



Rapport produit pour le Réseau porcin du MAPAQ :

Rapport sur les tendances des *Escherichia coli* pathogènes chez le porc au Québec -Comparaison des données obtenues en 2020 avec les quatre années précédentes

John Morris Fairbrother, Expert

Ghyslaine Vanier, Professionnelle de Laboratoire

Gabriel Desmarais, Professionnel de Laboratoire

Laboratoire de référence de l'OIE pour *Escherichia coli* (ECL)

Service de Diagnostic

Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal

30 avril 2021

Glossaire

<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EPEC	<i>E. coli</i> entéropathogène
ESBL	Beta-lactamases à spectre étendu
ETEC	<i>E. coli</i> entérotoxinogène
ETEC:F4	<i>E. coli</i> entérotoxinogène possédant le fimbriae F4
ETEC:F18	<i>E. coli</i> entérotoxinogène possédant le fimbriae F18
ETEC :STEC :F18	<i>E. coli</i> entérotoxinogène et verotoxinogène possédant le fimbriae F18
ExPEC	<i>E. coli</i> extra-intestinal pathogène
F4 (K88)	fimbriae F4 (K88) (adhésine fimbrillaire)
F5 (K99)	fimbriae F5 (K99) (adhésine fimbrillaire)
F18	fimbriae F18 (F107) (adhésine fimbrillaire)
MDR	isolat multi-résistant (aux antimicrobiens) ou multi-résistance
LT	entérotoxine non-stable à la chaleur (labile) « LT »
pathotype	ensemble de bactéries, ici <i>E. coli</i> , possédant des caractéristiques communes (ex. toxines et ou adhésines) et causant des pathologies distinctives (ex. EPEC, ETEC, STEC)
pathovirotype	pathotype plus détaillé avec certaines informations sur le virotype (sous-groupe d'isolats d'un même pathotype)
STa	entérotoxine stable à la chaleur (STa ou STI)
STb	entérotoxine stable à la chaleur (STb ou STII)
STEC	<i>E. coli</i> producteur de Shiga toxine(s) (ou vérotoxinogène)
STEC:F18	<i>E. coli</i> producteur de Shiga toxine(s) (ou vérotoxinogène) possédant le fimbriae F18
Stx	Shiga toxine ou vérotoxine
virotype	ensemble des gènes de virulence dont la présence a été détecté pour un isolat
XDR	isolat largement multi-résistant (<i>extensively drug resistant</i>) selon la définition dans Magiorakos <i>et al.</i> 2012
WGS	Séquençage du génome complet (<i>whole genome sequencing</i>)
2TF4	isolat de virotype STb :LT :F4
3TF4	isolat de virotype STa : STb :LT :F4

1) Mise en situation

Origine des échantillons : Les échantillons ayant servi à produire les isolats étudiés dans ce rapport proviennent des cas porcins soumis au laboratoire ECL au courant de l'année 2020. Ils proviennent de cas de porcs malades au Québec. Ce sont tous les cas reçus au laboratoire ECL, incluant les cas transférés par le Laboratoire de santé animale du MAPAQ et par le Centre de diagnostic vétérinaire de l'Université de Montréal (CDVUM) de la Faculté de médecine vétérinaire. Ce sont majoritairement des frottis d'intestins (iléon ou côlon) réalisés au moment de la nécropsie ou des écouvillons rectaux réalisés sur des animaux vivants.

Définition d'un cas : Tous les échantillons provenant d'un même animal malade. Ici l'animal malade est un porc ayant démontré des signes de diarrhée pré-ou post-sevrage ou des signes de maladie de l'œdème. Si des échantillons de plus d'un animal de la même ferme sont soumis en même temps, ils seront considérés comme faisant partie du même cas.

Isolats : lien avec diarrhée à la ferme : Les isolats isolés au niveau des prélèvements d'intestins ou d'écouvillonnages rectaux sont réputés avoir colonisé l'intestin. Si on détecte la présence d'entérotoxines et de certains fimbriae sur ces isolats, ils sont alors reconnus comme agents causatifs de la diarrhée chez l'animal.

*Pour une description plus en détails de la pathogénèse de la diarrhée chez le porc par les *E. coli*, voir le site web du laboratoire ECL (<http://www.ecl-lab.ca/fr/ecoli/pathogenesis.asp>).*

2) Cas soumis

Entre 2016 et 2019, de 459 à 503 cas (moyenne de 486 ± 21 cas) de porc du Québec ont été soumis au Laboratoire ECL par année. De ces cas, entre 46,7% et 55,7% ($51,3 \pm 3,6\%$) se sont avérés positifs et nous y avons détecté la présence d'*Escherichia coli* comme agent de diarrhée ou de maladie de l'œdème. Au cours de l'année 2020, le nombre de cas

soumis est inférieur à celui de l'année précédente, soit 457 cas au lieu de 494 cas. Ce nombre est légèrement plus bas que la moyenne des quatre dernières années. Parmi les cas soumis en 2020, 52,1% étaient positifs, ce qui est similaire à la moyenne des années précédentes (Tableau 1).

Tableau 1. Nombre de cas totaux et positifs à *E. coli* soumis entre 2016 et 2020

Année	Nombre total de cas soumis	Nombre de cas à partir desquels <i>E. coli</i> comme agent de diarrhée ou maladie de l'œdème a été isolé (% des cas totaux)
2016	503	247 (49.1%)
2017	459	256 (55.7%)
2018	487	261 (53,6%)
2019	494	231 (46,7%)
2020	457	238 (52,1%)

3) Les pathotypes détectés

Durant la période de 2016 à 2020, le pathovirotype le plus prévalent a été le ETEC:F4 (*E. coli* entérotoxigène possédant le fimbriae F4 et causant majoritairement la diarrhée post-sevrage). Ainsi, 106 cas (21,2%), 114 cas (24,8%), 115 cas (23,6%) et 82 cas (16,6%) ont été positifs en 2016, 2017, 2018 et 2019, respectivement (Figure 1). En 2020, on note une légère remontée du nombre de cas d'ETEC:F4, soit 89 cas (19,5%).

Par ailleurs, on note l'augmentation des cas de ETEC :F18 (*E. coli* entérotoxigène possédant le fimbriae F18) en 2020 par rapport aux 4 années précédentes, avec 41 cas (9,0%), bien que le nombre absolu soit stable depuis l'année dernière (41 cas et 8,5% des cas en 2019). Malgré cette augmentation, le pathotype ETEC :F18 retourne au 3^e rang des plus prévalents au Québec, derrière les EPEC pour l'année 2020 (Figure 1).

Des *E. coli* au phénotype hybride « ETEC :STEC :F18 » (des *E. coli* entérotoxigènes et verotoxinogènes possédant le fimbriae F18) continuent à être détectés en 2020 (9 cas, 2,0%) et leur prévalence semble relativement stable. Un cas d'ETEC :F4 :F18 a été détecté

en 2020 et sa présence était sporadique entre 2016 et 2019 (entre 0 et 1 cas par année). Un cas d'EPEC :STEC :F4 :F18 et un cas d'EPEC :STEC :F4 ont aussi été détectés en 2020.

Pour ce qui est des EPEC :F5, on a détecté 9 cas en 2020 (2,0%), ce qui est plus du double que ce qui avait été détecté précédemment (entre 0 et 5 cas par année entre 2016 et 2019).

L'agent causatif de la maladie de l'œdème STEC:F18 a été détecté dans 3 cas en 2020 (0,7%). Il s'agit d'une remontée par rapport à 2019 (1 cas, 0,2%). Cependant, sa prévalence a diminué depuis le début la période étudiée passant de 1,4 % en 2016 à 0,2% en 2019 (Figure 1).

Au niveau des agents opportunistes de diarrhée, des isolats entéropathogènes EPEC (également à considérer pour la santé publique) sont présents dans 9,6% des cas de 2020, ce qui représente leur niveau le plus élevé en 5 ans (5,1% à 9,1% des cas sur la période étudiée) (Figure 1). Cette augmentation permet aux EPEC de retourner au 2^e des pathovirotypes les plus prévalents au Québec pour cette année.

Finalement, un deuxième type d'agents opportunistes de diarrhée, les EPEC STa :STb, ont été détectés chez un nombre considérable de cas (12 cas, 2.6%) en 2020. Ce nombre de cas est égal à ceux détectés en 2018 (13 cas, 2.7%) et 2019 (12 cas, 2,6%). Ces isolats sont négatifs pour les fimbriae F4 et F18.

Note au lecteur : *Pour une description détaillée des tendances temporelles des différents pathotypes et profils d'antibiorésistance des isolats E. coli soumis au Laboratoire ECL entre 2008 et 2016, voir notre publication récente (de Lagarde et al. 2021, J Appl Microbiol, annexe 1).*

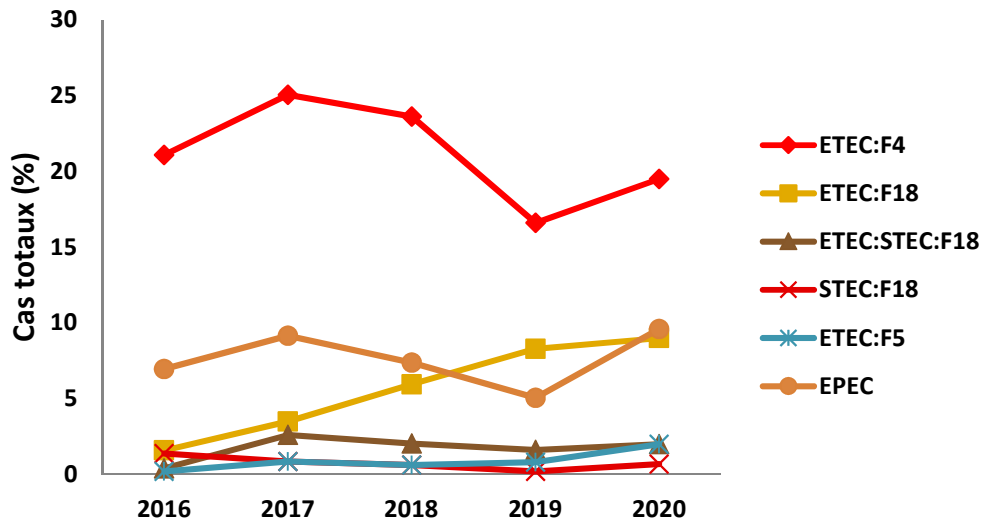


Figure 1 : Les différents pathotypes d'*E. coli* détectés entre 2016 et 2020 sur les cas de porc du Québec soumis au laboratoire *E. coli*.

4) Les ETEC :F4

4.1) Les différents pathovirotypes de ETEC:F4 en détails

C'est en 2014 qu'on a commencé à détecter les LT:STb:STa:F4 (3TF4) avec 10,3% des cas. Par la suite, un sommet a été atteint en 2015 avec 15,8% des cas. Par contre, au courant de la période étudiée de 2016-2020, la prévalence a diminué avec 11,1%, 11,3%, 8,6% et 3,4% des cas en 2016, 2017, 2018 et 2019 pour atteindre un niveau encore plus bas de 2,0% en 2020 (Figure 2).

Pour ce qui est des cas positifs à LT:STb:F4 (2TF4, le virotype majoritaire avant 2014), après un pic en 2017 (8,9%), leur prévalence n'a cessé de diminuer (7,8% et 4,7% des cas en 2018 et 2019, respectivement) pour atteindre 3,1% des cas en 2020 (14 cas) (Figure 2).

Inversement, le nombre de cas positifs dus aux STa :STb :F4 a constamment augmenté au courant de la période de 2016 à 2020. Ainsi, il est passé de 1,4% en 2016 à 13,1 % en 2020

(60 cas) pour dépasser la prévalence des 3TF4 et 2TF4, même combinés ensemble (Figure 2). Ceci en fait donc le virotype le plus prévalent des ETEC :F4 isolées en 2019 et 2020.

D'autres ETEC :F4 (c'est-à-dire ceux possédant une combinaison différente d'entérotoxines que celles mentionnées ci-haut) ont également été détectées au courant de 2020 (7 cas, 1,5%) et leur prévalence reste similaire à celle mesurée au courant des 4 dernières années (entre 0,6% et 2,4%) (Figure 2).

Avec la baisse de la prévalence des cas liés aux 2 virotypes majoritaires depuis les dernières années (3TF4 et 2TF4), mais une augmentation substantielle des cas à STa :STb :F4, on note quand même un rebond dans le nombre de cas à ETEC :F4 en 2020, soit 19,5% (comparé à 16,6% en 2019).

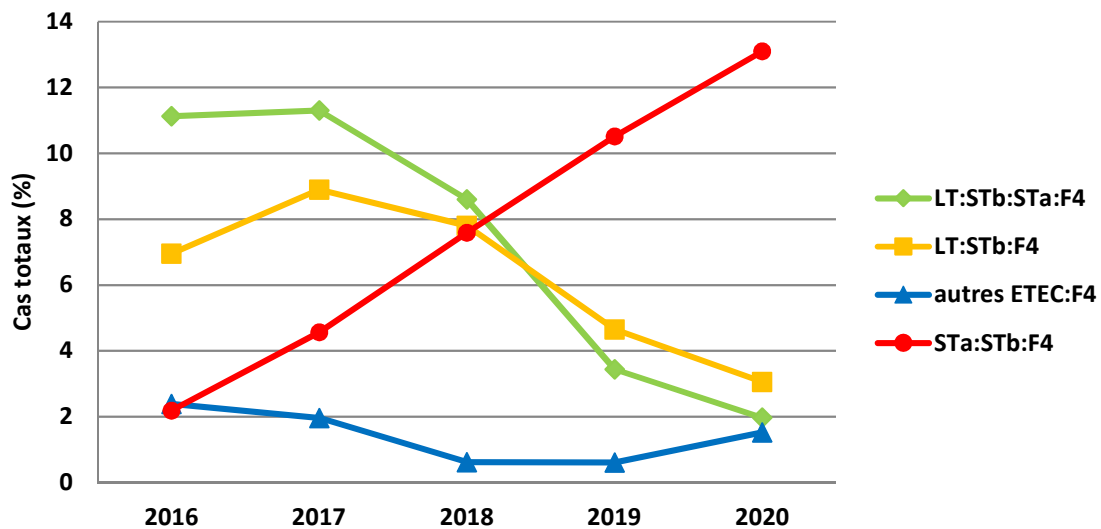


Figure 2 : Prévalence des cas positifs à ETEC:F4 entre 2016 et 2020

4.2) Les cas à ETEC :F4 selon l'âge des porcs

En 2020, le nombre de cas causés par les ETEC :F4 en maternité (17 cas) a légèrement diminué comparé à ceux observés en 2018 (21 cas) et 2019 (21 cas) après un pic en 2016 (35 cas). De plus, bien qu'en 2017, les 3 types de ETEC :F4 (3TF4, 2TF4 et STa :STb :F4)

étaient responsables environ à parts égales des cas en maternité, depuis les 3 dernières années, le tableau change. En effet, depuis 2018, la majorité des cas sont dus aux STa:STb:F4 (9 cas sur 17 en 2020). Au niveau des pouponnières, le nombre de cas à ETEC:F4 en 2020 a augmenté (67 cas) par rapport à l'an dernier (58 cas en 2018), mais leur niveau a varié grandement au courant de la période allant de 53 à 96 cas entre 2016 et 2020. Tout comme l'année dernière, le virotype prédominant en pouponnière est le STa:STb:F4, suivi du virotype LT:STb:F4 (2TF4) et du virotype LT:STb:STa:F4 (3TF4) au 3^e rang.

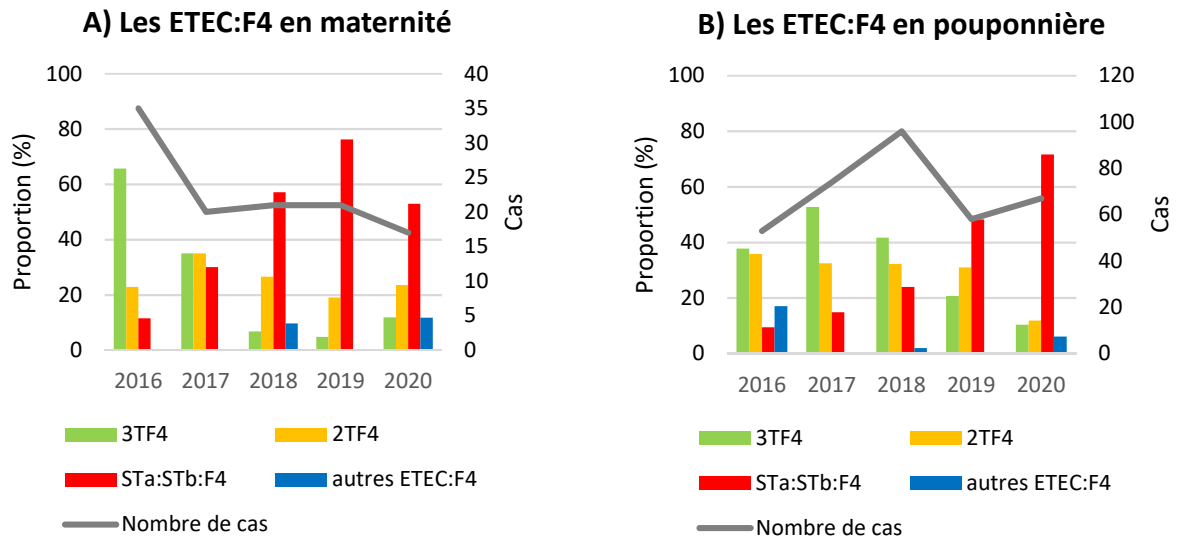


Figure 3 : Proportion des différents virotypes isolés dans les cas de ETEC:F4 selon le stade de production, en maternité (A) et en pouponnière (B) et nombre de cas détectés.

4.3) Résistance à l'enrofloxacin des ETEC:F4

L'émergence des cas de LT:STb:STa:F4 (3TF4) non-susceptibles à l'enrofloxacin (antibiotique de catégorie I, de très haute importance en médecine humaine, dont l'usage

est restreint à titre curatif chez les animaux de consommation depuis février 2019) a eu lieu au début 2014 et cette non-susceptibilité (isolats intermédiaires et isolats résistants) persiste depuis. En 2020, la totalité des 9 isolats 3TF4 étaient intermédiaires (Figure 4A).

De leur côté, tous les isolats LT:STb:F4 (2TF4) étaient sensibles à l'enrofloxacin au début de 2014, mais à partir de ce moment-là, on a noté un changement dans la population des 2TF4 et on a observé l'apparition d'isolats intermédiaires et même des isolats résistants à partir de 2016. En 2020 (n=14), la proportion d'isolats sensibles est de 64%, comparativement à 44% en 2017, 54% en 2018 et 46% en 2019 (Figure 4B).

La non-susceptibilité à l'enrofloxacin chez les ETEC :F4 (3TF4 et 2TF4) du Québec depuis 2014 a été attribuée à l'accumulation de plusieurs mutations au niveau des gènes *gyrA* et *parC* (majoritairement *gyrA* (S83L) et *parC* (S80I), respectivement) chez ces isolats (de Lagarde *et al.* 2021, Antibiotics, annexe 2).

En 2020, un isolat STa :STb :F4 (n=60), était résistant et un second était intermédiaire à l'enrofloxacin, tandis que 4 étaient résistants en 2019 (n = 43) (Figure 4C). Lorsque les isolats de 2016 à 2018 sont observés, on note quelques isolats intermédiaires ou résistants. Ceci démontre que la présence de quelques isolats intermédiaires ou résistants à l'enrofloxacin n'est pas un phénomène nouveau en 2020 et était déjà présente au courant des 5 dernières années.

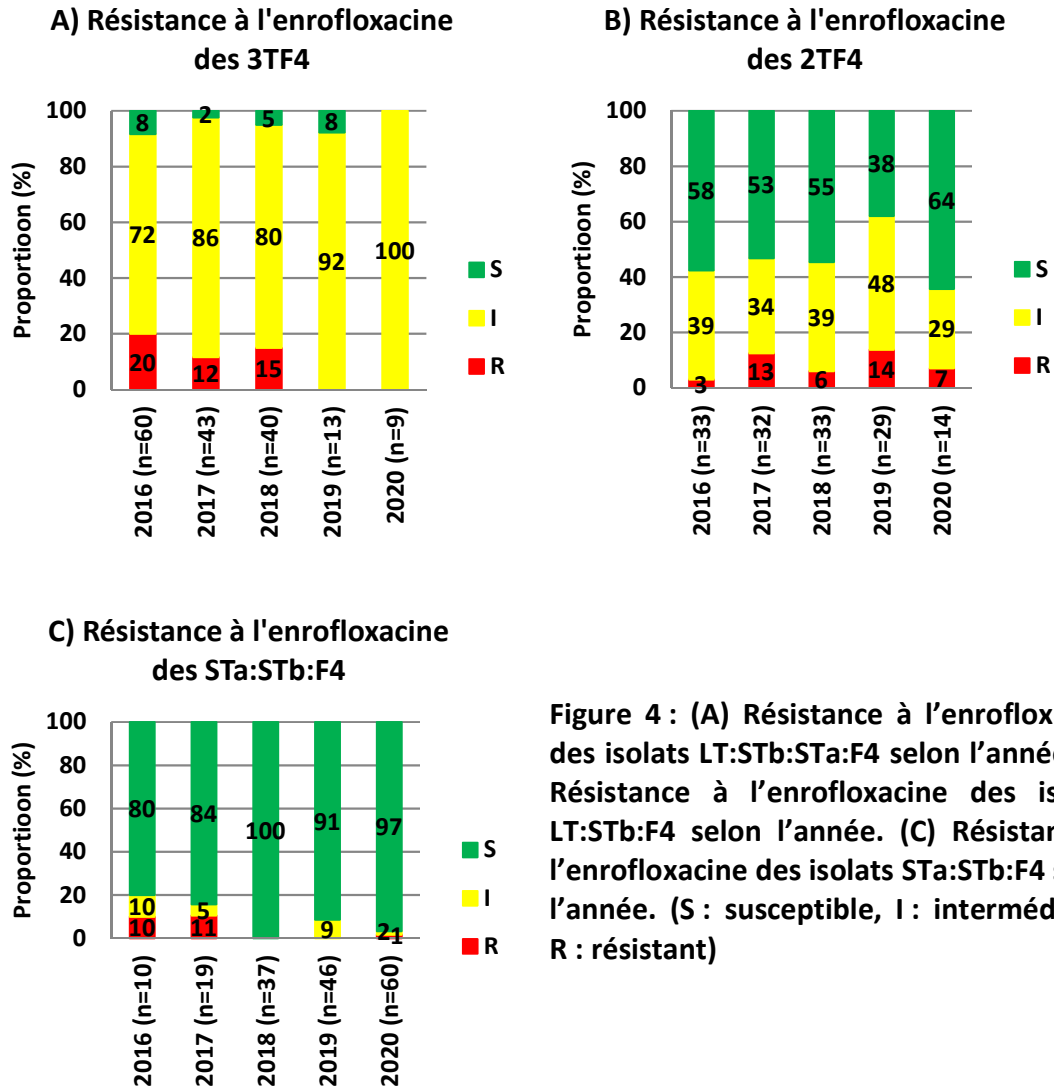


Figure 4 : (A) Résistance à l'enrofloxacin des isolats LT:STb:STa:F4 selon l'année. (B) Résistance à l'enrofloxacin des isolats LT:STb:F4 selon l'année. (C) Résistance à l'enrofloxacin des isolats STa:STb:F4 selon l'année. (S : susceptible, I : intermédiaire, R : résistant)

4.4) Résistance au ceftiofur des ETEC:F4

Les ETEC :F4 montrent également une non-sensibilité notable pour le ceftiofur, qui est lui aussi un antibiotique de catégorie I, suggérant la présence d'une Beta-lactamase à large spectre (ESBL) ou Beta-lactamase AmpC chez ces isolats, ce qui en fait des souches d'intérêts pour la santé publique. La proportion d'isolats non-susceptibles au ceftiofur a varié considérablement au cours des dernières années (Figure 5). Ainsi, bien qu'elle semble diminuer chez les 3TF4 depuis 2018, elle semble stable depuis 2018 chez les 2TF4, tout en augmentant chez les STa :STb :F4 (Figure 5).

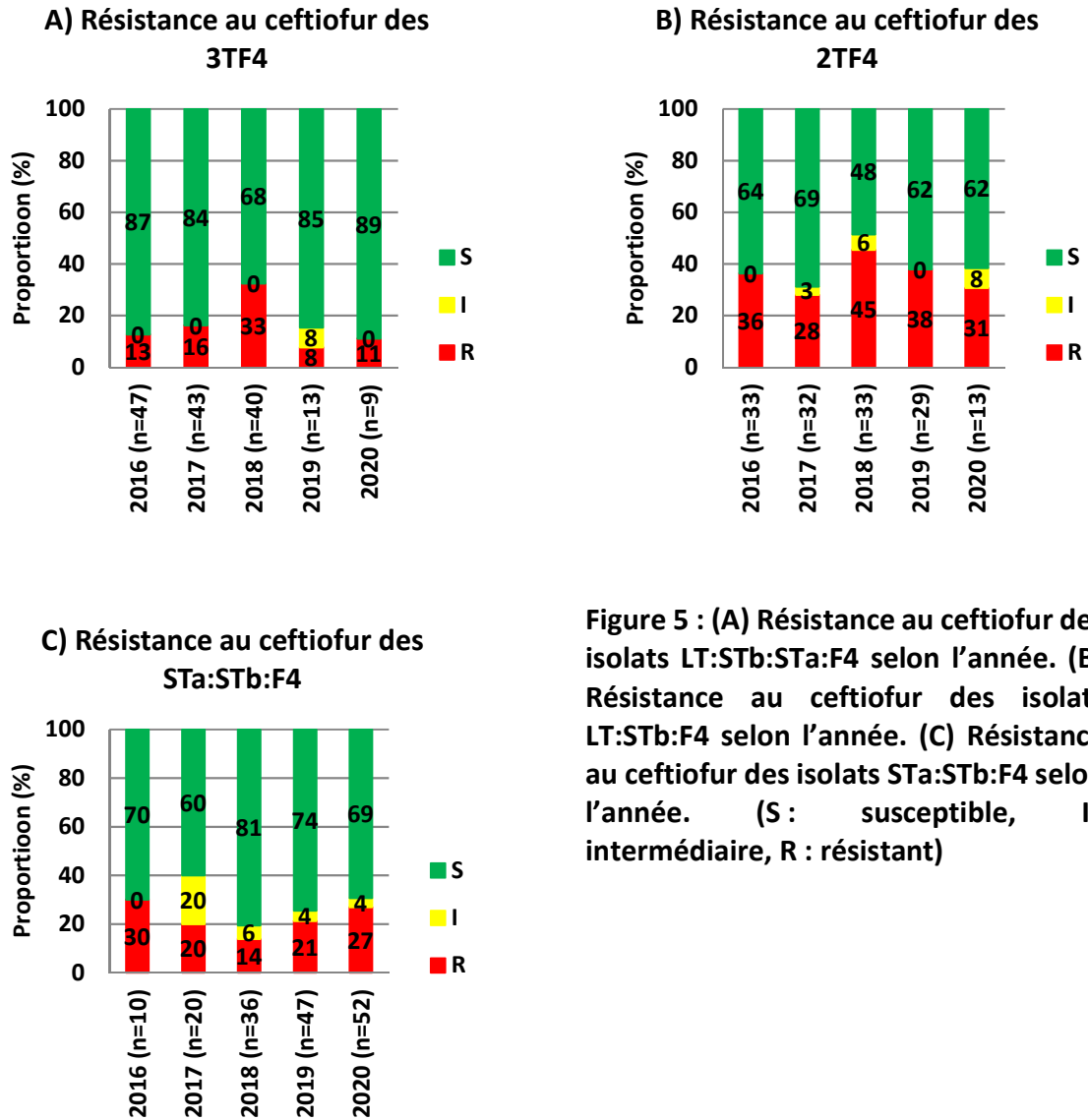


Figure 5 : (A) Résistance au ceftiofur des isolats LT:STb:STa:F4 selon l'année. (B) Résistance au ceftiofur des isolats LT:STb:F4 selon l'année. (C) Résistance au ceftiofur des isolats STa:STb:F4 selon l'année. (S : susceptible, I : intermédiaire, R : résistant)

4.5) Multi-résistance chez les ETEC :F4

La multi-résistance des isolats a également été étudiée chez les isolats ETEC:F4. Elle se définit comme la non-susceptibilité au nombre de catégories d'antimicrobiens testés (Magiorakos *et al.*, 2012). Face aux 8 catégories d'antimicrobiens à l'étude, les isolats ETEC:F4 provenant des virotypes 3TF4 et 2TF4 ont démontré des profils de non-susceptibilité différents. Depuis 2016, il y a peu d'isolats 3TF4 non-MDR (moins de 7%) et en 2020, aucun isolat 3TF4 non-MDR (sur un total de 9 isolats) n'a été isolé (Figure 6A).

Par ailleurs, les isolats MDR de 3 à 4 classes, qui représentaient entre 48% et 79% des ETEC:F4 au courant de ces 4 années précédentes ont montré une stabilité si on compare le nombre observé en 2020 (77,8%) à celui de 2019 (79%). Quant aux isolats MDR de 5 à 6 classes, on observe une baisse de leur proportion depuis le pic de 2016 (44%), pour descendre à 14% en 2019 et remonter à 22% en 2020. Finalement, il est important qu'aucun isolat 3TF4 possiblement XDR (*extensively drug resistant*), n'a été observé cette année. Leur présence continue, bien que minime, avait été observée depuis 2016.

Pour l'année 2020, dans le cas des isolats 2TF4, on observe un retour graduel de la proportion des isolats non-MDR (21%) au niveau de 2015 (22%) après une baisse importante entre 2016 et 2018 (Figure 6B), tout comme en 2019 (19%). Du côté de la proportion des isolats MDR de 3-4 catégories (28,6% en 2020) bien qu'elle ait diminué depuis 2016, elle reste stable par rapport à celles de 2018 et 2019 (30% et 31%, respectivement). En 2020, la proportion des isolats MDR de 5 à 6 classes représente 50% des isolats, c'est comparable aux proportions observées entre 2016 et 2019 (entre 37 et 50% des isolats). Aucun isolat possiblement XDR n'a été observé en 2020, bien que quelques isolats aient été isolés entre 2016 et 2019.

De leur côté, les isolats STa:STb :F4 isolés en 2020 sont pour la plupart MDR de 3 à 4 classes (53%) ou de 5 à 6 classes (36%), ce qui est similaire aux proportions observées depuis 2016, ces proportions variant d'une année à l'autre (un tiers et 2 tiers étant non-susceptibles à 3 à 4 ou 5 à 6 classes d'antimicrobiens) (Figure 6C). Peu d'isolats sont non-MDR depuis 2016 (entre 0 et 9%). Un premier isolat possiblement XDR a été isolé en 2019. Fait à noter, ils démontrent également un patron de résistance typique avec environ 98% des isolats résistants au triméthoprim-sulfaméthoxazole, 83% des isolats résistants à la néomycine, 79% résistants aux tétracyclines, 66% non-susceptibles aux phénicolés, 40% résistants à l'ampicilline, 36% non-susceptibles à la spectinomycine, 31% non-susceptibles au ceftiofur, 9% non-susceptibles à l'apramycine et 7% à la gentamycine (données non-montrées). Un isolat (1,9%) a démontré une résistance intermédiaire à

l'enrofloxacin. Par ailleurs, seulement 13% des isolats étaient pleinement sensibles aux 4 aminoglycosides testés.

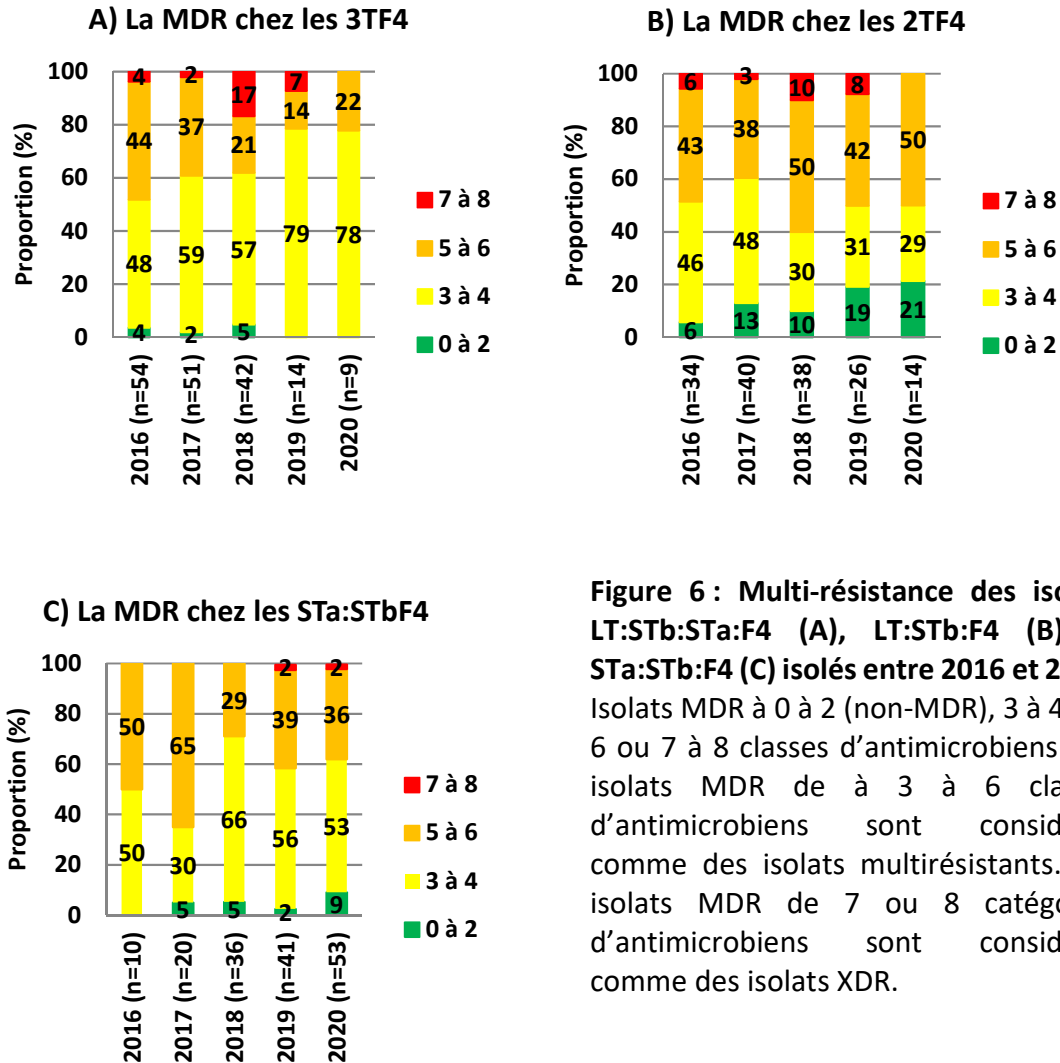


Figure 6 : Multi-résistance des isolats LT:STb:STa:F4 (A), LT:STb:F4 (B) et STa:STb:F4 (C) isolés entre 2016 et 2020. Isolats MDR à 0 à 2 (non-MDR), 3 à 4, 5 à 6 ou 7 à 8 classes d'antimicrobiens. Les isolats MDR de à 3 à 6 classes d'antimicrobiens sont considérés comme des isolats multirésistants. Les isolats MDR de 7 ou 8 catégories d'antimicrobiens sont considérés comme des isolats XDR.

4.6) Séquençage du génome complet (WGS) sur des isolats STa :STb :F4 de 2020

Tel que mentionné précédemment et pour une deuxième année consécutive, les ETEC :F4 de pathovirotype STa :STb :F4 constituent le pathovirotype le plus prévalent en 2020 chez les porcs du Québec (13,1%). Ainsi, un nombre considérable de cas STa :STb :F4 a été

répertorié en 2020 (60 cas). La plupart (81%) de cas provenaient de porcs en pouponnière, mais aussi de porcs en maternité (12%) et de porcs en engraissement (7%).

Pour mieux caractériser ce type d'isolats, certains des spécimens isolés en 2020 (4) ont été séquencés par WGS au laboratoire (technologie Illumina, mini-séquenceur iSeq100). Ceci permet la recherche simultanée de centaines de gènes de virulence, de gènes de résistance, de mutations impliquées dans l'antibiorésistance, de séquences plasmidiques ainsi que la détermination du phylogroupe, du ST (MLST, basé sur 7 gènes et du sérotype O:H. Un isolat par trimestre a été sélectionné au hasard. Leurs résultats ont été comparés à ceux d'autres isolats porcins du même genre (isolés entre 2016 et 2018 dans le cadre d'un projet de recherche sur les ETEC:F4 du Québec) (de Lagarde *et al.* 2021, Antibiotics, annexe 2) et à des isolats pathogènes représentatifs des différents *E. coli* retrouvés chez les porcs du Québec qui avaient déjà été séquencés au laboratoire.

Note au lecteur : *Pour une étude détaillée par WGS des différents pathovirotypes d'ETEC:F4 présents chez les porcs du Québec (gènes de virulence, gènes de résistance, phylogroupes, ST, sérotypes), la description de leurs lignées clonales et la définition d'un clone à haut risque présent au sein de ces souches, voir notre publication récente (de Lagarde et al. 2021, Antibiotics, annexe 2).*

On a observé que la totalité des isolats de 2020 (n=4) ainsi que les 7 autres isolats STa:STb:F4 (en rouge, Figure 7) isolés entre 2016 et 2018 formaient un groupe très homogène et distinct des autres ETEC:F4 (jaune et vert, Figure 7). Ainsi, les isolats STa:STb:F4 testés forment une lignée clonale dont tous les isolats sont de groupe phylogénétique A, ST772 et de sérotype O23:H37.

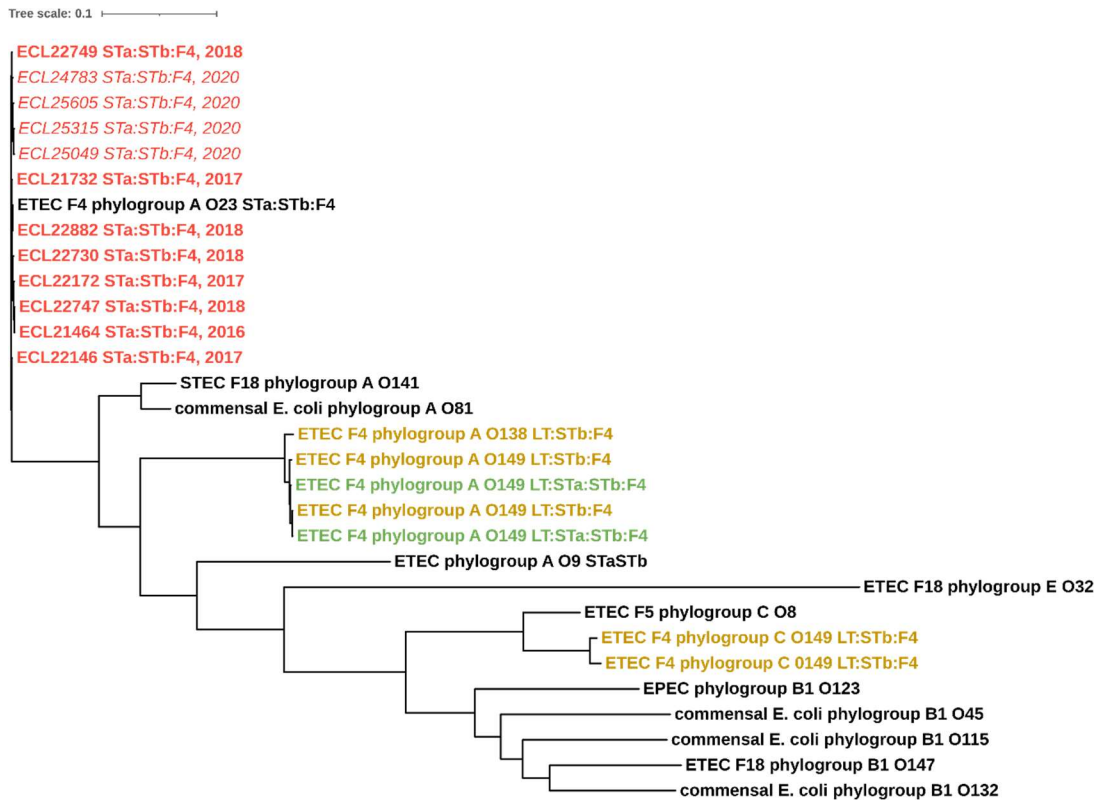


Figure 7 : Arbre phylogénétique (SNP tree) des isolats STa :STb :F4 et d'isolats représentatifs des différents types d'isolats détectés chez le porc du Québec

Les profils de gènes de virulence observés sont également très homogènes. En plus des 2 enterotoxines (STa et STb) et du fimbriae F4, les isolats STa :STb :F4 possèdent toutes l'enterohémolysine (*ehxA*), l'autotransporteur *sepA* et le système de la yersiniabactine (acquisition du fer) (*fyuA*, *ybt*).

5) Les ETEC:F18

Tel que mentionné précédemment, 41 cas de ETEC:F18 (*E. coli* entérotoxigène possédant le fimbriae F18) ont été détectés en 2020 (8,9%). Tel qu'observé à la Figure 7,

les cas liés aux ETEC :F18 sont en progression depuis 2016 (1,2% des cas), bien que le nombre de cas soit stable depuis l’an dernier (42 cas).

5.1) Les différents pathovirotypes de ETEC :F18

La majorité de ces cas isolés en 2020 étaient de virotypes LT:STb:F18 (43,9%) et LT:STa:STb:F18 (34,1%) (Figure 7).

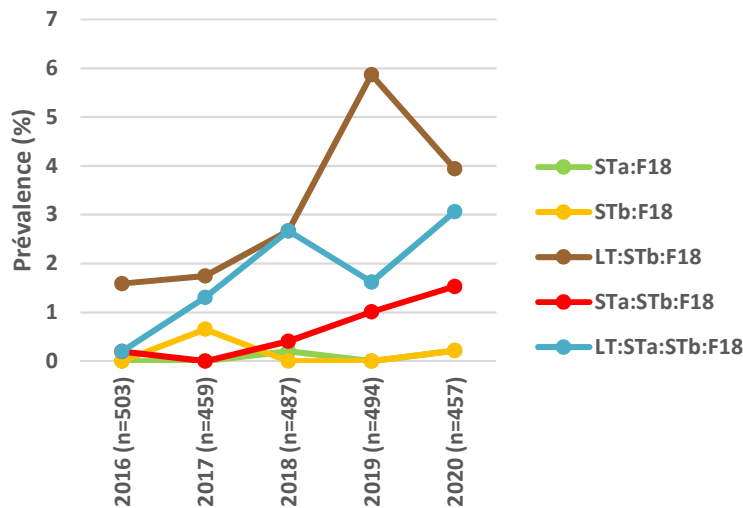


Figure 7 : Prévalence des cas positifs à ETEC :F18 selon le virotype.

5.2) Les cas à ETEC :F18 selon l’âge des porcs

Depuis 2016, la quasi-totalité des cas dont le stade de production est connu provenaient de porcs en pouponnière (données non-montrées). Par contre, en 2018 et 2019, seulement 66% et 86% des cas seulement proviennent de porcs en pouponnière, respectivement. Pour ce qui est des porcs en engraissement, ils constituent 17% et 12% des cas proviennent en 2018 et 2019, respectivement. En 2020, on note que pour les cas dont le stade de production est connu, 82% proviennent des pouponnières tandis que 18% proviennent des porcs en engraissement.

5.3) La multi-résistance chez les ETEC :F18

Au niveau de la multi-résistance, 16,2% de ces isolats ne sont pas multi-résistants; tandis que 75,7% et 8,1% de ces isolats sont multi-résistants à 3 à 4 classes d'antimicrobiens et 5 à 6 classes, respectivement. La plupart, soit 83,3%, sont non-susceptibles à l'un ou plusieurs des aminoglycosides testés (apramycine, gentamycine, néomycine, spectinomycine), surtout la néomycine (69,4%). De plus, 80,5% sont résistants à l'ampicilline. Finalement, tous les isolats ETEC:F18 de 2020 sans exception sont sensibles à l'enrofloxacin. Les nombres d'isolats MDR de 3 à 4 classes et de 5 à 6 classes sont similaires à ceux observés en 2018, après une augmentation des isolats MDR de 3 à 4 classes (88,8%) et une diminution des isolats MDR de 5 à 6 classes (2,8%) en 2019.

L'observation de données fragmentaires obtenues par le séquençage WGS sur 20 isolats ETEC :F18 isolés entre 2014 et 2020 a permis de détecter la présence de mutations chromosomiques sur le gène *gyrA* (*gyrA* (S83L) (n=5) et *gyrA* (D87G) (n=1)) chez 6 isolats (sur 20). Il s'agit de mutations similaires à celles retrouvées chez les ETEC :F4 non-susceptibles à l'enrofloxacin isolées au Québec (*de Lagarde et al. 2021, Antibiotics, annexe 2*). Par contre, la présence d'une seule mutation (du moins pour la mutation *gyrA* (S83L)) n'est pas suffisante en elle-même pour induire une résistance phénotypique. Bien que nos données soient fragmentaires, cette dernière affirmation semble se confirmer dans le fait qu'une seule souche ETEC :F18 isolée au Qc entre 2016 et 2020 (et deux souches ETEC :STEC :F18) a démontré un phénotype de résistance intermédiaire à l'enrofloxacin. Par contre, il est important de mentionner que la présence d'une mutation chromosomique sur *gyrA* par ces souches constitue un premier pas vers une résistance aux fluoroquinolones et que ces souches pourraient devenir effectivement phénotypiquement résistantes si elles acquerraient une seconde mutation au niveau des gènes *gyrA* ou *parC*. Il est donc pertinent de continuer à surveiller ces mutations sur les ETEC :F18 par séquençage WGS.

6) Les ETEC :F5

Tous les isolats (n=9) ETEC :F5 détectés en 2020 ont démontré un profil STa :F5 par PCR. Les deux tiers des cas proviennent de pouponnières, 22% proviennent de porcs en engraissement et seulement 11% (1 cas sur 9) proviennent de porc à la mamelle. Pour les isolats dont le profil de résistance a été testé, 50% étaient MDR de 5 à 6 classes, 33% étaient MDR de 3 à 4 classes et 17% étaient non-MDR. Tous les isolats étaient susceptibles à l'enrofloxacin. Un isolat était résistant au ceftiofur.

7) Les STEC :F18 (agent causatif de la maladie de l'œdème)

Les 3 cas détectés en 2020 proviennent tous de pouponnières. Ils sont tous susceptibles à l'enrofloxacin et au ceftiofur. Deux isolats sur trois sont non-MDR, tandis que le troisième isolat est MDR à 3 classes.

8) Les EPEC

Les *E. coli* enteropathogènes (EPEC) sont considérés comme des agents opportunistes de diarrhée chez le porc et comme des souches d'intérêts pour la santé publique étant donné que des EPEC peuvent être pathogènes chez l'humain. En 2020, ils ont été détectés chez 44 cas de porc dont 77,8% provenant de porcs en pouponnières et 8,1% chez des porcs à la mamelle. Bien que peu d'isolats isolés en 2020 (n=19) aient été testés pour la résistance aux antimicrobiens, on observe cependant 2 isolats de résistance intermédiaire à l'enrofloxacin. Un autre isolat EPEC de résistance intermédiaire à l'enrofloxacin a été isolé en 2017. Étant donné que les données sur l'antibiorésistance des EPEC porcines sont fragmentaires (seul un tiers de nos isolats EPEC a été testé pour l'antibiorésistance depuis 2016), il est difficile d'extrapoler sur la prévalence de cette résistance aux fluoroquinolones. Une caractérisation plus en détails de ces souches par séquençage WGS nous permettrait d'en apprendre plus sur l'origine de cette résistance (mutation chromosomique sur des gènes connus tels que *parC* et/ou *gyrA* ou présence de gènes plasmidiques de résistance comme les gènes *qnr*).

9) Les ETEC STa : STb

En 2020, un deuxième type d'agents opportunistes de diarrhée, les ETEC STa :STb, ont été détectées chez 12 cas. Ils provenaient tous de porcs en pouponnière lorsque l'âge était connu. Peu de données étaient disponibles pour l'antibiorésistance, des deux isolats testés, un était non-MDR et l'autre MDR de 3 à 4 classes. Aucun n'était résistant à l'enrofloxacinine ni au ceftiofur.

10) Conclusions

L'analyse de l'année 2020 montre une augmentation du nombre de cas à ETEC:F4 chez les cas de porc au Québec. Ce pathotype demeure le plus prévalent chez les porcs au Québec. On observe également l'augmentation de la prévalence des cas d'ETEC :F18 et la persistance de la présence des ETEC :STEC :F18, bien que minoritaires. On répertorie également la présence continue de cas d' ETEC STa :STb.

Les proportions de cas dues aux différents types d'ETEC :F4 (3TF4, 2TF4 et STa :STb :F4) ont changé et le virotype STa :STb :F4 est maintenant le virotype majoritaire. Le nombre de cas en maternité a légèrement diminué par rapport à l'année 2019, mais n'est pas de retour aux niveaux de 2013 (4 cas), tandis que les cas en pouponnière ont légèrement augmenté en comparaison à l'année dernière. La non-susceptibilité à l'enrofloxacinine des 3TF4 et d'une partie des 2TF4 continue à être détectée, tandis que celle des STa :STb :F4 semble sporadique. Finalement, en 2020, la multi-résistance des isolats 3TF4 et 2TF4 provenant de porc du Québec semble être stable avec des niveaux comparables d'isolats résistants aux différentes classes d'antimicrobiens par rapport à l'année 2019. Ainsi, les STa :STb :F4, étant donné leur nombre de cas plus élevé tant chez les porcs en maternité qu'en pouponnière et leurs profils multi-résistance sont définitivement le virotype à surveiller en 2021.

Références

de Lagarde M. *et al.* A new multidrug-resistant Enterotoxigenic *Escherichia coli* Pulsed-Field Gel Electrophoresis cluster associated with enrofloxacin non-susceptibility in diseased pigs. *J Appl Microbiol.* 2021 Mar; 130(3): 707-21. doi:10.1111/jam.14816



de Lagarde M. *et al.* High Risk Clone: A Proposal of Criteria Adapted to the One Health Context with Application to Enterotoxigenic *Escherichia coli* in the Pig Population. *Antibiotics* 2021, 10(3), 244; doi.org/10.3390/antibiotics10030244

Magiorakos AP *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 Mar;18(3):268-81. doi: 10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x.

Annexe 1

ORIGINAL ARTICLE

A new multidrug-resistant enterotoxigenic *Escherichia coli* pulsed-field gel electrophoresis cluster associated with enrofloxacin non-susceptibility in diseased pigs

M. de Lagarde¹ , G. Vanier¹, G. Desmarais¹, H-R. Kohan-Ghadr², J. Arsenault³ and J.M. Fairbrother^{1,3} 

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

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

Keywords

antimicrobial resistance, clonal complex, *Escherichia coli*, ETEC, fluoroquinolones non-susceptibility, pigs.

Correspondence

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

E-mail: john.morris.fairbrother@umontreal.ca

2020/0808: received 28 April 2020, revised 13 July 2020 and accepted 3 August 2020

doi:10.1111/jam.14816

Abstract

Aims: To describe the temporal trends in *Escherichia coli* pathotypes and antimicrobial resistance detected in isolates from diseased-pig cases submitted to the Ecl. from 2008 to 2016, in Quebec, Canada, and to investigate the presence of spatiotemporal 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 disc diffusion assay were performed. Demographic and clinical data were entered in the Animal Pathogenic and Zoonotic *E. 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 spatiotemporal cluster of LT:STb:STa:F4 isolates non-susceptible to enrofloxacin was detected between 4/2015 and 9/2016. 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.

Article

High Risk Clone: A Proposal of Criteria Adapted to the One Health Context with Application to Enterotoxigenic *Escherichia coli* in the Pig Population

Maud de Lagarde ¹, Ghyslaine Vanier ¹, Julie Arsenault ^{2,3}  and John Morris Fairbrother ^{1,2,*}

¹ OIE Reference Laboratory for *Escherichia coli*, Faculty of Veterinary Medicine, Université de Montréal, Saint-Hyacinthe, QC J2S2M2, Canada; maud.de.lagarde@umontreal.ca (M.d.L.); ghyslaine.vanier@umontreal.ca (G.V.)

² Swine and Poultry Infectious Research Center (CRIPA-FQRNT), Faculty of Veterinary Medicine, Université de Montréal, Saint-Hyacinthe, QC J2S2M2, Canada; julie.arsenault@umontreal.ca

³ Groupe de Recherche en Épidémiologie des Zoonoses et Santé Publique (GREZOSP), Faculty of Veterinary Medicine, Université de Montréal, Saint-Hyacinthe, QC J2S2M2, Canada

* Correspondence: john.morris.fairbrother@umontreal.ca



Citation: de Lagarde, M.; Vanier, G.; Arsenault, J.; Fairbrother, J.M. High Risk Clone: A Proposal of Criteria Adapted to the One Health Context with Application to Enterotoxigenic *Escherichia coli* in the Pig Population. *Antibiotics* **2021**, *10*, 244. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10030244>

Academic Editor: Laura J. Rojas

Received: 29 January 2021

Accepted: 25 February 2021

Published: 28 February 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: The definition of a high risk clone for antibiotic resistance dissemination was initially established for human medicine. We propose a revised definition of a high risk clone adapted to the One Health context. Then, we applied our criteria to a cluster of enrofloxacin non susceptible ETEC:F4 isolates which emerged in 2013 in diseased pigs in Quebec. 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. The 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, the isolates were mostly ST100/O149:H10. In this article, we demonstrated the presence of a ETEC:F4 high risk clone. This clone (1) emerged in 2013, (2) is multidrug resistant, (3) has a widespread distribution over North America and was able to persist several months on farms, and (4) possesses 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.

Keywords: *Escherichia coli*; ETEC:F4; fluoroquinolones non-susceptibility; antimicrobial resistance; pigs; genomics; multidrug resistance; North America

1. 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 a subject for debate [2]. 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 [3] and has been used to describe bacterial clones that enhance the dissemination of antibiotic resistance [4,5]. 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 third generation cephalosporins, is one of the best examples of this problem [6]. In its current definition, the term “high risk clone” is mainly adapted for human pathogens, whereas antimicrobial