

ifce

institut français  
du cheval  
et de l'équitation



43<sup>ème</sup> Journée de la Recherche Équine  
Jeudi 16 mars 2017

## Le microbiote intestinal des chevaux, en France, est-il un réservoir de gènes d'antibiorésistance ? Caractérisation de souches de *Escherichia coli* multirésistantes aux antibiotiques et productrices de bêta-lactamases à spectre étendu (BLSE) et de céphalosporinases (AmpC).

M. de Lagarde<sup>1</sup>, C. Larrieu<sup>2</sup>, K. Praud<sup>2</sup> ; N. Lallier<sup>2</sup>, A. Trottereau<sup>2</sup>, C. Schouler<sup>2</sup>, G. Sallé<sup>2</sup>, J. Arsenault<sup>3</sup>, J. M. Fairbrother<sup>1</sup>, B. Doublet<sup>2</sup>.

<sup>1</sup>Ecl, Laboratoire de référence OIE pour *Escherichia coli*, C.P. 5000 Université de Montréal, Saint-Hyacinthe, QC, Canada.

<sup>2</sup>ISP, INRA, Université François Rabelais de Tours, 37380 Nouzilly, France.

<sup>3</sup>Département d'épidémiologie de la faculté de médecine vétérinaire de l'Université de Montréal, C.P. 5000, Saint-Hyacinthe, QC, Canada.

Auteur pour la correspondance : Dr Benoit Doublet, benoit.doublet@inra.fr.

### Résumé

L'antibiorésistance est une menace pour la médecine humaine et vétérinaire (OMS 2014). Notre objectif était de pallier au manque de données chez le cheval concernant le portage d'entérobactéries résistantes, et de documenter la résistance aux  $\beta$ -lactamines. Nous avons échantillonné des crottins de chevaux adultes sains. 46.8% (IC95% 36.3 – 57.3) des chevaux excrétaient des isolats multirésistants de *E. coli*. 16/41 des écuries abritaient des chevaux excréteur d'isolats produisant des BLSE/AmpC. Les profils phylogénétiques de ces isolats ont révélé une grande diversité. Le gène BLSE *bla*<sub>CTX-M-1</sub> a été majoritairement détecté. Différents plasmides porteurs de gènes BLSE ont été identifiés véhiculant également des résistances à d'autres classes d'antibiotiques, favorisant ainsi leur co-sélection par des traitements antibiotiques autres que les  $\beta$ -lactamines. La population équine française représente un réservoir potentiel de gènes de résistance aux antibiotiques, notamment pour le gène BLSE *bla*<sub>CTX-M-1</sub>.

**Mots Clés : BLSE/AmpC, équin, antibiorésistance, *E. coli*.**

### Summary

Antimicrobial resistance is a threat for human and veterinary medicine (OMS 2014). Our objective was to overcome the lack of data on the carriage of resistant enterobacteriaceae in horses, and to document resistance to  $\beta$ -lactams. We gathered fecal samples from healthy adult horses. 46.8% (IC95% 36.3 – 57.3) of horses shed multidrug resistant isolates. 16/41 stables housed horses that shed ESBL/AmpC producing *E. coli* isolates. The phylogenetic analysis of these ESBL/AmpC producing isolates revealed a great diversity. The main ESBL gene was *bla*<sub>CTX-M-1</sub>. Various ESBL/AmpC carrying plasmids were identified harbouring also other antimicrobial resistance genes, thus promoting co-selection with other antimicrobials than  $\beta$ -lactams. The equine French population represents a potential reservoir of antimicrobial resistance genes, particularly for the ESBL genes *bla*<sub>CTX-M-1</sub>.

**Key-words: ESBL/AmpC, equine, antimicrobial resistance, *E. coli*.**



## Introduction

L'antibiorésistance a été déclarée par l'OMS en 2014 comme l'une des plus grandes menaces pour la médecine. Elle est reconnue comme un problème à la fois en médecine vétérinaire et en médecine humaine. O'Neill et son équipe dans son rapport de 2016 estiment, à l'heure actuelle, à 700 000 le nombre de décès humains par an, au niveau mondial, dus à l'antibiorésistance. Ce chiffre déjà alarmant pourrait s'élever à 10 millions en 2050 si la communauté internationale n'agit pas rapidement. Dans ce rapport, les auteurs estiment qu'en plus du coût humain tragique, il faut ajouter un coût financier d'environ 95 milliards d'euros à l'échelle mondiale d'ici 2050 si la situation n'évolue pas (O'Neill, 2016). Aussi inquiétants que ces chiffres soient, il est encore possible de renverser la situation si toutes les parties impliquées travaillent ensemble. La médecine équine fait partie de ce tout. En effet, le nombre de cas d'échec de traitement dû à des bactéries multirésistantes augmente (Toombs-Ruane et al., 2016). Les données épidémiologiques disponibles en médecine équine sont, pour l'instant, insuffisantes. Le microbiote intestinal des chevaux pourrait représenter un danger pour le bien-être équin et la santé publique. Les partenaires de l'industrie équine doivent prendre part à la recherche et fournir des résultats objectifs pour pouvoir prendre des décisions éclairées.

*Escherichia coli* est une bactérie principalement commensale même si certaines souches peuvent être pathogènes. Chez le cheval, on la trouve principalement dans le tube digestif et elle subit une pression antibiotique à chaque traitement même si elle n'est pas la bactérie visée. Cette exposition continue et la grande plasticité de son génome en font un candidat parfait comme réservoir de gènes d'antibiorésistance. Un des principaux mécanismes de résistance aux antibiotiques développés par *E. coli* est la production de  $\beta$ -lactamases. Les  $\beta$ -lactamines, incluant les pénicillines, les céphalosporines les monobactames et les carbapénèmes sont des antibiotiques largement utilisés en médecine humaine et vétérinaire, pour traiter tous types d'infections bactériennes. Le ceftiofur (Excenel®) et la cefquinome (Cobactan®) sont des céphalosporines de troisième et quatrième génération respectivement, utilisées en médecine vétérinaire en France, favorisant ainsi l'apparition et la dissémination de résistances.

Les  $\beta$ -lactamases sont classifiées selon leurs structures et leurs propriétés (Bush et al., 2009).

- Les  $\beta$ -lactamases à spectre étendu (BLSE) inactivent les pénicillines, la plupart des céphalosporines et les monobactames. Elles sont sensibles à l'acide clavulanique. Il y a plusieurs types de BLSE, mais les plus prévalentes sont les variants de CTX-M encodés par les gènes *bla*<sub>CTX-M</sub>.
- Les  $\beta$ -lactamases de type céphalosporinases, appelées AmpC- $\beta$ -lactamases, inhibent les pénicillines, les céphalosporines, et les monobactames et sont résistantes à l'acide clavulanique. Elles ne sont cependant pas capables d'inhiber les carbapénèmes. Le gène d'importance dans cette catégorie est le gène *bla*<sub>CMY-2</sub>, responsable d'une résistance croisée entre le ceftiofur et la ceftriaxone (une céphalosporine utilisée contre la salmonellose infantile sévère chez l'humain).
- Les carbapénémases, parmi lesquelles on retrouve notamment les métallo- $\beta$ -lactamases, sont encore rarement trouvées chez les animaux, mais sont particulièrement inquiétantes du fait de leur capacité à inhiber toutes les  $\beta$ -lactamases y compris les carbapénèmes.

Les gènes des  $\beta$ -lactamases se disséminent principalement par l'intermédiaire de plasmides. Les plasmides sont des éléments génétiques, souvent transférables horizontalement entre bactéries qui portent des gènes favorisant la survie des bactéries dans des conditions difficiles. Les plasmides qui portent les  $\beta$ -lactamases sont souvent porteurs d'autres gènes de résistance, conférant ainsi une multirésistance et favorisant leur co-sélection par d'autres familles d'antibiotiques. Certains plasmides ont la capacité de se disséminer dans plusieurs espèces bactériennes (on les appelle alors « à large spectre d'hôte »). Les plasmides sont classés en groupe d'incompatibilité. Ces groupes font référence à l'impossibilité de deux plasmides d'un même groupe à co-exister dans une bactérie. L'acquisition de données sur les plasmides présents dans la population équine est capitale afin d'élucider les mécanismes de dissémination et de pouvoir évaluer les risques qu'ils représentent, pour développer des stratégies de lutte si nécessaire.

L'autre moyen de se disséminer efficacement pour des gènes d'antibiorésistance est à travers des clones dit « à haut risque ». Ces clones, dont l'exemple le plus connu est le clone de *E. coli* ST 131 sont des véhicules extrêmement efficaces de dissémination car ils sont également porteurs de gènes, appelés « gènes de fitness », qui leur permettent d'être compétitifs dans certaines situations.



Les praticiens équinés doivent faire face, de plus en plus fréquemment, à des échecs de traitement dus à des micro-organismes multi-résistants, à la fois sur le terrain et en milieu hospitalier. Chez le cheval, les données concernant les BLSE/AmpC peuvent être résumées ainsi :

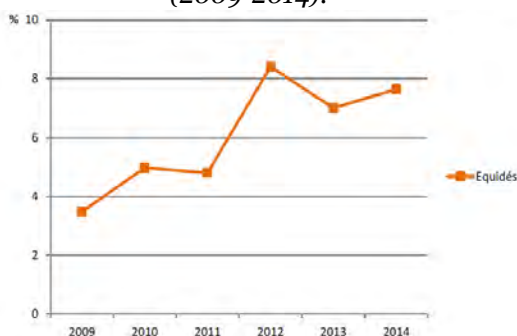
**La résistance au ceftiofur a été documentée dans différentes situations cliniques, chez l'adulte sain** (SAVRM, 2011) ou encore chez le poulain (Toombs-Ruane et al., 2016). Le gène *bla*<sub>CTX-M-1</sub> est le plus souvent identifié (Dunowska et al., 2006), mais les gènes *bla*<sub>CTX-M-2</sub> (Smet et al., 2012), *bla*<sub>CTX-M-14</sub> (Damborg et al., 2012) et *bla*<sub>CTX-M-15</sub> (Schmiedel et al., 2014) ont également été détectés. Ces gènes codant pour des BLSE ont été trouvés à la fois chez des chevaux sains et chez des chevaux ayant une infection clinique. Le gène *bla*<sub>CMY-2</sub> a été identifié en Amérique du Nord et en Europe, mais jusqu'à présent on l'a trouvé seulement dans des cas d'infection clinique (Rankin et al., 2005). Les variants *bla*<sub>CMY-34</sub>, *bla*<sub>CMY-53</sub> ont été identifiés chez des animaux sains au Danemark (Damborg et al., 2012), et le variant *bla*<sub>CMY-7</sub> a été identifié sur des chevaux en Australie (Gibson et al., 2010). La dissémination des 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 dont le spectre d'hôte bactérien est plus ou moins large.

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'homme et aux mouches vivant en contact rapproché (Dolejska et al., 2011). 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 multi résistantes.

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'analyses volontaires qui fournissent les antibiogrammes réalisés. La qualité des données produites est le résultat d'une coopération constante entre les vétérinaires de terrain, les laboratoires volontaires et le gouvernement français. Cependant, certaines limites de ces données peuvent les rendre difficiles à comparer et à interpréter. Premièrement, ces données sont récoltées de manière « passive ». De fait, elles sont biaisées de plusieurs façons : compte tenu de la difficulté et des coûts que représente la réalisation d'un antibiogramme sur le terrain, il est relativement rare d'en réaliser en première intention. Ces données concernent donc, pour la plupart, des infections n'ayant pas répondu au premier traitement. Il est donc envisageable que les prévalences de résistances détectées au travers du Résapath surestiment légèrement la situation réelle sur le terrain. Deuxièmement, ces données sont « franco-françaises », puisqu'il n'existe aucun autre réseau européen de collecte des données cliniques vétérinaires, et ne peuvent donc être inférées à d'autres pays. En effet, la prévalence de certaines résistances et/ou de certains gènes peut fortement varier en fonction de l'origine géographique des prélèvements. Pour finir, les données ne concernent que des bactéries pathogènes et ainsi ne donnent aucun renseignement sur les animaux porteurs sains. Malgré ces limites, ces données ont permis un suivi constant des résistances en France depuis 2005. Elles nous indiquent que dans l'espèce équine, la résistance aux céphalosporines augmente de manière significative depuis 2009 (Figure I).

Figure I : Bilan Résapath 2015. Evolution des proportions de isolats de *E. coli* non-susceptibles au ceftiofur chez les équidés (2009-2014).

**Figure I : Bilan Résapath 2015. Evolution of ceftiofur resistant *E. coli* isolates in horses in France (2009-2014).**





L'acquisition de données épidémiologiques sur des sujets sains pris au hasard dans la population serait donc complémentaire et pertinente. L'objectif général de l'étude était de pallier au manque de données épidémiologiques disponibles en médecine équine, en France. Les objectifs spécifiques étaient :

- de rapporter la prévalence de chevaux sains excréant des *E. coli* :
  - \* multirésistants (MDR), c'est-à-dire non-sensibles à trois classes d'antibiotiques et plus.
  - \* producteurs de BLSE ou d'AmpC,
- d'identifier des facteurs de risque au niveau de l'écurie favorisant l'excrétion de ces organismes,
- de caractériser les isolats producteurs de BLSE/AmpC en terme phylogénétique, d'identifier la présence de gènes de virulence et de gènes de résistance et enfin de définir les types de plasmides.

## 1 Matériel et Méthodes

Cette étude s'insère dans le projet national BIOREQUI financé par l'IFCE, Hippolia et le Fond Eperon. Ce projet avait pour but d'évaluer la prévalence des résistances aux antimicrobiens (antibiotiques et anthelminthiques) dans la filière équine en France.

L'échantillonnage a eu lieu au cours de l'été 2015. Les échantillons de crottins frais étaient prélevés soit directement dans le rectum soit au sol immédiatement après l'émission du crottin, afin de limiter au maximum la contamination par l'environnement. La population cible était des chevaux adultes (plus de 2 ans) sains/asymptomatiques (déterminés sains par leur propriétaire) de différents types de structures (élevage ou centre équestre). Pendant la journée de récolte les échantillons étaient stockés à 6°C pendant 6 heures au maximum. En fin de journée, 1 gramme de crottin était mélangé à 9mL de solution glycérolée à 30% pour être conservé à -18°C. Un questionnaire a été utilisé au moment de la récolte d'échantillons afin d'évaluer la gestion des différents établissements. Ce questionnaire a permis de réaliser une analyse de facteurs de risque au niveau de la structure. Il contenait sept parties (description de l'établissement, gestion des pâturages, gestion des écuries, médecine préventive au niveau de la structure, vermifugation, connaissance générale sur les résistances aux anti-microbiens, historique médical des chevaux échantillonnés). Les réponses à ce questionnaire étaient basées sur le volontariat.

**Collection générique :** Afin d'estimer la proportion de chevaux excréant des résistances, entre 3 et 6 échantillons par structure ont été choisis au hasard, soit 196 échantillons qui ont été mis en culture sur gélose MacConkey, et incubés 24h. Ensuite, pour 3 isolats choisis au hasard par animal, nous avons testé la sensibilité vis-à-vis de 14 antibiotiques, représentant 10 classes différentes d'antibiotiques, par la méthode de diffusion en disques. Les critères de sensibilité que nous avons employés étaient ceux recommandés par l'institut des standards clinique et de laboratoire (CLSI, 2012). Les antibiotiques testés sont recensés dans le tableau 1. Ces antibiotiques ont été sélectionnés selon les recommandations du système de surveillance des résistances aux antibiotiques (NARMS).

Tableau 1 : Antibiotiques et classes testés.

Table 1 : Tested antimicrobials and related families.

Classe d'antibiotique	Antibiotiques
<b>Aminoglycoside</b>	Streptomycine et Gentamicine
<b>Pénicilline</b>	Ampicilline
<b>Combinaison</b>	Amoxicilline + Acide Clavulanique
<b>Inhibiteur de la voie des folates</b>	Sulfisoxazole et Triméthoprime Sulfadizine (TMS)
<b>Céphalosporine 2<sup>ème</sup> génération</b>	Cefoxitine
<b>Céphalosporine 3<sup>ème</sup> génération</b>	Ceftriaxone et Ceftiofur
<b>Phénicolés</b>	Chloramphénicol
<b>Cycline</b>	Tétracycline
<b>Quinolones</b>	Acide nalidixique
<b>Fluoroquinolones</b>	Ciprofloxacine
<b>Macrolides</b>	Azythromicine



Un isolat était considéré sensible, s'il était sensible à tous les antibiotiques testés, et non-sensible s'il était résistant ou intermédiaire à un ou plusieurs antibiotiques dans une ou deux classes d'antibiotiques testés, et multirésistant (MDR) si non-sensible à au moins un antibiotique dans trois classes et plus d'antibiotiques, selon les recommandations décrites par un consensus d'expert (Magiorakos et al., 2012).

**Collection BLSE/AmpC : Afin d'augmenter notre sensibilité** de détection des bactéries produisant des BLSE/AmpC, nous avons effectué un enrichissement pour mettre en évidence leur présence. Les échantillons ont été mis en culture dans un bouillon brain-heart infusion (BHI) pendant 4 heures à 37°C, suivi d'un ensemencement sur gélose MacConkey en présence de ceftriaxone (1mg/L). Les prélèvements de 8 animaux par structure, sélectionnés au hasard, ont ainsi été analysés. Afin d'augmenter le nombre de chevaux testés par structure, les échantillons de 10 animaux supplémentaires par structure ont été poolés puis analysés comme indiqué ci-dessus.

Afin d'identifier les souches résistantes de *E. coli* ainsi isolées, nous avons réalisé une PCR spécifique d'espèce pour détecter la présence du gène de ménage (*uidA*), codant pour la  $\beta$ -glucuronidase de *E. coli*.

Pour les isolats de cette collection, nous avons également réalisé les antibiogrammes tels que décrit ci-dessus. La présence de cinq gènes BLSE/AmpC (*bla<sub>SHV</sub>*, *bla<sub>TEM</sub>*, *bla<sub>CMY-2</sub>*, *bla<sub>OXA</sub>* et *bla<sub>CTX-M</sub>*) a été déterminée par PCR et séquençage (Mataseje et al., 2012). Les isolats dans cette collection ont également été examinés pour la présence de gènes de virulence, qui définissent les principaux pathotypes d'*E. coli* habituellement retrouvés chez les animaux (*E. coli* entérotoxigénique (ETEC) (*eltB*, *estA*, *estB*), *E. coli* entérotoxigénique (EPEC) (*eae*), *E. coli* producteur de Shiga-toxine (STEC) (*stxA* et *stx2A*) et *E. coli* extra-intestinal (ExPEC) (*iutA*). Les PCR ont été réalisées selon les protocoles du laboratoire Ecl, disponibles sur notre site [http://www.apzec.ca/en/APZEC/Protocols/APZEC\\_PCR\\_e-n.aspx](http://www.apzec.ca/en/APZEC/Protocols/APZEC_PCR_e-n.aspx).

Une analyse phylogénétique des isolats de cette collection a été réalisée. Dans un premier temps nous avons déterminé les groupes phylogénétiques par PCR, suivant la technique de Clermont (Clermont et al., 2000). Puis le profil de macrorestriction a également été déterminé par champ pulsé (PFGE), tel que décrit précédemment (Braga et al., 2016). Cette technique consiste à segmenter l'ADN bactérien à l'aide de l'enzyme de restriction *XbaI*, et à faire migrer les segments d'ADN en fonction de leur taille sur un gel de migration. On se base sur le principe que deux clones auront le même profil de macrorestriction. Un test de conjugaison bactérienne a été réalisé, pour l'ensemble des souches productrices de BLSE/AmpC et dont le profil PFGE étaient spécifique, ceci afin de confirmer le support plasmidique et de déterminer quels phénotypes de résistances étaient transmis par ces plasmides. La caractérisation moléculaire par PCR et restriction de ces plasmides est en cours (Carattoli et al., 2005).

Les facteurs de risques ont été calculés grâce au logiciel SAS 9.0. Les données ont été groupées par cheval et par écurie. Du fait du nombre variable d'animaux échantillonnés dans chaque structure, nous avons introduit des poids d'échantillonnage dans les calculs afin d'harmoniser l'importance de chaque échantillon dans le calcul de prévalence. Les intervalles de confiance à 95% ont été calculés. Les facteurs de risque ont été calculés pour deux variables dépendantes d'intérêt au niveau de l'écurie (compte tenu du fait que les données individuelles obtenues dans les questionnaires étaient trop sporadiques) : la présence de chevaux excréant des isolats MDR, et la présence de chevaux excréant des isolats produisant des BLSE/AmpC. Pour sélectionner les variables indépendantes restant dans le modèle final, nous avons utilisé une procédure rétrograde par étape. Les facteurs de risque testés étaient : la fréquence des chevaux transportés, l'effectif total de l'écurie, l'effectif du personnel, la décision d'administration d'antibiotique sans avis médical, le contact potentiel avec des animaux sauvages, la présence d'autres animaux (compagnie et production) sur la ferme, la pratique de l'épandage sur les paddocks, la fréquence de curage des boxes, l'activité de l'écurie, le fait que les membres du personnel aient eut un contact avec le milieu médical (vétérinaire ou humain) dans les trois derniers mois, la présence d'un cheval ayant été hospitalisé dans les trois derniers mois, la présence d'un cheval ayant subi une chirurgie dans les trois derniers mois, la présence d'un cheval ayant reçu des traitements (tous types) dans les trois derniers mois.



## 2 Résultats

Au total, sur 41 structures équestres, 1061 échantillons ont été prélevés.

**Collection générique** : Presque 80% des écuries abritaient des chevaux excréant des isolats MDR (Tableau 2). Au total, 46,8% des chevaux excrétaient des isolats MDR. 9,7% des chevaux excrétaient des isolats résistants à 7 classes d'antibiotiques et plus.

Les antibiotiques les plus touchés sont l'ampicilline, et la streptomycine, viennent ensuite la tétracycline, l'association amoxicilline/acide clavulanique, le sulfisoxazole, le thriméthoprime-sulfadiazine (TMS) et l'acide nalidixique (Figure II). La non-sensibilité à la ciprofloxacine (un antibiotique de la même classe que l'enrofloxacine), la gentamicine et l'azithromycine est faible (moins de 5% des chevaux).

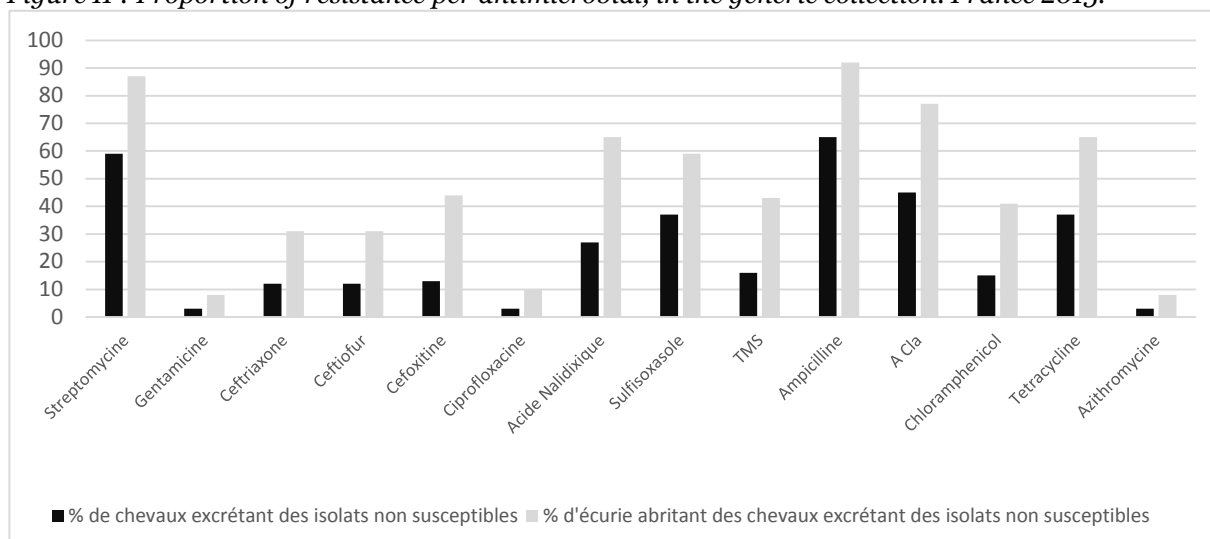
Tableau 2 : Proportion de résistance et de MDR par cheval et par écurie en France, en 2015.

Table 2 : *Proportion of resistance and MDR per horse and per stable in France, in 2015.*

<b>Cheval (n<sub>1</sub> = 120) excréant des isolats résistants à</b>	Prévalence (%)	CI (95%)	Effet d'expérience
0 classe d'antibiotique	16.3	7.7-24.9	1.56
1 et 2 classes d'antibiotiques	36.9	27.2 – 46.6	1.16
3 classes d'antibiotique et plus (= MDR)	46.8	36.3 – 57.3	1.28
5 classes d'antibiotique et plus	22.2	15.6 – 28.9	0.74
7 classes d'antibiotique et plus	9.7	1.8 – 17.7	2.08
<b>Ecuries (n<sub>2</sub> = 39) abritant des chevaux excréant des isolats résistants à</b>	Prevalence (%)	CI (95%)	
0 classe d'antibiotique	2.6	0.0 – 7.75	1
1 et 2 classes d'antibiotiques	17.9	5.3 – 30.5	1
3 classes d'antibiotique et plus (= MDR)	79.5	66.2 – 92.7	1
5 classes d'antibiotique et plus	53.8	37.4 – 70.2	1
7 classes d'antibiotique et plus	20.5	7.2 – 33.8	1

Figure II : Proportion de résistance en fonction des antibiotiques, dans la collection générique. France 2015. (n<sub>1</sub> = 120 chevaux et n<sub>2</sub> = 39 écuries).

Figure II : *Proportion of resistance per antimicrobial, in the generic collection. France 2015.*



TMS = Triméthoprime sulfadiazine. A cla = Amoxicilline + Acide clavulanique.

**Collection BLSE/AmpC** : Suite à l'étape d'enrichissement pour la résistance à la ceftriaxone, 16 (39%) écuries sur 41 testées abritaient des chevaux excréant des isolats produisant des BLSE/AmpC. Nous avons sélectionné 63 isolats provenant de l'enrichissement.

Ces isolats sont tous non sensibles aux céphalosporines de 3<sup>ème</sup> génération et dans la majorité des cas

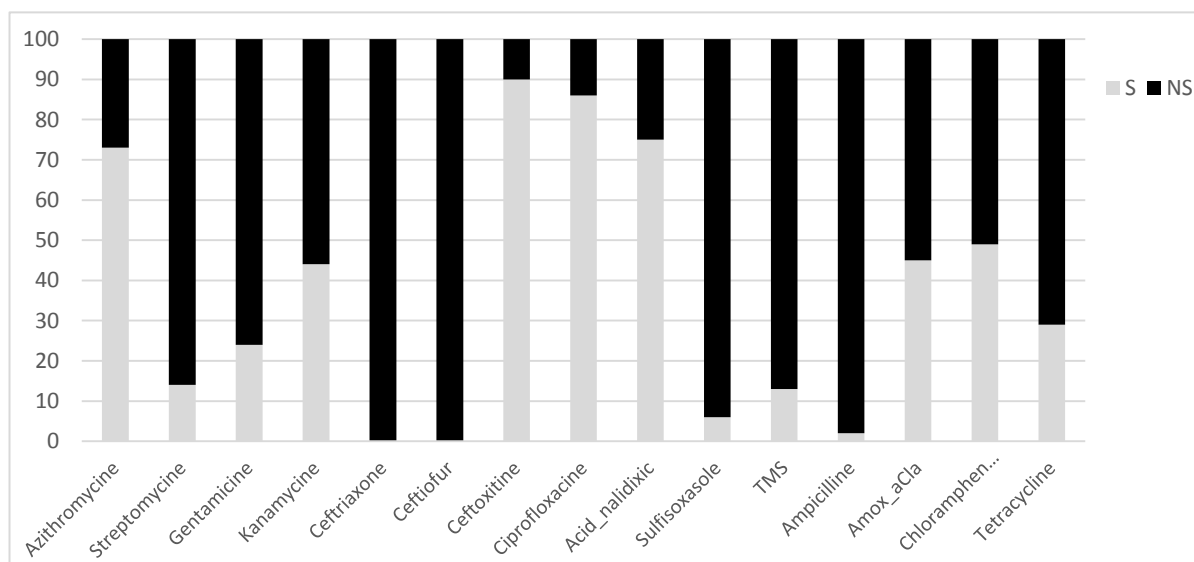


également MDR (Figure III). Le gène *bla*<sub>CTX-M-1</sub> est le plus prévalent (35/51 souches examinées jusqu'à maintenant). Les gènes *bla*<sub>CTX-M-2</sub>, *bla*<sub>CTX-M-14</sub> et *bla*<sub>SHV-12</sub> ont été également retrouvés. Le gène plasmidique AmpC *bla*<sub>CMY-2</sub> a également été identifié dans un des isolats non sensibles à la cefoxitine. **C'est la première fois à notre connaissance que ce gène est retrouvé chez des chevaux adultes sains. Le profil de ces isolats est polyclonal (Figure IV). Le phylogroupe prédominant est le phylogroupe B1. Dans ce phylogroupe on retrouve généralement les souches commensales des herbivores. Quatre souches appartenaient au phylogroupe D, dans lequel on peut retrouver des souches pathogènes extra-intestinales. Nous n'avons pas identifié de gènes susceptibles de causer une pathologie dans les souches testées.**

**Les plasmides identifiés porteurs de BLSE/AmpC sont majoritairement des groupes d'incompatibilité IncHI1 et IncI1 et IncN. Ces différents groupes de plasmides ont des spectres d'hôte bactérien plus ou moins large (IncI1 : étroit, plutôt restreint aux entérobactéries ; IncH et IncN : intermédiaire). Ils sont capables de transférer, au minimum, la résistance aux céphalosporines de 3<sup>ème</sup> et 4<sup>ème</sup> génération. Le transfert de certains plasmides confère à la bactérie la capacité de résister à 5 classes d'antibiotiques, suggérant que l'utilisation de certains antibiotiques tel que la tétracycline, pourrait favoriser la persistance de résistance aux céphalosporines de 3<sup>ème</sup> génération par le phénomène de co-sélection dans le microbiote intestinal des chevaux.**

Figure III : Proportion de sensibilité des isolats *E. coli* BLSE/AmpC par antibiotiques. France 2015. n<sub>3</sub> = 63 isolats.

Figure III : Susceptibility proportion of ESBL/AmpC producing *E. coli* isolates per antimicrobial.



S = sensible. NS = non sensible. TMS = Triméthoprime sulfadiazine. A cla = Amoxicycline + Acide Clavulanique

**Facteurs de risque :** Deux facteurs d'intérêts ont été étudiés, au niveau de l'écurie : la présence de chevaux excréant des isolats MDR et la présence de chevaux excréant des isolats producteurs de BLSE/AmpC. Nous n'avons pas été capables de mettre en évidence des facteurs de risques pour la présence de chevaux excréant des isolats MDR. Ce résultat est très probablement dû au fait que la proportion d'écuries abritant des chevaux excréant des isolats MDR était trop élevée. Cependant, les écuries étaient 5.2 fois plus à risque (p=0.04) d'abriter des chevaux excréant des isolats producteurs de ESBL/AmpC si certains chevaux de l'écurie avaient été traités (tous types de médicaments confondus) dans les trois mois précédant le prélèvement. Un autre facteur a presque atteint la significativité dans notre modèle final. Les écuries étaient 8.4 fois plus à risque (p=0.06) d'abriter des chevaux excréant des isolats producteurs de ESBL/AmpC si certains chevaux étaient transportés plusieurs fois par mois, toute l'année ou simplement pendant une période spécifique de l'année (par exemple la période de reproduction). La valeur de p étant supérieure à 0.05 nous ne pouvons pas inclure ce facteur dans le modèle final, cependant compte tenu du faible nombre d'écurie prélevées, il est possible que ce facteur ait atteint une significativité si notre échantillonnage avait été plus important.







### 3 Discussion

Le but de cet article était de pallier au manque **de données sur l'antibiorésistance dans la population équine saine, en France**. Nous avons trouvé que 46.8% (IC95% 36.3 – 57.3) des chevaux excrétaient des isolats de *E. coli* multirésistants, et 79.5% (IC95% 66.2 – 92.7) des écuries abritaient des chevaux qui excrètent des isolats multirésistants, 16 écuries parmi 41 prélevées abritaient des chevaux excrétaient des souches de *E. coli* productrices de BLSE/AmpC. **L'analyse phylogénétique par macrorestriction a révélé une importante diversité parmi ces souches. Le gène BLSE *bla*<sub>CTX-M-1</sub> est majoritairement retrouvé parmi les isolats testés chez le cheval, comme c'est le cas dans la plupart des populations animales, en Europe. Ces gènes BLSE/AmpC ont un mode de dissémination plasmidique. Les différents groupes de plasmides identifiés ont des spectres d'hôte plus ou moins large, c'est-à-dire que selon le groupe de plasmides, ils sont capables de se transmettre efficacement à un plus ou moins grand nombre d'espèces bactériennes. Ils sont également porteurs de résistance à d'autres classes d'antibiotique, ce qui favorise leur sélection et ainsi leur persistance dans l'environnement.**

Les chiffres de prévalence que nous avons trouvés ne sont pas statistiquement différents de ceux trouvés par Maddox *et al.* en 2012 dans la population équine saine en Angleterre. **La présence d'isolats potentiellement producteurs de BLSE/AmpC chez des chevaux sains avait également été mise en évidence dans cette population. Cela n'en reste pas moins préoccupant. En effet, ces isolats font partie du microbiote commensal de l'intestin des chevaux, et ne sont pas pathogènes, cependant leur présence rend possible la transmission de ces gènes à des bactéries pathogènes.**

De plus, depuis la révolution industrielle, les chevaux tiennent une place bien particulière dans la société, entre l'animal de compagnie et l'animal de production. **En 2013, on comptait, en France, environ 2 millions de personnes pratiquant l'équitation. Ces personnes, dont l'âge peut varier mais qui sont souvent jeunes, sont susceptibles d'avoir des contacts très directs avec les chevaux. Or, il existe déjà dans la littérature des illustrations de transmission d'isolats de *E. coli* produisant des BLSE ainsi qu'une transmission de plasmides porteurs de gène de BLSE entre chevaux, humains et mouches lors de contacts directs (Dolejska et al., 2011). On sait également que le fait de posséder un cheval augmente le risque d'être porteur d'isolats produisant des BLSE/AmpC chez l'Homme (Huijbers et al., 2013). La présence de ces gènes BLSE chez le cheval représente donc un risque avéré pour la santé publique.**

**A notre connaissance, c'est la première fois que le gène *bla*<sub>CMY-2</sub> est retrouvé chez des chevaux sains. Habituellement, il est plus fréquemment trouvé en Amérique du Nord dans la filière de production de viande porcine et aviaire. Ce gène a une importance particulière en santé publique car il est responsable d'une résistance croisée entre le ceftiofur et la ceftriaxone, une céphalosporine de 3<sup>ème</sup> génération utilisée dans le traitement de la salmonellose infantile. Le transport des chevaux au niveau international, pourrait être responsable de ce type de dissémination.**

La capacité de certains plasmides porteurs de gène de BLSE/AmpC à conférer des résistances à plusieurs autres classes d'antibiotiques suggèrent qu'une co-sélection par différents traitements antibiotiques autres que les  $\beta$ -lactamines peut participer à leur dissémination. Cette information est très importante pour les praticiens de terrain. **En effet, l'utilisation d'antibiotiques d'usage courant en médecine équine, tels que la tétracycline ou le TMS (Triméthoprime sulfadiazine) pourrait avoir une influence directe sur la persistance des plasmides porteurs de gènes de BLSE/AmpC. Il est donc important, sur le terrain, comme en milieu hospitalier de ne pas utiliser d'antibiotiques sans raison valable, y compris des antibiotiques qui ne semblent pas dangereux pour la santé publique.**

En conclusion, la population équine française représente un réservoir potentiel de gènes de résistance aux antibiotiques, en particulier des gènes codant pour des BLSE *bla*<sub>CTX-M-1</sub> susceptibles de diffuser vers des bactéries pathogènes pour le cheval et l'Homme. Les initiatives, telles que le plan écoantibio (<http://agriculture.gouv.fr/plan-ecoantibio-2012-2017-lutte-contre-lantibioresistance>), mis en place par le gouvernement français dès 2009, doivent être poursuivies et même renforcées.

**Il est important que les acteurs de l'industrie équine prennent conscience de leur rôle à jouer dans la lutte contre l'antibiorésistance. En effet, même si certains peuvent penser ce rôle anecdotique, l'espèce équine fait partie intégrante de l'approche « OneHealth » recommandée par la communauté internationale et ne doit pas être oubliée.**



## Références

- Braga, J.F., Chanteloup, N.K., Trotereau, A., Baucheron, S., Guabiraba, R., Ecco, R., Schouler, C., 2016. Diversity of *Escherichia coli* strains involved in vertebral osteomyelitis and arthritis in broilers in Brazil. *BMC Vet Res* 12, 140.
- Bush, K., Jacoby, G.A., Amicosante, G., Bonomo, R.A., Bradford, P., Cornaglia, G., Garau, J., Giamarellou, H., Jarlier, V., Martinez-Martinez, L., Miriagou, V., Palzkill, T., Pascual, A., Rodriguez-Bano, J., Rossolini, G.M., Sougakoff, W., Vatopoulos, A., 2009. Comment on: Redefining extended-spectrum beta-lactamases: balancing science and clinical need. *J Antimicrob Chemother* 64, 212-213; author reply 213-215.
- Carattoli, A., Bertini, A., Villa, L., Falbo, V., Hopkins, K.L., Threlfall, E.J., 2005. Identification of plasmids by PCR-based replicon typing. *J Microbiol Methods* 63, 219-228.
- Clermont, O., Bonacorsi, S., Bingen, E., 2000. Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. *Appl Environ Microbiol* 66, 4555-4558.
- CLSI, 2012. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Twenty-second Informational Supplement M100-S22.
- Damborg, P., Marskar, P., Baptiste, K.E., Guardabassi, L., 2012. Faecal shedding of CTX-M-producing *Escherichia coli* in horses receiving broad-spectrum antimicrobial prophylaxis after hospital admission. *Vet Microbiol* 154, 298-304.
- Dolejska, M., Duskova, E., Rybarikova, J., Janoszowska, D., Roubalova, E., Dibdakova, K., Maceckova, G., Kohoutova, L., Literak, I., Smola, J., Cizek, A., 2011. Plasmids carrying blaCTX-M-1 and qnr genes in *Escherichia coli* isolates from an equine clinic and a horseback riding centre. *J Antimicrob Chemother* 66, 757-764.
- Dunowska, M., Morley, P.S., Traub-Dargatz, J.L., Hyatt, D.R., Dargatz, D.A., 2006. 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* 228, 1909-1917.
- Gibson, J.S., Cobbold, R.N., Trott, D.J., 2010. Characterization of multidrug-resistant *Escherichia coli* isolated from extraintestinal clinical infections in animals. *J Med Microbiol* 59, 592-598.
- Huijbers, P.M., de Kraker, M., Graat, E.A., van Hoek, A.H., van Santen, M.G., de Jong, M.C., van Duijkeren, E., de Greeff, S.C., 2013. Prevalence of extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae in humans living in municipalities with high and low broiler density. *Clin Microbiol Infect* 19, E256-259.
- Magiorakos, A.P., Srinivasan, A., Carey, R.B., Carmeli, Y., Falagas, M.E., Giske, C.G., Harbarth, S., Hindler, J.F., Kahlmeter, G., Olsson-Liljequist, B., Paterson, D.L., Rice, L.B., Stelling, J., Struelens, M.J., Vatopoulos, A., Weber, J.T., Monnet, D.L., 2012. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect* 18, 268-281.
- Mataseje, L.F., Bryce, E., Roscoe, D., Boyd, D.A., Embree, J., Gravel, D., Katz, K., Kibsey, P., Kuhn, M., Mouchili, A., Simor, A., Taylor, G., Thomas, E., Turgeon, N., Mulvey, M.R., Canadian Nosocomial Infection Surveillance, P., 2012. Carbapenem-resistant Gram-negative bacilli in Canada 2009-10: results from the Canadian Nosocomial Infection Surveillance Program (CNISP). *J Antimicrob Chemother* 67, 1359-1367.
- O'Neill, J., 2016. Tackling drug-resistant infections globally: final report and recommendations. London: Wellcome Trust & HM Government.
- Rankin, S.C., Whichard, J.M., Joyce, K., Stephens, L., O'Shea, K., Aceto, H., Munro, D.S., Benson, C.E., 2005. Detection of a blaSHV extended-spectrum beta-lactamase in *Salmonella enterica* serovar Newport MDR-AmpC. *J Clin Microbiol* 43, 5792-5793.
- SAVRM, 2011. Swedish Veterinary Antimicrobial Resistance Monitoring. The National Veterinary Institute (SVA) Uppsala.
- Schmiedel, J., Falgenhauer, L., Domann, E., Bauerfeind, R., Prenger-Berninghoff, E., Imirzalioglu, C., Chakraborty, T., 2014. Multiresistant extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae from humans, companion animals and horses in central Hesse, Germany. *BMC Microbiol* 14, 187.
- Smet, A., Boyen, F., Flahou, B., Doublet, B., Praud, K., Martens, A., Butaye, P., Cloeckaert, A., Haesebrouck, F., 2012. Emergence of CTX-M-2-producing *Escherichia coli* in diseased horses: evidence of genetic exchanges of blaCTX-M-2 linked to ISCR1. *J Antimicrob Chemother* 67, 1289-1291.
- Toombs-Ruane, L.J., Riley, C.B., Kendall, A.T., Hill, K.E., Benschop, J., Rosanowski, S.M., 2016. Antimicrobial susceptibility of bacteria isolated from neonatal foal samples submitted to a New Zealand veterinary pathology laboratory (2004 to 2013). *N Z Vet J* 64, 107-111.