet), within the last three months?

- yes
- no
- I do not know

46. If you answered yes to question 48, please specify the treatment

Antimicrobial 1 (name molecule or brand name)

Antimicrobial 1 (Administration route orally intramuscular)

Antimicrobial 1 (doses)

Antimicrobial 1 (treatment duration)

Antimicrobial 2 (name molecule or brand name)

Antimicrobial 2 (Administration route orally intramuscular)

Antimicrobial 2 (doses)

Antimicrobial 2 (treatment duration)

Other medication 1 (name molecule or brand name)

Other medication 1 (Administration route orally intramuscular)

Other medication 1 (doses)

Other medication 1 (treatment duration)

Other medication 2 (name molecule or brand name)

Other medication 2 (Administration route orally intramuscular)

Other medication 2 (doses)

Other medication 2 (treatment duration)

if more medications have been used, please specify here

I do not know

47. Did your horse get dental care within the last three months

- yes
- no
- I do not know

Appendice 4 : Matériel supplémentaire de l'article 5

Tableau S1: Données de qualité d'assemblage et de données brutes pour les 173 isolats du Québec

ID_séquence	contig=C	contig=1000	Total length -5bp	Total length +500bp of contig	Largest contig	Total length	GC	NOO	N75	N70	LSO	L75	%N50	%GC	Length (bp)	mean_length	Min Seq	Total mean	Total length	%_read	depth
01.00001	332	300	510072	510072	207	510072	51.0072	4154	36	30	28.11	0.51	245	245.0	510072	2173727	100000	510072	100	79.133661	
01.00011	297	133	5142302	5142302	296	420094	51.42302	72151	11	11	24.154	0.51	239	240.0	5142302	1337207	116514	5142302	100	11.442287	
01.00061	154	105	5145471	5145471	209	60790	51.45471	14420	12	12	20.21	0.51	231	232.0	5145471	1336021	339440	5145471	100	61.207703	
01.00082	241	146	5121857	5121858	189	313002	51.21858	106376	54	50	31.28	0.51	182	182.0	5121858	238810	238810	5121858	100	68.459276	
01.00083	237	112	4902297	4902297	176	23380	49.02297	74446	11	11	21.28	0.51	217	217.0	4902297	4902297	4902297	4902297	100	101.862665	
01.00084	279	146	5100397	5100397	176	113309	51.00397	56311	13	13	27.11	0.51	214	214.0	5100397	488425	82040	5100397	100	38.161545	
01.00087	237	116	4902297	4902297	176	23380	49.02297	74446	11	11	21.28	0.51	217	217.0	4902297	4902297	4902297	4902297	100	101.862665	
01.00088	239	118	5100273	5100285	161	210485	51.00273	10074	47	43	36.24	0.51	230	230.0	5100273	507893	125984	5100273	100	54.746777	
01.00091	231	111	5100718	5100718	112	21079	51.00718	61381	11	11	20.21	0.51	217	217.0	5100718	5100718	5100718	5100718	100	111.896001	
01.00413	230	145	5104288	5104316	164	40809	51.04288	107775	45	41	31.17	0.51	173	173.0	5104288	148444	148444	5104288	100	54.645954	
01.00414	238	139	5111008	5111008	118	21079	51.11008	61381	11	11	20.21	0.51	217	217.0	5111008	5111008	5111008	5111008	100	79.259911	
01.00480	242	155	5114381	5113700	162	115565	51.14381	113360	47	47	31.14	0.51	214	215.0	5114381	118354	118354	5114381	100	55.362415	
01.00481	242	156	5114381	5114379	162	115565	51.14381	113360	47	47	31.14	0.51	214	215.0	5114381	118354	118354	5114381	100	55.362415	
01.00558	239	125	5110384	5110312	112	114243	51.10384	105910	45	41	32.42	0.51	217	217.0	5110384	210454	210454	5110384	100	106.115544	
01.00559	240	161	5110384	5110312	112	114243	51.10384	105910	45	41	32.42	0.51	217	217.0	5110384	210454	210454	5110384	100	106.115544	
01.00560	240	162	5110384	5110312	112	114243	51.10384	105910	45	41	32.42	0.51	217	217.0	5110384	210454	210454	5110384	100	106.115544	
01.00561	240	162	5110384	5110312	112	114243	51.10384	105910	45	41	32.42	0.51	217	217.0	5110384	210454	210454	5110384	100	106.115544	
01.00562	240	162	5110384	5110312	112	114243	51.10384	105910	45	41	32.42	0.51	217	217.0	5110384	210454	210454	5110384	100	106.115544	
01.00563	240	162	5110384	5110312	112	114243	51.10384	105910	45	41	32.42	0.51	217	217.0	5110384	210454	210454	5110384	100	106.115544	
01.00564	240	162	5110384	5110312	112	114243	51.10384	105910	45	41	32.42	0.51	217	217.0	5110384	210454	210454	5110384	100	106.115544	
01.00565	240	162	5110384	5110312	112	114243	51.10384	105910	45	41	32.42	0.51	217	217.0	5110384	210454	210454	5110384	100	106.115544	
01.00566	240	162	5110384	5110312	112	114243	51.10384	105910	45	41	32.42	0.51	217	217.0	5110384	210454	210454	5110384	100	106.115544	
01.00567	240	162	5110384	5110312	112	114243	51.10384	105910	45	41	32.42	0.51	217	217.0	5110384	210454	210454	5110384	100	106.115544	
01.00568	240	162	5110384	5110312	112	114243	51.10384	105910	45	41	32.42	0.51	217	217.0	5110384	210454	210454	5110384	100	106.115544	
01.00569	240	162	5110384	5110312	112	114243	51.10384	105910	45	41	32.42	0.51	217	217.0	5110384	210454	210454	5110384	100	106.115544	
01.00570	240	162	5110384	5110312	112	114243	51.10384	105910	45	41	32.42	0.51	217	217.0	5110384	210454	210454	5110384	100	106.115544	
01.00571	240	162	5110384	5110312	112	114243	51.10384	105910	45	41	32.42	0.51	217	217.0	5110384	210454	210454	5110384	100	106.115544	
01.00572	240	162	5110384	5110312	112	114243	51.10384	105910	45	41	32.42	0.51	217	217.0	5110384	210454	210454	5110384	100	106.115544	
01.00573	240	162	5110384	5110312	112	114243	51.10384	105910	45	41	32.42	0.51	217	217.0	5110384	210454	210454	5110384	100	106.115544	
01.00574	240	162	5110384	5110312	112	114243	51.10384	105910	45	41	32.42	0.51	217	217.0	5110384	210454	210454	5110384	100	106.115544	
01.00575	240	162	5110384	5110312	112	114243	51.10384	105910	45	41	32.42	0.51	217	217.0	5110384	210454	210454	5110384	100	106.115544	
01.00576	240	162	5110384	5110312	112	114243	51.10384	105910	45	41	32.42	0.51	217	217.0	5110384	210454	210454	5110384	100	106.115544	
01.00577	240	162	5110384	5110312	112	114243	51.10384	105910	45	41	32.42	0.51	217	217.0	5110384	210454	210454	5110384	100	106.115544	
01.00578	240	162	5110384	5110312	112	114243	51.10384	105910	45	41	32.42	0.51	217	217.0	5110384	210454	210454	5110384	100	106.115544	
01.00579	240	162	5110384	5110312	112	114243	51.10384	105910	45	41	32.42	0.51	217	217.0	5110384	210454	210454	5110384	100	106.115544	
01.00580	240	162	5110384	5110312	112	114243	51.10384	105910	45	41	32.42	0.51	217	217.0	5110384	210454	210454	5110384	100	106.115544	
01.00581	240	162	5110384	5110312	112	114243	51.10384	105910	45	41	32.42	0.51	217	217.0	5110384	210454	210454	5110384	100	106.115544	
01.00582	240	162	5110384	5110312	112	114243	51.10384	105910	45	41	32.42	0.51	217	217.0	5110384	210454	210454	5110384	100	106.115544	
01.00583	240	162	5110384	5110312	112	114243	51.10384	105910	45	41	32.42	0.51	217	217.0	5110384	210454	210454	5110384	100	106.115544	
01.00584	240	162	5110384	5110312	112	114243	51.10384	105910	45	41	32.42	0.51	217	217.0	5110384	210454	210454	5110384	100	106.115544	
01.00585	240	162	5110384	5110312	112	114243	51.10384	105910	45	41	32.42	0.51	217	217.0	5110384	210454	210454	5110384	100	106.115544	
01.00586	240	162	5110384	5110312	112	114243	51.10384	105910	45	41	32.42	0.51	217	217.0	5110384	210454	210454	5110384	100	106.115544	
01.00587	240	162	5110384	5110312	112	114243	51.10384	105910	45	41	32.42	0.51	217	217.0	5110384	210454	210454	5110384	100	106.115544	
01.00588	240	162	5110384	5110312	112	114243	51.10384	105910	45	41	32.42	0.51	217	217.0	5110384	210454	210454	5110384	100	106.115544	
01.00589	240	162	5110384	5110312	112	114243	51.10384	105910	45	41	32.42	0.51	217	217.0	5110384	210454	210454	5110384	100	106.115544	
01.00590	240	162	5110384	5110312	112	114243	51.10384	105910	45	41	32.42	0.51	217	217.0	5110384	210454	210454	5110384	100	106.115544	
01.00591	240	162	5110384	5110312	112	114243	51.10384	105910	45	41	32.42	0.51	217	217.0	5110384	210454	210454	5110384	100	106.115544	
01.00592	240	162	5110384	5110312	112	114243	51.10384	105910	45	41	32.42	0.51	217	217.0	5110384	210454	210454	5110384	100	106.115544	
01.00593	240	162	5110384	5110312	112	114243	51.10384	105910	45	41	32.42	0.51	217	217.0	5110384	210454	210454	5110384	100	106.115544	
01.00594	240	162	5110384	5110312	112	114243	51.10384	105910	45	41	32.42	0.51	217	217.0	5110384	210454	210454	5110384	100	106.115544	
01.00595	240	162	5110384	5110312	112	114243	51.10384	105910	45	41	32.42	0.51	217	217.0	5110384	210454	210454	5110384	100	106.115544	
01.00596	240	162	5110384	5110312	112	114243	51.10384	105910	45	41	32.42	0.51	217	217.0	5110384	210454	210454	5110384	100	106.115544	
01.00597	240	162	5110384	5110312	112	114243	51.10384	105910	45	41	32.42	0.51	217	217.0	5110384	210454	210454	5110384	100	106.115544	
01.00598	240	162	5110384	5110312	112	114243	51.10384	105910	45	41	32.42	0.51	217	217.0	5110384	210454	210454	5110384	100	106.115544	
01.00599	240	162	5110384	5110312	112	114243	51.10384	105910	45	4											

Tableau S6 : Résultat de ARG-Annot

LINE	TYPE	PROTEIN	PROTEIN_ID	PROTEIN_NAME	PROTEIN_DESC	PROTEIN_LEN	PROTEIN_MW	PROTEIN_PI	PROTEIN_PZ	PROTEIN_C	PROTEIN_N	PROTEIN_D	PROTEIN_E	PROTEIN_F	PROTEIN_G	PROTEIN_H	PROTEIN_I	PROTEIN_J	PROTEIN_K	PROTEIN_L	PROTEIN_M	PROTEIN_N	PROTEIN_O	PROTEIN_P	PROTEIN_Q	PROTEIN_R	PROTEIN_S	PROTEIN_T	PROTEIN_U	PROTEIN_V	PROTEIN_W	PROTEIN_X	PROTEIN_Y	PROTEIN_Z	
1	Sequence	Protein	ARG_1	Protein	Protein	100	10000	5.0	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100

Tableau S9: Number of isolates associated with a disease severity score per clonal lineage. The clonal lineage D, E and F were gathered because the number of isolates for which necropsy reports were available was low.

Clonal lineage	Disease severity score		Total
	0	1	
A	38	45	83
B	4	2	6
C	8	0	8
D, E, F	6	3	9
Total	56	50	106

Tableau S10 : Number of isolates associated with a disease severity score per clone within the clonal lineage A.

Clones within clonal lineage A	Disease severity score		Total
	0	1	
A1-subclone	2	3	5
A1	30	19	49
A2	3	0	3
A3	2	6	8
A4	6	2	5
Isolates belonging to no clones within the clonal lineage A	8	2	10
Total	43	30	73

Tableau S11 : Number of isolates associated with each stage of production. The clonal lineage D, E and F were gathered because the number of isolates for each clonal lineage was low.

Clonal lineage	Stage of production				Total
	Lactation	Post-Weaning	Growing-Finishing	Unknown	
A	20	90	10	11	131
B	0	6	1	0	7
C	1	10	0	0	11
D, E, F	7	14	1	2	24
Total	22	116	11	9	173

Tableau S12 : Number of isolates associated with each stage of production score per clone within the clonal lineage A.

Clones within clonal lineage	Stage of production				Total
	Lactation	Post-Weaning	Growing-Finishing	Unknown	
A					
A1-subclone	0	7	0	0	7
A1	13	53	1	5	72
A2	1	5	4	1	11
A3	3	8	2	1	14
A4	1	7	0	0	8
Isolates not belonging to any clone within clonal lineage A	2	10	3	1	16
Total	20	90	10	8	128

Appendice 5 : Résumé de l'étude des facteurs de risque de la présence et de la dissémination du clone AI dans les fermes porcines au Québec.

Contexte

Comme démontré dans l'article 5, il existe un clone à haut risque ETEC :F4 non susceptible à l'enrofloxacin (appelé clone AI) qui se dissémine dans la population porcine en Amérique du Nord.

Hypothèse

Il existe des facteurs favorisant la présence et la dissémination du clone AI (Cf article 5) dans les fermes porcines au Québec.

Objectifs

Analyser les facteurs de risques (présence et dissémination) des isolats appartenant au clone AI.

Matériel et Méthode

Nous avons collaboré avec le Dr Marie-Ève Lambert dont l'expertise nous a été d'une grande aide pour établir un questionnaire concis. Le questionnaire est disponible à la fin de cette appendice. Onze facteurs de dissémination ont été évalués. Nous avons sélectionné l'ensemble des 48 fermes (14 fermes contrôles, fermes sur lesquelles un isolat ETEC:F4 non clonal a été isolé, et 34 fermes sur lesquelles nous avons isolé un clone) pour lesquelles un ETEC :F4 a été isolé et dont le génome avait été séquencé au complet au cours des années 2017 et 2018. Nous avons choisi cette période d'étude afin de limiter le biais d'information. En effet, notre étude a été réalisée au cours de l'automne 2019. Le questionnaire a été soumis aux vétérinaires qui ont soumis les échantillons au laboratoire EcL. Ces vétérinaires ont été contactés par téléphone par Maud de Lagarde et ont participé à l'étude sur une base volontaire.

Une fois les données récoltées nous les avons analysées à l'aide du logiciel SAS.9.2. Nous avons utilisé une régression logistique. Nous avons utilisé dans un premier temps, une analyse univariée (avec la procédure proc logistic) pour sélectionner des facteurs qui seraient introduits dans l'analyse multivariée. Notre critère de sélection pour entrer dans le modèle multivarié était $P < 0.2$ (likelihood ratio). Nous avons testé les associations paarées, avec un test de χ^2 . En présence d'une association significative ($P > 0.05$), nous avons conservé un des deux facteurs basés sur la pertinence biologique. Le modèle final a été ensuite révisé en séquence en enlevant les facteurs de risque dont le $P > 0.05$.

Résultats

Sur les 48 isolats sélectionnés, nous avons récolté de l'information pour 44 isolats. Les 11 facteurs de risque avec lesquels nous avons fait le modèle multivarié était : le réseau (si la ferme faisait partie d'un réseau ou non), le nom du réseau, le nom du vétérinaire, le nombre de bâtiments sur la ferme, le type de production (maternité, pouponnière, engraissement), le type de roulement, le nombre et l'origine des de source (Québec ou autres états/province), si l'enrofloxacin avait été utilisée sur le site, si l'enrofloxacin avait été utilisée sur des sites en amont des lots (si les porcelets n'étaient pas en maternité). Nous n'avons identifié aucune association significative entre les facteurs différents de risque.

L'étude des facteurs de dissémination du clone n'a pas pu mettre en évidence de facteurs significatifs, même si certains facteurs tels que la taille de la ferme (les fermes présentant plus de 2 bâtiments auraient été à risque d'abriter le clone) ($p=0.051$) et le traitement avec de l'enrofloxacin en maternité (le traitement en amont avec de l'enrofloxacin aurait un effet protecteur sur la présence du clone à la ferme) ($p=0.06$).

Conclusion

L'étude des facteurs de dissémination du clone n'a pas pu mettre en évidence de facteurs significatifs. Cette étude rétrospective manquait probablement de puissance. En effet, dans le but d'éviter un biais d'information nous avons choisi une période d'étude restreinte à deux ans avant l'étude (2017-2018). Le nombre d'isolats ETEC :F4 séquencés (et donc appartenant (ou non) au clone AI avec certitude) était de ce fait limité. En revanche, deux facteurs approchaient le seuil de signification statistique (le nombre de bâtiments et l'utilisation de

l'enrofloxacin sur des sites en amont). Il serait très intéressant de recommencer une étude de ce type de manière prospective, en sélectionnant plus de fermes, pour confirmer ou infirmer ces deux facteurs. Le rôle « protecteur » de l'utilisation de l'enrofloxacin en amont est très surprenant et un peu frustrant. Cependant, il pourrait s'expliquer parce que les fermes en amont ont été forcées d'utiliser l'enrofloxacin dû à la présence du clone, qui a persisté malgré l'utilisation de l'enrofloxacin. Le manque d'information sur la présence du clone dans les sites en amont ne nous a pas permis de valider cette hypothèse.

Questionnaire

Questionnaire / Projet ETECF4 / 2017-2018 / Fermes porcines

Nom du Vétérinaire :

Nom de la ferme disponible dans le dossier :

Date de l'échantillon Disponible dans le dossier

1. Quel était le site échantillonné en date du _____ ?

- 1.1 Adresse complète
- 1.2 Municipalité
- 1.3 Code postal à 6 chiffres

Veillez répondre à l'ensemble des questions suivantes concernant la situation de cet élevage en date du _____ :

2. Quel était le nombre de bâtiments présents sur le site de production ?

3. Qui était le propriétaire des animaux présents sur le site ?

4. Qui était le propriétaire du site ?

5. Quel(s) étai(en)t le(s) type(s) de production présent(s) sur le site ?

*Veillez cocher **la ou les cases** qui s'appliquent*

- Maternité
- Pouponnière
- Engraissement
- Quarantaine/acclimatation

6. Quel était le roulement de production observé sur le site ?

Veillez cocher **la case** qui s'applique

- Tout-plein-tout-vide par site
- Tout-plein-tout-vide par bâtiment
- Tout-plein-tout-vide par chambre
- Rotation

6.1 : Pour les sites de maternités, veuillez indiquer si le roulement en mise-bas chambre tout-plein tout-vide ou en rotation.

7. Quel était le nombre de provenances différentes alimentant le site échantillonné ?

(Pour les maternités la réponse à cette question sera 1 source)

- Un site
- Deux sites

Plus de deux sites
Ne sait pas

8. Au moment de l'échantillonnage, quel était la provenance des animaux présents sur le site ?
Veuillez cocher **le ou les cases** qui s'appliquent.

Québec
Ontario
Manitoba
États-Unis
Autres

Svp, veuillez préciser : _____

Ne sait pas

9. Concernant l'utilisation de l'enrofloxacin

	Oui	Non	Ne sait pas
9.1 Il avait été administré au(x) cochon(s) échantillonné(s)			
9.2 Il avait été utilisé sur le site dans les 6 mois précédent l'échantillonnage			
9.3 Il avait été utilisé sur un site en amont* dans les derniers 6 mois précédent l'échantillonnage			

*Sur un ou plusieurs sites de provenance des animaux présents sur le site

Appendice 6 : Récapitulatif des gènes BLSE/AmpC retrouvés chez le porc entre 2018 et 2019.

Bactérie étudiée	Age des porcs/etat de sante (si disponible)	Pays	Période d'étude	Gènes	Plasmides	Référence
<i>E. coli</i> (<i>ETEC carrying mcr-genes</i>)	Inconnu	Espagne	2006-2016	<i>bla</i> _{CTX-M-14} <i>bla</i> _{CTX-M-32} <i>bla</i> _{SHV}		(442, 443)
<i>E. coli</i>	Porcs à l'engraissement	Allemagne	2015	<i>bla</i> _{VIM-1}	IncHI2	(444)
<i>E. coli</i>	Porcs à l'engraissement et adulte	Philippines		<i>bla</i> _{CTXM}		(445)
<i>E. coli</i>	Inconnu	Portugal	2018	<i>bla</i> _{CTX-M-15} <i>bla</i> _{CTX-M-1} <i>bla</i> _{CTX-M-9} <i>bla</i> _{CTXM}		(446)
<i>E. coli</i>	Porcelets postsevrage	Inde	Non précisé	<i>bla</i> _{TEM} <i>bla</i> _{SHV} <i>bla</i> _{CMY-2} <i>bla</i> _{CTX-M-55}		(447)
<i>E. coli</i>	Porcs sains (âge non précisé)	Thaïlande	Octobre-novembre 2013	<i>autre</i> <i>bla</i> _{CTX-M} <i>bla</i> _{TEM}		(448)

Bactérie étudiée	Age des porcs/état de santé (si disponible)	Pays	Période d'étude	Gènes	Plasmides	Référence
				<i>bla_{SHV}</i>		
<i>E. coli</i> <i>co-harboring mcr-1</i>	Porcs sains et morts (âges non précisés)	Jiangsu, Chine	Août 2016- décembre 2017	<i>bla_{CTXM}</i> <i>bla_{TEM}</i> <i>bla_{SHV}</i>		(449)
<i>E. coli</i>	Porcelets pré et postsevrage avec et sans diarrhée	Inde	2014-2017	<i>bla_{CTX-M-1}</i> <i>bla_{TEM}</i>		(450)
<i>E. coli</i>	Porcs et environnement	Chine				(451)
<i>E. coli</i>	Porcelets en diarrhée et porcs à l'engraissement sains	Argentine	2017	<i>bla_{CTX-M}</i> (détection des 4 groupes de CTX-M)		(452)
<i>E. coli</i> (également porteur de <i>mcr-1-9</i>)	Non précisé (ceacum) 1 seul isolat (séquencé complètement)	Portugal	2015	<i>bla_{PER}</i> <i>bla_{CMY}</i> <i>bla_{CTX-M-8}</i>	IncX4	(453)

Bactérie étudiée	Age des porcs/etat de sante (si disponible)	Pays	Période d'étude	Gènes	Plasmides	Référence
)			<i>bla</i> _{CTX-M-1}		
				<i>bla</i> _{CTX-M-14}		
<i>E. coli</i>	Non précisé	Portugal	2015	<i>bla</i> _{CTX-M-27} <i>bla</i> _{CTX-M-32} <i>bla</i> _{TEM} <i>bla</i> _{SHV-12} <i>bla</i> _{CTX-M}		(454)
<i>K. pneumoniae</i>	Non précisé	Malaisie		<i>bla</i> _{TEM} <i>bla</i> _{SHV}		(455)
<i>Nontyphoidal Salmonella enterica</i>	Cas cliniques	États-Unis	2014-2016	<i>bla</i> _{CMY-2} <i>bla</i> _{CTX-M-1} <i>bla</i> _{CTX-M-27} <i>bla</i> _{SHV-12} <i>bla</i> _{TEM-70} <i>bla</i> _{TEM-186}		(456)
<i>E. coli</i>	Porcelets de 10 jours à 16 semaines	États-Unis	Novembre 2013 - décembre 2014	<i>bla</i> _{CTX-M-32} <i>bla</i> _{SHV-12} <i>bla</i> _{OXA-1} <i>bla</i> _{CMY-44} <i>bla</i> _{CMY-33} <i>bla</i> _{CMY-22}		(166)

Bactérie étudiée	Age des porcs/etat de sante (si disponible)	Pays	Période d'étude	Gènes	Plasmides	Référence
				<i>bla</i> _{CMY-44}		
<i>E. coli</i> and <i>Enterococcus spp</i>	Non précisé	Estonie	2010-2015	<i>bla</i> _{TEM-52}		(457)
<i>Elizabethkingia Meningoseptica</i> (one isolate)	Adultes sains	Espagne	2012-2017	<i>bla</i> _{B-12_1} <i>bla</i> _{GOB-17_1}		(458)
				<i>bla</i> _{CTX-M-55}		
				<i>bla</i> _{CTX-M-27}		
<i>E. coli</i>	Tous âges	Cambodge	Mai 2011	<i>bla</i> _{CTX-M-14} <i>bla</i> _{CMY-2} <i>bla</i> _{TEM} <i>bla</i> _{OXA} <i>bla</i> _{CTX-M-1} <i>bla</i> _{CTX-M-2} <i>bla</i> _{CTX-M-3}		(459)
				<i>bla</i> _{CTX-M-9}		
<i>E. coli</i>	Tous âges (contexte de surveillance)	Pays-Bas	2007-2017	<i>bla</i> _{CTX-M-27} <i>bla</i> _{CTX-M-8} <i>bla</i> _{CTX-M-32} <i>bla</i> _{CTX-M-15} <i>bla</i> _{CTX-M-14}		(460)

Bactérie étudiée	Age des porcs/etat de sante (si disponible)	Pays	Période d'étude	Gènes	Plasmides	Référence
				<i>bla</i> _{CTX-M-65}		
				<i>bla</i> _{CMY-2}		
				<i>bla</i> _{TEM-52}		
				<i>bla</i> _{TEM-20}		
				<i>bla</i> _{SHV-12}		
				<i>bla</i> _{TEM-1}		
				<i>bla</i> _{GES-1}		
				<i>bla</i> _{OXA-1}		
Extraction d'ADN d'échantillon fécaux	Tout âge	Chine du Nord	Juillet et décembre 2017	<i>bla</i> _{CMY-2} <i>bla</i> _{SHV} <i>bla</i> _{DHA} <i>bla</i> _{KPC-2} (<i>bla</i> _{CTX-M} n'a pas été recherché)		(461)
<i>E. coli</i>	Contexte diagnostic et porcs sains	France	2006-2016	<i>bla</i> _{CTX-M-1} <i>bla</i> _{CTX-M-27} <i>bla</i> _{CTX-M-14}	Incl1/ST3 incFII/incFIB IncN	(462)
<i>E. coli</i>	Échantillons fécaux et environnement	Allemagne	2011-2012	<i>bla</i> _{CTX-M} <i>bla</i> _{TEM} <i>bla</i> _{SHV}		(463)

Bactérie étudiée	Age des porcs/etat de sante (si disponible)	Pays	Période d'étude	Gènes	Plasmides	Référence
	taux			(pas d'identification des variantes)		
<i>E. coli</i>	Échantillons fécaux porcs sains	Liban	Mai 2017	<i>bla_{CTX-M}</i> <i>bla_{CMY}</i>		(464)
<i>E. coli</i>	Porcs sains ou en diarrhée	Chine du Nord Est	Mai 2015 -juin 2017	<i>bla_{CTX-M-14}</i> <i>bla_{CTX-M-15}</i> <i>bla_{CTX-M-64}</i> <i>bla_{CTX-M-9}</i> <i>bla_{CTX-M-123}</i> <i>bla_{SHV-12}</i> <i>bla_{TEM-1}</i> <i>bla_{KPC}</i> <i>bla_{OXA-48}</i>		(465)
<i>E. coli</i>	Viande de porc	Importé en Allemagne en provenance du Chili	2014-2015	<i>bla_{CTX-M-12}</i>		(466)
<i>E. coli</i>	Échantillons fécaux et	Brésil du Sud	Mars 2016	<i>bla_{CMY-2}</i> <i>bla_{SHV-1}</i>		(467)

Bactérie étudiée	Age des porcs/état de santé (si disponible)	Pays	Période d'étude	Gènes	Plasmides	Référence
	environnement		mai 2017	<i>bla_{TEM-1}</i> <i>bla_{CTX-M-2}</i> <i>bla_{OXA-1}</i> <i>bla_{PSE-1}</i>		
<i>Salmonella</i>	Carcasses dans des abattoirs	Italie	Septembre 2016 - mai 2017	Aucun		(468)
<i>E. coli</i>	Échantillons fécaux (tout âge)	Inde (Assam et Meghalaya)	Non précisé	<i>bla_{CMY}</i>		(469)
<i>Salmonella</i>				<i>bla_{TEM}</i> <i>bla_{CTX-M}</i>		
<i>K. pneumoniae</i>						
<i>E. coli</i>	Viande de porc	Allemagne	2012-2013	<i>bla_{CTX-M-1}</i>	incl1-ST3	(470)
<i>Enterobacter aerogenes</i>	Viscères de porc dans un abattoir	Cameroun	Non précisé	<i>bla_{CTX-M-15}</i> <i>bla_{TEM-1B}</i> <i>bla_{ACT-6}</i>		(471)
<i>E. coli</i>	Échantillons fécaux de porcs à l'abattoir	Nigeria	Septembre - novembre 2015	<i>bla_{CTX-M-15}</i> <i>bla_{SHV}</i>		(472)
<i>E. coli</i>	Carcasses de porc à l'abattoir	Belgique	Octobre 2015 - février 2016	<i>bla_{CTX-M-gr1}</i> <i>bla_{TEM}</i>		(473)

Bactérie étudiée	Age des porcs/etat de sante (si disponible)	Pays	Période d'étude	Gènes	Plasmides	Référence
<i>E. coli</i>	Échantillons fécaux porcs adultes sains	Vietnam	Mai à juillet 2015	<i>bla_{CTX-M}</i> <i>bla_{TEM}</i>		(474)
<i>Acinetobacter baumannii</i>	Viande de porc (échantillonné e au supermarché)	Australie	Mars à juin 2014	<i>bla_{CMY-2}</i>		(475)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>						
<i>Serratia fonticola</i>						
<i>E. coli</i>						