



**La résistance antimicrobienne chez les *E. coli* BLSE et
Commensales, *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp.,
Staphylococcus aureus résistants à la méthicilline (MRSA) et
Enterococcus faecalis et *faecium*
isolés des populations d'animaux producteurs d'aliments
(production primaire) et des denrées alimentaires
en 2021**

Rapport 2021

**Antimicrobiële resistentie bij commensale *E. coli* en *E. coli*
ESBL, *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp. en
meticillineresistente *Staphylococcus aureus* (MRSA) en
Enterococcus faecalis en *faecium* geïsoleerd uit
voedselproducerende dieren (primaire productie) en
levensmiddelen in 2021**

Verslag 2021

**Nationaal Referentielaboratorium antimicrobiële
resistentie
Laboratoire National de Référence résistance antimicrobienne**

Sciensano

Auteurs: C. Garcia-Graells, F. Bricteux, I. Van Damme, C. Boland, C. Kowalewicz, K. Van Hoorde, D. Fretin, K. Dierick

Résumé

En Belgique, l'AFSCA surveille la situation de la résistance antimicrobienne (AMR) à la fois dans les denrées alimentaires et chez les animaux producteurs d'aliments (production primaire). La résistance chez les bactéries zoonotiques *Salmonella* et *Campylobacter* et chez les *Staphylococcus aureus* résistants à la méthicilline (MRSA), ainsi que la résistance chez les bactéries indicatrices *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis* et *Enterococcus faecium* ont été surveillées en 2021. De même, une surveillance spécifique comprenait l'évaluation des niveaux d'*E. coli* producteurs présumés de bêta-lactamases à spectre étendu (BLSE)/AmpC-/carbapénémases provenant d'animaux destinés à l'alimentation et des viandes provenant de ces catégories d'animaux a aussi été réalisée. La résistance microbiologique a été évaluée à l'aide des valeurs seuils épidémiologiques (ECOFF).

En 2021, la décision d'exécution de la Commission européenne 2020/1729 du 17 novembre 2020 est entrée en application, remplaçant la décision 2013/652/EU. Cette décision modifie les panels d'antibiotiques testés (EUVSEC3/EUCAMP3/EUST2) ainsi que certaines valeurs seuils épidémiologiques.

Chez les *Campylobacter jejuni* isolés à partir de la viande de volaille, la diminution de la résistance à la ciprofloxacine et à la tétracycline se poursuit depuis 2019. De même une augmentation du nombre d'isolats sensibles à tous les antibiotiques testés et une diminution du nombre d'isolats multirésistants a été remarquée. Les taux de résistance ont également été déterminés pour les *Campylobacter coli* isolés à partir de la viande de volaille. Le profil de résistance observé est similaire à celui de *C. jejuni* bien que certains isolats de *C. coli* montraient une résistance à l'érythromycine tandis que cette résistance n'a pas été détectée chez *C. jejuni*. La prévalence des résistances à l'ertapénème et à la tétracycline est aussi nettement plus élevée chez *C. coli* que chez *C. jejuni*. La surveillance de *Campylobacter* spp. dans la matière fécale de veaux confirme la présence de taux de résistance supérieurs chez *C. coli* par rapport à *C. jejuni*, notamment pour l'érythromycine et l'ertapénème. Enfin, la surveillance de *Campylobacter coli* dans la matière fécale de porcs en 2021 montre un profil de résistance similaire à ceux obtenus dans les autres matrices avec toutefois des taux de résistance généralement plus faibles.

Chez *Salmonella* spp. Les serovars prédominants en 2021 sont Infantis dans les matrices alimentaires et Monophasic Typhimurium dans les matrices de production primaire (matières fécales de porcs et de veaux). Dans les denrées alimentaires la résistance des *Salmonella* spp a augmenté en 2021, notamment pour les (fluoro)quinolones, le sulfaméthoxazole, le triméthoprime, l'ampicilline, la tétracycline et la tigécycline. Un isolat a aussi montré un phénotype BLSE.

Une surveillance spécifique d'*E. coli* productrices de BLSE, AmpC ou de carbapénémases a été menée dans les populations de poulets de chair, de porcs d'engraissement et de bovins de moins d'un an et dans les viandes fraîches de ces 3 populations d'animaux et de dindes. Comme attendu, le taux de prévalence le plus élevé est retrouvé chez les poulets de chair (79%), suivi des bovins de moins d'un an (60%) et des porcs d'engraissement (40%). En ce qui concerne les viandes fraîches des différentes catégories d'animaux précitées, le taux le plus élevé a été retrouvé dans la viande de poulet de chair (56.00%), suivi de la viande de dinde (22.67%), de la viande de bœuf (3.33%) et de la viande de porc (2%). Malgré une prévalence très basse dans la viande de bœuf et de porc, les isolats montrent une forte multirésistance. Aucun isolat n'a été détecté résistant au méropénème.

Chez les *E. coli* indicateurs isolés à partir de matière fécale de poulets de chair, de veaux et de porcs à l'abattoir, le taux de résistance aux antibiotiques de dernier choix (colistine, tigécycline et méropénème) était très faible ou inexistant bien que pour plusieurs matrices on constate une (ré)apparition de faibles taux de résistance à la tigécycline. A noter, la diminution progressive de la résistance aux (fluoro)quinolones chez la volaille (~41%), et les porcs d'engraissement (<10%). En ce qui concerne les céphalosporines de troisième génération, une résistance <10% a été retrouvée pour les trois catégories d'animaux.

La surveillance des *Staphylococcus aureus* résistants à la méthicilline (MRSA) a été réalisée chez les bovins à la ferme en 2021. La prévalence des MRSA dans les différentes catégories de bovins est restée stable pendant la période 2012-2021. En 2021, celle-ci était très élevée chez les veaux (54.5%), modérée chez les vaches laitières (11.7%) et faible chez les bovins viandeux (4.7%). En 2021, la majorité des MRSA isolées appartenaient au complexe clonal CC398 et au spa-type t011, principalement associé aux animaux de rente (LA-MRSA). Cependant, certaines MRSA étaient apparentées aux lignées associées aux humains. En effet, une souche isolée de veaux présentait un génotype CA-MRSA (CC1-ST1-t386) et 5 souches appartenaient au génotype HA-MRSA CC8-ST239-t037, 3 isolées de vaches laitières et 2 de bovins viandeux. La présence des gènes du cluster d'évasion du système immunitaire humain détectés dans les souches CA et HA-MRSA suggère un passage récent de l'homme à l'animal. Aucune souche résistante aux antibiotiques de derniers recours pour le traitement des infections humaines (i.e. linézolide et vancomycine) n'a été détectée au fil des ans chez les MRSA isolés de bovins en Belgique. La résistance à la mupirocine observée en 2012 n'a plus été rapportée depuis 2015, dans toutes les catégories de bovins. Entre 2012 et 2021, des diminutions significatives de pourcentages de résistance ont été observées pour la ciprofloxacine, l'acide fusidique, la mupirocine, la rifampicine, le sulfaméthoxazole et la streptomycine parmi les isolats de veaux. En 2021, à l'exception d'une souche, toutes les MRSA étaient multirésistantes à un nombre variant de 4 à 10 familles d'antimicrobiens différentes et incluant les bêta-lactames. La multirésistance observée était plus élevée chez les veaux et les vaches laitières, avec un maximum atteignant des résistances à 10 et 8 familles d'antimicrobiens différentes respectivement.

La surveillance des *Enterococcus faecalis* et *Enterococcus faecium*, organisée en Belgique chez les animaux producteurs de denrées alimentaires entre 2011 et 2013, et reprise en 2019, a continué. Elle permet de faire un état des lieux de la prévalence de ces bactéries commensales indicatrices et de compléter l'image de la situation de la résistance aux antimicrobiens au sein de nos élevages, complémentairement à la surveillance des *E. coli* indicatrices. Les entérocoques sont en effet aussi considérés comme des réservoirs de gènes de résistances aux antibiotiques, présents à la fois chez l'homme et chez les animaux. En 2021, les prévalences des espèces d'entérocoques par catégorie animale étaient similaires à celles observées en 2019 et 2020. En effet, *Enterococcus faecium* a été plus fréquemment isolée qu'*E. faecalis* au sein des échantillons de poules reproductrices (**77.6%**), poules pondeuses (**72.4%**), veaux (**61.8%**) et porcs (**61.0%**). A l'inverse, *Enterococcus faecalis* (**67.3%**) a été isolée plus fréquemment qu'*E. faecium* (**52.8%**) au sein des échantillons de poulets de chair. Les tests de susceptibilité antimicrobienne réalisés cette année ont montré que, dans l'ensemble, les pourcentages de résistance observés chez *Enterococcus faecalis* et *Enterococcus faecium* au sein des différentes matrices animales étudiées semblent stables depuis 2019. Les résistances à la tétracycline, à l'érythromycine et à la quinupristine/dalfopristine étaient les résistances les plus observées, à la fois chez *E. faecalis* et *E. faecium*, en taux variable selon la matrice animale. Des diminutions significatives de la résistance antimicrobienne ont été observées pour le chloramphénicol chez *E. faecalis* isolées de veaux et de porcs, pour l'érythromycine chez *E. faecalis* isolées de porcs, pour l'ampicilline chez *E. faecium* isolées de poulets de chair, pour la quinupristine/dalfopristine chez *E. faecium* isolées de veaux et pour la daptomycine chez *E. faecium* isolées de toutes catégories animales en 2021. Des résistances au linézolide (n=14) et à la vancomycine (n=1), antibiotiques critiques en santé humaine, étaient également observées en 2021, à savoir 12 *E. faecalis* isolées de veaux (n=10), poulets de chair (n=1) et poules reproductrices (n=1), 2 *E. faecium* isolées de porcs (n=1) et veaux (n=1) et une *E. faecalis* isolée de veaux, respectivement. La résistance à la daptomycine était absente en 2021 et est la conséquence de la modification du seuil de résistance appliqué (de 4mg/L à 8mg/L) chez *E. faecium*. La multirésistance (résistance à au moins 3 familles d'antimicrobiens), était principalement observée chez *E. faecium* et particulièrement celles isolées de poulets de chair (**60.6%** contre **1.8%** d'*E. faecalis*). A l'inverse, les souches isolées de veaux représentent l'exception, avec **54.2%** d'*E. faecalis* multirésistantes contre **18.8%** d'*E. faecium*.

En 2021, certaines souches ont été séquencées complètement par Next-generation sequencing (NGS). Ce rapport présente également ces résultats et la caractérisation détaillée de ces souches réalisée grâce à ce séquençage.

TABLE DES MATIÈRES

1. Introduction	7
2. Matériel et méthodes	8
2.1. Tests de sensibilité aux agents antimicrobiens.....	8
2.2. Critères de classifications de sensibilité aux agents antimicrobiens selon l'EFSA.....	12
2.3. Critères de classification des β -lactames selon l'EFSA	12
2.4. Définition de multirésistance	14
2.5. Isolement et identification des <i>Staphylococcus aureus</i> résistants à la méthicilline	14
2.5.1. Echantillonnage	14
2.5.2. Isolement et identification	14
2.5.3. Confirmation par real-time PCR.....	14
2.5.4. Génotypage	14
2.5.4.1. Typage du gène <i>spa</i>	14
2.5.4.2. CC398 et autres CC	14
2.5.5. Etude de la susceptibilité antimicrobienne.....	15
2.6. Isolement et identification des <i>Enterococcus faecalis</i> et <i>Enterococcus faecium</i>	15
2.6.1. Echantillonnage des entérocoques.....	15
2.6.2. Isolement et identification par MALDI-TOF.....	15
2.6.3. Etude de la susceptibilité antimicrobienne.....	16
2.7. Analyse des données des tests de susceptibilité antimicrobienne.....	16
2.8. NGS	16
2.8.1. NGS des <i>E. coli</i> ESBL	16
2.8.2. NGS des <i>Staphylococcus aureus</i> résistants à la méthicilline	17
2.8.3. NGS des <i>Enterococcus faecalis</i> et <i>Enterococcus faecium</i>	18
3. Résultats et discussion	18
3.1. Surveillance antimicrobienne chez les bactéries zoonotiques et commensales dans les denrées alimentaires	18
3.1.1. Résistance antimicrobienne des <i>Campylobacter</i> spp.....	19
3.1.2. Résistance antimicrobienne des <i>Salmonella</i>	22
3.1.2.1. <i>Salmonella</i> FOOD	22
3.1.2.2. <i>Salmonella</i> Feed	23
3.1.3. <i>E. coli</i> productrices de β -lactamases	24
3.1.3.1. Détection d' <i>E. coli</i> productrices de BLSE, d'AmpC ou de carbapénémases dans des matrices alimentaires d'origine animale.....	24
3.1.3.2. Surveillance spécifique des bactéries <i>E. coli</i> productrices de BLSE, d'AmpC ou de carbapénémases dans les viandes de poulets de chair.....	24
3.1.3.3. Surveillance spécifique des bactéries <i>E. coli</i> productrices de BLSE, d'AmpC ou de carbapénémases dans le lait cru	26
3.1.3.4. Surveillance spécifique des bactéries <i>E. coli</i> productrices de BLSE, d'AmpC ou de carbapénémases dans les légumes.....	28
3.1.3.5. Surveillance spécifique des bactéries <i>E. coli</i> productrices de BLSE, d'AmpC ou de carbapénémases dans la viande de bœuf, de porc et de dinde.....	28
3.2. Surveillance antimicrobienne chez les bactéries zoonotiques et commensales isolées des populations d'animaux producteurs d'aliments (production primaire)	31
3.2.1. Surveillance de <i>Campylobacter coli</i> dans la matière fécale de porcs.....	31
3.2.2. Surveillance de <i>Campylobacter</i> spp. dans la matière fécale de veaux.....	31
3.2.3. Surveillance de <i>Salmonella</i> spp. dans la matière fécale de porcs.....	33

3.2.4. Surveillance de <i>Salmonella</i> spp. dans la matière fécale de veaux	33
3.2.5. Surveillance d' <i>E. coli</i> commensales indicatrices et BLSE/AmpC/Carbapénémases.	34
3.2.6. Surveillance d' <i>E. coli</i> commensales indicatrices dans la matière fécale de poulets de chair, de porcs d'engraissement et de veaux.....	35
3.2.6.1. Surveillance d' <i>E. coli</i> commensales indicatrices dans la matière fécale de poulet de chair.	35
3.2.6.2. Surveillance d' <i>E. coli</i> commensales indicatrices dans la matière fécale de porc d'engraissement	36
3.2.6.3. Surveillance d' <i>E. coli</i> commensales indicatrices dans la matière fécale des veaux à l'abattoir.....	37
3.2.6.4. Surveillance d' <i>E. coli</i> commensales indicatrices dans la matière fécale des bovins de moins d'un an.....	38
3.2.6.5. Surveillance d' <i>E. coli</i> commensales indicatrices dans la matière fécale des poules reproductrices et des poules pondeuses.....	39
3.2.7. Surveillance spécifique des bactéries <i>E. coli</i> productrices de BLSE, d'AmpC ou de carbapénémases	41
3.2.7.1. Surveillance spécifique des bactéries <i>E. coli</i> productrices de BLSE, d'AmpC ou de carbapénémases dans les contenus caecaux de poulets de chair	41
3.2.7.2. Surveillance spécifique des bactéries <i>E. coli</i> productrices de BLSE, d'AmpC ou de carbapénémases dans les matières fécales de porc	42
3.2.7.3. Surveillance spécifique des bactéries <i>E. coli</i> productrices de BLSE, d'AmpC ou de carbapénémases dans les matières fécales de bovins.	43
3.2.8. Surveillance antimicrobienne de <i>Staphylococcus aureus</i> résistants à la méthicilline isolés à partir d'écouvillons nasaux de vaches laitières, bovins viandeux et veaux de moins d'un an/veaux de boucherie.	45
3.2.8.1. Prévalences des <i>Staphylococcus aureus</i> résistants à la méthicilline	45
3.2.8.2. Caractérisation des souches <i>Staphylococcus aureus</i> résistantes à la méthicilline	46
3.2.8.3. Résistance antimicrobienne chez <i>Staphylococcus aureus</i> résistants à la méthicilline	46
(i) Veaux.....	46
(ii) Bovins viandeux.....	47
(iii) Vaches laitières.....	48
(iv) Comparaison des résistances antimicrobiennes observées entre les différentes catégories animales en 2021.....	49
3.2.8.1. Comparaison des prévalences de résistance antimicrobienne observées en 2012, 2015, 2018 et 2021 chez <i>Staphylococcus aureus</i> résistant à la méthicilline par catégorie animale	50
(v) Veaux.....	50
(vi) Bovins viandeux.....	51
(vii) Vaches laitières.....	52
3.2.8.2. Profils de multirésistance observés chez les <i>Staphylococcus aureus</i> résistants à la méthicilline isolés de bovins	54
3.2.8.3. Investigation par NGS des <i>Staphylococcus aureus</i> résistants à la méthicilline isolés de bovins	55
3.2.8.4. Discussion.....	68
3.2.9. Surveillance antimicrobienne d' <i>Enterococcus faecium</i> et <i>Enterococcus faecalis</i> isolées à partir de faeces de poulets de chair, de dindes, de poules reproductrices, de poules pondeuses, de veaux et de porcs.....	71
3.2.9.1. Prévalences d' <i>Enterococcus faecalis</i> et <i>Enterococcus faecium</i> isolées à partir d'échantillons de poulets de chair, dindes, poules reproductrices, poules pondeuses, veaux et porcs.	71

3.2.9.2. Résistance antimicrobienne chez <i>Enterococcus faecium</i> et <i>Enterococcus faecalis</i> isolées à partir d'échantillons de poulets de chair, dindes, poules reproductrices et poules pondeuses.	71
3.2.9.3. Résistance antimicrobienne chez <i>Enterococcus faecium</i> et <i>Enterococcus faecalis</i> isolées à partir d'échantillons de veaux.....	74
3.2.9.4. Résistance antimicrobienne chez <i>Enterococcus faecium</i> et <i>Enterococcus faecalis</i> isolées à partir d'échantillons de porcs	75
3.2.9.5. Comparaison des pourcentages de résistance antimicrobienne observés entre les différentes catégories animales	76
3.2.9.6. Comparaison des pourcentages de résistance antimicrobienne observés en 2019, 2020 et 2021 chez <i>Enterococcus faecalis</i> et <i>Enterococcus faecium</i> par espèce animale	78
3.2.9.7. Multirésistance observée chez <i>Enterococcus faecalis</i> et <i>Enterococcus faecium</i> , par espèce animale	82
3.2.9.8. Investigation par NGS de souches <i>Enterococcus faecalis</i> et <i>Enterococcus faecium</i> isolées en 2021	85
3.2.9.9. Discussion.....	90
3.3. Séquençage du génome entier chez les <i>E. coli</i> BLSE (ESBL) isolés de la production primaire et les viandes fraîches.....	92
3.3.1. Présence des gènes de résistance aux antibiotiques : analyse des résultats	92
3.3.2. Analyse génétique des souches <i>E. coli</i> productrices de β -lactamase à spectre étendu (BLSE/ESBL)	99
3.3.3. Co-résistance des ESBL aux fluoroquinolones	100
3.3.4. Co-résistance des ESBL aux macrolides	102
3.3.5. Co-résistance des ESBL à la colistine.....	103
3.3.6. Co-résistance des ESBL aux aminoglycosides	103
3.3.7. Co-résistance des ESBL aux désinfectants.....	104
3.3.8. Dendrogrammes réalisés à partir du core genome MLST d' <i>E. coli</i> ESBL	104
3.3.8.1. Analyse parmi les isolats de la production primaire	105
3.3.8.2. Analyse comparative parmi les isolats provenant de caeca de volaille et viande fraîche de volaille	106
4. Conclusion.....	108
5. Liste des figures.....	112
6. Liste des tableaux	114
7. Abréviations	115
8. Références.....	115
9. Remerciements	118

1. Introduction

Les agents antimicrobiens, dont les antibiotiques, sont des substances utilisées pour tuer des micro-organismes ou pour arrêter leur développement et leur multiplication. Ils sont couramment utilisés pour traiter une grande variété de maladies infectieuses chez l'homme ou chez l'animal.

Si le phénomène de résistance aux antimicrobiens (AMR ou RAM) est pour une part un phénomène naturel, dans la mesure où chaque espèce de bactérie est d'emblée résistante à un type donné d'antibiotiques – ce qui définit en retour le spectre d'activités de l'antimicrobien –, c'est aussi un phénomène acquis, favorisé par l'usage et le mésusage des antibiotiques. En premier lieu, l'usage, puisque le simple fait d'utiliser un antibiotique va petit à petit favoriser la reproduction de spécimens résistants.

Un exemple bien connu de bactéries ayant acquis une résistance à plusieurs antibiotiques est le cas des bactéries qui produisent des bêta-lactamases à spectre étendu, c.-à-d. des enzymes qui confèrent une résistance (ou une diminution de l'activité) à une vaste gamme de bêta-lactamines dont les céphalosporines de troisième génération. Ces bactéries sont appelées bactéries productrices de bêta-lactamases à spectre étendu ou élargi (BLSE).

Les bactéries résistantes peuvent se propager par différentes voies. Notamment, lorsqu'une résistance aux antimicrobiens apparaît parmi des bactéries zoonotiques présentes chez des animaux ou dans des aliments, cela peut compromettre le traitement efficace de maladies infectieuses chez l'homme.

Dans le domaine de la sécurité des aliments, les autorités doivent protéger les consommateurs contre les risques liés à la chaîne alimentaire et définir les meilleures options de contrôle pour diminuer ces risques. Les scientifiques et les évaluateurs des risques examinent les facteurs pouvant conduire à la présence de bactéries résistantes aux antimicrobiens dans les aliments et chez les animaux, afin de fournir des avis scientifiques appropriés aux décideurs.

En Europe, l'EFSA surveille et analyse la situation en matière d'AMR dans les aliments et chez les animaux à travers l'Europe. Elle est assistée par le réseau de l'EFSA chargé de la collecte des données sur les zoonoses. Une décision a été implémentée depuis 2014 afin d'harmoniser l'échantillonnage, l'analyse de résistance aux agents antimicrobiens et la collecte de données, celle-ci a été remplacée, à partir de 2021, par la décision d'exécution du 17 novembre 2021 modifiant les antibiotiques ou leurs concentrations utilisés dans les panels de test (EUVSEC3 remplaçant EUVSEC, EUCAMP3 remplaçant EUCAMP2 et EUST2 remplaçant EUST) et certaines valeurs seuils épidémiologiques.

La surveillance est organisée afin de détecter la résistance chez les bactéries zoonotiques *Salmonella* spp. et *Campylobacter* spp. qui sont d'un grand intérêt pour la santé publique. Elles peuvent contaminer la nourriture et provoquer des intoxications alimentaires. De plus, les bactéries intestinales indicatrices présentes chez les animaux sains telles que *E. coli* font aussi partie de la surveillance. Ces bactéries indicatrices peuvent contaminer la nourriture. Le niveau de résistance de ces bactéries indicatrices représente la résistance présente dans ce type de population. Il reflète également la magnitude de la pression exercée par les antibiotiques dans la population intestinale et peut servir d'indicateur des émergences et changements. Aussi, ces bactéries indicatrices peuvent servir de réservoir de gènes de résistance.

La surveillance des *Staphylococcus aureus* résistants à la méthicilline (MRSA) est organisée en Belgique chez les animaux producteurs de denrées alimentaires depuis 2011, en plus des surveillances imposées par la décision européenne. Elle suit un cycle de 3 ans et inclut des échantillons de ferme des catégories animales de volailles, bovins ou porcins, selon l'année. Ceci permet de faire un état des lieux de la prévalence des MRSA, des types génétiques observés, et de la situation de la résistance aux antimicrobiens au sein de nos élevages. La résistance présente chez nos animaux est importante

à évaluer puisque des échanges de MRSA et potentiellement des résistances associées de l'animal vers l'homme, et inversement, ont été décrits. D'un point de vue de santé humaine, il est donc dans notre intérêt de surveiller les résistances émergentes chez l'animal afin d'établir d'éventuels liens avec des cas d'infection humaine à *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline.

La surveillance des *Enterococcus faecalis* et *Enterococcus faecium*, organisée en Belgique chez les animaux producteurs de denrées alimentaires entre 2011 et 2013, et reprise en 2019, a continué en 2021. Elle permet de faire un état des lieux de la prévalence de ces bactéries commensales indicatrices et de compléter l'image de la situation de la résistance aux antimicrobiens au sein de nos élevages, complémentairement à la surveillance des *E. coli* indicatrices. Les entérocoques sont en effet aussi considérés comme des réservoirs de gènes de résistances aux antibiotiques, présents à la fois chez l'homme et chez les animaux. De plus, certaines de ces espèces *Enterococcus* possèdent déjà des résistances (dites intrinsèques) liées à la présence de gènes spécifiques : par exemple, la résistance à la quinupristine/dalfopristine (Synercid) présente chez *Enterococcus faecalis* ou encore la résistance à la vancomycine présente chez *Enterococcus gallinarum/Enterococcus casseliflavus*.

En 2021, l'utilisation du NGS a été implémentée dans le cadre des surveillances officielles afin d'investiguer les bactéries résistantes aux antimicrobiens isolées d'animaux et dans les denrées alimentaires. Il y a un intérêt mondial pour la surveillance génomique afin de lutter contre les bactéries multirésistantes. Cette surveillance révèle les gènes de résistance qui, lorsqu'ils sont exprimés, sont bien responsables de la résistance aux antibiotiques. Avec l'avancée des nouvelles technologies est apparue la première génération des appareils de séquençage à haut débit, couramment nommés NGS (*Next Generation Sequencing*). Ces automates permettent d'analyser des dizaines de milliers de séquences ADN en une seule fois.

A cet effet, une approche flexible est décrite dans le rapport scientifique publié par l'EFSA sur les spécifications techniques sur la surveillance harmonisée de la résistance aux antimicrobiens chez les bactéries zoonotiques et indicatrices des animaux producteurs de denrées alimentaires et des denrées alimentaires (EFSA Journal 2012). En particulier dans le cadre de la surveillance des ESBL, une approche flexible des États membres/laboratoires nationaux de référence (LNR) à utiliser le WGS sur une base volontaire pour la détection des BLSE/AmpC/carbapénémase-producteurs *E. coli* remplacent les panneaux 1 et 2 de la méthode de test de sensibilité phénotypique aux antimicrobiens dans la surveillance de ces organismes (EU 2020/1729). Le séquençage d'une sélection de MRSA et d'entérocoques a également été réalisé cette année dans le but d'investiguer, de typer et de caractériser la résistance antimicrobienne ainsi que la virulence au sein de ces souches. Précisément, caractériser génétiquement les résistances observées aux antibiotiques critiques tels que la vancomycine et le linézolide est d'un grand intérêt. De même, la caractérisation des MRSA associées aux lignées humaines acquises dans la communauté (CA-MRSA) ou à l'hôpital (HA-MRSA) mais isolées d'animaux est d'un grand intérêt pour la santé publique.

2. Matériel et méthodes

2.1. TESTS DE SENSIBILITÉ AUX AGENTS ANTIMICROBIENS

La diminution de la sensibilité d'une bactérie à un certain antimicrobien est mesurée grâce à la concentration minimale inhibitrice (CMI).

La CMI est la plus petite concentration en antibiotique nécessaire pour inhiber la croissance d'une bactérie. La CMI mesure une concentration, normalement exprimée en mg/l.

La CMI est déterminée selon la méthode de dilution conformément aux méthodes décrites par le comité européen des antibiogrammes (European Committee on Antimicrobial susceptibility Testing-EUCAST) et l'institut des normes de laboratoire et d'analyse médicales (Clinical and Laboratory Standard Institute-CLSI). Celle-ci est reconnue comme méthode de référence internationale (norme ISO 20776-1 :2019).

En 2021, la détermination de la CMI des isolats a été réalisée en utilisant la "méthode de microdilution" avec l'utilisation de l'appareil Sensititre (ThermoFisher) et les panels respectifs d'antimicrobiens suivants : EUVSEC3 (premier panel), EUVSEC2 (deuxième panel) pour *E. coli* et *Salmonella*, EUCAMP3 pour *Campylobacter*, EUST2 pour *Staphylococcus aureus* et EUVENC pour *Enterococcus faecalis* et *Enterococcus faecium*. L'interprétation des résultats a été réalisée sur base des seuils de résistance ECOFF établis par EUCAST, comme décrit et précisé dans la Décision d'exécution 2020/1729/UE.

Les tableaux suivants (Tableau 1 à Tableau 8) reprennent les seuils d'interprétation de la résistance aux antimicrobiens selon la bactérie concernée.

Tableau 1. Panel de substances antimicrobiennes testées (EUCAMP3) et seuils d'interprétation pour *Campylobacter jejuni*.

Antimicrobien	Abréviation	Seuils d'interprétation de la RAM > (mg / l)
Chloramphénicol	Chl	16
Ciprofloxacine	Cip	0,5
Ertapénème	Etp	0,5*
Érythromycine	Ery	4
Gentamicine	Gen	2
Tétracycline	Tet	1

*Données officielles non disponibles, mais la valeur considérée pour Etp est >0,5 (mg/l) selon les valeurs données par l'EFSA pour le rapportage AMR 2021.

Tableau 2. Panel de substances antimicrobiennes testées (EUCAMP3) et seuils d'interprétation pour *Campylobacter coli*.

Antimicrobien	Abréviation	Seuils d'interprétation de la RAM > (mg / l)
Chloramphénicol	Chl	16
Ciprofloxacine	Cip	0,5
Ertapénème	Etp	0,5*
Érythromycine	Ery	8
Gentamicine	Gen	2
Tétracycline	Tet	2

*Données officielles non disponibles, mais la valeur considérée pour Etp est >0,5 (mg/l) selon les valeurs données par l'EFSA pour le rapportage AMR 2021.

Tableau 3. Panel de substances antimicrobiennes (premier panel EUVSEC3) testées et seuils d'interprétation pour *Salmonella* spp.

Antimicrobien	Abréviation	Seuils d'interprétation de la RAM > (mg / l)
Amikacine	Ami	4
Ampicilline	Amp	8
Céfotaxime	Fot	0.5
Ceftazidime	Taz	2
Méropénème	Mer	0.125
Acide Nalidixique	Nal	8
Ciprofloxacine	Cip	0.064
Tétracycline	Tet	8
Colistine	Col	2*
Gentamicine	Gen	2
Triméthoprime	Tmp	2

Sulfaméthoxazole	Smx	256*
Chloramphénicol	Chl	16
Azithromycine	Azi	16*
Tigécycline	Tig	0.5*

*Données officielles non disponibles, mais les valeurs considérées pour Col, Smx, Azi et Tig sont les valeurs données par l'EFSA pour le rapportage AMR 2021.

Tableau 4. Panel de substances antimicrobiennes (deuxième panel EUVSEC2) testées et seuils d'interprétation pour *Salmonella* spp.

Antimicrobien	Abréviation	ECOFF (R>mg/l)
Céfoxitin	Fox	8
Céfépime	Fep	0.125*
Céfotaxime+acide clavulanique	Fot/Cl	0.5*
Ceftazidime+acide clavulanique	Taz/Cl	2*
Méropénème	Mer	0.125
Temocilline	Tem	16*
Imipénème	Imi	1
Ertapénème	Ert	0.06*
Céfotaxime	Fot	0.5
Ceftazidime	Taz	2

*Données officielles non disponibles, mais les valeurs considérées pour Fep, Fot/Cl, Taz/Cl, Tem et Etp sont les valeurs données par l'EFSA pour le rapportage AMR 2021.

Tableau 5. Panel de substances antimicrobiennes (premier panel EUVSEC3) testées et seuils d'interprétation pour *E. coli* indicatrice.

Antimicrobien	Abréviation	Seuils d'interprétation de la RAM > (mg / l)
Amikacine	Ami	8
Ampicilline	Amp	8
Céfotaxime	Fot	0.25
Ceftazidime	Taz	0.5
Méropénème	Mer	0.125
Acide Nalidixique	Nal	8
Ciprofloxacine	Cip	0.064
Tétracycline	Tet	8
Colistine	Col	2
Gentamicine	Gen	2
Triméthoprim	Tmp	2
Sulfaméthoxazole	Smx	64
Chloramphénicol	Chl	16
Azithromycine	Azi	16*
Tigécycline	Tig	0,5

*Données officielles non disponibles, mais la valeur considérée pour Azi est >16 (mg/l) selon les valeurs données par EFSA pour le rapportage AMR 2021.

Tableau 6. Panel de substances antimicrobiennes (deuxième panel EUVSEC2) testées et seuils d'interprétation pour *E. coli* indicatrice.

Antimicrobien	Abréviation	ECOFF (R>mg/l)
Céfoxitin	Fox	8
Céfépime	Fep	0.125
Céfotaxime+acide clavulanique	Fot/Cl	0.25
Ceftazidime+acide clavulanique	Taz/Cl	0.5
Méropénème	Mer	0.125
Temocilline	Tem	16
Imipénème	Imi	0,5
Ertapénème	Ert	0.06*
Céfotaxime	Fot	0.25
Ceftazidime	Taz	0.5

*Données officielles non disponibles, mais la valeur considérée pour Etp est >0.06 (mg/l) selon les valeurs données par l'EFSA pour le rapportage AMR 2021.

Tableau 7. Panel de substances antimicrobiennes testées, concentrations minimales et maximales testées (panel EUST2) et seuils d'interprétation pour *Staphylococcus aureus*.

Antimicrobien *	Abréviation	ECOFF (R>mg/l)* *	Concentration minimale mg/L	Concentration maximale mg/L
Céfoxitine	FOX	4	0.5	16
Chloramphénicol	CHL	16	4	64
Ciprofloxacine	CIP	1	0.25	8
Clindamycine	CLI	0.25	0.12	4
Erythromycine	ERY	1	0.25	8
Acide fusidique	FUS	0.5	0.25	4
Gentamicine	GEN	2	0.5	16
Kanamycine	KAN	8	4	32
Linézolide	LZD	4	1	8
Mupirocine	MUP	1	0.5	256
Pénicilline	PEN	0.125	0.06	1

Quinupristine-Dalfopristine (Synercid)	SYN	1	0.5	4
Rifampicine	RIF	0.016	0.015	0.5
Streptomycine	STR	16	4	32
Sulfaméthoxazole	SMX	128	64	512
Tétracycline	TET	1	0.5	16
Tiamuline	TIA	2	0.5	4
Triméthoprime	TMP	2	1	16
Vancomycine	VAN	2	1	8

*La liste d'antimicrobiens testés est identique au panel EUST utilisé précédemment. La gamme de concentrations testées a changé pour FUS, GEN, KAN, PEN, TMP et VAN.

**Les valeurs ECOFF utilisées pour les MRSA sont celles publiées par l'EUCAST pour *S. aureus* publiées en Février 2021. Par rapport au monitoring de 2018, seul le seuil de la rifampicine a changé (>0.032 en 2018).

Tableau 8. Panel de substances antimicrobiennes testées, concentrations minimales et maximales testées et seuils d'interprétation pour *Enterococcus faecalis* et *Enterococcus faecium*.

Antimicrobien	Abréviation	ECOFF* (R>mg/l) - <i>E. faecalis</i>	ECOFF* (R>mg/l) - <i>E. faecium</i>	Concentration minimale mg/L	Concentration maximale mg/L
Ampicilline	AMP	4	4	0.5	64
Chloramphénicol	CHL	32	32	4	128
Ciprofloxacine	CIP	4	4	0.12	16
Daptomycine	DAP	4	8	0.25	32
Erythromycine	ERY	4	4	1	128
Gentamicine	GEN	64	32	8	1024
Linézolide	LZD	4	4	0.5	64
Quinupristine/dalfopristine (Synercid)	SYN	0.5 [#]	1	0.5	64
Teicoplanine	TEI	2	2	0.5	64
Tétracycline	TET	4	4	1	128
Tigecycline	TGC	0.25	0.25	0.03	4
Vancomycine	VAN	4	4	1	128

* Les valeurs ECOFF utilisées pour les entérocoques sont celles publiées par l'EFSA en avril 2021.

[#]résistance intrinsèque chez *Enterococcus faecalis*, un seuil de 0.5 mg/L a été fixé pour le rapportage des données.

2.2. CRITÈRES DE CLASSIFICATIONS DE SENSIBILITÉ AUX AGENTS ANTIMICROBIENS SELON L'EFSA

Les termes utilisés pour décrire les niveaux de résistance aux antimicrobiens sont décrits selon les critères suivants : «rare: <0,1%», «très faible: 0,1% à 1,0%», «faible : 1% à 10,0%», «modéré: 10,0% à 20,0 % », « élevé: 20,0% à 50,0% »,« très élevé: 50,0% à 70,0% »,« extrêmement élevé:> 70,0% ». Ces termes sont appliqués à tous les antimicrobiens. Toutefois, l'importance d'un niveau de résistance donné dépendra de l'antimicrobien en question et son importance en médecine humaine et vétérinaire (Efsa Journal 2015, 13 (2) :4036).

2.3. CRITÈRES DE CLASSIFICATION DES B-LACTAMES SELON L'EFSA

Le deuxième panel permet une classification précise des isolats d'*E. coli* présentant une résistance aux céphalosporines de troisième génération. Les critères ont été mis à jour en 2016 et ont été présentés lors du meeting EFSA AMR-Network en novembre 2016 (voir Tableau 9).

Tableau 9. Critères de classification des enzymes du type β -lactamases selon l'EFSA.

Case	Phénotype	Description
1	BLSE	Céfotaxime ou ceftazidime > 1mg/L (R) Synergie céfotaxime/acide clavulanique ou ceftazidime/acide clavulanique Céfoxitine < 8mg/L (S)
2	AmpC	Céfoxitine > 8mg/L (R) Pas de synergie céfotaxime/acide clavulanique ou ceftazidime/acide clavulanique
3	BLSE+AmpC	Céfotaxime ou ceftazidime > 1mg/L (R) Céfoxitine > 8mg/L (R) Synergie céfotaxime/acide clavulanique ou ceftazidime/acide clavulanique
4	Carbapénémases	Méropénème > 0.12mg/L (R)
5	Autres phénotypes	Céfotaxime or ceftazidime > 1mg/L (R) Céfoxitine < 8mg/L (S) Pas de Synergie céfotaxime/acide clavulanique ou ceftazidime/acide clavulanique Céfoxitine < 8mg/L (S) Céfotaxime and Ceftazidime \leq 1mg/L Céfoxitine > 8mg/L (R) Céfotaxime or ceftazidime > 1mg/L (R) Méropénème \leq 0.12 mg/L (S) Ertapénème > 0.06 mg/L (R) Imipénème > 1 mg/L (R) Autres combinaisons non décrites dans ce tableau-ci mais qui montrent une résistance aux β -lactames ou aux carbapénèmes

2.4. DÉFINITION DE MULTIRÉSISTANCE

Le terme multirésistance fait référence à des isolats dont le phénotype a une résistance à au moins trois familles d'antibiotiques. Cela implique par exemple que la résistance à la ciprofloxacine et l'acide nalidixique représente la résistance à une seule famille d'antimicrobiens ainsi que la résistance à la céfotaxime et ceftazidime représente la résistance aux céphalosporines de troisième génération ou encore la résistance à la gentamicine et à l'amikacine qui représente la résistance aux aminoglycosides.

2.5. ISOLEMENT ET IDENTIFICATION DES *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* RÉSISTANTS À LA MÉTHICILLINE

2.5.1. Echantillonnage

Un total de 358 échantillons a été analysé, répartis en 3 catégories animales différentes (n total=145 veaux, 85 bovins viandeux et 128 vaches laitières). Les échantillons sont répartis sur toute l'année selon les différentes unités locales de contrôle. Dix écouvillons nasaux de 10 veaux différents ou 20 écouvillons nasaux de 20 bovins viandeux ou vaches laitières différents sont pris dans chaque exploitation et rassemblés en un seul échantillon au sein du laboratoire. Les écouvillons sont stockés entre 5 et 25 °C. Une exploitation est considérée comme positive lorsqu'une souche MRSA est isolée et confirmée par PCR.

2.5.2. Isolement et identification

Les échantillons ont été incubés dans 300 ml de milieu Mueller-Hinton (MH) supplémenté de NaCl (6.5%) à 37°C pendant 18-24h. Un millilitre de cette culture a été ajouté à 9ml de milieu Tryptic Soy Broth (TSB) supplémenté avec de la céfoxitine (3.5mg/l) et aztréonam (75mg/l) et incubé à 37°C pendant 18-24h. Une boucle d'inoculation (10µl) de cet enrichissement a été étalée sur gélose Brilliance MRSA 2 (Oxoid) et incubée pendant 18-24h à 37°C. La présence de MRSA est suspectée sur base de la morphologie des colonies et ensuite confirmée par PCR triplex real-time.

2.5.3. Confirmation par real-time PCR

Par échantillon, une à 5 colonies suspectes sont sélectionnées à partir d'une gélose Brilliance MRSA 2. L'ADN est extrait selon le protocole décrit dans la SOP/BAC/ANA/18. La confirmation des MRSA se fait via la méthode PCR triplex real-time. Cette PCR permet de détecter un gène spécifique de *Staphylococcus aureus*, *nuc*, ainsi que la présence du gène *mecA* responsable de la résistance à la méthicilline et le gène variant *mecC*. Par échantillon, un seul isolat sélectionné au hasard, confirmé comme MRSA par cette real-time PCR est génotypé et évalué pour sa susceptibilité aux antibiotiques.

2.5.4. Génotypage

2.5.4.1. Typage du gène *spa*

Tous les isolats MRSA confirmés par la PCR real time décrite au point 2.5.3 ont été typés par séquençage de la région répétitive du gène *spa* codant pour la protéine A staphylococcale. Le gène de la protéine A (*spa*) a été amplifié selon le protocole standard Ridom StaphType (www.ridom.de/staphtype) et l'amplification a été vérifiée sur gel d'agarose 2%. Le séquençage a été réalisé avec un séquenceur ABI3130xl utilisant les protocoles standards et les séquences obtenues ont été comparées avec la base de données internationale Ridom.

2.5.4.2. CC398 et autres CC

La PCR CC398 a été faite sur tous les isolats confirmés MRSA selon le protocole décrit par Stegger *et al.* 2011. Cette méthode permet la détection rapide des souches appartenant au complexe clonal (CC) 398 qui inclut le « sequence type » ST398 de *S. aureus*.

En 2021, les isolats typés comme négatifs pour le CC398 d'après cette méthode ont été séquencés complètement (Next Generation sequencing, NGS) pour déterminer leurs complexes clonaux (CC) et leurs séquences-types (STs). Des bibliothèques de séquençage ont été créées avec le kit « Nextera XT DNA library preparation » (Illumina, San Diego, CA, USA), selon les instructions du fabricant et ont ensuite été séquencées en utilisant la méthode chimique MiSeq V3 (Illumina) pour la production de reads « paired-end » de 2x250pb. Le schéma classique MLST du site PubMLST.org a été utilisé pour déterminer le complexe clonal et le ST pour chaque génome séquencé.

2.5.5. Etude de la susceptibilité antimicrobienne

La résistance antimicrobienne a été déterminée via la méthode de micro-dilution (Sensititre, Trek Diagnostic Systems, Thermofisher), selon les instructions du fabricant (SOP/BAC/ANA/11) et les cut-off épidémiologiques (ECOFFs) (voir Tableau 7). Cette méthode a été démontrée comme étant en accord avec la méthode de référence ISO 20776-1:2019.

Les isolats sont d'abord inoculés sur géloses au sang et incubés à 37°C pendant 24h. 3 à 5 colonies de ces géloses sont ajoutées à 10ml d'eau physiologique stérile jusqu'à obtenir une solution de 0.5 McFarland. 30µl de cette suspension sont inoculés dans un tube de 11ml de milieu Mueller-Hinton avec TES et ajusté en cations. 50µl de cet inoculum sont ensuite ajoutés à chaque puits d'une plaque Sensititre® EUST2 via l'automate AIM Automated Inoculation Delivery System et la plaque est incubée à 35°C pendant précisément 24h. Les plaques Sensititre® sont lues avec le logiciel Sensititre Vision System qui permet un enregistrement semi-automatique de la concentration minimale inhibitrice (CMI) des différents antibiotiques testés. La CMI est définie comme la concentration la plus basse où aucune croissance visible n'a pu être détectée (voir point 2.1). La définition de la CMI pour les sulphonamides (sulfaméthoxazole), le linézolide et le triméthoprime est une exception : la CMI est définie comme la concentration à laquelle une diminution de croissance de 80-90% en comparaison avec la croissance observée pour le contrôle positif est observée. La détermination de la CMI suit également une règle spéciale pour les bactéries Gram-positives pour le chloramphénicol, la clindamycine, l'érythromycine et la tétracycline, pour lesquels les petits culots qui ont une taille comparable à celle illustrée dans la figure 3 du document M07 (11ème édition) du CLSI doivent être ignorés. Il est important de noter que toutes les souches confirmées MRSA sont résistantes à au moins 2 antibiotiques, la pénicilline et la céfoxitine.

2.6. ISOLEMENT ET IDENTIFICATION DES *ENTEROCOCCUS FAECALIS* ET *ENTEROCOCCUS FAECIUM*

2.6.1. Echantillonnage des entérocoques

L'échantillonnage pour la surveillance des entérocoques a lieu de janvier à décembre et suit différentes procédures selon la matrice animale étudiée. Les échantillons prélevés à l'abattoir et à la ferme par les agents officiels de l'AFSCA dans le cadre du monitoring de la résistance antimicrobienne des *E. coli* commensales sont également utilisés pour le monitoring de la résistance antimicrobienne chez *Enterococcus faecium* et *faecalis*. Pour les prélèvements de poulets de chair, porcs et veaux réalisés à l'abattoir, 100ml de matières fécales sont prélevés à partir du gros intestin (colon, caecum ou rectum), et chaque échantillon correspond à une unité différente. Pour les prélèvements de poules pondeuses et poules reproductrices réalisés à la ferme, au moins 20ml de matières fécales sont prélevés au sol à différents endroits (de préférence 10 lieux différents) à l'aide d'un gant stérile, et constituent un échantillon.

2.6.2. Isolement et identification par MALDI-TOF

Pour la surveillance des entérocoques, des échantillons de matières fécales ou caecales sont resuspendus dans de l'eau peptonée tamponnée (BPW) et directement inoculés sur gélose Slanetz-Bartley et incubés à 41.5°C durant 48h dans les laboratoires de l'agence fédérale pour la sécurité de la chaîne alimentaire (AFSCA) puis transportés au LNR à Sciensano pour l'identification et les tests de

susceptibilité antimicrobienne. À partir des géloses Slanetz-Bartley, les colonies suspectes sont repiquées sur boîtes CSB (géloses au sang) et incubées à 37°C pendant 24h. L'identification de l'espèce bactérienne est ensuite réalisée par MALDI-TOF à partir d'une colonie pure provenant de boîtes CSB.

2.6.3. Etude de la susceptibilité antimicrobienne

La résistance antimicrobienne a été déterminée via la méthode de micro-dilution (Sensititre, Trek Diagnostic Systems, Thermofisher), selon les instructions du fabricant (SOP/BAC/ANA/11) et les cut-off épidémiologiques (ECOFFs) établis par EUCAST ou définis par le laboratoire de référence européen de la résistance antimicrobienne (DTU) pour *Enterococcus faecalis* et *Enterococcus faecium* (voir Tableau 8). Cette méthode a été démontrée comme étant en accord avec la méthode de référence ISO 20776-1:2019. Pour l'étude de la susceptibilité antimicrobienne, au maximum une *Enterococcus faecalis* et une *Enterococcus faecium* ont été analysées par échantillon. Les autres espèces d'entérocoques ne sont pas testées. Après repiquage d'une colonie pure et une incubation à 37°C pendant 24h, 3 à 5 colonies provenant de géloses au sang sont ajoutées à 10ml d'eau physiologique stérile jusqu'à obtenir une solution de 0.5 McFarland. 30µl de cette suspension sont inoculés dans un tube de 11ml de milieu Mueller-Hinton avec TES et ajusté en cations. 50µl de cet inoculum sont ensuite ajoutés à chaque puits d'une plaque Sensititre® EUVENC via l'automate AIM Automated Inoculation Delivery System et la plaque est incubée à 35°C pendant 24h. Les plaques Sensititre® sont lues avec le logiciel Sensititre Vision System qui permet un enregistrement semi-automatique de la concentration minimale inhibitrice (CMI) des différents antibiotiques testés. La CMI est définie comme la concentration la plus basse où aucune croissance visible n'a pu être détectée (voir point 2.1). La définition de la CMI pour le linézolide est une exception : la CMI est définie comme la concentration à laquelle une diminution de croissance de 80-90% en comparaison avec la croissance observée pour le contrôle positif est observée. La détermination de la CMI suit également une règle spéciale pour les bactéries Gram-positives pour le chloramphénicol, l'érythromycine et la tétracycline, pour lesquels les petits culots qui ont une taille comparable à celle illustrée dans la figure 3 du document M07 (11ème édition) du CLSI doivent être ignorés.

2.7. ANALYSE DES DONNÉES DES TESTS DE SUSCEPTIBILITE ANTIMICROBIENNE

Le nombre d'antimicrobiens auxquels une souche résiste a été compté et les pourcentages de résistance de chaque antimicrobien par catégorie animale et par espèce bactérienne ont été calculés et représentés graphiquement (Excel). Pour ce rapport, les termes utilisés pour décrire les différentes résistances antimicrobiennes observées suivent l'interprétation proposée par l'EFSA (voir point 2.2). Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel SAS 9.4. Pour chaque catégorie animale et chaque année, la proportion de souches résistantes (p) ainsi que leurs intervalles de confiance à 95 % (IC) ont été calculés par antimicrobien. Une régression logistique univariée où chaque antimicrobien a été considéré séparément, a été réalisée afin de déterminer, via les odds ratios, si la proportion de souches résistantes était significativement plus élevée en 2021 par rapport aux années antérieures.

2.8. NGS

2.8.1. NGS des *E. coli* ESBL

En 2021, un total de 281 *E. coli* ESBL ont été analysés par WGS. La distribution par matrice alimentaire et fiche technique est illustrée dans le tableau 10.

Tableau 10. Distribution par matrice alimentaire et fiche technique des isolats d'E.coli ESBL analysés par WGS.

FT	Description	n
DIS 809	Viande fraîche de veau	3
DIS 809	Viande fraîche de porc	2
DIS 819	Viande fraîche de poulet de chair (carcasse entière)	56
DIS 821	Viande fraîche de poulet de chair (viande de découpes)	110
PRI 019	Matière fécale de poulet de chair	90
PRI 035	Matière fécale de porc	9
PRI 036	Matière fécale de veau	11

L'ADN génomique des *E. coli* ESBL a été extrait à partir de 10 ml de culture pure à l'aide du kit génomique Maxwell cultured cells (Promega) en suivant les instructions du fabricant. La pureté de l'ADN a été évaluée avec un spectrophotomètre Nanodrop 2000 (ThermoFisher Scientific) et l'ADN a été déterminé avec un fluoromètre Qubit 3.0 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Les séquençage a été réalisé par une firme externe. Les données brutes ont été analysées chez Sciensano dans le service des Pathogènes alimentaires à l'aide la de pipeline STEC, développée par le service TAG (Transversal activities in Applied Genomics) de Sciensano et accessible sur Galaxy (<https://galaxy-tag.sciensano.be/>). Les lectures brutes de séquençage MiSeq ont été coupées à l'aide de Trimmomatic (v0.38) avec l'option "SLIDINGWIN-DOW: 4:20" (Bolger *et al.* 2014). Les bases de début et de fin d'une lecture ont été supprimées lorsque le Phred est tombé en dessous d'un score de 3. Les lectures MiSeq ajustées ont été utilisées dans un assemblage de novo généré avec SPAdes v3.15.4 (Bankevich *et al.* 2012).

La prédiction du gène codant pour la résistance aux antibiotiques acquise a été effectuée à l'aide de Resfinder v4 qui inclus aussi la prédiction des mutations chromosomiques connues associées aux résistances aux antibiotiques, en utilisant les paramètres par défaut (<https://cge.food.dtu.dk/services/ResFinder/>, Bortolaia *et al.* 2020).

L'analyse phylogénétique des isolats ESBL a été réalisée afin d'étudier le lien de parenté entre les différentes souches qui circulent parmi les animaux producteurs de denrées alimentaires et la viande fraîche de ces catégories d'animaux. L'analyse est basée sur le cgMLST, qui consiste en un ensemble fixe de gènes conservés au niveau du génome (core genome). Les schéma cgMLST sont spécifiques à une espèce bactérienne. Chez *E. coli*, le schéma cgMLST STEC a été utilisé (3152 loci). Le seuil de distance d'allèle est prédéfini pour détecter des clusters.

Les arbres ont été créés à l'aide de R version 4.2.0 (2022, <https://www.R-project.org/>). Toutes les dissemblances par paires (distances) entre les résultats du cgMLST ont été calculées à l'aide d'une généralisation de la formule de Gower (1971) à l'aide du package cluster (Maechler *et al.* 2022) et ont été visualisées à l'aide du package ggtree (Yu *et al.* 2017).

2.8.2. NGS des *Staphylococcus aureus* résistants à la méthicilline

En 2021, un total de 44 MRSA ont été analysées par NGS afin de déterminer la diversité génétique de cette collection. L'ADN génomique a été extrait selon le protocole décrit dans la SOP/BAC/ANA/18. Les données brutes ont été analysées au sein du service de Bactériologie Vétérinaire de Sciensano via l'utilisation de la pipeline *Staphylococcus* v0.1, développée par le service TAG (Transversal activities in Applied Genomics) de Sciensano et accessible sur Galaxy (<https://galaxy-tag.sciensano.be/>). L'utilisation de la pipeline *Staphylococcus* inclut la découpe des extrémités des fragments bruts (Trimmomatic v0.38), l'assemblage (SPAdes v3.13.0), le typage MLST, le typage *spa*, le typage de la cassette SCCmec, la détection des gènes de résistance, la détection des mutations (PointFinder) et la détection des gènes de virulence (VirulenceFinder). L'outil « cgMLST scheme » publié sur

PubMLST.org a été utilisé pour investiguer la clonalité des isolats. La détection des gènes de résistance aux antimicrobiens a été réalisée comme décrit par Bogaerts *et al.* (2021) et est basée sur l'utilisation de 2 bases de données: la base de données ResFinder (Novembre 2021) et la base de données NCBI AMRFinderPlus (Janvier 2021). Les mutations dans le gène *folP* n'étant pas encore présentes dans l'outil PointFinder, elles ont été recherchées dans les souches phénotypiquement résistantes au sulfaméthoxazole par BLAST en utilisant comme séquence de référence le gène *folP* de la souche ATCC 25923 (numéro d'accèsion Z84573). Afin de déterminer si des souches caractérisées par un même ST étaient phylogénétiquement proches, des comparaisons de leurs profils core genome MLST (cgMLST) ont été réalisées via l'outil MLST Phylogeny v0.1.

2.8.3. NGS des *Enterococcus faecalis* et *Enterococcus faecium*

En 2021, un total de 36 entérocoques ont été analysées par NGS. L'ADN génomique a été extrait selon le protocole décrit dans la SOP/BAC/ANA/18. Les données brutes ont été analysées au sein du service de Bactériologie Vétérinaire de Sciensano via l'utilisation de la pipeline *Enterococcus* v0.1, développée par le service TAG (Transversal activities in Applied Genomics) de Sciensano et accessible sur Galaxy (<https://galaxy-tag.sciensano.be/>). L'utilisation de la pipeline *Enterococcus* inclut la découpe des extrémités des fragments bruts (Trimmomatic v0.38), l'assemblage (SPAdes v3.13.0), le typage MLST, la détection des gènes de résistance, la détection des mutations (PointFinder) et la détection des gènes de virulence (VirulenceFinder), selon l'espèce bactérienne sélectionnée (*Enterococcus faecalis* ou *Enterococcus faecium*). La détection des gènes de résistance aux antimicrobiens a été réalisée comme décrit par Bogaerts *et al.* (2021) et basée sur l'utilisation de 2 bases de données: la base de données ResFinder (Novembre 2021) et la base de données NCBI AMRFinderPlus (Janvier 2021). Afin de déterminer si des souches caractérisées par un même ST étaient phylogénétiquement proches, des comparaisons de leurs profils cgMLST ont été réalisées via l'outil MLST Phylogeny v0.1.

3. Résultats et discussion

Les résultats de la surveillance relative à la résistance aux antimicrobiens en 2021 des bactéries suivantes : *Salmonella* spp., *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli*, *Escherichia coli* (*E. coli*) commensales indicatrices et BLSE, *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline (MRSA), *Enterococcus faecalis* et *Enterococcus faecium* commensales indicatrices sont présentés ci-après : tout d'abord la surveillance dans les denrées alimentaires, ensuite la surveillance dans les populations d'animaux producteurs d'aliments (production primaire).

3.1. SURVEILLANCE ANTIMICROBIENNE CHEZ LES BACTÉRIES ZONOTIQUES ET COMMENSALES DANS LES DENREES ALIMENTAIRES

Un tableau récapitulatif (Tableau 11) montre le nombre d'isolats analysés pour la sensibilité aux antimicrobiens isolés dans les denrées alimentaires.

Tableau 11. Nombre d'isolats analysés pour leur résistance aux antimicrobiens par programme en 2021 (denrées alimentaires).

Programme	Nombre d'isolats analysés pour la CMI
<i>Salmonella</i> FOOD	
MIC 1 ^{er} panel	50
MIC 2 ^e panel	1
<i>Salmonella</i> FEED	
MIC 1 ^{er} panel	28

MIC 2 ^e panel	0
<i>E. coli</i> BLSE viande fraîche de boeuf (marché)	
MIC 1 ^{er} panel	10
MIC 2 ^e panel	10
<i>E. coli</i> BLSE viande fraîche de porc (marché)	
MIC 1 ^{er} panel	6
MIC 2 ^e panel	6
<i>E. coli</i> BLSE viande fraîche de dinde (marché)	
MIC 1 ^{er} panel	33
MIC 2 ^e panel	33
<i>E. coli</i> BLSE légumes (marché)	
MIC 1 ^{er} panel	4
MIC 2 ^e panel	4
<i>E. coli</i> BLSE viande fraîche de volaille (marché)	
MIC 1 ^{er} panel	167
MIC 2 ^e panel	167
<i>E. coli</i> BLSE lait de vache (exploitation)	
MIC 1 ^{er} panel	25
MIC 2 ^e panel	25
<i>Campylobacter</i> FOOD	
MIC <i>C. jejuni</i>	45
MIC <i>C. coli</i>	23

3.1.1. Résistance antimicrobienne des *Campylobacter* spp.

En 2021, le LNR a reçu 78 isolats de *Campylobacter* spp. présumés provenant de la viande de volaille. L'identification de l'espèce a été effectuée par MALDI-TOF et les résultats sont illustrés dans le tableau 12.

Tableau 12. Nombre d'isolats de *Campylobacter* spp. identifiés par MALDI-TOF en 2021.

Espèce	Nombre
<i>Campylobacter coli</i>	23
<i>Campylobacter jejuni</i>	48
<i>Campylobacter lari</i>	0
<i>Campylobacter</i> n'ayant pas poussé	7
Total	78

La concentration minimale inhibitrice a été déterminée sur 45 *Campylobacter jejuni* (Figure 1) et 23 *Campylobacter coli* (Figure 3) selon la méthode décrite dans la décision d'exécution 2020/1729 (Official Journal of the European Union 19.11.2020).

L'interprétation des résultats a été effectuée selon les seuils d'interprétation publiés dans la décision européenne 2020/1729 (Annexe Partie A, Tableau 3).

Le tableau 13 liste le nombre d'isolats de *Campylobacter jejuni* et *Campylobacter coli* et leurs matrices d'origine.

Tableau 13. Nombre d'isolats et matrices d'origine de *Campylobacter jejuni* et *Campylobacter coli* testés pour leur sensibilité aux antimicrobiens en 2021.

FT	Description	Nombre	
		<i>C. jejuni</i>	<i>C. coli</i>
TRA 100	Viandes découpées de volaille	35	16
DIS 801	Produits à base de viande	0	1
DIS 815	Préparations de viande	0	1
DIS 819	Volailles entières	6	3
DIS 821	Viandes de découpes de volaille	4	2

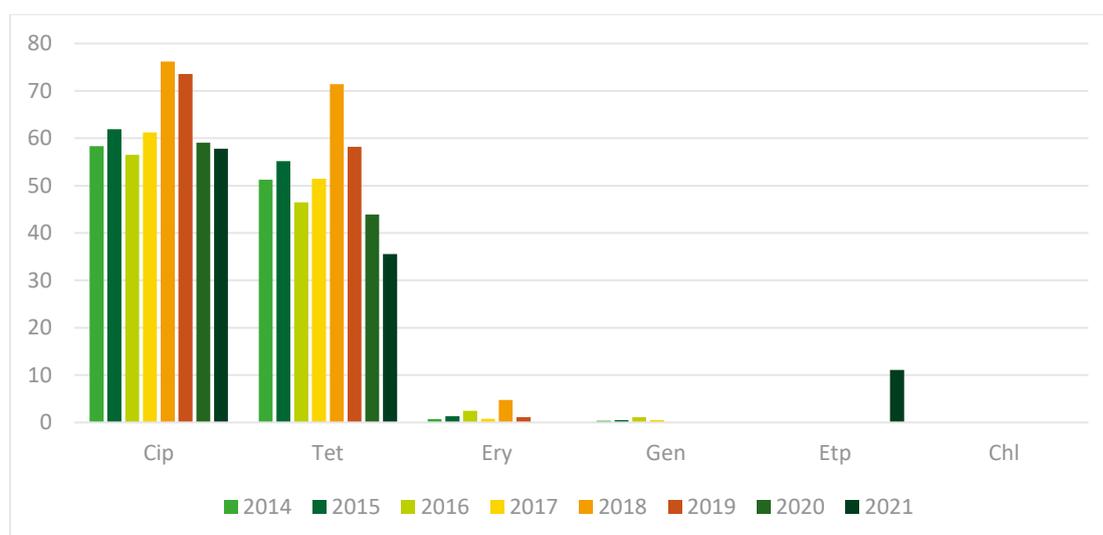


Figure 1. Evolution de la résistance chez *C. jejuni* isolés à partir de la viande de volaille (2014-2021).

Après une forte augmentation de 2017 à 2018, en 2021, les taux de résistance à la ciprofloxacine et à la tétracycline des *C. jejuni* continuent leur diminution depuis 2019, ce qui confirme la tendance à la baisse observée.

Une diminution du nombre d'isolats sensibles à tous les antibiotiques testés a été observée en 2021 (36%) par rapport à 2020 (38%), cette diminution peut être expliquée en partie par le fait que certains antibiotiques testés sont différents des années précédentes. A noter également que le taux d'isolats sensibles à tous les antibiotiques est plus élevé en 2021 par rapport aux années antérieures à 2020. Le pourcentage d'isolats résistant à au moins 3 familles d'antibiotiques est de 4.4% en 2021, ce qui représente une nette diminution comparé aux années précédentes (12.1% en 2020 ; 16.5% en 2019), mais reste plus élevé qu'entre 2014 et 2017 (Figure 2). A nouveau, il faut tenir compte de la différence entre les plaques EUCAMP2 et EUCAMP3 et donc des antibiotiques différents testés par rapport aux années précédentes. Notamment deux antibiotiques moins relevant au niveau de la surveillance épidémiologique et l'usage en santé humaine, tel que l'acide nalidixique (quinolones) ainsi que la streptomycine (aminoglycoside) ont été supprimés du panel. Par contre, l'ertapénème a été ajouté à la surveillance puisque des résistances à cet antibiotique de dernier choix ont déjà rapporté dans la littérature (ref). On remarque par exemple une résistance de 11.11% à l'ertapénème chez *C. jejuni* en 2021. Cet antibiotique n'était pas testé précédemment chez *Campylobacter* spp.

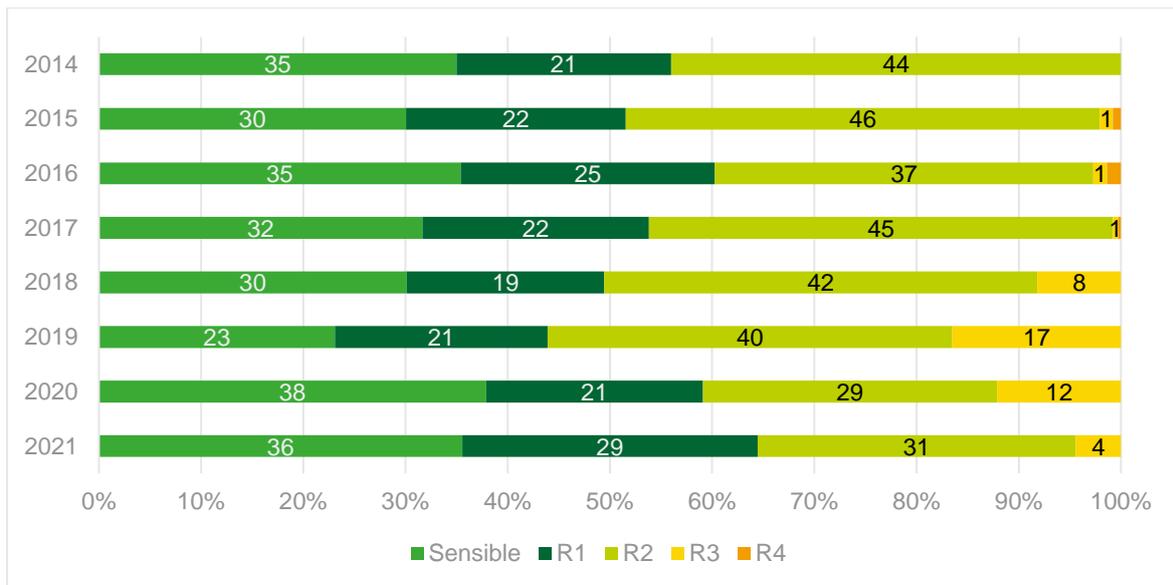


Figure 2. Pourcentage de sensibilité et de résistance à une ou plusieurs familles d'antimicrobiens chez *C. jejuni* (2014-2021).

Pour les *Campylobacter coli* (n=23) isolés de la viande de volaille en 2021, on constate des résistances plus élevées à tous les antibiotiques testés que chez *Campylobacter jejuni* (n=45), à l'exception de la résistance à la ciprofloxacine qui est comparable dans les deux espèces (Figure 3). On constate une grande différence entre les deux espèces pour les résistances à la tétracycline (69.57% - 35.56%) et à l'ertapénème (69.57%-11.11%). A noter également que tous les isolats de *C.coli* résistants à la tétracycline étaient aussi résistants à l'ertapénème. On remarque aussi une faible résistance (8.7%) à l'érythromycine. Aucun isolat n'était résistant à la gentamicine ou au chloramphénicol, le second antibiotique nouvellement testé en 2021 pour *Campylobacter* spp.

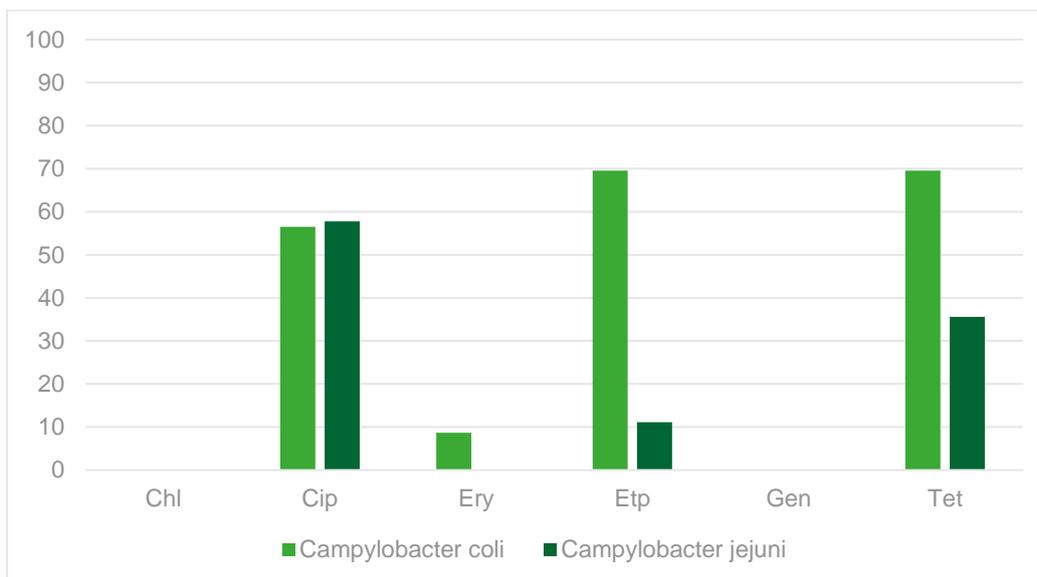


Figure 3. Taux de résistance aux antimicrobiens chez *Campylobacter jejuni* (n=45) et *Campylobacter coli* (n=23) isolés de la viande de volaille en 2021.

3.1.2. Résistance antimicrobienne des *Salmonella*

Cette section comprend les analyses des programmes Salmonella Food et Feed.

Les plaques EUVSEC3 de Sensititre (Section 2, Tableau 3) ont été utilisées pour déterminer les CMI des souches en 2021. Les CMI ont été déterminées sur tous les sérovars de *Salmonella* spp.

Dans le panel EUVSEC3, un nouveau antibiotique, l'Amikacin a été ajouté. Il s'agit d'un aminoglycosides les plus utilisés dans les hôpitaux pour le traitement des infections à Gram-.

3.1.2.1. Salmonella FOOD

Dans le cadre du programme Salmonella Food, 50 isolats ont été testés en 2021 pour leur sensibilité aux antimicrobiens.

La Figure 4 montre le pourcentage d'isolats par sérovar dans les matrices alimentaires. Le sérovar Infantis est le plus prédominant (56%) suivi de Paratyphi B Var. L(+) Tartrate+ (22%).

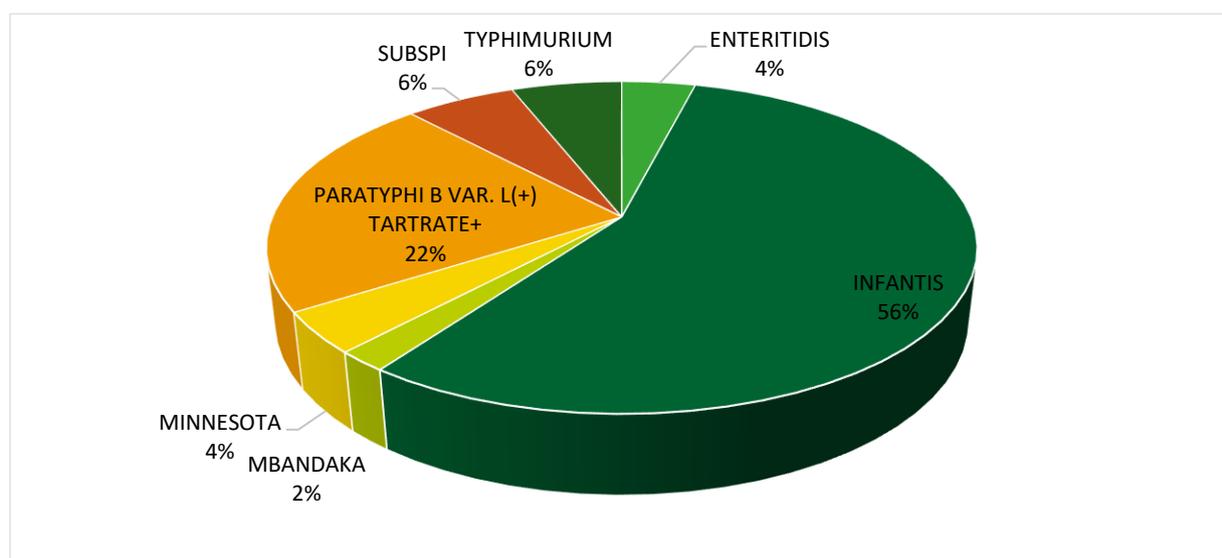


Figure 4. Pourcentage d'isolats de *Salmonella* par sérovar dans les matrices alimentaires en 2021.

Le tableau 14 reprend le nombre d'isolats de *Salmonella* retrouvé dans les différentes matrices alimentaires en fonction du sérovar.

Tableau 14. Nombre d'isolats de *Salmonella* par matrice alimentaire et par sérovar en 2021.

Sérovar	n
ENTERITIDIS	2
Carcasses de poule	2
INFANTIS	28
Produits à base de viande	2
Préparations de viande	3
Volailles entières	5
Viandes de découpes de volaille	4
Carcasses de poule	1
Viandes découpées de volaille	13
MBANDAKA	1
Fromage	1
MINNESOTA	2

Volailles entières	1
Viandes découpées de volaille	1
PARATYPHI B VAR. L(+) TARTRATE+	11
Produits à base de viande	2
Préparations de viande	1
Viandes de découpes de volaille	3
Viandes découpées de volaille	5
SUBSPI	3
Volailles entières	1
Viandes découpées de volaille	2
TYPHIMURIUM	3
Mollusque bivalve (huître)	1
Préparations de viande	2
Total	50

La Figure 5 montre le taux de résistance aux antimicrobiens de toutes les *Salmonella* spp. analysées en 2021 dans le cadre du programme Salmonella Food.

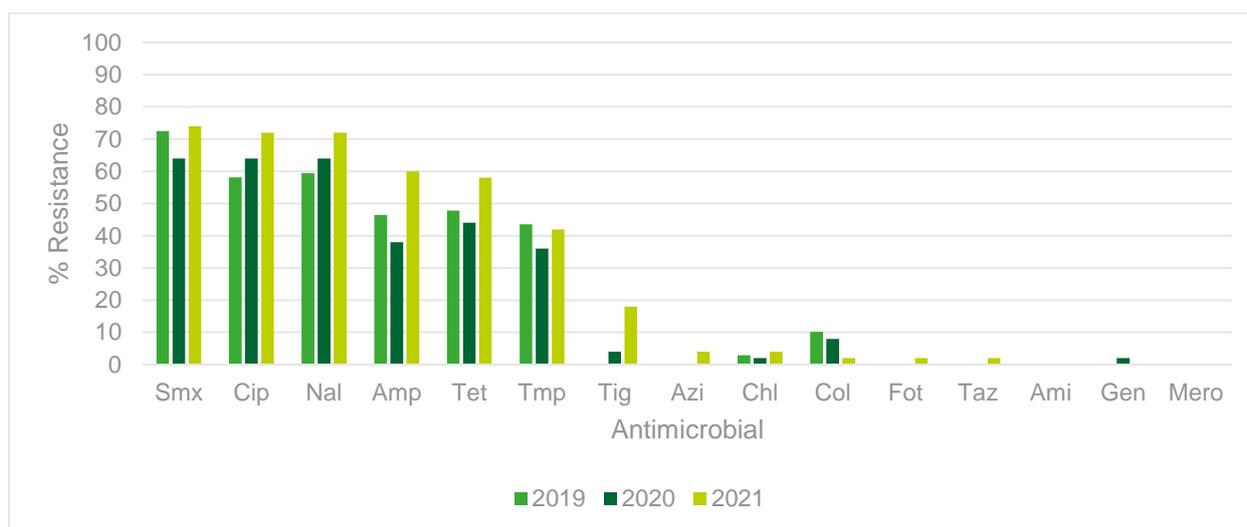


Figure 5. Evolution des taux de résistance aux antimicrobiens des *Salmonella* spp. isolées à partir de denrées alimentaires en 2021 (n=50).

De manière générale, les taux de résistance ont augmenté en 2021 par rapport à 2020 pour tous les antibiotiques à l'exception de la colistine et la gentamicine. On constate une augmentation progressive des taux de résistance aux (fluoro)quinolones depuis 2019.

Un isolat appartenant au sérovar Enteritidis était résistant à la colistine et un isolat du sérovar Paratyphi B Var. L(+) Tartrate+ était résistant aux céphalosporines de 3^{ème} génération (céfotaxime/ceftazidime) le deuxième panel d'antibiotiques analysé pour cet isolat a confirmé un phénotype BLSE. Aucun isolat n'était résistant à l'amikacine, à la gentamicine ou au méropénème.

3.1.2.2. Salmonella Feed

Les *Salmonella* spp. isolées à partir d'aliments pour animaux ont été soumises au test de sensibilité aux antimicrobiens.

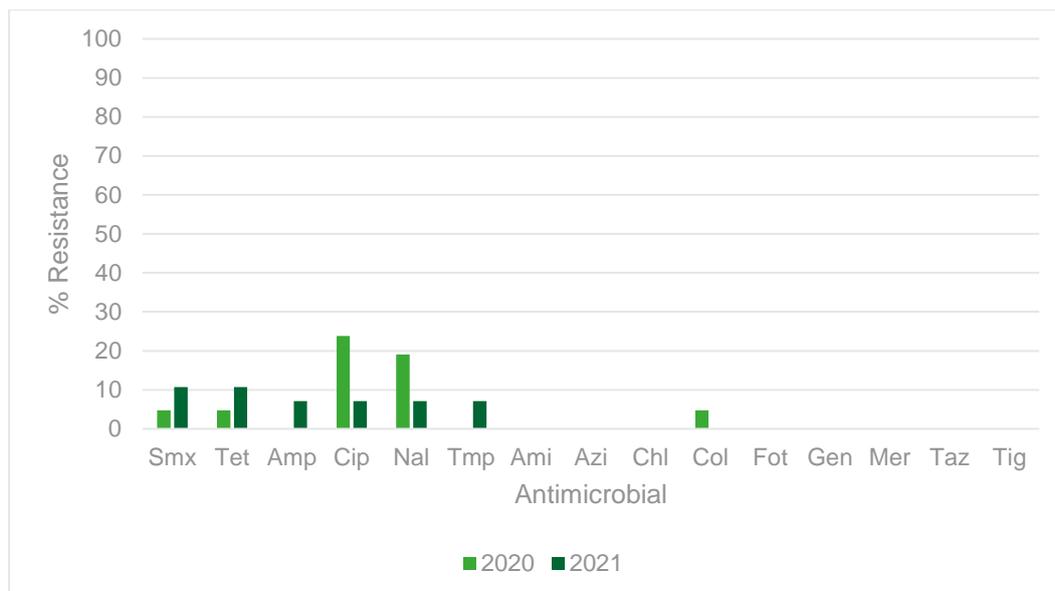


Figure 6. Taux de résistance aux antimicrobiens des *Salmonella* spp. isolées à partir de feed en 2021 (n=28).

28 *Salmonella* spp. isolées à partir d'aliments pour animaux ont été soumises au test de sensibilité aux antimicrobiens (Figure 6). Le taux de sensibilité à tous les antibiotiques testés est de 85.71%, quatre isolats ont montré une résistance à au moins un antibiotique. On peut constater que les taux de résistance aux (fluoro)quinolones ont diminué en 2021 tandis que les taux de résistance au sulfaméthoxazole et à la tétracycline ont augmenté.

3.1.3. *E. coli* productrices de β -lactamases

3.1.3.1. Détection d'*E. coli* productrices de BLSE, d'AmpC ou de carbapénémases dans des matrices alimentaires d'origine animale

La détection de *E. coli* productrices de β -lactamases a été effectuée selon la méthode décrite dans la décision d'exécution de la Commission européenne 2020/1729 sur des échantillons de viande fraîche de poulet de chair (DIS 819, DIS 821), de viande fraîche de porc (DIS 809), de viande fraîche de bœuf (DIS 809), de viande fraîche de dinde (DIS 809), de lait cru (PRI 013) et de légumes (DIS 841).

De plus, depuis 2014, nous effectuons une surveillance spécifique : tous les isolats, présentant une résistance à une céphalosporine de troisième génération et considérés comme *E. coli* BLSE présumés, sont analysés avec le premier et le deuxième panel d'agents antimicrobiens, conformément à la section 2, tableaux 5 et 6.

Au vu de la faible prévalence d'*E. coli* BLSE dans les matrices DIS 809 et DIS 841 et donc du faible nombre d'isolats analysés pour ces matrices, les intervalles de confiance ne sont pas présentés car ils ne sont pas pertinents.

3.1.3.2. Surveillance spécifique des bactéries *E. coli* productrices de BLSE, d'AmpC ou de carbapénémases dans les viandes de poulets de chair

En 2021, dans le cadre de la recherche spécifique des bactéries *E. coli* productrices de BLSE, d'AmpC ou de carbapénémases présentes dans les viandes de poulets de chair, une méthode qualitative (détection/non-détection dans 25g) a été effectuée. Le milieu utilisé est MacConkey associé avec du céfotaxime (CTX, 1 mg/L) prêt-à-l'emploi (Biorad) pour la détection d'*E. coli* BLSE et AmpC et le milieu CarbaSmart (BioMérieux) pour la détection de carbapénémases. Parmi 100 échantillons de volailles entières (DIS 819) et 200 échantillons de viandes de découpes de volaille (DIS 821), 57 et 111 étaient respectivement positifs pour la détection d'*E. coli* BLSE. Ceci signifie que le taux de BLSE dans la

volaille est de 56%. Parmi ces 168 isolats, 167 ont été testés pour déterminer leur résistance aux antimicrobiens (Figure 7 et Figure 8).

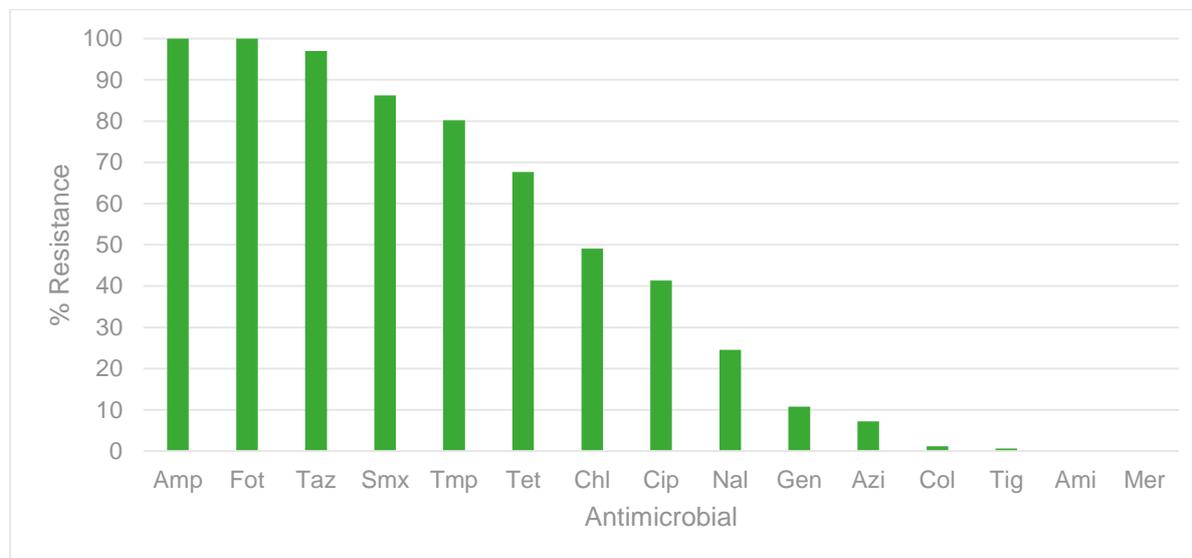


Figure 7. Pourcentage de résistance au premier panel d'agents antimicrobiens chez *E. coli* isolées à partir de la viande de poulet de chair (DIS 819 et DIS 821) en 2021 (n=167).

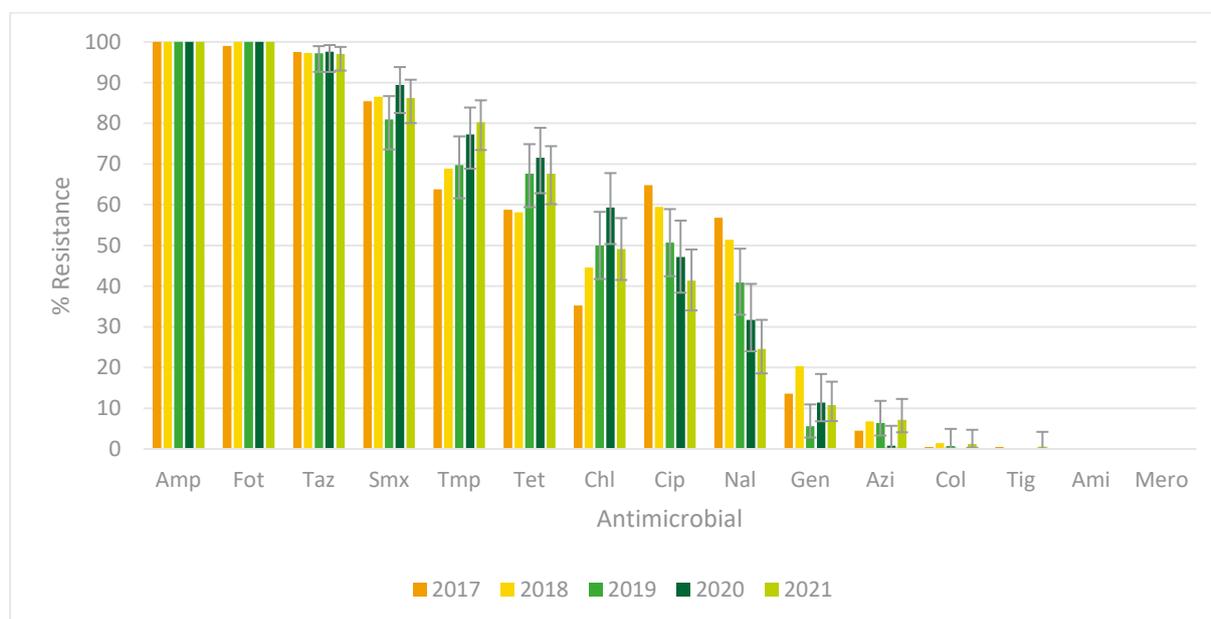


Figure 8. Evolution de la résistance chez les *E. coli* isolées à partir de la viande de poulet de chair entre 2017-2021.

Le taux de résistance, comme attendu, est extrêmement élevé (>70%) pour l'ampicilline et les céphalosporines de 3^{ème} génération mais aussi pour le sulfaméthoxazole et le triméthoprime. Il est très élevé (>50%-70%) pour, la tétracycline et élevé (>20-50%) pour les (fluoro)quinolones et le chloramphénicol. A noter, la diminution progressive du taux de résistance aux (fluoro)quinolones qui persiste en 2021 comme déjà remarqué en 2018-2020 (Figure 8). Une diminution de la résistance (~23-31%) est constatée en 2021 par rapport à 2017. Le taux de résistance à la gentamicine est modéré, celui à l'azithromycine est faible et a augmenté en 2021 par rapport à 2020, il est maintenant similaire

aux taux obtenus en 2018-2019. Deux isolats (1.2%) étaient résistants à la colistine et un isolat (0.6%) à la tigécycline. Le taux de résistance à l'amikacine et au méropénème est nul.

Tout isolat d'*E. coli* affichant une résistance à la céfotaxime, à la ceftazidime ou au méropénème devait être soumis à l'analyse du deuxième panel (EUVSEC2) et interprété selon le tableau 6. Le deuxième panel permet une classification précise des isolats d'*E. coli* présentant une résistance aux céphalosporines de troisième génération.

En ce qui concerne la caractérisation précise d'isolats résistants aux céphalosporines de troisième génération (Figure 9), la grande majorité (95%) d'isolats résistants aux β -lactames présentent un profil de résistance du type BLSE, 2% des isolats présentaient un profil combiné BLSE + AmpC et 2% présentent un profil de résistance du type AmpC. Un isolat a été classé comme BLSE + AmpC + carbapénémase car il était résistant à l'imipénème. Il n'était cependant pas résistant au méropénème. Cet isolat n'est donc pas repris comme producteur de carbapénémases selon les critères de l'EFSA (autre phénotype).

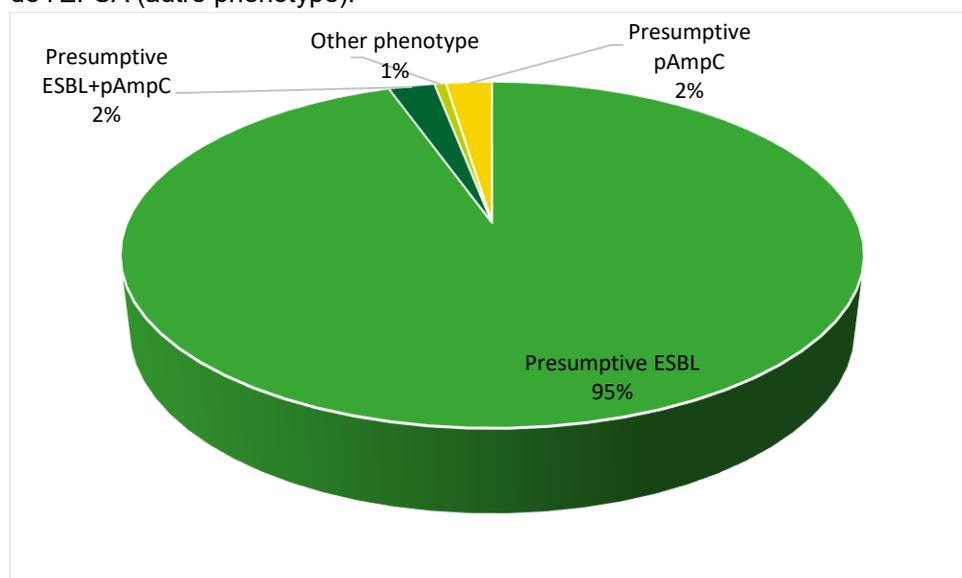


Figure 9. Pourcentage des phénotypes obtenus grâce au deuxième panel d'antimicrobiens chez *E. coli* BLSE isolées à partir de la viande de volaille (DIS 819 et DIS 821) en 2021.

3.1.3.3. Surveillance spécifique des bactéries *E. coli* productrices de BLSE, d'AmpC ou de carbapénémases dans le lait cru

Dans le cadre de la recherche spécifique des bactéries *E. coli* productrices de BLSE, d'AmpC ou de carbapénémases dans le lait cru de vache (PRI 013), une méthode qualitative (détection/non-détection dans 25ml) a été effectuée. Le milieu utilisé est MacConkey associé avec du céfotaxime (CTX, 1 mg/L) prêt-à-l'emploi (Biorad) pour la détection d'*E. coli* BLSE et AmpC et le milieu CarbaSmart (BioMérieux) pour la détection de carbapénémases.

En 2021, 161 échantillons de lait (25ml) ont été testés pour la détermination d'*E. coli* BLSE et AmpC, et 28 ont été testés positifs (17,39%). Un isolat présumé producteur de carbapénémase lors de l'isolement a été testé et le profil carbapénémase n'a pas été confirmé. La CMI a été déterminée pour 25 de ces isolats d'*E. coli* isolés à partir du milieu McConkey+1 mg/L céfotaxime.

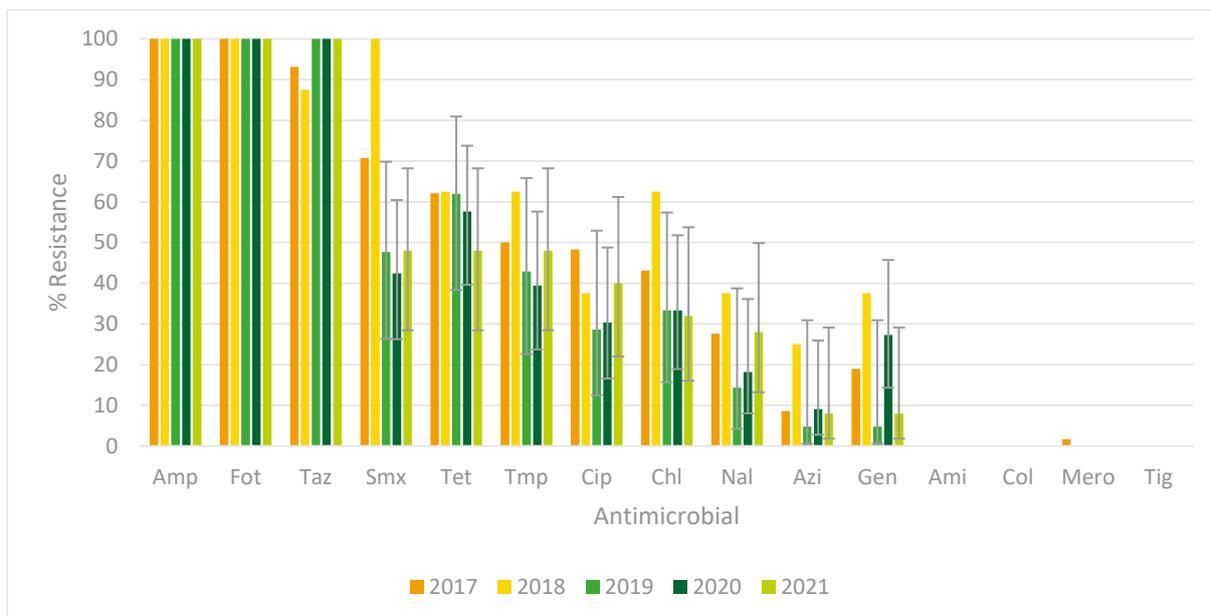


Figure 10. Pourcentage de résistance au premier panel d’agents antimicrobiens chez *E. coli* BLSE isolées à partir du lait cru de vache (2017-2021).

En 2021, le taux de résistance à la tétracycline continue une diminution progressive depuis 2019 tandis que les taux de résistance aux (fluoro)quinolones continuent d’augmenter en 2021 depuis 2019. Après une forte augmentation en 2020, le taux de résistance à la gentamicine est revenu à un niveau proche de celui de 2019. En ce qui concerne la caractérisation précise d’isolats résistants aux céphalosporines de 3^{ème} génération, 76% des isolats présentaient un profil β -lactames du type BLSE et 20% du type AmpC. Un isolat était résistant à l’impénème et a donc été classé selon le profil AmpC + carbapénémase bien qu’il était sensible au méropénème (Figure 11). Cet isolat n’est donc pas repris comme producteur de carbapénémases selon les critères de l’EFSA (autre phénotype).

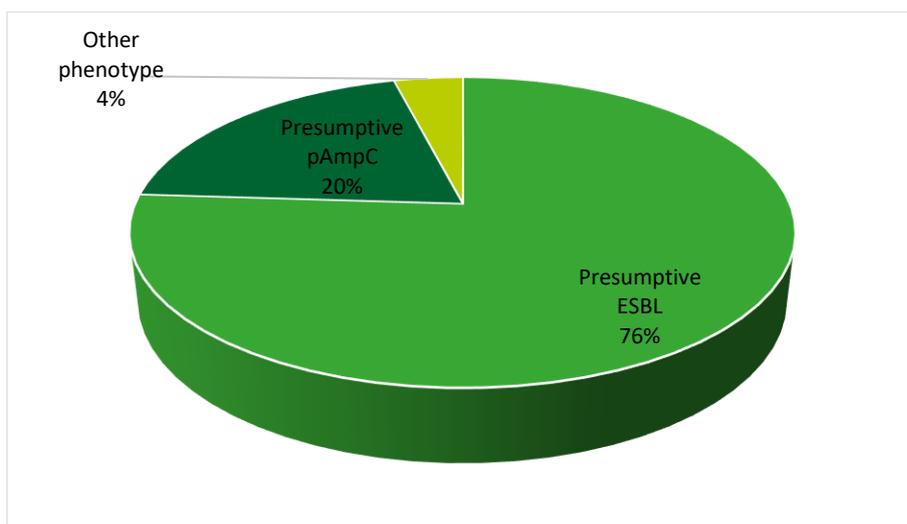


Figure 11. Pourcentage des phénotypes obtenus grâce au deuxième panel d’antimicrobiens chez *E. coli* BLSE isolées à partir du lait cru de vache en 2021 (n=25).

3.1.3.4. Surveillance spécifique des bactéries *E. coli* productrices de BLSE, d'AmpC ou de carbapénémases dans les légumes

En 2021, dans le cadre de la recherche spécifique des bactéries *E. coli* productrices de BLSE, d'AmpC ou de carbapénémases dans les fruits et légumes (DIS 841), une méthode qualitative (détection/non-détection dans 25 ml) a été effectuée. Le milieu utilisé est MacConkey associé avec du céfotaxime (CTX, 1 mg/L) prêt-à-l'emploi (Biorad) pour la détection d'*E. coli* BLSE et AmpC et le milieu CarbaSmart (BioMérieux) pour la détection de carbapénémases.

Au total, 300 échantillons de légumes chicons, cresson, endives, épinards, germes de légumes, laitues et tomates ont été testés pour la détermination d'*E. coli* BLSE et AmpC et 4 étaient positifs. 2 étaient isolés à partir d'épinards en provenance des Pays-Bas, les 2 autres isolats provenaient de Belgique et ont été isolés à partir de laitues et de germes de légumes. La CMI a été déterminée pour ces 4 isolats (Figure 12).

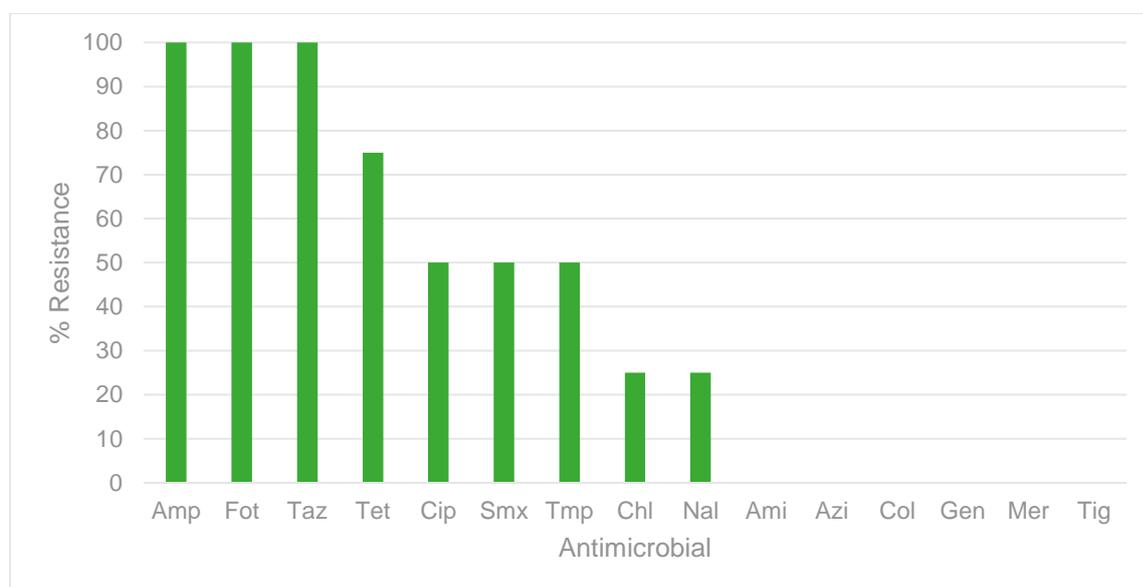


Figure 12. Pourcentage de résistance au premier panel d'agents antimicrobiens chez *E. coli* BLSE isolées à partir de légumes en 2021.

3.1.3.5. Surveillance spécifique des bactéries *E. coli* productrices de BLSE, d'AmpC ou de carbapénémases dans la viande de bœuf, de porc et de dinde

En 2021, dans le cadre de la recherche spécifique de bactéries *E. coli* productrices de BLSE, d'AmpC ou de carbapénémases dans les viandes de bœuf, de porc et de dinde une méthode qualitative (détection/non-détection dans 25g) a été effectuée. Le milieu utilisé est MacConkey associé avec du céfotaxime (CTX, 1 mg/L) prêt-à-l'emploi (Biorad) pour la détection d'*E. coli* BLSE et AmpC et le milieu CarbaSmart (BioMérieux) pour la détection de carbapénémases. Parmi les 300 échantillons de viande de bœuf (DIS 809 bœuf), 300 échantillons de viande de porc (DIS 809 porc) et 150 échantillons de viande de dinde (DIS 809 dinde), 10 (3.33%), 6 (2%) et 34 (22.67%) isolats ont respectivement été testés positifs pour *E. coli* BLSE.

Les pourcentages de résistance au premier panel d'antibiotiques sont affichés dans la Figure 13 pour la viande de bœuf et dans les Figure 14 et Figure 15 pour la viande de porc et de dinde.

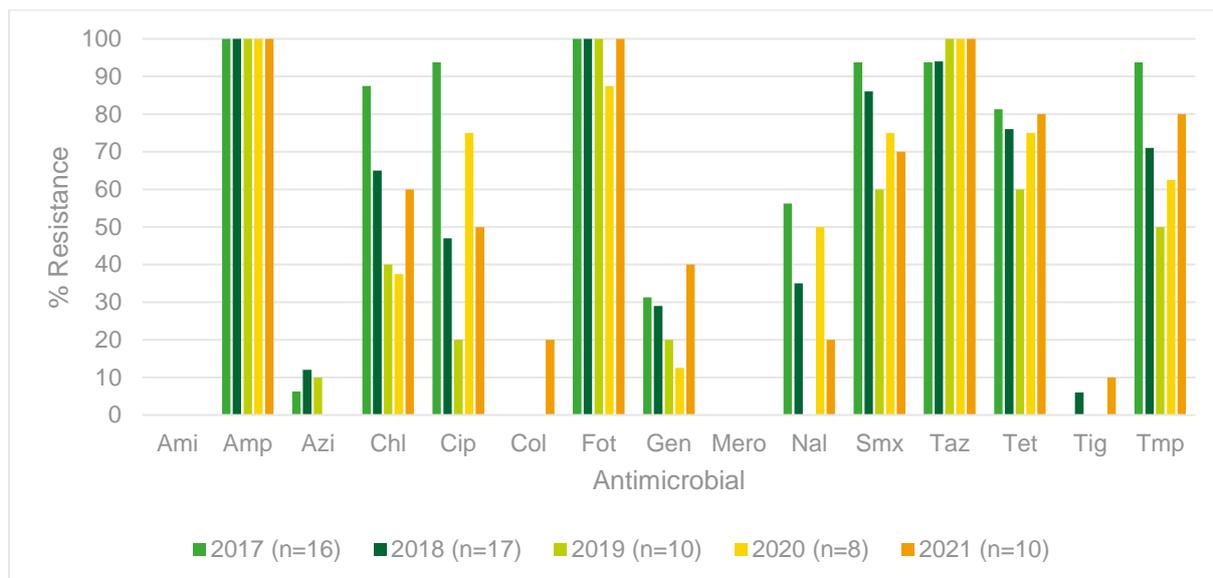


Figure 13. Evolution de la résistance chez les *E. coli* isolées à partir de la viande de bœuf entre 2017-2021.

En général, le taux de résistance aux antibiotiques testés, en dehors de la résistance attendue à l'ampicilline et les céphalosporines de 3^{ème} génération, a augmenté par rapport à 2020 à l'exception d'une forte diminution de la résistance à la ciprofloxacine et à l'acide nalidixique. Très remarquable : l'augmentation de la résistance à la gentamicine après une diminution progressive depuis 2018. 90% des isolats étaient multirésistants car un isolat était résistant à seulement 2 classes d'antibiotiques testées (profil AmpFotTaz). Tous les isolats présentaient un phénotype BLSE.

En ce qui concerne les *E. coli* BLSE isolés à partir de la viande de porc, le taux de résistance aux antibiotiques testés, en dehors de la résistance attendue à l'ampicilline et aux céphalosporines de 3^{ème} génération, poursuit en 2021 sa diminution depuis 2019 pour la ciprofloxacine tandis que la résistance à l'acide nalidixique a augmenté par rapport à 2020 bien qu'elle reste plus faible qu'en 2018-2019. La résistance au sulfaméthoxazole continue d'augmenter et la résistance à la tétracycline a également augmenté en 2021 après une diminution en 2020. Contrairement à 2020 cependant, aucun isolat résistant à l'azithromycine n'a été détecté. Aucune résistance à l'amikacine, la colistine, la gentamicine, le méropénème ou la tigécycline n'a été détectée (Figure 14). Le taux de multirésistance s'élève à 100%. 5 isolats (83.33%) avaient un phénotype BLSE tandis qu'un isolat (16.67%) avait un phénotype BLSE + AmpC.

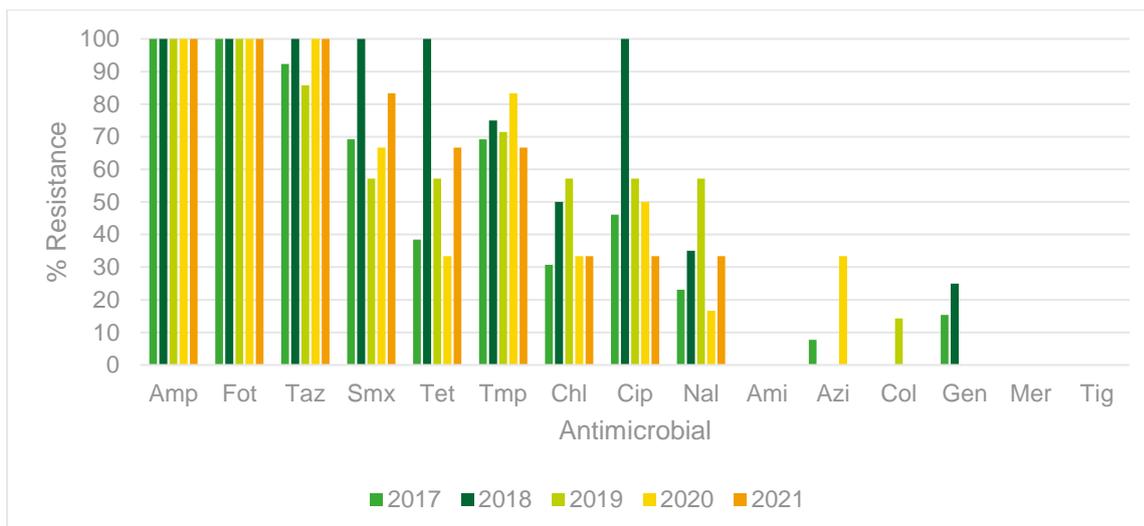


Figure 14. Evolution de la résistance chez les *E. coli* isolées à partir de la viande de porc entre 2017-2021.

En ce qui concerne les *E. coli* BLSE isolés à partir de la viande de dinde, le taux de résistance aux antibiotiques testés, en dehors de la résistance attendue à l'ampicilline et aux céphalosporines de 3^{ème} génération, était extrêmement élevé (>70%) pour la tétracycline et le sulfaméthoxazole, très élevé (>50-70%) pour la ciprofloxacine et le triméthoprime, élevé (>20-50%) pour l'acide nalidixique et le chloramphénicol, modéré (>10-20%) pour la colistine et faible (>1-10%) pour l'azithromycine, la gentamicine et la tigécycline. Aucune résistance à l'amikacine ou au méropénème n'a été détectée (Figure 15). Suite à l'analyse du deuxième panel d'antibiotiques, tous les isolats ont montré un phénotype BLSE.

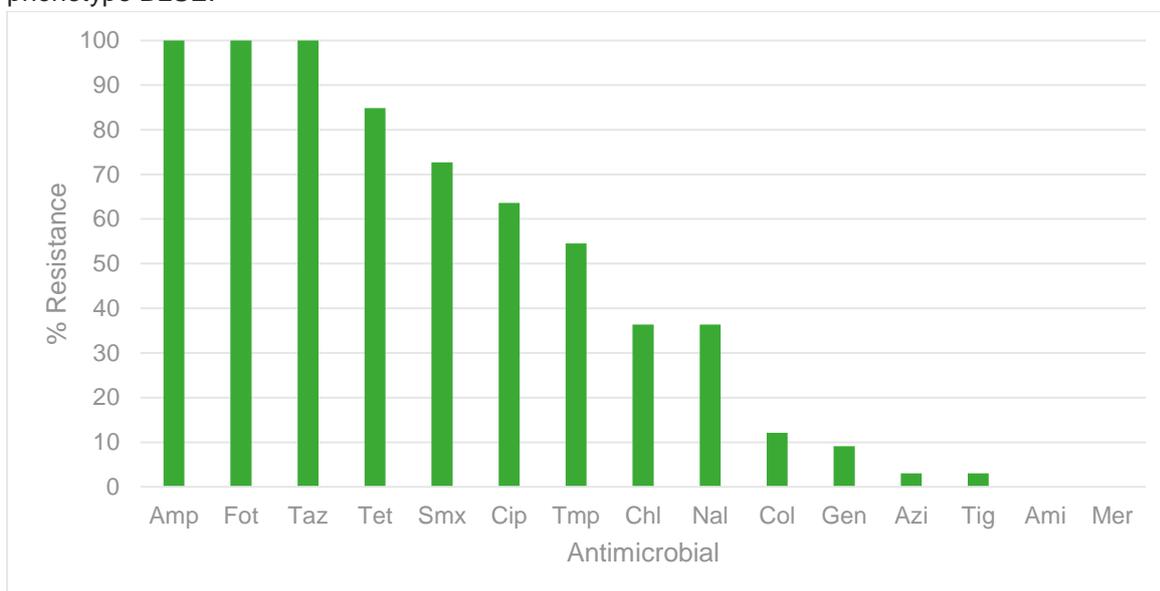


Figure 15. Taux de résistance chez les *E. coli* isolées à partir de la viande de dinde en 2021 (n=33).

3.2. SURVEILLANCE ANTIMICROBIENNE CHEZ LES BACTÉRIES ZONOTIQUES ET COMMENSALES ISOLÉES DES POPULATIONS D'ANIMAUX PRODUCTEURS D'ALIMENTS (PRODUCTION PRIMAIRE)

Dans cette section, les résultats de la surveillance antimicrobienne chez les bactéries zoonotiques et commensales isolées des populations d'animaux producteurs d'aliments (production primaire) sont présentés.

3.2.1. Surveillance de *Campylobacter coli* dans la matière fécale de porcs

Parmi les 294 échantillons de matière fécale de porcs prélevés à l'abattoir pour la détection de *Campylobacter* spp., 190 étaient positifs. La concentration minimale inhibitrice (CMI) a été déterminée pour 165 isolats de *Campylobacter coli* parmi ceux-ci (Figure 16).

On remarque une faible résistance (>1-10%) à l'ertapénème, l'un des deux antibiotiques nouvellement testé depuis 2021, ainsi qu'une résistance extrêmement élevée (>70%) à la tétracycline et une résistance élevée (>20-50%) à la ciprofloxacine. Le taux de résistance était également faible pour l'érythromycine et la gentamicine tandis qu'aucune résistance au chloramphénicol, le second antibiotique ajouté en 2021, n'a été détectée.

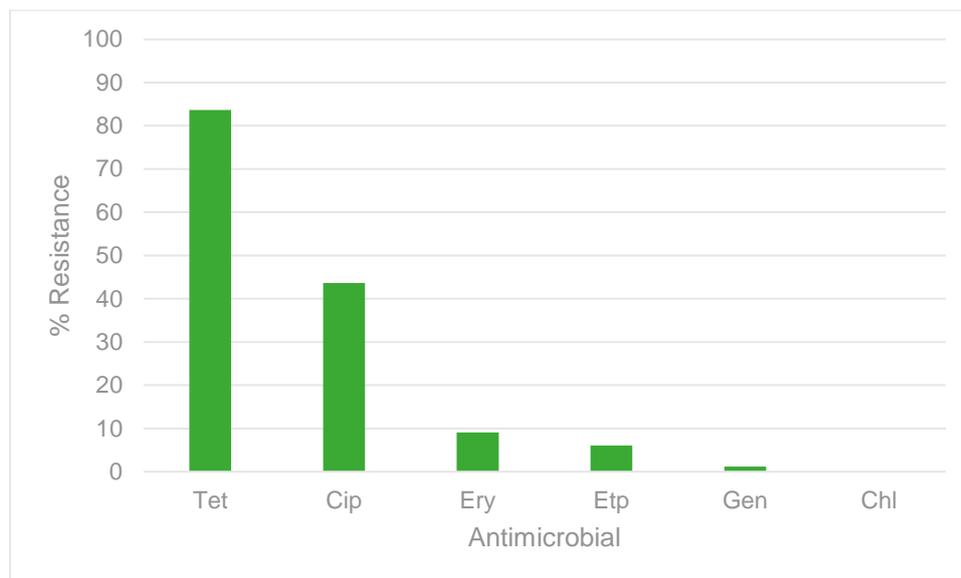


Figure 16. Pourcentage de résistance au panel d'agents antimicrobiens chez *Campylobacter coli* isolés de la matière fécale de porcs en 2021 (n=165).

3.2.2. Surveillance de *Campylobacter* spp. dans la matière fécale de veaux

Parmi les 301 échantillons de matière fécale de veaux prélevés pour la détection de *Campylobacter* spp., 227 étaient positifs. Ces 227 échantillons ont été analysés par MALDI-TOF pour la détermination de l'espèce et 74 étaient des *Campylobacter coli* et 153 des *Campylobacter jejuni*. La concentration minimale inhibitrice (CMI) a été déterminée pour 218 isolats parmi ceux-ci. 72 étaient des *C. coli* et 146 des *C. jejuni* (Figure 17 et Figure 18).

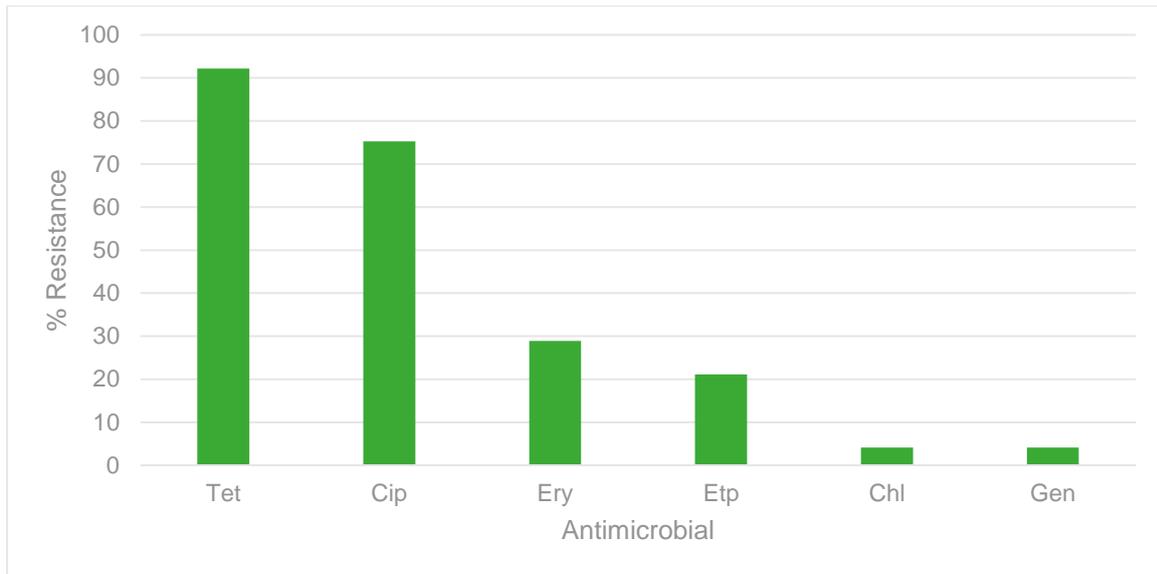


Figure 17. Pourcentage de résistance au panel d'agents antimicrobiens chez *Campylobacter* spp. isolés de la matière fécale de veaux en 2021 (n=218).

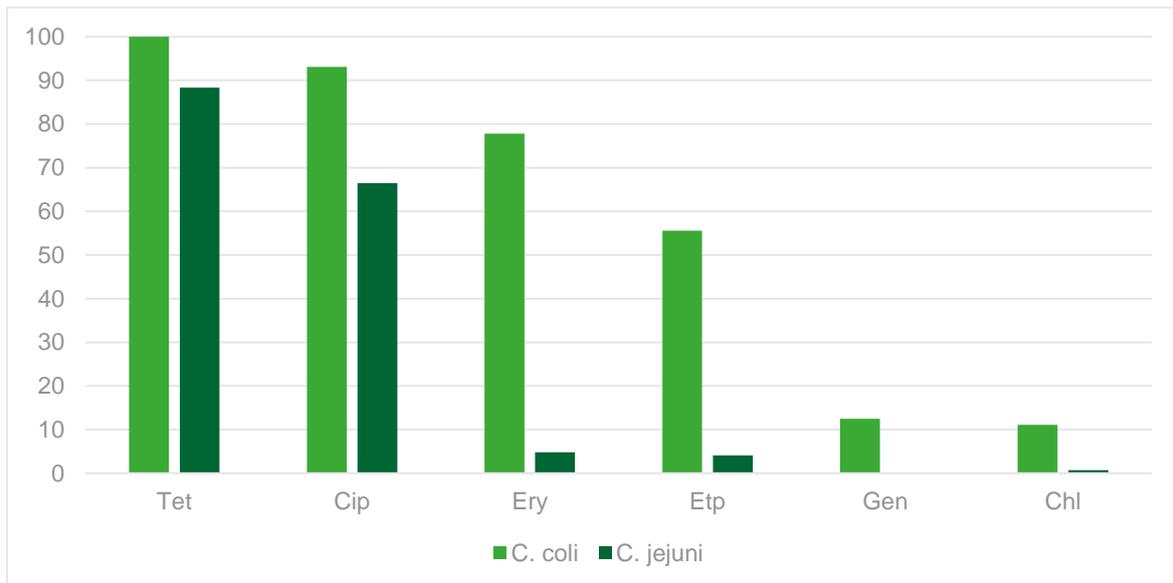


Figure 18. Comparaison des pourcentages de résistance au panel d'agents antimicrobiens chez *Campylobacter coli* (n=72) et *Campylobacter jejuni* (n=146) isolés de la matière fécale de veaux en 2021.

On constate, pour tous les antibiotiques, une résistance plus élevée chez *C. coli* que chez *C. jejuni*. Cette différence de taux de résistance est particulièrement marquée pour l'érythromycine (~73%) et l'ertapénème (~51%). Il est cependant intéressant de noter que, sur 40 isolats de *C.coli* résistants à l'ertapénème, 28 avaient une concentration minimale inhibitrice étant supérieure de seulement une dilution à la valeur seuil. Une sélection de souches ayant été soumises au séquençage a toutefois permis de confirmer cette résistance. Tous les isolats de *C. coli* analysés étaient résistants à la tétracycline. Aucun *C. jejuni* n'était résistants à la gentamicine tandis que les *C. coli* montraient une résistance modérée (12,5%) à cet antibiotique.

3.2.3. Surveillance de *Salmonella* spp. dans la matière fécale de porcs

Dans le cadre du programme de surveillance de *Salmonella* spp., 45 isolats ont été testés en 2021 pour leur sensibilité aux antimicrobiens.

La Figure 19 montre le pourcentage d'isolats par sérovar dans les matrices alimentaires. Le sérovar Monophasic Typhimurium est le plus prédominant (31%) suivi de Derby (24%) et Typhimurium (18%).

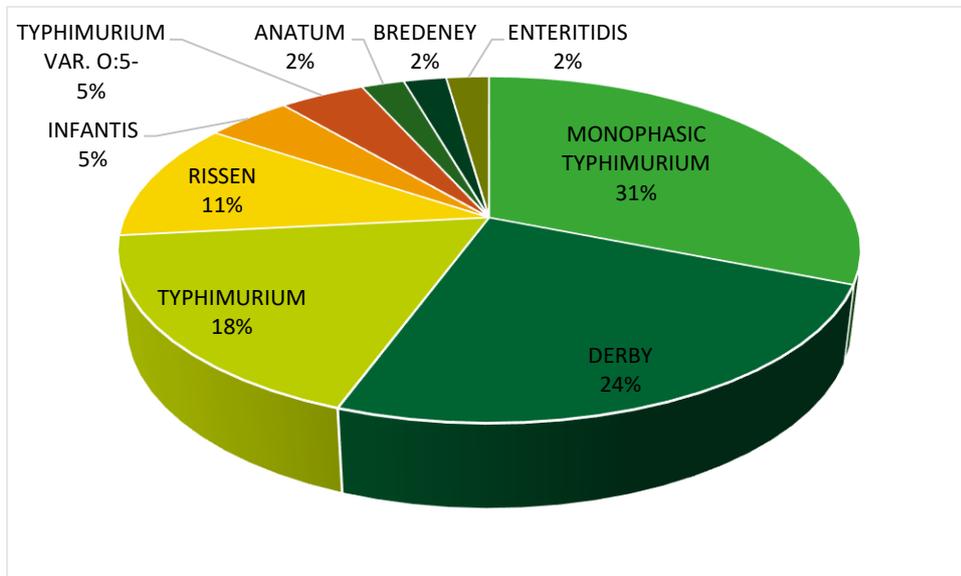


Figure 19. Pourcentage d'isolats de *Salmonella* par sérovar dans la matière fécale de porcs en 2021.

La Figure 20 montre le taux de résistance aux antimicrobiens de toutes les *Salmonella* spp. analysées en 2021 dans le cadre du programme de surveillance des *Salmonella* dans la matière fécale de porcs.

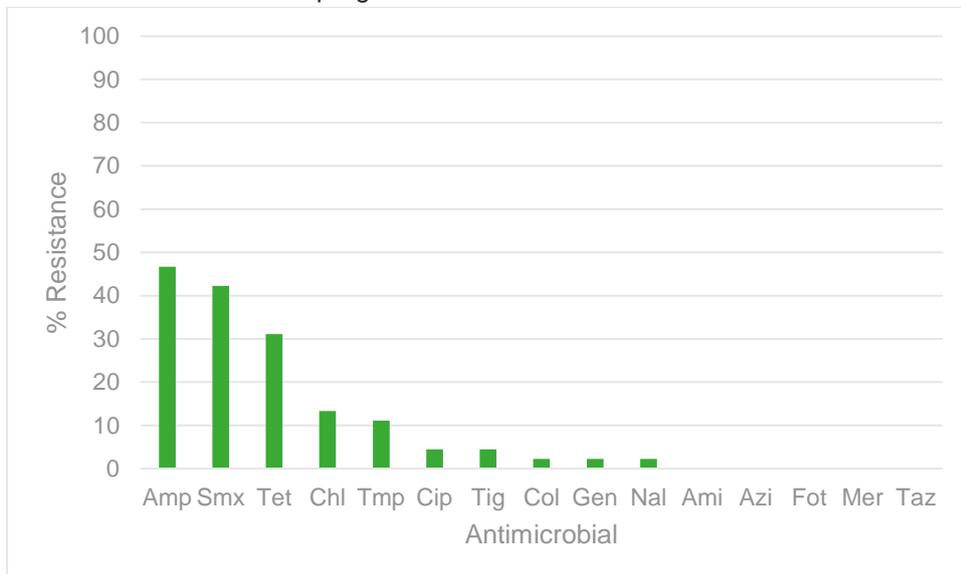


Figure 20 Taux de résistance aux antimicrobiens des *Salmonella* spp. isolées à partir de matière fécale de porcs en 2021 (n=45).

3.2.4. Surveillance de *Salmonella* spp. dans la matière fécale de veaux

Dans le cadre du programme de surveillance de *Salmonella* spp., 3 isolats ont été testés en 2021 pour leur sensibilité aux antimicrobiens. 2 isolats appartenaient au sérovar Monophasic Typhimurium et

étaient résistants au sulfaméthoxazole et à la tétracycline. Le 3^{ème} isolat appartenait au sérovar Dublin et était résistant à la colistine.

3.2.5. Surveillance d'*E. coli* commensales indicatrices et BLSE/AmpC/Carbapénémases.

Un tableau récapitulatif (Tableau 15) montre le nombre d'isolats d'*E. coli* commensales et BLSE/AmpC/Carbapénémases, isolés d'animaux producteurs d'aliments reçus et le nombre d'isolats analysés pour la sensibilité aux antimicrobiens. Les résultats de ces *E. coli* ainsi que des *Staphylococcus aureus* résistants à la méthicilline (MRSA), *Enterococcus faecalis* et *Enterococcus faecium* isolés en 2021 sont présentés ci-après.

Tableau 15. Nombre total d'isolats d'*E. coli* commensaux et BLSE/AmpC/Carbapénémases, isolés d'animaux producteurs d'aliments, analysés pour la sensibilité aux antimicrobiens en 2021.

Programme	Fiche technique	MIC rapportés
Poulets de chair - caeca	PRI 019 (Poulet de chair)	
<i>E. coli</i> commensaux		
MIC 1er panel		170
MIC 2ème panel		9
<i>E. coli</i> BLSE/AmpC/Carba		
MIC 1er panel		193
MIC 2ème panel		193
Poules reproductrices - faeces	PRI 515	
<i>E. coli</i> commensaux		
MIC 1er panel		174
MIC 2ème panel		0
Poules pondeuses - faeces	PRI 515	
<i>E. coli</i> commensaux		
MIC 1er panel		181
MIC 2ème panel		0
Veaux (abat.) - faeces	PRI 036	
<i>E. coli</i> commensaux		
MIC 1er panel		173
MIC 2ème panel		3
<i>E. coli</i> BLSE/AmpC/Carba		
MIC 1er panel		175
MIC 2ème panel		175
Veaux (expl.) - faeces	PRI 515	
<i>E. coli</i> commensaux		
MIC 1er panel		119
MIC 2ème panel		1

Porcs d'engraissement - faeces	PRI 035	
<i>E. coli</i> commensaux		
MIC 1er panel		170
MIC 2ème panel		0
<i>E. coli</i> BLSE/AmpC/Carba		
MIC 1er panel		114
MIC 2ème panel		114

3.2.6. Surveillance d'*E. coli* commensales indicatrices dans la matière fécale de poulets de chair, de porcs d'engraissement et de veaux.

En 2021, des échantillons de contenu caecal collectés à l'abattage, prélevés sur des populations animales, telles que les poulets de chair (PRI 019), les porcs d'engraissement (PRI 035) et les veaux (PRI 036) ont été analysés conformément à la décision d'exécution de la commission du 17 novembre 2020 (2020/1729).

L'échantillonnage de matière fécale prélevée à la ferme sur des bovins de moins de 7 mois (PRI 515) a aussi été réalisé, tout comme l'échantillonnage de la matière fécale de poules reproductrices et pondeuses (PRI 515).

L'isolement d'*E. coli* commensales est réalisé par les laboratoires de l'AFSCA. Les isolats ont été envoyés au LNR AMR (Sciensano) pour réaliser le test de sensibilité aux antibiotiques.

Tableau 16. Nombre d'échantillons testés pour la présence d'*E. coli* commensales.

FT	Description	Lieu d'échantillonnage	Echantillons testés	<i>E. coli</i> détectée
PRI 019	Poulets de chair	Abattoir	178	178
PRI 035	Porcs d'engraissement	Abattoir	175	175
PRI 036	Bovins/veaux	Abattoir	176	176
PRI 515	Bovins viandeux	Exploitation	120	120
PRI 515	Poules reproductrices	Exploitation	181	175
PRI 515	Poules pondeuses	Exploitation	217	216

3.2.6.1. Surveillance d'*E. coli* commensales indicatrices dans la matière fécale de poulet de chair.

En 2021, 178 échantillons de matière fécale de poulet de chair prélevés à l'abattoir ont été analysés pour la présence d'*E. coli*. Tous ont été testés positifs. La concentration minimale inhibitrice (CMI) a été déterminée pour 170 de ces isolats (Figure 21).

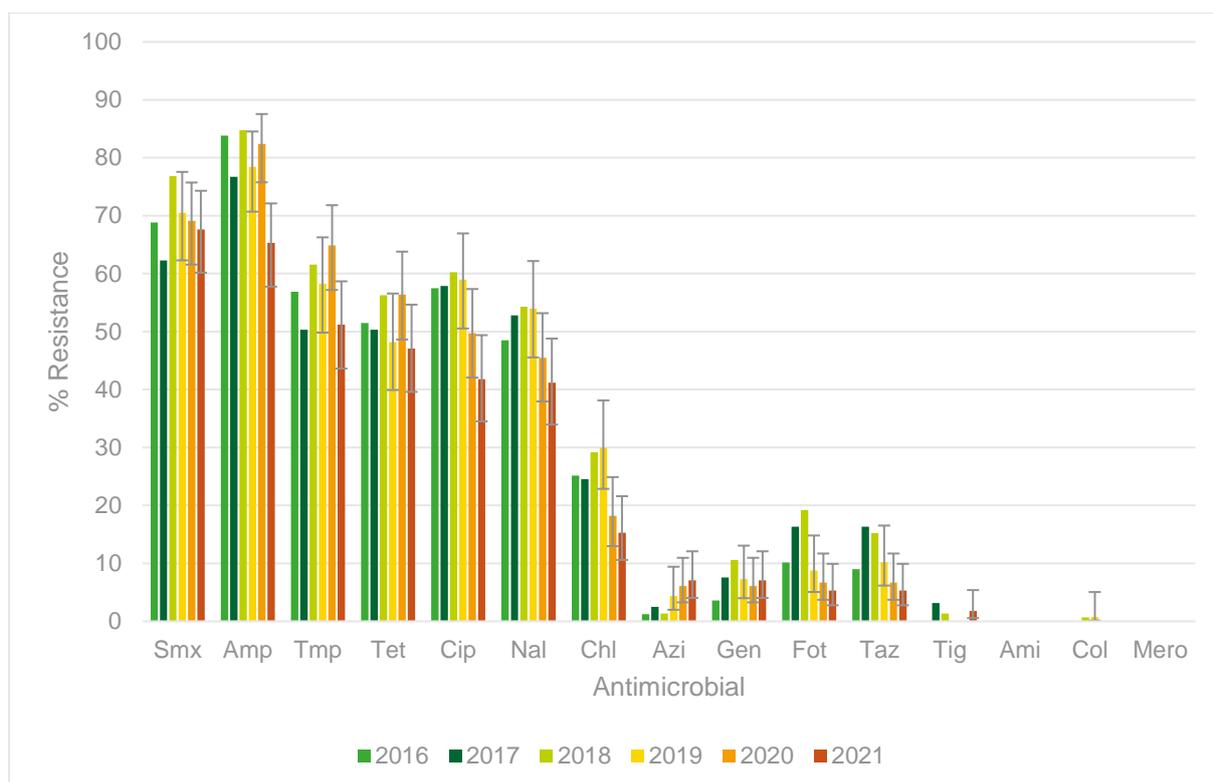


Figure 21. Pourcentage de résistance au premier panel d'agents antimicrobiens chez *E. coli* indicatrices isolées à partir des contenus caecaux de poulets de chair (2017-2021).

En 2021 on a observé une baisse du taux de résistance d'*E. coli* commensale pour tous les antimicrobiens à l'exception de l'azithromycine et la gentamicine. La résistance à la tigécycline a également été retrouvée en 2021 alors qu'elle n'était plus détectée depuis 2018. On peut noter une diminution significative de la résistance à l'ampicilline en 2021 par rapport à 2020. De manière générale, les résistances suivent une tendance à la baisse qui se poursuit en 2021. Aucun isolat n'était résistant à l'amikacine, à la colistine ou au méropénème.

9 isolats ayant montré une résistance aux céphalosporines de 3^{ème} génération ont été analysés avec le deuxième panel d'antibiotiques (EUVSEC2). Le phénotype obtenu était BLSE pour 8 isolats et BLSE + AmpC pour un isolat.

3.2.6.2. Surveillance d'*E. coli* commensales indicatrices dans la matière fécale de porc d'engraissement

En 2021, 175 échantillons de matière fécale de porcs d'engraissement prélevés à l'abattoir ont été analysés pour la présence d'*E. coli*. Tous ont été testés positifs. La concentration minimale inhibitrice a été déterminée pour 170 isolats (Figure 22).

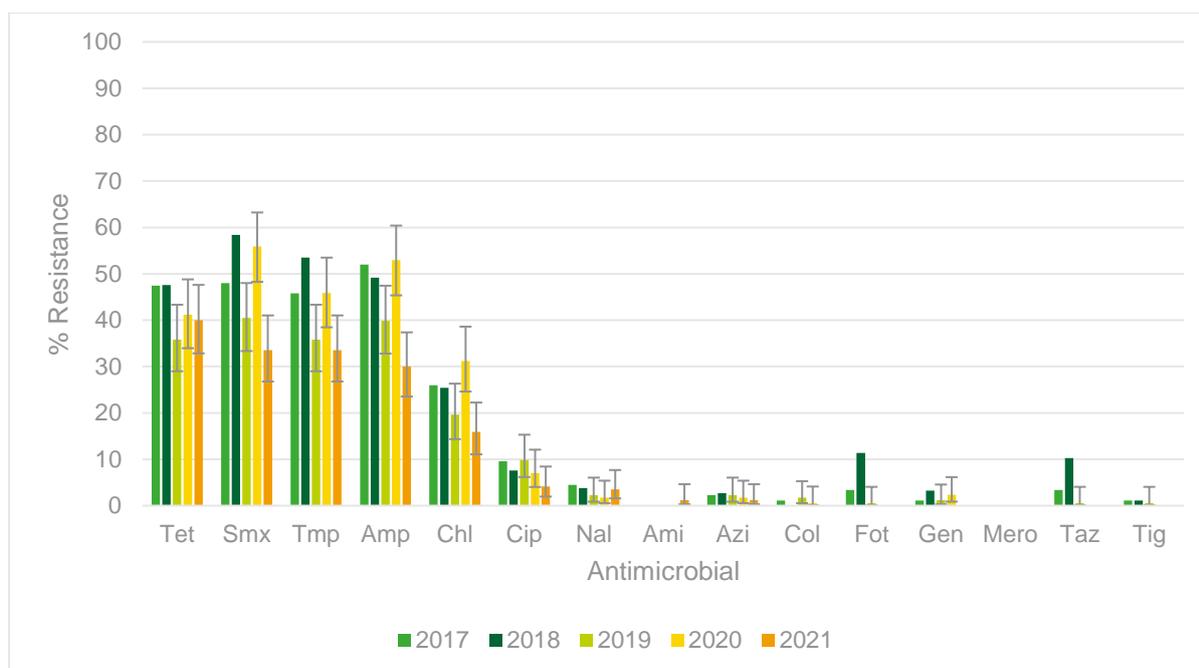


Figure 22. Pourcentage de résistance au premier panel d'agents antimicrobiens chez *E. coli* indicatrices isolés à partir des contenus caecaux de porc d'engraissement (2017-2021).

En 2021 on a observé une baisse du taux de résistance d'*E. coli* commensale pour tous les antibiotiques à l'exception de l'acide nalidixique pour lequel la résistance a légèrement augmenté, bien que le taux de résistance est toujours bas (<10%). On constate aussi une faible résistance à l'amikacine (1,18%), l'antibiotique nouvellement testé en 2021 suite à la décision d'exécution 2020/1729. Il est également intéressant de constater qu'aucune résistance à la gentamicine (pour la première fois en 2021) ni à la colistine (pour la première fois depuis 2018) n'a été retrouvée.

A noter également, la diminution significative en 2021 par rapport à 2020 des résistances au sulfaméthoxazole, à l'ampicilline et au chloramphénicol. Ces résistances avaient fortement augmenté en 2020 en comparaison à 2019.

3.2.6.3. Surveillance d'*E. coli* commensales indicatrices dans la matière fécale des veaux à l'abattoir

En 2021, 176 échantillons de matière fécale de veaux à l'abattoir ont été analysés pour la présence d'*E. coli*. Tous ont été testés positifs. La concentration minimale inhibitrice a été déterminée pour 173 isolats (Figure 23).

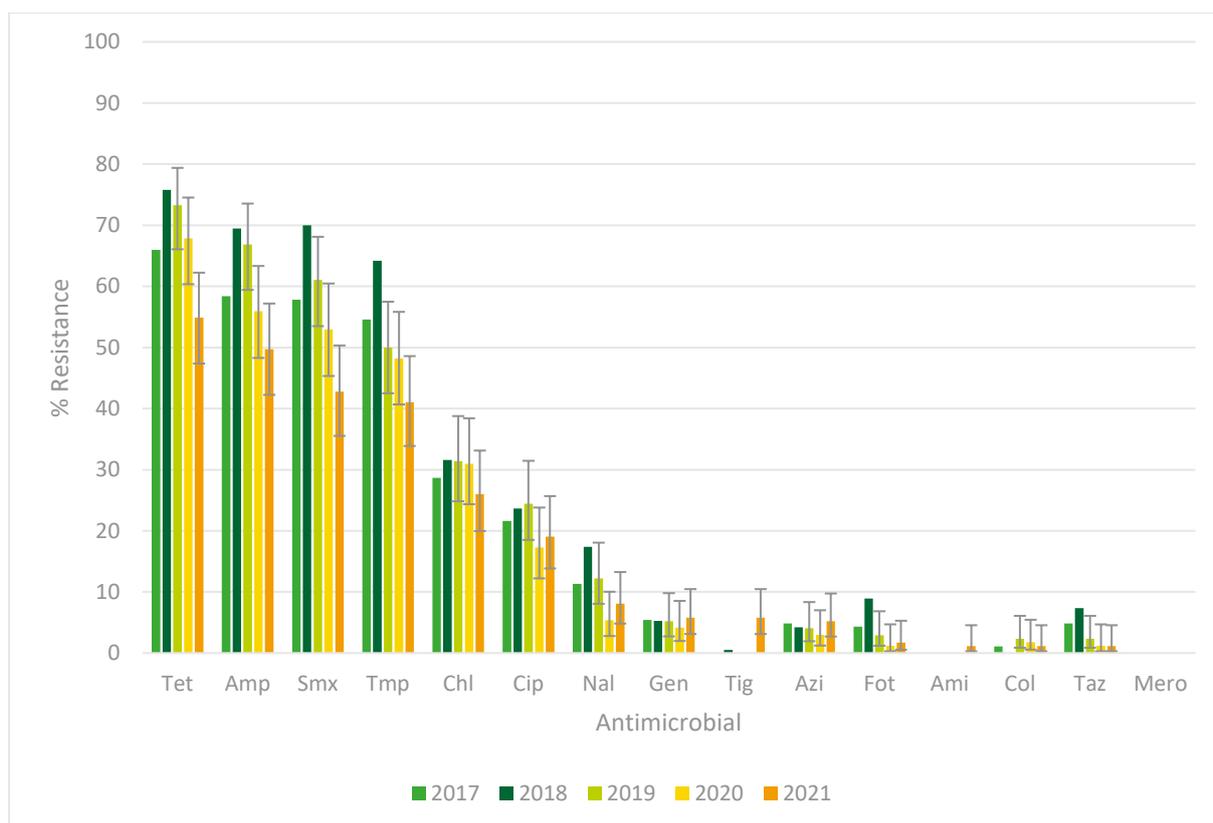


Figure 23. Pourcentage de résistance au premier panel d'agents antimicrobiens chez *E. coli* indicatrices isolées à partir des contenus caecaux des bovins (2016-2021).

En 2021 on observe une légère augmentation du taux de résistance d'*E. coli* commensale aux (fluoro)quinolones mais qui se maintient <20%, à la gentamicine, à la céfotaxime et à l'azithromycine (<10%). On constate aussi pour la première fois depuis 2018, une résistance à la tigécycline (5.78%). Cependant, en 2021, les taux de résistances à la tétracycline, à l'ampicilline, au sulfaméthoxazole, au triméthoprime et au chloramphénicol poursuivent leur tendance à la baisse depuis 2019.

3.2.6.4. Surveillance d'*E. coli* commensales indicatrices dans la matière fécale des bovins de moins d'un an

En 2021, 120 échantillons de matière fécale de bovins de moins d'un an prélevés aux élevages ont été analysés pour la présence d'*E. coli*. Tous ont été testés positifs. La concentration minimale inhibitrice (CMI) a été déterminée pour 119 isolats (Figure 24).

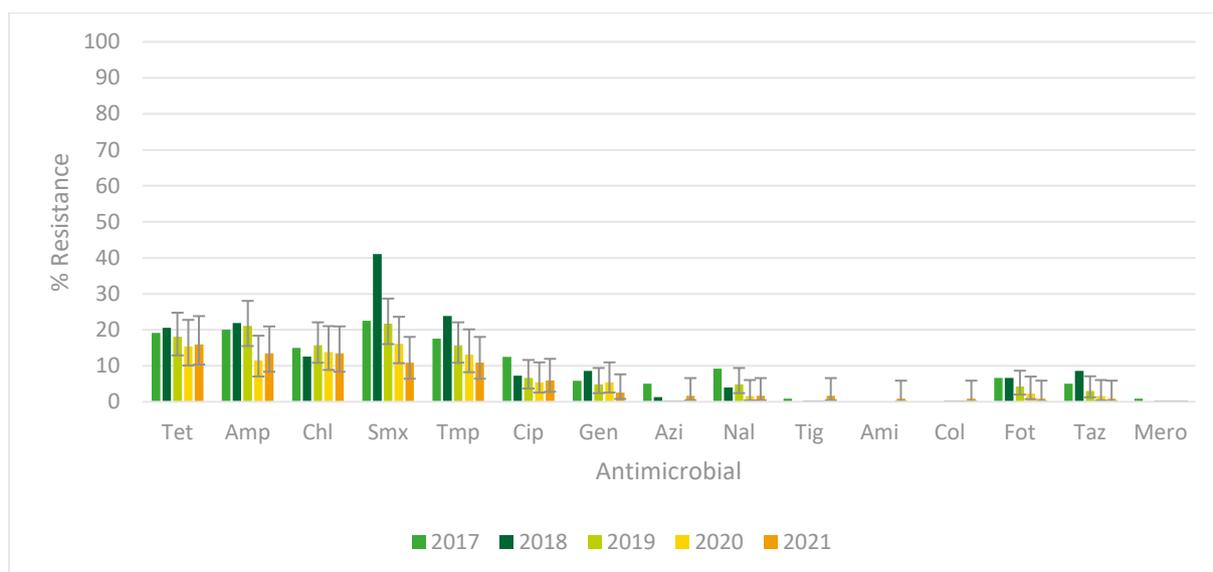


Figure 24. Pourcentage de résistance au premier panel d'agents antimicrobiens chez *E. coli* indicatrices isolées à partir de matière fécale de bovins (2017-2021).

A noter en 2021, la détection pour la première fois depuis 2018 d'une résistance à l'azithromycine (1.68%) et pour la première fois depuis 2017 à la tigécycline (1.68%). Ces résistances sont toutefois faibles. Il y a également, pour la première fois, une très faible (0.84%) résistance à la colistine et à l'amikacine (nouvellement testé en 2021). Les taux de résistance à au sulfaméthoxazole et au triméthoprime poursuivent en 2021 une tendance à la baisse depuis 2019. Aucun isolat n'était résistant au méropénème.

3.2.6.5. Surveillance d'*E. coli* commensales indicatrices dans la matière fécale des poules reproductrices et des poules pondeuses

En 2021, 181 échantillons de matière fécale de poules reproductrices ont été analysés pour la présence d'*E. coli*. 175 ont été testés positifs. La concentration minimale inhibitrice (CMI) a été déterminée pour 174 isolats (Figure 25).

Après une augmentation en 2020, on constate en 2021 une diminution de la plupart des taux de résistance. On peut noter une diminution significative de la résistance à l'ampicilline, au sulfaméthoxazole et au triméthoprime. Aussi, contrairement à 2020, aucun isolat n'était résistant à la colistine ni aux céphalosporines de 3^{ème} génération en 2021. Cependant, on remarque aussi en 2021 l'apparition très faible d'une résistance à l'azithromycine (0.57%), non détectée en 2020, et à la tigécycline (0.57%). Aucun isolat n'était résistant au méropénème.

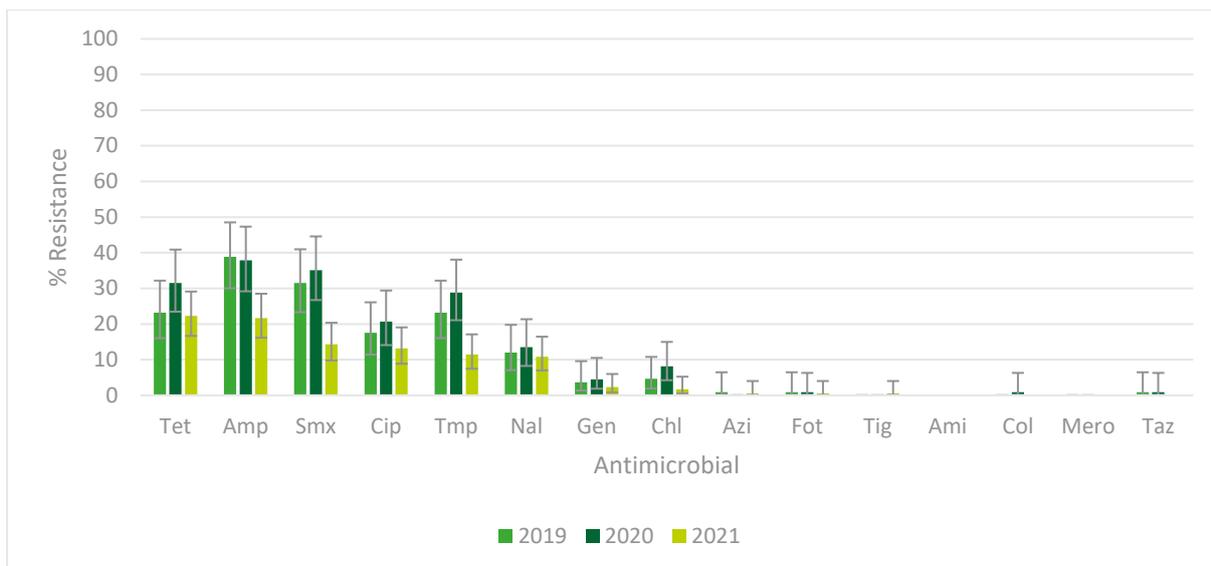


Figure 25. Pourcentage de résistance au premier panel d'agents antimicrobiens chez *E. coli* indicatrices isolées à partir des contenus caecaux des poules reproductrices (2019-2021).

217 échantillons de matière fécale de poules pondeuses ont été analysés pour la présence d'*E. coli*. 216 ont été testés positifs. La concentration minimale inhibitrice (CMI) a été déterminée pour 181 isolats (Figure 26).

On constate en 2021, des taux faibles et généralement stable voire en baisse en 2021. On remarque cependant l'apparition en 2021 de la résistance à la tigécycline (0.55%) et à l'amikacine (2.21%), l'antibiotique nouvellement testé en 2021. Aucun isolat n'était résistant à l'azithromycine, à la colistine, aux céphalosporines de 3^{ème} génération ou au méropénème.

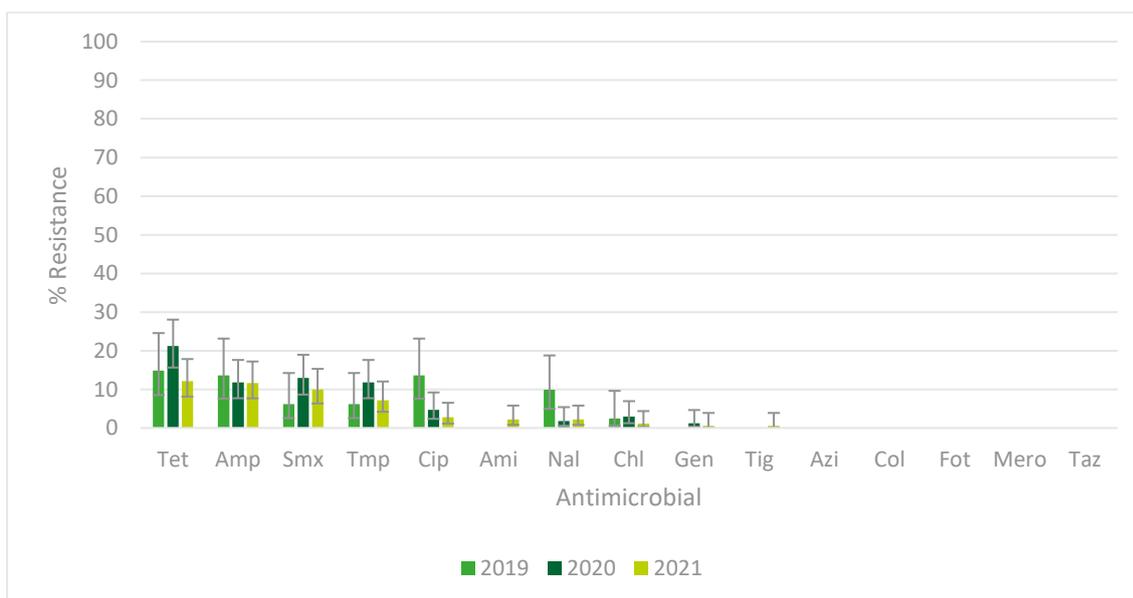


Figure 26. Pourcentage de résistance au premier panel d'agents antimicrobiens chez *E. coli* indicatrices isolées à partir des contenus caecaux des poules pondeuses (2019-2021).

3.2.7. Surveillance spécifique des bactéries *E. coli* productrices de BLSE, d'AmpC ou de carbapénémases

3.2.7.1. Surveillance spécifique des bactéries *E. coli* productrices de BLSE, d'AmpC ou de carbapénémases dans les contenus caecaux de poulets de chair

En 2021, dans le cadre de la recherche spécifique des bactéries *E. coli* productrices de BLSE, d'AmpC ou de carbapénémases présentes dans le contenu caecal de poulets de chair, une méthode qualitative (détection/non-détection dans 25g) a été effectuée. Le milieu utilisé est MacConkey associé avec du céfotaxime (CTX, 1 mg/L) prêt-à-l'emploi (Biorad) pour la détection d'*E. coli* BLSE et AmpC et le milieu CarbaSmart (BioMérieux) pour la détection de carbapénémases. Parmi 261 échantillons de contenu caecal de poulet de chair 205 (78.54%) ont été testés positifs pour BLSE et/ou AmpC. Aucun isolat n'a montré une résistance au méropénème. La résistance aux antimicrobiens a été testée pour 193 isolats (Figure 27).

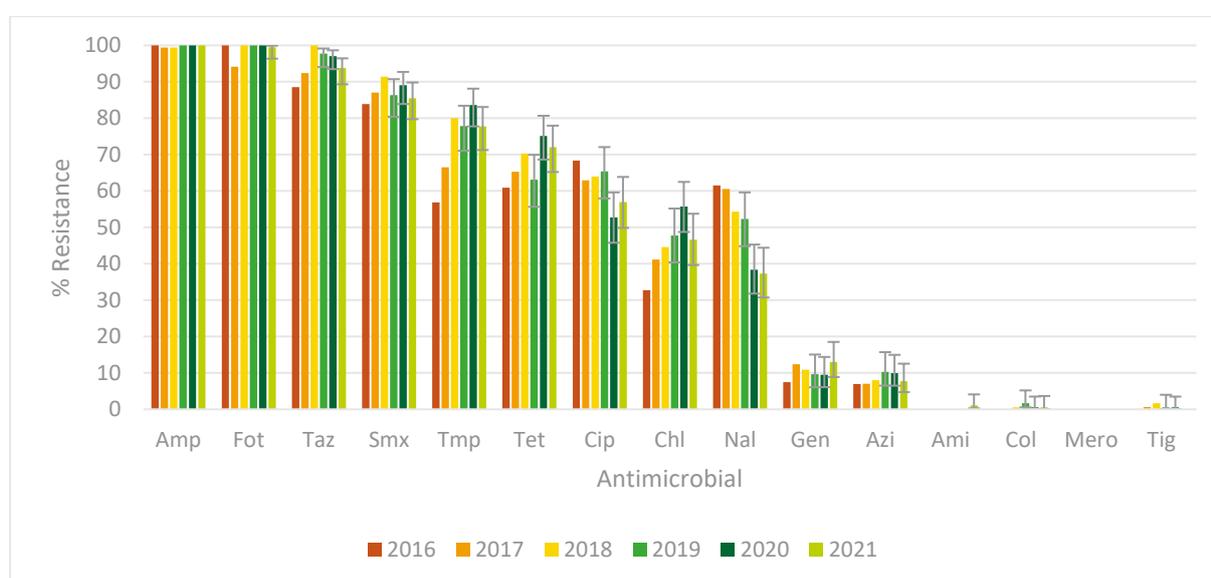


Figure 27. Pourcentage de résistance au premier panel d'agents antimicrobiens chez *E. coli* BLSE isolées à partir des contenus caecaux de poulets de chair (2016-2021).

On constate une diminution de la résistance à la plupart des antibiotiques mais une faible augmentation des taux de résistance à la ciprofloxacine et à la gentamicine. On peut également remarquer que pour la première fois en 2021, la résistance au chloramphénicol a diminué par rapport à l'année précédente. En effet, cette résistance était en hausse depuis 2017. Une résistance (1.04%) à l'amikacine, nouvellement testée en 2021, a également été détectée.

En ce qui concerne la caractérisation précise d'isolats résistants aux céphalosporines de troisième génération, la Figure 28 montre les résultats.

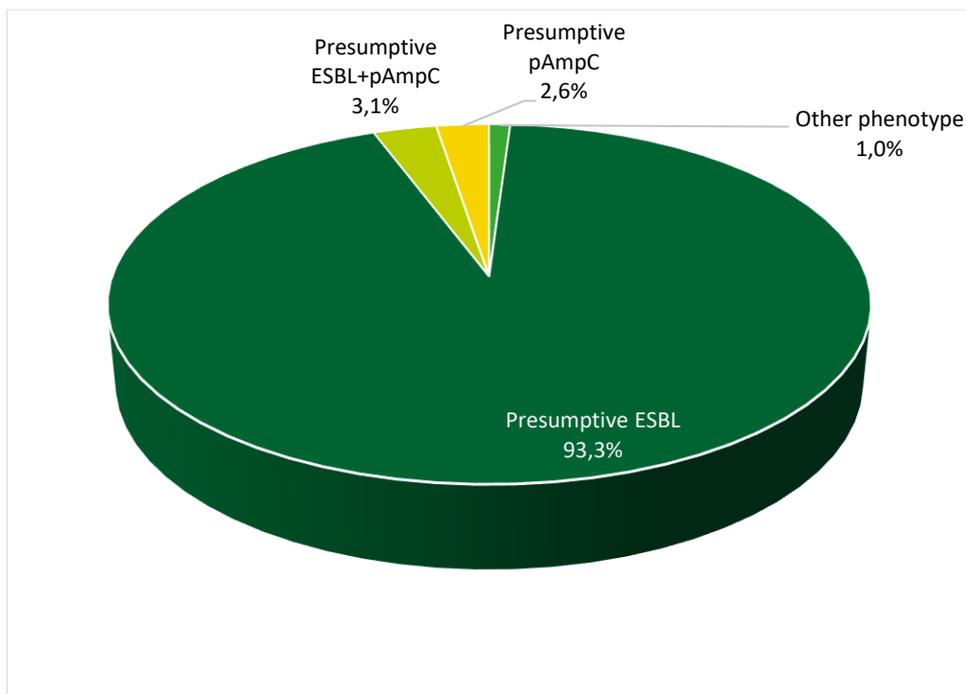


Figure 28. Pourcentage des phénotypes obtenus grâce au deuxième panel d'agents antimicrobiens chez *E. coli* BLSE isolées à partir des contenus caecaux de poulets de chair en 2021.

La grande majorité des isolats portent un phénotype de type BLSE (93.3%), suivi d'un phénotype combiné du type BLSE+ AmpC (3.1%) et d'un phénotype du type AmpC (2.6%). Un isolat a été classé selon le phénotype BLSE + carbapénémase car il était résistant à l'imipénème mais aucune résistance au méropénème n'a été détectée. Cet isolat n'est donc pas repris comme producteur de carbapénémases selon les critères de l'EFSA (autre phénotype).

3.2.7.2. Surveillance spécifique des bactéries *E. coli* productrices de BLSE, d'AmpC ou de carbapénémases dans les matières fécales de porc

En 2021, dans le cadre de la recherche spécifique des bactéries *E. coli* productrices de BLSE, d'AmpC ou de carbapénémases présentes dans les matières fécales de porc à l'abattoir, une méthode qualitative (détection/non-détection dans 25g) a été effectuée. Le milieu utilisé est MacConkey associé avec du céfotaxime (CTX, 1 mg/L) prêt-à-l'emploi (Biorad) pour la détection d'*E. coli* BLSE et AmpC et le milieu CarbaSmart (BioMérieux) pour la détection de carbapénémases. Parmi 300 échantillons de matière fécale 121 (40.33%) ont été testés positifs pour BLSE et/ou AmpC. Aucun isolat n'a montré une résistance au méropénème. La résistance aux antimicrobiens a été testée pour 114 isolats (Figure 29).

En général, le taux de résistance chez les *E. coli* BLSE est très élevé (>50%-70%) pour le sulfaméthoxazole et le triméthoprime bien que la résistance à ces deux antibiotiques ait diminué depuis 2020. On remarque en 2021 une augmentation de la résistance à l'acide nalidixique et une faible augmentation à la colistine par rapport à 2020. On peut également constater une faible résistance (2.63%) à l'amikacine, nouvellement testée en 2021. Cependant, le taux de résistance pour la plupart des antibiotiques est en baisse en 2021.

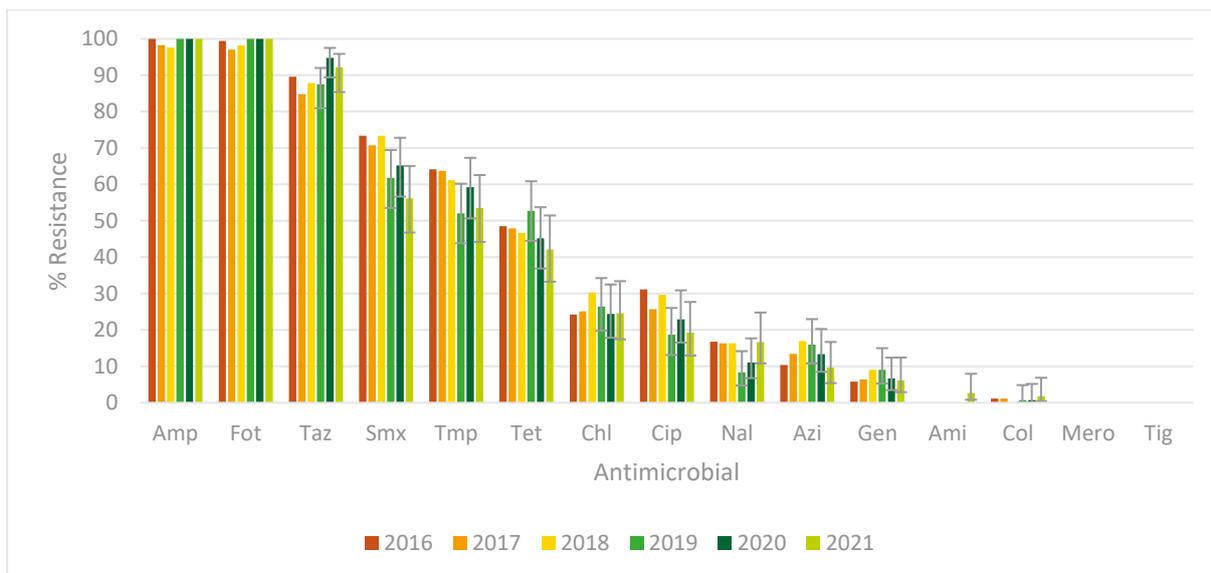


Figure 29. Pourcentage de résistance au premier panel d’agents antimicrobiens chez *E. coli* BLSE isolées à partir de matières fécales de porc (2016-2021).

En ce qui concerne la caractérisation précise d’isolats résistants aux céphalosporines de 3^{ème} génération, la Figure 30 montre les résultats.

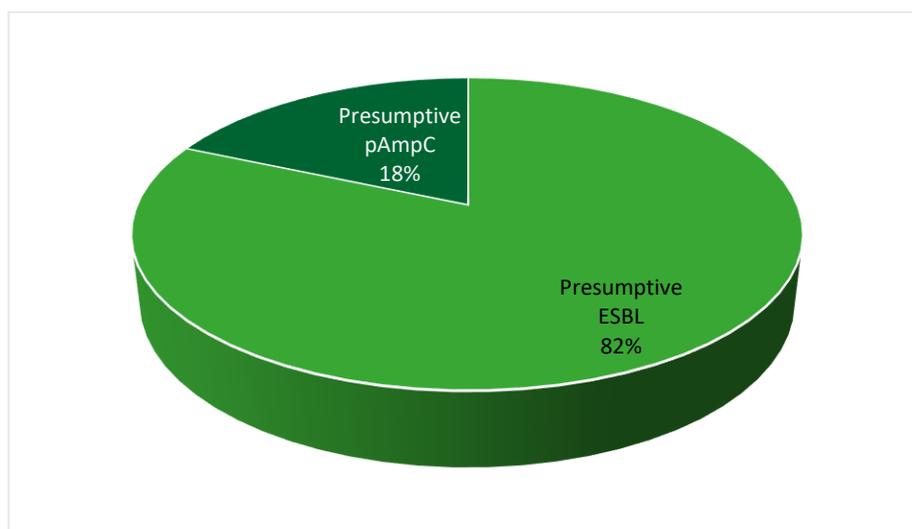


Figure 30. Pourcentage des phénotypes obtenus grâce au deuxième panel d’agents antimicrobiens chez *E. coli* BLSE isolées à partir de matières fécales de porc en 2021.

3.2.7.3. Surveillance spécifique des bactéries *E. coli* productrices de BLSE, d’AmpC ou de carbapénémases dans les matières fécales de bovins.

En 2021, dans le cadre de la recherche spécifique des bactéries *E. coli* productrices de BLSE, d’AmpC ou de carbapénémases présentes dans les matières fécales des bovins de moins d’un an à l’abattoir, une méthode qualitative (détection/non-détection dans 25g) a été effectuée. Le milieu utilisé est MacConkey associé avec du céfotaxime (CTX, 1 mg/L) prêt-à-l’emploi (Biorad) pour la détection d’*E. coli* BLSE et AmpC et le milieu CarbaSmart (BioMérieux) pour la détection de carbapénémases. Parmi 301 échantillons de matière fécale 170 (59.80%) ont été testés positif pour BLSE et/ou AmpC. Aucun isolat n’a montré une résistance au méropénème. La résistance aux antimicrobiens a été testée pour 175 isolats (Figure 31).

Le taux de résistance chez les *E. coli* BLSE reste extrêmement élevé (>70%) pour la tétracycline le sulfaméthoxazole bien qu'il ait diminué en 2021, le taux de résistance au triméthoprim est très élevé (>50-70%) en 2021 contre extrêmement élevé en 2020. La résistance à la ciprofloxacine a diminué (~11.7%) en 2021 mais celle à l'acide nalidixique a augmenté (~7%). Un isolat (~0.6%) était résistant à la tigécycline en 2021 cependant sa concentration minimale inhibitrice était seulement d'une dilution supérieure à la valeur-seuil. La résistance à la colistine reste faible (1.71%) et aucune résistance à l'amikacine ou au méropénème n'a été détectée en 2021.

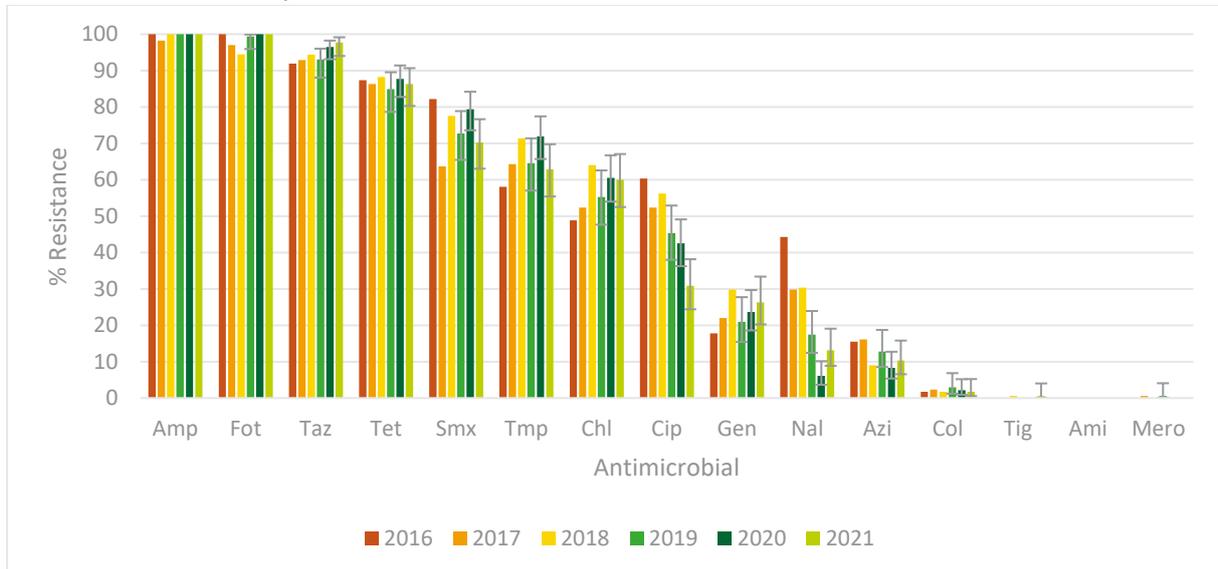


Figure 31. Pourcentage de résistance au premier panel d'agents antimicrobiens chez *E. coli* BLSE isolés à partir de matières fécales de veaux (2016-2021).

En ce qui concerne la caractérisation précise d'isolats résistants aux céphalosporines de 3^{ème} génération, la Figure 32 montre les résultats. La grande majorité des isolats (90%) montrent un profil de type BLSE seul ou combiné. 10% des isolats montrent un phénotype AmpC et 2% ont un profil BLSE + carbapénémase ou BLSE + AmpC + carbapénémase car ils étaient résistants à l'ertapénème ou à l'imipénème. Cependant aucun isolat n'était résistant au méropénème. Ces isolats ne sont donc pas repris comme producteur de carbapénémases selon les critères de l'EFSA (autre phénotype).

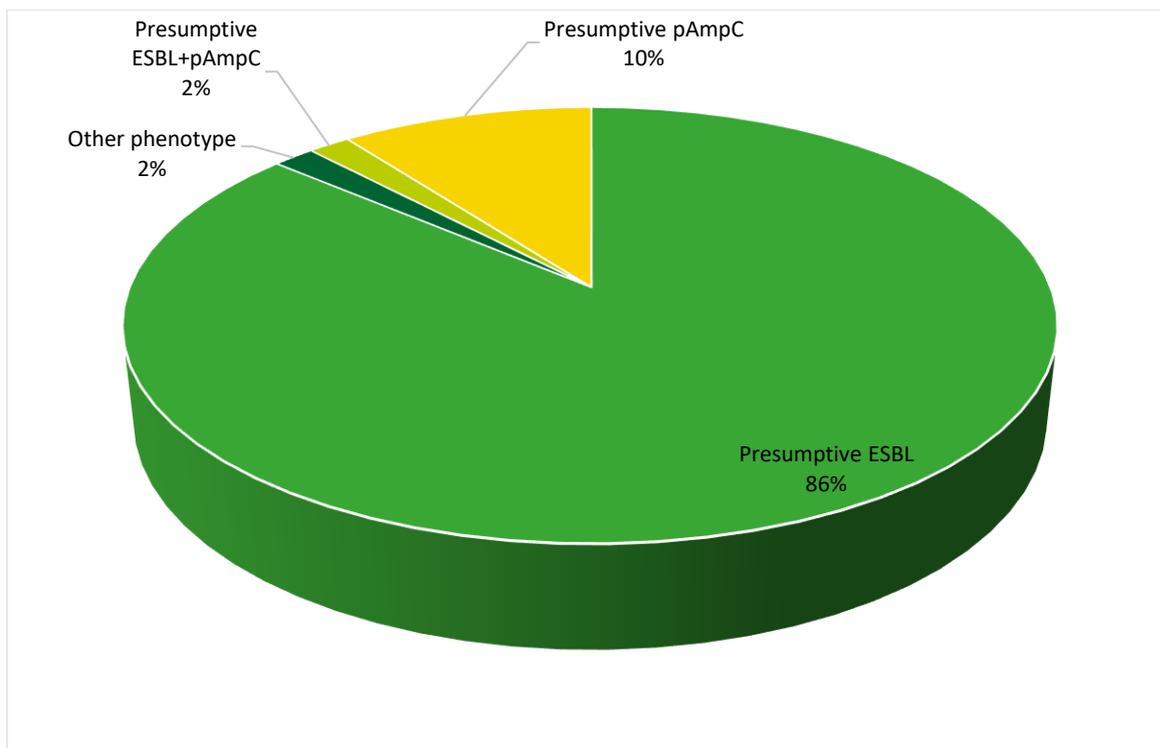


Figure 32. Pourcentage des phénotypes obtenus grâce au deuxième panel d'agents antimicrobiens chez *E. coli* BLSE isolés à partir de matières fécales de veaux en 2021.

3.2.8. Surveillance antimicrobienne de *Staphylococcus aureus* résistants à la méthicilline isolés à partir d'écouvillons nasaux de vaches laitières, bovins viandeux et veaux de moins d'un an/veaux de boucherie.

3.2.8.1. Prévalences des *Staphylococcus aureus* résistants à la méthicilline

La présence de MRSA a été confirmée dans 98 échantillons sur un total de 358 échantillons analysés, toutes catégories animales confondues, en 2021. Au sein de chaque catégorie animale, **54.5%** des échantillons étaient positifs chez les veaux, **4.7%** chez les bovins viandeux et **11.7%** chez les vaches laitières (voir Tableau 17).

Tableau 17. Prévalences de MRSA dans les différentes catégories animales, selon l'année de la surveillance.

Catégorie animale	Année	N échantillons	N positifs	% positifs	IC à 95%
Veaux	2021	145	79	54.5	46.4-62.6
	2018	145	79	54.5	46.2-62.5
	2015	147	116	78.9	72.3-85.5
	2012	104	49	47.1	37.5-56.7
Bovins viandeux	2021	85	4	4.7	1.8-11.5
	2018	103	9	8.7	4.7-16.4
	2015	104	16	15.4	8.5-22.3
	2012	187	19	10.2	5.0-14.9
Vaches laitières	2021	128	15	11.7	6.1-17.3
	2018	93	13	14.0	8.2-22.8
	2015	96	10	10.4	5.1-18.0
	2012	141	14	9.9	5.3-22.7

3.2.8.2. Caractérisation des souches *Staphylococcus aureus* résistantes à la méthicilline

- Complexe clonal CC398

Sur un total de 98 souches identifiées MRSA, 92 (**93.9%**) d'entre-elles étaient positives pour le complexe clonal CC398 par PCR, un type génétique caractéristique des clones MRSA d'origine animale. Parmi les différentes catégories animales, le CC398 a ainsi été retrouvé dans 98.7% des souches MRSA isolées de veaux (n=78/79), dans 50.0% des souches de bovins viandeux (n=2/4) et dans 80.0% des souches de vaches laitières (n=12/15).

- Spa-types

Onze spa-types différents ont été identifiés. **78.6%** des souches présentent un spa-type **t011**, tandis que les autres spa-types t034, t037, t386, t1451, t1456, t2346, t2370, t3423, t5210 et t6228 sont peu fréquents (voir Tableau 18). Le complexe clonal CC398 est associé à tous les spa-types identifiés, exceptés les t037 et t386. Le spa-type t011 est présent dans **78.6%** des souches MRSA, également positives pour le CC398. Tous les spa-types t011 sont associés au complexe clonal CC398. Cette association spa-type t011 et CC398 est caractéristique des souches isolées d'animaux. Seuls les spa-types t037 (N=5, soit 3 souches de vaches laitières et 2 de bovins viandeux) et t386 (N=1, veaux) sont associés à des souches négatives pour le CC398. Cela suggère que ces souches seraient apparentées aux souches d'origine humaine.

Tableau 18. Nombre d'échantillons MRSA et % des différents spa-types observés dans les différentes catégories animales.

Catégorie animale	N total	t011	t034	t037	t386	t1451	t1456	t2346	t2370	t3423	t5210	t6228
Vaches laitières	15	N	10	2	3	0	0	0	0	0	0	0
		%	66.7	13.3	20.0	0	0	0	0	0	0	0
Bovins viandeux	4	N	2	0	2	0	0	0	0	0	0	0
		%	50.0	0	50.0	0	0	0	0	0	0	0
Veaux	79	N	65	6	0	1	1	1	1	1	1	1
		%	82.3	7.6	0	1.3	1.3	1.3	1.3	1.3	1.3	1.3
Total	98	N	77	8	5	1	1	1	1	1	1	1
		%	78.6	8.2	5.1	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0

3.2.8.3. Résistance antimicrobienne chez *Staphylococcus aureus* résistants à la méthicilline

La résistance antimicrobienne observée au sein des souches MRSA est présentée dans les figures suivantes. Comme attendu, toutes les souches MRSA sont résistantes à la céfoxitine et à la pénicilline.

(i) Veaux

La résistance antimicrobienne observée chez les MRSA isolées de veaux était extrêmement élevée pour la clindamycine (**93.7%**), l'érythromycine (**93.7%**), la tétracycline (**100%**), le triméthoprime (**96.2%**) et la kanamycine (**70.9%**) ; très élevée pour la gentamicine (**67.1%**), élevée pour la ciprofloxacine (**27.9%**) et modérée pour le synergide (**15.2%**), la streptomycine (**13.9%**), le chloramphénicol (**13.9%**) et la tiamuline (**10.1%**). Pour le sulfaméthoxazole, le niveau de résistance était faible (**7.6%**) tandis

qu'aucune résistance n'a été observée pour l'acide fusidique, le linézolide, la mupirocine, la rifampicine et la vancomycine en 2021 (voir Figure 33).

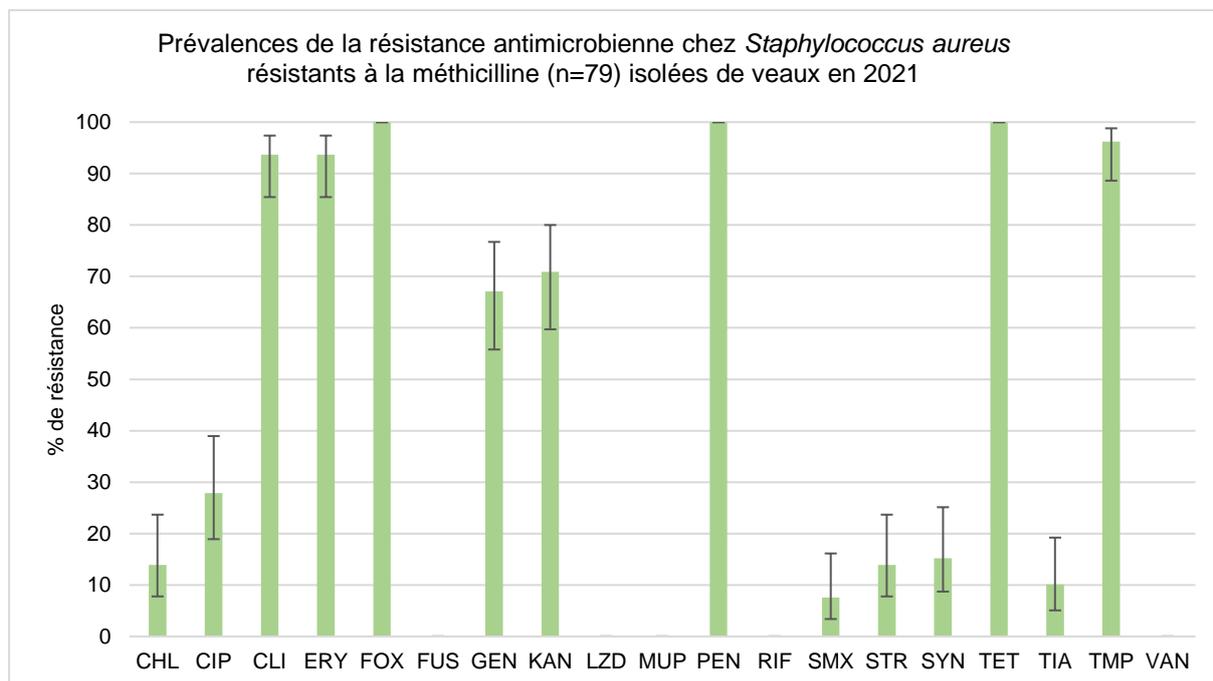


Figure 33. Prévalences de la résistance antimicrobienne chez *Staphylococcus aureus* résistants à la méthicilline (n=79) isolées de veaux à la ferme.

Basées sur les cut-offs épidémiologiques selon le comité européen de la susceptibilité antimicrobienne (EUCAST) pour les antimicrobiens suivants : chloramphénicol (CHL), ciprofloxacine (CIP), clindamycine (CLI), érythromycine (ERY), céfoxitine (FOX), acide fusidique (FUS), gentamicine (GEN), kanamycine (KAN), linézolide (LZD), mupirocine (MUP), pénicilline (PEN), rifampicine (RIF), sulfaméthoxazole (SMX), streptomycine (STR), synergicide (SYN), tétracycline (TET), tiamuline (TIA), triméthoprim (TMP) et vancomycine (VAN).

(ii) Bovins viandeux

La résistance antimicrobienne observée chez les MRSA isolées de bovins viandeux (n=4) était extrêmement élevée pour la tétracycline (**100%**) et la kanamycine (**100%**), ainsi que très élevée pour le chloramphénicol (**50.0%**), l'érythromycine (**50.0%**), la gentamicine (**50.0%**), la rifampicine (**50.0%**), le sulfaméthoxazole (**50.0%**), la streptomycine (**50.0%**) et le triméthoprim (**50.0%**). Aucune résistance à la ciprofloxacine, à la clindamycine, à l'acide fusidique, au linézolide, à la mupirocine, au synergicide, à la tiamuline ou à la vancomycine n'a été observée en 2021 (voir Figure 34). Etant donné le faible nombre d'isolats observés (n=4) les intervalles de confiance sont très grands et ces pourcentages de résistance doivent donc être interprétés avec précaution.

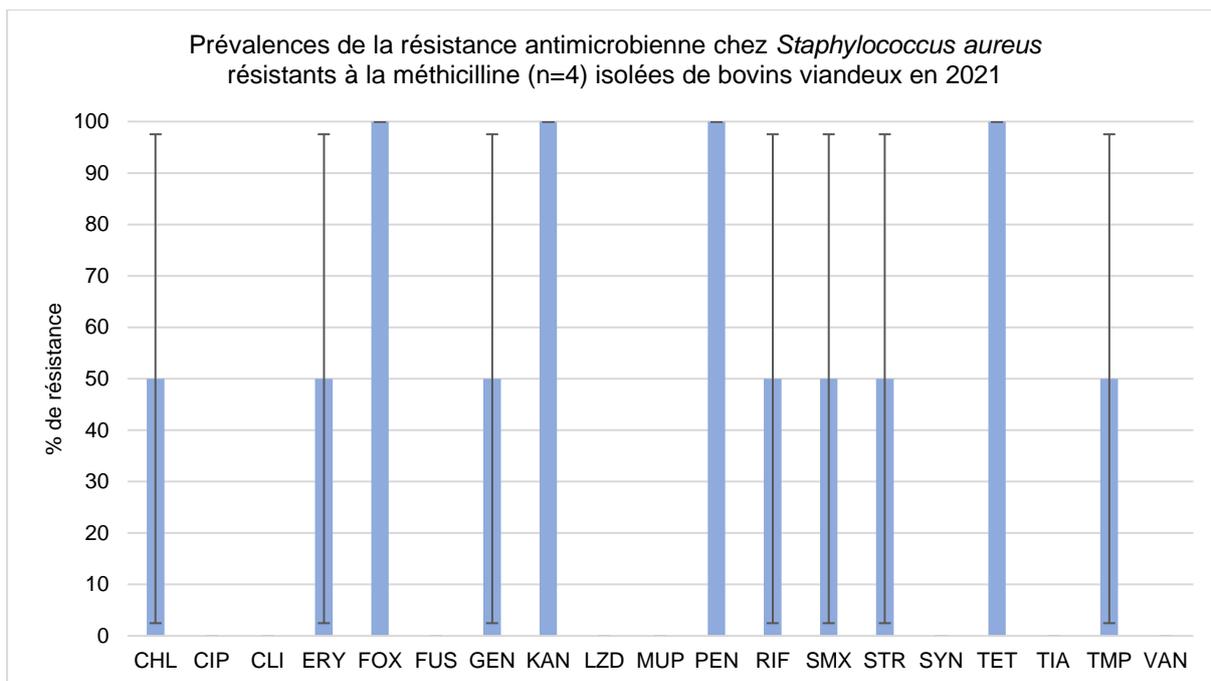


Figure 34. Prévalences de la résistance antimicrobienne chez *Staphylococcus aureus* résistants à la méthicilline (n=4) isolées de bovins viandeux.

Basées sur les cut-offs épidémiologiques selon le comité européen de la susceptibilité antimicrobienne (EUCAST) pour les antimicrobiens suivants : chloramphénicol (CHL), ciprofloxacine (CIP), clindamycine (CLI), érythromycine (ERY), céfoxitine (FOX), acide fusidique (FUS), gentamicine (GEN), kanamycine (KAN), linézolide (LZD), mupirocine (MUP), pénicilline (PEN), rifampicine (RIF), sulfaméthoxazole (SMX), streptomycine (STR), synergide (SYN), tétracycline (TET), tiamuline (TIA), triméthoprime (TMP) et vancomycine (VAN).

(iii) Vaches laitières

La résistance antimicrobienne observée chez les MRSA isolées de vaches laitières (n=15) était extrêmement élevée pour la tétracycline (**100%**), très élevée pour l'érythromycine (**60.0%**), la kanamycine (**60.0%**) et le triméthoprime (**66.7%**), élevée pour le chloramphénicol (**20.0%**), la ciprofloxacine (**20.0%**), la clindamycine (**46.7%**), la gentamicine (**33.3%**), la rifampicine (**20.0%**), le sulfaméthoxazole (**20.0%**), la streptomycine (**26.7%**), le synergide (**33.3%**) et la tiamuline (**26.7%**). Aucune résistance à l'acide fusidique, au linézolide, à la mupirocine et à la vancomycine n'a été observée en 2021 (voir Figure 35). Etant donné le faible nombre d'isolats observés (n=15) les intervalles de confiance sont très grands et ces pourcentages de résistance doivent donc être interprétés avec précaution.

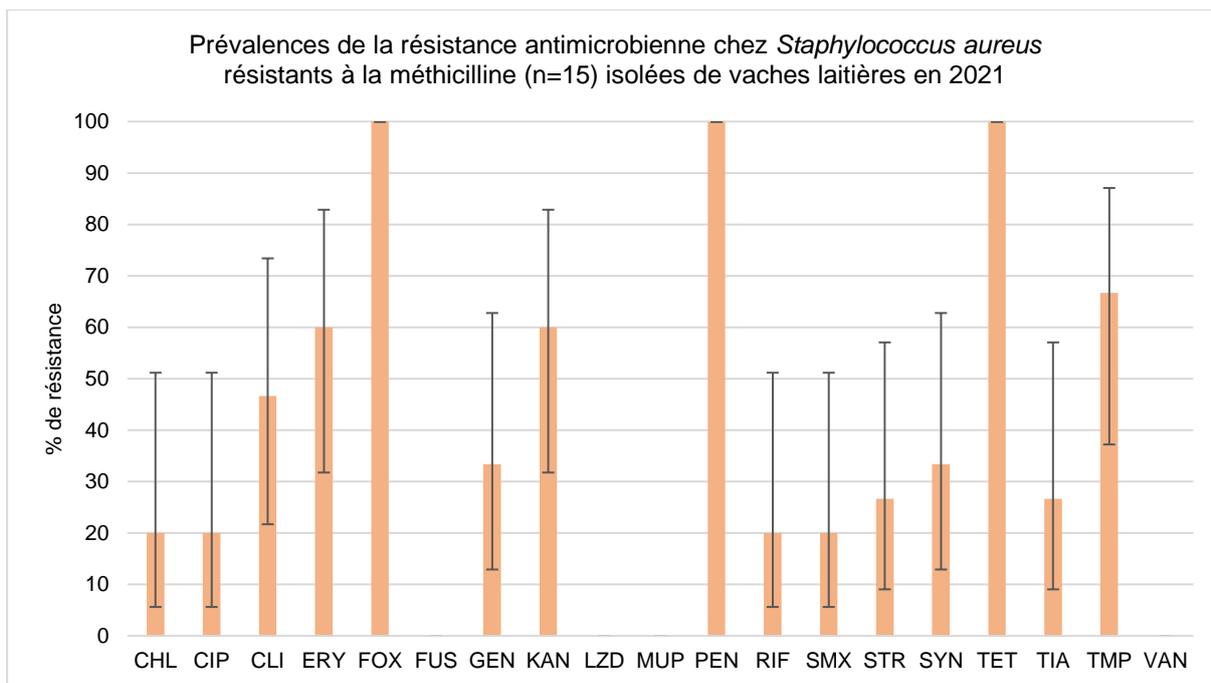


Figure 35. Prévalences de la résistance antimicrobienne chez *Staphylococcus aureus* résistants à la méthicilline (n=15) isolées de vaches laitières.

Basées sur les cut-offs épidémiologiques selon le comité européen de la susceptibilité antimicrobienne (EUCAST) pour les antimicrobiens suivants : chloramphénicol (CHL), ciprofloxacine (CIP), clindamycine (CLI), érythromycine (ERY), céfoxitine (FOX), acide fusidique (FUS), gentamicine (GEN), kanamycine (KAN), linézolide (LZD), mupirocine (MUP), pénicilline (PEN), rifampicine (RIF), sulfaméthoxazole (SMX), streptomycine (STR), synergide (SYN), tétracycline (TET), tiamuline (TIA), triméthoprime (TMP) et vancomycine (VAN).

(iv) Comparaison des résistances antimicrobiennes observées entre les différentes catégories animales en 2021

Toutes les souches MRSA isolées en 2021 étaient résistantes à la céfoxitine, à la pénicilline et à la tétracycline. Aucune résistance au linézolide, à l'acide fusidique, à la mupirocine et à la vancomycine n'a été observée en 2021 (voir Figure 36). Cependant, le nombre de MRSA analysées dans 2 catégories animales à savoir n=15 vaches laitières et n=4 bovins viandeux, n'ont pas permis de comparer de façon significative les pourcentages de résistance entre les différentes catégories animales. Nous pouvons cependant noter que certaines résistances n'ont pas été observées dans les 4 isolats de bovins viandeux, à savoir la résistance à la ciprofloxacine, à la clindamycine, au synergide et à la tiamuline, alors que ces résistances ont été détectées dans les 2 autres catégories de bovins. A l'inverse, la résistance à la rifampicine n'a pas été détectée chez le veau alors qu'elle a été observée chez les vaches laitières et les bovins viandeux.

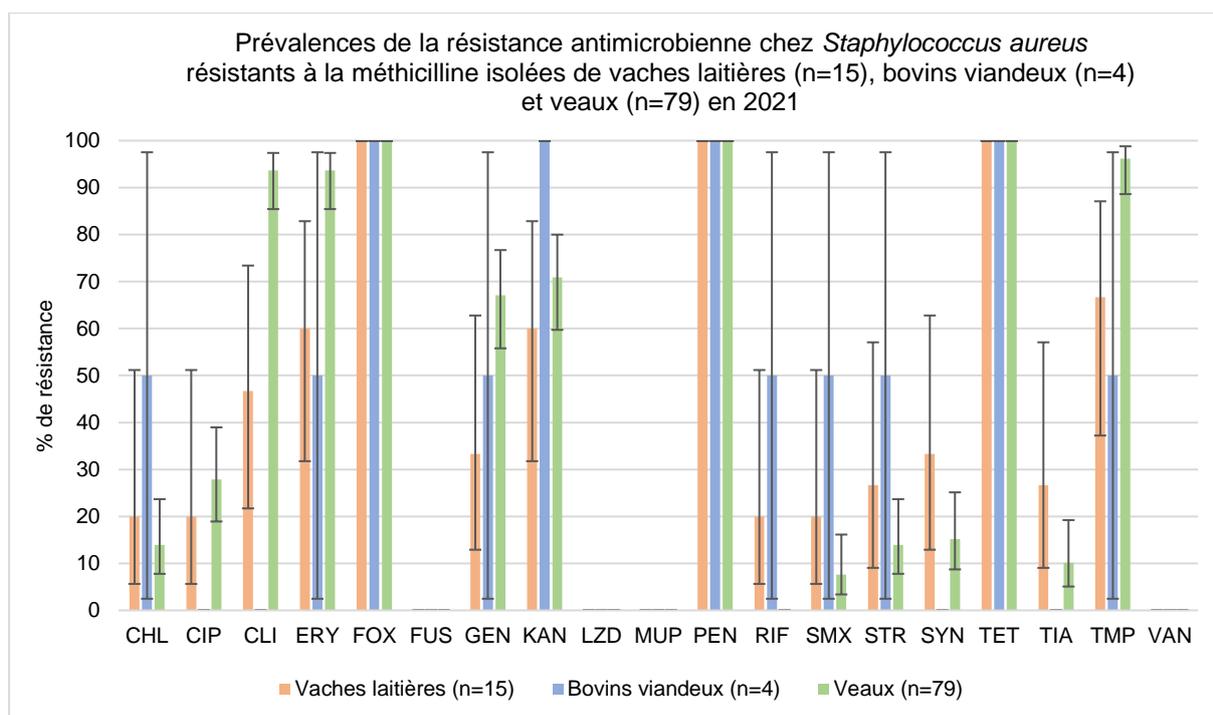


Figure 36. Prévalences de la résistance antimicrobienne observées chez *Staphylococcus aureus* résistants à la méthicilline (n=98) selon la catégorie animale.

Basées sur les cut-offs épidémiologiques selon le comité européen de la susceptibilité antimicrobienne (EUCAST) pour les antimicrobiens suivants : chloramphénicol (CHL), ciprofloxacine (CIP), clindamycine (CLI), érythromycine (ERY), céfoxitine (FOX), acide fusidique (FUS), gentamicine (GEN), kanamycine (KAN), linézolide (LZD), mupirocine (MUP), pénicilline (PEN), rifampicine (RIF), sulfaméthoxazole (SMX), streptomycine (STR), synergide (SYN), tétracycline (TET), tiamuline (TIA), triméthoprim (TMP) et vancomycine (VAN).

3.2.8.1. Comparaison des prévalences de résistance antimicrobienne observées en 2012, 2015, 2018 et 2021 chez *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline par catégorie animale

Il est important de souligner les faibles nombres d'échantillons des catégories animales « bovins viandeux » et « vaches laitières » inclus dans l'analyse statistique des prévalences de résistance observées au cours du temps.

(v) Veaux

Toutes les souches isolées de veaux résistaient à la tétracycline en 2021, comme observé déjà en 2018. Chez les MRSA isolées de veaux, une diminution significative a été observée en 2021 par rapport à 2012 pour la ciprofloxacine (-14.7%, de 42.6% à 27.9%), l'acide fusidique (-23.4%, de 23.4% à 0.0%), la mupirocine (-6.4%, de 6.4% à 0.0%) et la rifampicine (-6.4%, de 6.4% à 0.0%). Les taux de résistance au sulfaméthoxazole (-17.9%, de 25.5% à 7.6%) et à la streptomycine (-47.8%, de 61.7% à 13.9%) ont significativement diminués par rapport à 2012. Malgré une diminution significative du taux de résistance à la clindamycine (-10.5%, de 99.1% à 88.6%) et à l'érythromycine (-13.5%, de 98.3% à 84.8%) observée entre 2015-2018, ces résistances n'ont significativement pas évoluées en 2021 par rapport 2018. De même, aucun changement significatif dans les taux de résistance à la gentamicine et à la kanamycine n'a été observé en 2021, malgré la diminution significative (-26.5%, de 89.4% à 62.9% ; et -23.0%, de 89.4% à 66.4% respectivement) qui avait été observée entre 2012 et 2015 (voir Figure 37). Aucune résistance au linézolide et à la vancomycine n'ont été observées au fil des années, et la résistance à la mupirocine observée en 2012 n'est plus présente depuis 2015.

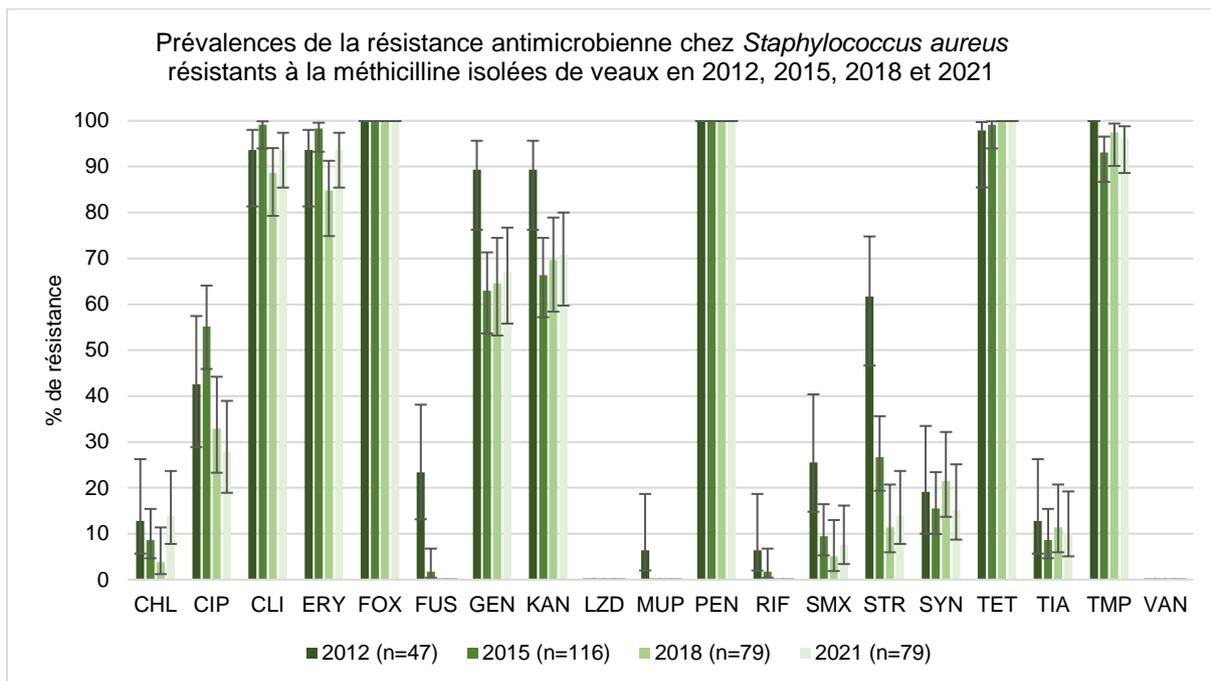


Figure 37. Prévalences de résistance observées chez les MRSA isolées de veaux en 2012 (n=47), 2015 (n=116), 2018 (n=79) et 2021 (n=79).

Basées sur les cut-offs épidémiologiques selon le comité européen de la susceptibilité antimicrobienne (EUCAST) pour les antimicrobiens suivants : chloramphénicol (CHL), ciprofloxacine (CIP), clindamycine (CLI), érythromycine (ERY), céfoxitine (FOX), acide fusidique (FUS), gentamicine (GEN), kanamycine (KAN), linézolide (LZD), mupirocine (MUP), pénicilline (PEN), rifampicine (RIF), sulfaméthoxazole (SMX), streptomycine (STR), synergide (SYN), tétracycline (TET), tiamuline (TIA), triméthoprime (TMP) et vancomycine (VAN).

(vi) Bovins viandeux

Aucune résistance au linézolide et à la vancomycine n'ont été observées au fil des années, et la résistance à la mupirocine observée en 2012 n'a plus été détectée depuis 2015 (voir Figure 38). La résistance à l'acide fusidique a été observée en 2012 et 2015 mais plus depuis. Vu le faible nombre d'isolats de bovins viandeux analysés au fil des ans, les écarts-types sont importants et il n'est pas relevant de réaliser une analyse de tendance.

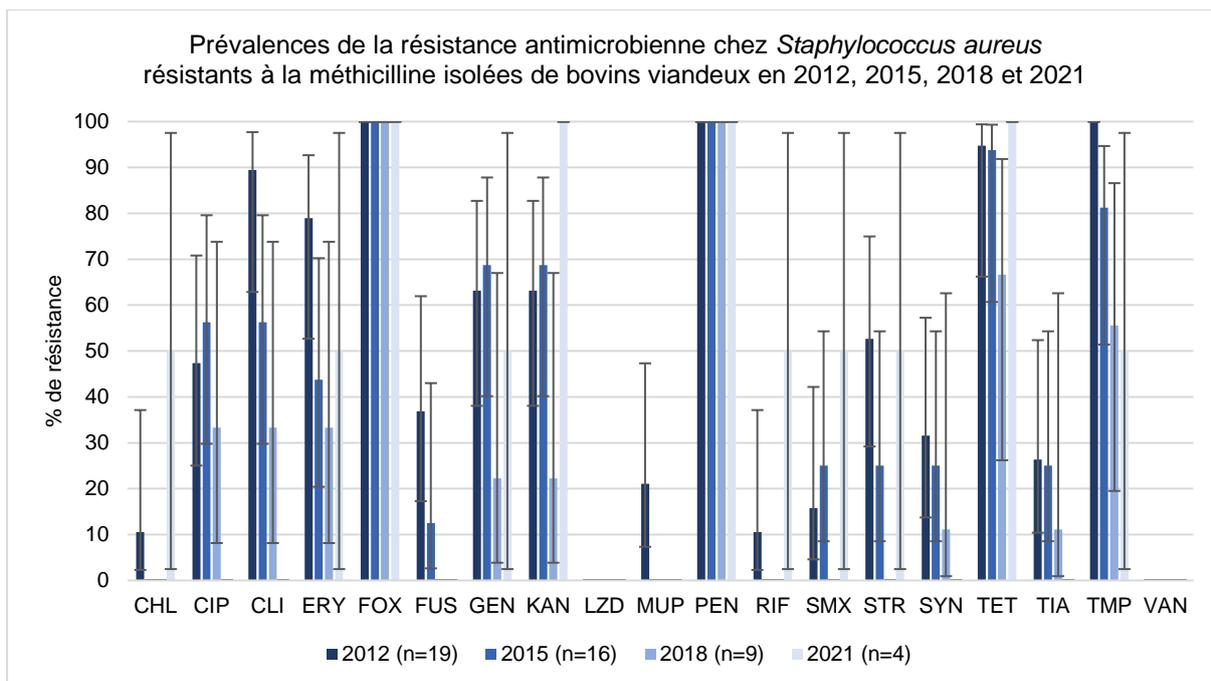


Figure 38. Prévalences de résistance observées chez les MRSA isolées de bovins viandeux en 2012 (n=19), 2015 (n=16), 2018 (n=9) et 2021 (n=4).

Basées sur les cut-offs épidémiologiques selon le comité européen de la susceptibilité antimicrobienne (EUCAST) pour les antimicrobiens suivants : chloramphénicol (CHL), ciprofloxacine (CIP), clindamycine (CLI), érythromycine (ERY), céfoxitine (FOX), acide fusidique (FUS), gentamicine (GEN), kanamycine (KAN), linézolide (LZD), mupirocine (MUP), pénicilline (PEN), rifampicine (RIF), sulfaméthoxazole (SMX), streptomycine (STR), synergide (SYN), tétracycline (TET), tiamuline (TIA), triméthoprime (TMP) et vancomycine (VAN).

(vii) Vaches laitières

Aucune variation de tendance significative n'a été observée chez les MRSA isolées de vaches laitières entre 2012 et 2021 (voir Figure 39). Les intervalles de confiance sont grands en raison du faible nombre d'isolats collectés chaque année. Aucune résistance au linézolide et à la vancomycine n'a été observée au fil des années, et la résistance à la mupirocine observée en 2012 n'a plus été détectée depuis 2015.

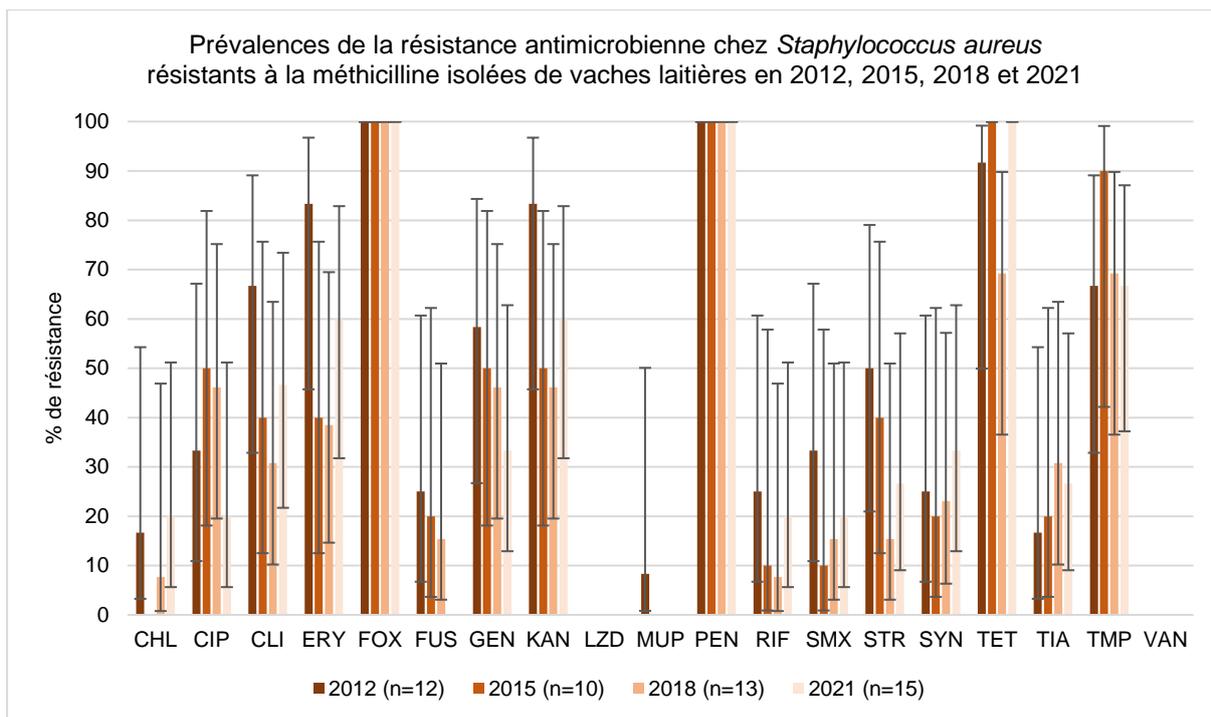


Figure 39. Prévalences de résistance observées chez les MRSA isolées de vaches laitières en 2012 (n=12), 2015 (n=10), 2018 (n=13) et 2021 (n=15).

Basées sur les cut-offs épidémiologiques selon le comité européen de la susceptibilité antimicrobienne (EUCAST) pour les antimicrobiens suivants : chloramphénicol (CHL), ciprofloxacine (CIP), clindamycine (CLI), érythromycine (ERY), céfoxitine (FOX), acide fusidique (FUS), gentamicine (GEN), kanamycine (KAN), linézolide (LZD), mupirocine (MUP), pénicilline (PEN), rifampicine (RIF), sulfaméthoxazole (SMX), streptomycine (STR), synergide (SYN), tétracycline (TET), tiamuline (TIA), triméthoprime (TMP) et vancomycine (VAN).

3.2.8.2. Profils de multirésistance observés chez les *Staphylococcus aureus* résistants à la méthicilline isolés de bovins

Les 98 souches confirmées MRSA présentait au minimum une résistance à 2 antibiotiques, la pénicilline et la céfoxitine, comme attendu. Une souche a été considérée multi-résistante lorsqu'elle résistait à minimum 3 familles d'antibiotiques différentes, à savoir **93.3%** des isolats de vaches laitières, **100%** des isolats de bovins viandeux et **100%** des isolats de veaux (Figure 40).

Toutes les souches provenant d'échantillons de veaux étaient multi-résistantes avec une majorité de souches résistantes à 6 (**49.4%**) ou 7 (**27.8%**) familles d'antimicrobiens différentes. Le profil de résistance le plus observé chez les veaux (n=28, **35.4%**) était : PEN-CLI-ERY-FOX-GEN-KAN-TET-TMP (voir Tableau 19). La majorité des MRSA provenant de vaches laitières résistaient à 4 (**20.0%**), 6 (**20.0%**) ou 7 (**40.0%**) familles d'antimicrobiens différentes. Parmi les isolats de bovins viandeux, **50.0%** des souches résistaient à 4 familles d'antibiotiques différentes tandis que l'autre moitié des isolats (**50.0%**) résistaient à 7 familles d'antibiotiques différentes. La multirésistance la plus élevée a été observée chez les veaux, avec **6.3%** (n=5), **1.3%** (n=1) et **2.5%** (n=2) de MRSA résistantes à 8, 9 ou 10 familles d'antimicrobiens, respectivement. La multirésistance observée chez les vaches laitières atteignait jusqu'à 8 familles différentes dans un seul isolat. A noter que les profils de multirésistance observés chez les vaches laitières et les bovins viandeux sont à considérer en fonction du nombre total d'isolats testés, à savoir respectivement 15 et 4.

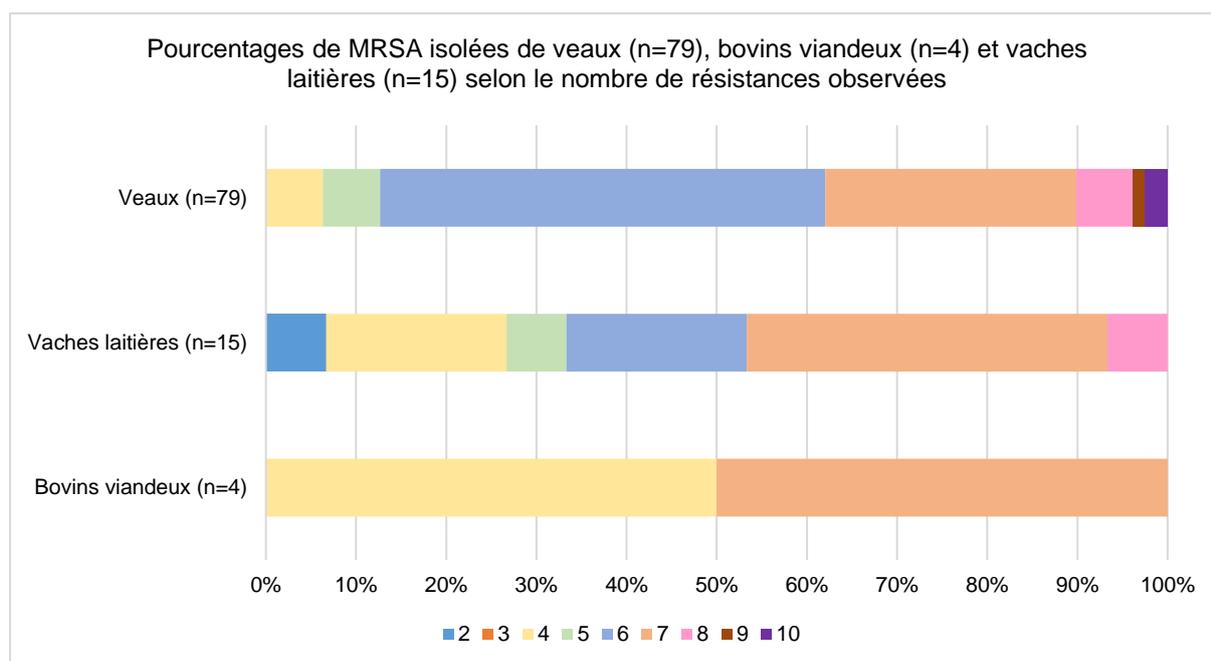


Figure 40. Pourcentages de MRSA isolées de veaux (n=79), bovins viandeux (n=4) et vaches laitières (n=15) selon le nombre de résistances observées.

La légende des couleurs indique le nombre de familles d'antibiotiques auxquels les souches résistent, l'abscisse indique le pourcentage de souches résistantes au nombre correspondant d'antibiotiques. Une souche est considérée comme multirésistante lorsqu'elle résiste à minimum 3 familles d'antibiotiques différentes. La résistance à la famille des bêta-lactames (pénicilline et céfoxitine) est comprise dans le calcul de multirésistance.

Tableau 19. Nombre de souches selon les différents profils de résistance observés par catégorie animale, chez les bovins en 2021.

Profil MDR	MDR	N total isolats	N Bovins viandeux	N Vaches laitières	N Veaux
PEN-CHL-CIP-CLI-ERY-FOX-SYN-TET-TIA-TMP	9	1	0	0	1
PEN-CHL-CLI-ERY-FOX-GEN-KAN-TET-TMP	7	1	0	0	1
PEN-CHL-CLI-ERY-FOX-GEN-TET-TMP	7	1	0	0	1
PEN-CHL-CLI-ERY-FOX-KAN-TET-TMP	7	1	0	0	1
PEN-CHL-CLI-ERY-FOX-SYN-TET-TIA-TMP	8	1	0	0	1
PEN-CHL-CLI-ERY-FOX-TET	5	1	0	0	1
PEN-CIP-CLI-ERY-FOX-GEN-KAN-TET-TMP	7	7	0	0	7
PEN-CIP-CLI-ERY-FOX-SYN-TET-TIA-TMP	8	1	0	0	1
PEN-CIP-CLI-ERY-FOX-TET-TMP	6	5	0	0	5
PEN-CIP-FOX-GEN-KAN-TET-TMP	5	1	0	1	0
PEN-CIP-FOX-TET-TMP	4	3	0	2	1
PEN-CLI-ERY-FOX-GEN-KAN-SYN-TET-TMP	7	5	0	1	4
PEN-CLI-ERY-FOX-GEN-KAN-TET-TMP	6	30	0	2	28
PEN-CLI-ERY-FOX-KAN-SYN-TET-TIA	7	1	0	1	0
PEN-CLI-ERY-FOX-KAN-TET-TMP	6	1	0	0	1
PEN-CLI-ERY-FOX-SYN-TET-TIA	6	1	0	0	1
PEN-CLI-ERY-FOX-SYN-TET-TIA-TMP	7	2	0	1	1
PEN-CLI-ERY-FOX-TET-TMP	5	4	0	0	4
PEN-CLI-FOX-SYN-TET-TIA-TMP	6	1	0	1	0
PEN-FOX-GEN-KAN-TET-TMP	4	6	2	1	3
PEN-FOX-TET	2	1	0	1	0
PEN-FOX-TET-TIA-TMP	4	1	0	0	1
SMX-PEN-CLI-ERY-FOX-GEN-KAN-SYN-TET-TMP	8	1	0	0	1
SMX-PEN-CLI-ERY-FOX-GEN-KAN-TET-TMP	7	3	0	0	3
SMX-PEN-CLI-ERY-FOX-TET-TMP	6	1	0	0	1
STR-PEN-CHL-CIP-CLI-ERY-FOX-GEN-KAN-TET-TMP	8	1	0	0	1
STR-PEN-CHL-CIP-CLI-ERY-FOX-KAN-TET-TMP	8	1	0	0	1
STR-PEN-CHL-CIP-CLI-ERY-FOX-SYN-TET-TIA-TMP	10	2	0	0	2
STR-PEN-CHL-CLI-ERY-FOX-KAN-TET	6	1	0	0	1
STR-PEN-CIP-CLI-ERY-FOX-GEN-KAN-TET-TMP	7	2	0	0	2
STR-PEN-CIP-CLI-ERY-FOX-TET-TMP	7	1	0	0	1
STR-PEN-CLI-ERY-FOX-GEN-KAN-TET-TMP	6	1	0	0	1
STR-PEN-CLI-ERY-FOX-SYN-TET-TIA-TMP	8	1	0	1	0
STR-PEN-CLI-ERY-FOX-TET-TMP	6	1	0	0	1
STR-SMX-PEN-CLI-ERY-FOX-GEN-KAN-TET-TMP	7	1	0	0	1
STR-SMX-RIF-PEN-CHL-ERY-FOX-KAN-TET	7	5	2	3	0

La colonne MDR « Multi-Drug resistance » correspond à la multirésistance à savoir le nombre de résistances observées à chaque famille d'antimicrobiens. La famille des bêta-lactames (pénicilline et céfoxitine) est incluse dans ce nombre MDR.

3.2.8.3. Investigation par NGS des *Staphylococcus aureus* résistants à la méthicilline isolés de bovins

- **Critères de sélection**

Une sélection de 44 isolats MRSA du monitoring de 2021 ont été séquencées sur base des critères de sélection suivants :

- i. Au sein de chaque catégorie de bovins, la sélection des isolats a inclus au moins un isolat de chaque profil phénotypique de multi-résistance observé entre Janvier et Novembre 2021. De plus cette sélection a inclus au moins un isolat de chaque *spa*-type observé durant la même période en 2021. Le but de cette sélection visait à couvrir la diversité de profils de résistance phénotypique observée parmi les isolats collectés en 2021 et d'investiguer la diversité génétique des déterminants de ces résistances.
- ii. Tous les isolats typés n'appartenant pas au CC398 (d'après la PCR CC398) ont été séquencés pour déterminer à quel complexe clonal et à quel *sequence-type* ils appartenaient.

- **Génotypage de la résistance antimicrobienne observée**

Tous les 44 isolats MRSA séquencés étaient résistants à la tétracycline et portaient au moins un gène de résistance à la tétracycline avec les profils de gènes de résistance suivants : *tet(38)-tet(K)-tet(M)* dans 18 isolats, *tet(38)-tet(L)-tet(M)* dans 16 isolats, *tet(38)-tet(M)* dans 6 isolats, *tet(38)-tet(K)-tet(L)-tet(M)* dans 3 isolats, et *tet(38)-tet(K)* dans 1 isolat (Tableau 20). Donc, tous les isolats séquencés sauf un isolat portaient le gène *tet(M)*, qui est typique des LA-MRSA (Tegegne et al., 2021). Il est à noter que le seul isolat qui ne portait pas le gène *tet(M)* était la souche MRSA qui avait le génotype CC1 ST1-t386 (Tableau 20).

Trente-cinq isolats résistants au triméthopime ont été séquencés. Tous portaient un gène de résistance au triméthopime : *dfrK* (n=27), *dfrG* (n=7) ou *dfrC* (n=1).

Trente-six isolats résistants à l'érythromycine ont été investigués par NGS : tous portaient au moins un gène *erm* ; 11 portaient *erm(T)*, 10 *erm(C)*, 7 *erm(A)*, 3 *erm(B)*, 3 *erm(C)* et *erm(T)*, 1 *erm(A)* et *erm(C)*, 1 *erm(B)* et *erm(C)*.

Parmi les 32 isolats séquencés qui étaient résistants à la clindamycine, tous portaient au moins un gène de résistance associé à cette résistance phénotypique : 1 portait *Inu(A)* et *erm(C)*; 6 portaient *Inu(B)* et *Isa(E)* dont 5 portaient également un gène *erm*: *erm(B)* (n=2) ou *erm(C)* (n=3); 1 portait *vga(A)LC* et *erm(C)*; 2 portaient *vga(E)* et *erm(A)* ; 1 *vga(E)*, *erm(A)* et *erm(C)*; 3 portaient *erm(C)* et *erm(T)*; 11 portaient uniquement *erm(T)* et 5 portaient uniquement *erm(C)*; 1 portait *erm(B)* et *erm(C)* et un dernier portait uniquement *erm(B)*. Cependant, certains gènes de résistance associés à la clindamycine ont également été observés dans la moitié (6/12) des isolats phénotypiquement sensibles à cette antibiotique : en effet, le gène *erm(A)* a été observé dans 5 isolats sensibles et le gène *vga(A)* dans un isolat sensible à la clindamycine (Tableau 20).

Treize isolats résistants à la combinaison quinupristine/dalfopristine (SYN, synergicide) ont été investigués génétiquement. Tous portaient au moins un gène de résistance connu pour être associé à la résistance aux streptogramines A (dont la dalfopristine) et/ou à la résistance aux streptogramines B (dont la quinupristine) : 6 portaient *Isa(E)* ainsi qu'un gène *erm* (*B*) (n=2) ou *erm(C)* (n=3); 1 portait *vga(E)*, *erm(A)* et *erm(C)*; 2 portaient *vga(E)* et *erm(A)*; 1 portait *vga(A)LC* et *erm(C)*; 2 portaient uniquement *erm(T)* et un portait uniquement *erm(C)*. Dans ces trois derniers isolats qui portaient uniquement un gène *erm*, un autre mécanisme de résistance non détecté est probablement également associé à la résistance au synergicide, étant donné que les gènes *erm* ne confèrent habituellement pas à eux seuls la résistance à la combinaison quinupristine/dalfopristine mais seulement la résistance aux streptogramines B. En effet, parmi les 31 isolats sensibles au synergicide séquencés, 24 portaient au moins un gène *erm*: 5 portaient *erm(A)*, 5 *erm(C)*, 3 *erm(C)* et *erm(T)*, 9 *erm(T)*, 1 *erm(B)*, 1 *erm(B)* et *erm(C)*. Un autre isolat sensible au synergicide portait *vga(A)*. Ce gène est connu pour conférer la résistance aux pleuromutilines (TIA), aux lincosamides (CLI) et aux streptogramines A (dalfopristine). La sensibilité au synergicide dans cette souche peut s'expliquer par l'absence de gènes de résistance aux streptogramines B.

Quant à la résistance à la tiamuline, 11 isolats avec cette résistance phénotypique ont été séquencés. Tous portaient un gène associé à cette résistance: 6 portaient *Isa(E)*, 3 portaient *vga(E)*, et les 2 derniers portaient respectivement *vga(A)* et *vga(A)LC*.

Tous les 13 isolats résistants à la ciprofloxacine qui ont été séquencés portaient une ou plusieurs mutations connues pour conférer ce phénotype résistant : *griA* p.S80F (n=1), *gyrA* p.S84L et *griA* p.S80F (n=10) et *gyrA* p.S84L et *griA* p.S80Y (n=2).

Une sélection d'isolats résistants aux aminoglycosides ont également été séquencés, ci-après les gènes de résistances correspondant à chacun des trois aminoglycosides analysés dans les tests de susceptibilités phénotypiques sont présentés, indépendamment pour chaque aminoglycoside : streptomycine, kanamycine et gentamicine.

Parmi les 15 isolats résistants à la streptomycine séquencés, 7 portaient le gène *str* et 8 portaient le gène *ant(6)-Ia* associés à la résistance à cet antibiotique.

Parmi les 17 isolats résistants à la gentamicine séquencés, 15 portaient le gène *aac(6')-aph(2'')*, un portait le gène *apmA* et dans le dernier isolat aucun gène de résistance associé à la gentamicine n'a été détecté. Le gène *aac(6')-aph(2'')* a été également détecté dans 5 souches phénotypiquement sensibles à la gentamicine, de même que le gène *apmA* dans une souche sensible. Le gène *apmA* est connu pour être associé à une susceptibilité réduite à la gentamicine.

Vingt-cinq isolats résistants à la kanamycine ont été séquencés, les profils suivants de gènes de résistance à la kanamycine ont été observés : 6 portaient le gène *aac(6')-aph(2'')*, 12 portaient les gènes *aac(6')-aph(2'')* et *aadD/ant(4')-Ia*, 5 portaient les gènes *aadD/ant(4')-Ia* et *aph(3')-III*, un isolat portait *aph(3')-III* seul. Dans le dernier isolat résistant à la kanamycine, aucun gène de résistance connu pour cet antibiotique n'a été détecté. Six souches sensibles à la kanamycine portaient des gènes connus pour être associés à la résistance à cet antibiotique : *aac(6')-aph(2'')* (n=1), *aac(6')-aph(2'')* et *aadD/ant(4')-Ia* (n=1) ou *aadD/ant(4')-Ia* (n=4).

Parmi les 15 souches résistantes au chloramphénicol, toutes portaient un gène de résistance aux phénicolés : 10 portaient le gène *fexA* et 5 portaient le gène *cat(pC194)/catA9*

Selon Griffith et al (2018), la résistance au sulfaméthoxazole est associée à des mutations dans le gène chromosomique *folP* codant pour une dihydroptéroate synthase chez *S. aureus*. Selon Nurjadi et al (2021), parmi les mutations dans ce gène qu'ils ont étudiées, seule la mutation F17L est clairement associée à un phénotype résistant. Cette mutation *folP_F17L*, accompagnée d'autres mutations et insertions/délétions a été observée dans 5 des 9 souches résistantes au sulfaméthoxazole séquencées. Les 4 dernières souches résistantes au sulfaméthoxazole, portent 2 mutations dans *folP* : *folP_V182I*, *folP_F266L*. Cependant, ces mutations sont aussi présentes dans des souches sensibles au sulfaméthoxazole (p. ex., VAR735). Ces mutations n'ont donc pas été listées dans le Tableau 20. La résistance phénotypique au sulfaméthoxazole dans ces 4 souches ne semble donc pas liée à des mutations dans *folP* ni aux marqueurs de résistance à cet antibiotique détectables par les outils actuellement disponibles

Enfin, la résistance à la rifampicine observée phénotypiquement dans 5 des 44 MRSA séquencés était associée à la présence des mutations *rpoB* p.H481N et *rpoB* p.S529L connues pour être associées à la résistance à cet antibiotique, observées dans les 5 souches.

Dans le Tableau 20, les gènes de résistance aux beta-lactames (dont la pénicilline et la céfoxitine) sont également listés. La présence du gène *mecA* a été confirmée par NGS dans tous les isolats séquencés (n=44). D'autres gènes de résistance qui ne sont pas connus pour être associés à la résistance aux antibiotiques testés phénotypiquement ont également été trouvés dans cette collection de souches. Il s'agit des gènes de résistance à la spectinomycine (*ant(9)-Ia* (n=12), *spw* (n=2) et *spd* (n=2)), à la bléomycine (*bleO* (n=5)), à la fosfomycine (*fosB-Saur* (n=5)) et à la streptothricine (*sat4* (n=6)).

Tableau 20. Liste des gènes de résistance identifiés par NGS par phénotype résistant observé dans les 44 isolats de MRSA séquencés en 2021.

Sciensano ID	Matrice animale	CC/ST/spa-type	FOX, PEN	CHL	CIP	CLI	ERY	GEN	KAN	STR	RIF	SMX	SYN ⁴	TET	TIA	TMP
VAR-737 (U2103597)	veaux	CC398 t011	mecA, blaZ, blal, blaR1	fexA	gyrA p.S84L, grlA p.S80F	erm(T)	erm(T)	aac(6')- aph(2'')	aac(6')-aph(2''), aadD/ant(4')-Ia	str			erm(T)	tet(L), tet(M), tet(38)		dfrK
VAR-738 (U2103892)	veaux	CC398 t011	mecA, blaZ, blal, blaR1		gyrA p.S84L, grlA p.S80F	erm(T)	erm(T)	aac(6')- aph(2'')	aac(6')-aph(2''), aadD/ant(4')-Ia	str			erm(T)	tet(L), tet(M), tet(38)		dfrK
VAR-739 (U2103988)	veaux	CC398 t011	mecA, blaZ, blal, blaR1	fexA		erm(C), erm(T)	erm(C), erm(T)	aac(6')- aph(2'')	aac(6')-aph(2''), aadD/ant(4')-Ia				erm(C), erm(T)	tet(L), tet(M), tet(38)		dfrK
VAR-740 (U2103994)	veaux	CC398 t011	mecA, blaZ, blal, blaR1			erm(T)	erm(T)	aac(6')- aph(2'')	aac(6')-aph(2''), aadD/ant(4')-Ia				erm(T) ⁴	tet(L), tet(M), tet(38)		dfrK
VAR-741 (U2104005)	veaux	CC398 t011	mecA, blaZ, blal, blaR1			erm(B)	erm(B)	apmA ²	aadD/ant(4')-Ia	str			erm(B)	tet(K), tet(L), tet(M), tet(38)		dfrK

Sciensano ID	Matrice animale	CC/ST/spa-type	FOX, PEN	CHL	CIP	CLI	ERY	GEN	KAN	STR	RIF	SMX	SYN ⁴	TET	TIA	TMP
VAR-742 (U2104109)	veaux	CC398 t011	mecA, blaZ, blal, blaR1		gyrA p.S84L, grlA p.S80F	erm(T)	erm(T)	aac(6')- aph(2'')	aac(6')-aph(2''), aadD/ant(4')-la	str			erm(T)	tet(L), tet(M), tet(38)		dfrK
VAR-746 (U2104231)	veaux	CC398 t011	mecA, blaZ, blal, blaR1			erm(T)	erm(T)	aac(6')- aph(2'')	aac(6')-aph(2''), aadD/ant(4')-la	str			erm(T),	tet(L), tet(M), tet(38)		dfrK
VAR-751 (U2103591)	veaux	CC398 t011	mecA, blaZ, blal, blaR1			erm(T)	erm(T)	aac(6')- aph(2'')	aac(6')-aph(2''), aadD/ant(4')-la				erm(T)	tet(L), tet(M), tet(38)		dfrK
VAR-752 (U2104159)	veaux	CC398 t011	mecA, blaZ, blal, blaR1			erm(T)	erm(T)	aac(6')- aph(2'')	aac(6')-aph(2''), aadD/ant(4')-la				erm(T)	tet(L), tet(M), tet(38)		dfrK
VAR-753 (U2104160)	veaux	CC398 t011	mecA, blaZ, blal, blaR1	fexA	gyrA p.S84L, grlA p.S80F	erm(T)	erm(T)	aac(6')- aph(2'')	aac(6')-aph(2''), aadD/ant(4')-la	str			erm(T)	tet(L), tet(M), tet(38)		dfrK
VAR-755 (U2105647)	veaux	CC398 t011	mecA, blaZ, blal, blaR1		gyrA p.S84L, grlA p.S80F	erm(C), erm(T)	erm(C), erm(T)	aac(6')- aph(2'')	aac(6')-aph(2''), aadD/ant(4')-la				erm(C), erm(T)	tet(L), tet(M), tet(38)		dfrK

Sciensano ID	Matrice animale	CC/ST/spa-type	FOX, PEN	CHL	CIP	CLI	ERY	GEN	KAN	STR	RIF	SMX	SYN ⁴	TET	TIA	TMP
VAR-756 (U2105934)	veaux	CC398 t011	mecA, blaZ, blal, blaR1				erm(T)	erm(T)	aac(6')-aph(2'')	aac(6')-aph(2''), aadD/ant(4')-Ia			erm(T)	tet(L), tet(M), tet(38)		dfrK
VAR-758 (U2106088)	veaux	CC398 t011	mecA, blaZ, blal				erm(T)	erm(T)	aac(6')-aph(2'')	aac(6')-aph(2'')			erm(T)	tet(L), tet(M), tet(38)		dfrK
VAR-759 (U2106089)	veaux	CC398 t011	mecA, blal, blaR1		gyrA p.S84L, grlA p.S80F									tet(K), tet(M), tet(38)		dfrK
VAR-764 (U2107178)	veaux	CC398 t011	mecA, blaZ, blal, blaR1			lnu(B), lsa(E), erm(B)	erm(B)						lsa(E), erm(B)	tet(K), tet(M), tet(38)	lsa(E),	
VAR-787 (U2111081)	veaux	CC398 t011	mecA, blaZ, blal, blaR1				erm(T)	erm(T)	aac(6')-aph(2'')	aac(6')-aph(2''), aadD/ant(4')-Ia			erm(T) ⁴	tet(L), tet(M), tet(38)		dfrK
VAR-788 (U2107174)	veaux	CC398 t011	mecA, blaZ, blal, blaR1	fexA			erm(C),	erm(C)					erm(C),	tet(K), tet(M), tet(38)		

Sciensano ID	Matrice animale	CC/ST/spa-type	FOX, PEN	CHL	CIP	CLI	ERY	GEN	KAN	STR	RIF	SMX	SYN ⁴	TET	TIA	TMP
VAR-793 (U2107851)	veaux	CC398 t011	mecA, blaZ, blaI, blaR1			erm(C), erm(T)	erm(C), erm(T)	aac(6')- aph(2'')	aac(6')-aph(2''), aadD/ant(4')-Ia				erm(C),erm(T)	tet(L), tet(M), tet(38)		dfrK
VAR-748 (U2104493)	veaux	CC398 t034	mecA, blaZ, blaI, blaR1			vga(A) ¹							vga(A) ¹	tet(M), tet(38)	vga(A) ¹	dfrC
VAR-757 (U2105971)	veaux	CC398 t034	mecA, blaZ, blaI, blaR1	fexA	gyrA p.S84L, grlA p.S80Y	lnu(B), lsa(E), erm(C)	erm(C)		aadD/ant(4')-Ia	ant(6)-Ia			lsa(E),erm(C),	tet(K), tet(M), tet(38)	lsa(E)	dfrG
VAR-761 (U2106769)	veaux	CC398 t034	mecA, blaZ/blaPC 1, blaI, blaR1		gyrA p.S84L, grlA p.S80F	vga(E), erm(A), erm(C),	erm(A), erm(C),						vga(E),erm(A), erm(C),	tet(K), tet(M), tet(38)	vga(E),	dfrG
VAR-762 (U2106854)	veaux	CC398 t034	mecA, blaZ, blaI, blaR1	fexA	gyrA p.S84L, grlA p.S80Y	lnu(B), lsa(E), erm(C),	erm(C)		aadD/ant(4')-Ia	ant(6)-Ia			lsa(E), erm(C),	tet(K), tet(M), tet(38)	lsa(E),	dfrG
VAR-795 (U2111310)	veaux	CC398 t034	mecA, blaZ/blaPC 1, blaI, blaR1	fexA		lnu(B), lsa(E),erm (C),	erm(C)						lsa(E), erm(C)	tet(K), tet(M), tet(38)	lsa(E),	dfrG

Sciensano ID	Matrice animale	CC/ST/spa-type	FOX, PEN	CHL	CIP	CLI	ERY	GEN	KAN	STR	RIF	SMX	SYN ⁴	TET	TIA	TMP
VAR-763 (U2107175)	veaux	CC398 t1451	mecA, blaI, blaR1		grlA p.S80F	erm(C)	erm(C)						erm(C),	tet(K), tet(M), tet(38)		dfrK
VAR-789 (U2111284)	veaux	CC398 t1456	mecA, blaZ, blaI, blaR1	fexA		erm(B), erm(C),	erm(B), erm(C),	apmA ²	aadD/ant(4')-Ia				erm(B), erm(C),	tet(K), tet(L), tet(M), tet(38)		dfrK
VAR-754 (U2104950)	veaux	CC398 t2370	mecA, blaZ, blaI, blaR1			erm(C),	erm(C)						erm(C),	tet(K), tet(M), tet(38)		dfrG
VAR-760 (U2106227)	veaux	CC398 t5210	mecA, blaZ, blaI, blaR1					aac(6')- aph(2'')	aac(6')-aph(2'')					tet(L), tet(M), tet(38)		dfrK
VAR-744 (U2104165)	veaux	CC398 t6228	mecA, blaZ, blaI, blaR1	fexA	gyrA p.S84L, grlA p.S80F	vga(A)L C,erm(C) ,	erm(C)						vga(A)LC,erm(C) ,	tet(K), tet(M), tet(38)	vga(A)L C	dfrK
VAR-708 (U2104228)	veaux	CC1 ST1 t386	mecA, blaZ, blaI, blaR1	fexA		erm(C),	erm(C)		aph(3')-III	ant(6)-Ia			erm(C),	tet(K), tet(38)		

Sciensano ID	Matrice animale	CC/ST/spa-type	FOX, PEN	CHL	CIP	CLI	ERY	GEN	KAN	STR	RIF	SMX	SYN ⁴	TET	TIA	TMP
VAR-735 (U2100664)	vaches laitières	CC398 t011	mecA, blaZ, blal, blaR1			Inu(B), lsa(E), erm(B)	erm(B)						lsa(E), erm(B)	tet(K), tet(L), tet(M), tet(38)	lsa(E),	dfrK
VAR-736 (U2100806)	vaches laitières	CC398 t011	mecA, blaZ, blal, blaR1			erm(C)	erm(C)	aac(6')- aph(2'')	aac(6')-aph(2'')				erm(C)	tet(M), tet(38)		dfrK
VAR-743 (U2104110)	vaches laitières	CC398 t011	mecA, blaZ, blal, blaR1					aac(6')- aph(2'')	aac(6')-aph(2'')					tet(M), tet(38)		dfrK
VAR-745 (U2104168)	vaches laitières	CC398 t011	mecA, blaZ, blal, blaR1			Inu(A), erm(C),	erm(C)	aac(6')- aph(2'')	aac(6')-aph(2'')				erm(C) ⁴	tet(L), tet(M), tet(38)		dfrK
VAR-747 (U2104396)	vaches laitières	CC398 t011	mecA, blaZ, blal, blaR1			vga(E), erm(A)	erm(A)	aac(6')- aph(2'')	aac(6')-aph(2'')				vga(E), erm(A)	tet(M), tet(38)	vga(E),	
VAR-750 (U2101854)	vaches laitières	CC398 t011	mecA, blaZ, blal, blaR1		gyrA p.S84L, grlA p.S80F									tet(K), tet(M), tet(38)		dfrK

Sciensano ID	Matrice animale	CC/ST/spa-type	FOX, PEN	CHL	CIP	CLI	ERY	GEN	KAN	STR	RIF	SMX	SYN ⁴	TET	TIA	TMP
VAR-797 (U2113751)	vaches laitières	CC398 t011	mecA, blaZ, blaI, blaR1		gyrA p.S84L, grlA p.S80F			aac(6')- aph(2'')	aac(6')-aph(2'')					tet(M), tet(38)		dfrK
VAR-749 (U2104786)	vaches laitières	CC398 t034	mecA, blaZ/blaPC 1, blaI, blaR1,			vga(E), erm(A)	erm(A)			str			vga(E), erm(A)	tet(K), tet(M), tet(38)	vga(E),	dfrG
VAR-796 (U2111832)	vaches laitières	CC398 t034	mecA, blaZ/blaPC 1, blaI, blaR1			lnu(B),ls a(E),							lsa(E) ⁵	tet(K), tet(M), tet(38)	lsa(E),	dfrG
VAR-707 (U2101255)	vaches laitières	CC8 ST239 t037	mecA, mecR1	cat(pC194)/ca tA9		erm(A)	erm(A)		aadD/ant(4')-la, aph(3')-III	ant(6)-la	rpoB p.H481N, rpoB p.S529L	folP_F17L ³	erm(A)	tet(K), tet(M), tet(38)		
VAR-785 (U2111075)	vaches laitières	CC8 ST239 t037	mecA, mecl, mecR, blaI, blaR1,	cat(pC194)/ca tA9		erm(A)	erm(A)		aadD/ant(4')-la, aph(3')-III	ant(6)-la	rpoB p.H481N, rpoB p.S529L	folP_F17L ³	erm(A)	tet(K), tet(M), tet(38)		
VAR-786 (U2111080)	vaches laitières	CC8 ST239 t037	mecA, mecl, mecR1, blaZ, blaI, blaR1	cat(pC194)/ca tA9		erm(A)	erm(A)		aadD/ant(4')-la, aph(3')-III	ant(6)-la	rpoB p.H481N, rpoB p.S529L	folP_F17L ³	erm(A)	tet(K), tet(M), tet(38)		

Sciensano ID	Matrice animale	CC/ST/spa-type	FOX, PEN	CHL	CIP	CLI	ERY	GEN	KAN	STR	RIF	SMX	SYN ⁴	TET	TIA	TMP
VAR-705 (U2101080)	bovins viandeux	CC8 ST239 t037	mecA, mecl, mecR1, blaZ/blaPC1, blaI, blaR1	cat(pC194)/catA9		erm(A)	erm(A)		aadD/ant(4')-Ia, aph(3')-III	ant(6)-Ia	rpoB p.H481N, rpoB p.S529L	folP_F17L ³	erm(A)	tet(K), tet(M), tet(38)		
VAR-706 (U2101184)	bovins viandeux	CC8 ST239 t037	mecA, mecl, mecR1, blaZ, blaI, blaR1	cat(pC194)/catA9		erm(A)	erm(A)		aadD/ant(4')-Ia, aph(3')-III	ant(6)-Ia	rpoB p.H481N, rpoB p.S529L	folP_F17L ³	erm(A)	tet(K), tet(M), tet(38)		
VAR-765 (U2107381)	bovins viandeux	CC398 t011	mecA, blaZ, blaI, blaR1											tet(M), tet(38)		dfrK

Le tableau est organisé par catégories de bovins puis par complexe clonal (CC) et spa-types et ensuite par numéro interne VAR croissant. Chaque case orangée correspond à la présence de la résistance phénotypique à l'antimicrobien cité, avec les antimicrobiens suivants : céfoxitine (FOX), pénicilline (PEN), chloramphénicol (CHL), ciprofloxacine (CIP), clindamycine (CLI), érythromycine (ERY), gentamicine (GEN), kanamycine (KAN), streptomycine (STR), rifampicine (RIF), sulfaméthoxazole (SMX), synergicide (SYN), tétracycline (TET), tiamuline (TIA), triméthoprime (TMP). Chaque gène (ou mutation) retrouvé par NGS est indiqué en dessous de chaque antimicrobien auquel il confère la résistance. Les gènes présents dans les cases blanches sont des gènes de résistance observés dans des souches dont le phénotype pour l'antibiotique correspondant était sensible. Le gène *aadD/ant(4')-Ia* est un seul et unique gène. De même, le gène *cat(pC194)* s'appelle aussi *catA9*.¹*vga(A)* confère la résistance aux pleuromutilines (TIA), aux lincosamides (CLI) et aux streptogramines A (dalfopristine).²*apmA* confère une susceptibilité réduite à la gentamicine. ³accompagnée de plusieurs autres mutations/indels. ⁴habituellement les gènes *erm* seuls ne confèrent pas la résistance au synergicide. ⁵*Isa(E)* confère la résistance aux pleuromutilines (TIA), lincosamides (CLI), et streptogramines A (dalfopristine). Aucun gène de résistance à la quinupristine (streptogramines B) n'a été détecté dans cette souche.

- **Facteurs de virulence**

Les facteurs de virulence détectés dans les 44 MRSA séquencées sont présentés dans le Tableau 21. La principale observation concernant ces facteurs de virulence est que les souches associées aux lignées humaines CA-MRSA (VAR-708) ou HA-MRSA (VAR 707, 785, 786, 705 et 706) portaient un nombre élevé de facteurs de virulence alors que les souches LA-MRSA en portaient un nombre beaucoup plus faible. Les 5 souches appartenant à la lignée HA-MRSA CC8-ST239-t037 portaient toutes les mêmes gènes de virulence dont les gènes *sak* et *scn* associés au cluster d'évasion immunitaire humain et plusieurs gènes associés à des toxines (*hlgA*, *hlgB*, *hlgC*, *lukD*, *lukE*, *sea*, *sek*, *seq*, *selw* et *selx*) et exoenzymes (*aur*, *splA*, *splB* et *splE*).

La souche VAR-708 isolée de veaux appartenant au CC1-ST1-t386 portait également de nombreux gènes de virulence: les gènes *sak* et *scn* et plusieurs gènes associés aux toxines (*hlgA*, *hlgB*, *hlgC*, *lukD*, *lukE*, *seh*, *selw* et *selx*) et exoenzymes (*aur*, *splA* et *splB*).

Les 38 MRSA associées au CC398 portaient toutes le gène *aur* mais pas d'autres gènes codant pour des exoenzymes. Le gène *aur* code pour l'aureolysine, une exoenzyme typique de *S. aureus* (Dubin, 2022). Aucune de ces souches ne portaient le gène *sak* et une seule portait le gène *scn* impliqué dans l'évasion du système immunitaire humain (VAR-754, une MRSA CC398 t2370 isolée de veaux). Toutes les MRSA CC398 portaient les gènes *hlgA*, *hlgB* et *hlgC* codant pour des toxines et toutes sauf une (VAR-759) portaient le gène *selw* codant pour une entérotoxine staphylococcique.

Les gènes *hlgA*, *B* et *C* sont connus pour être associés à des souches capables de coloniser les humains et les bovins. Cependant leur rôle dans la virulence de *S. aureus* n'est pas encore bien compris (Oliveira et al, 2018). Le gène *selw* n'est pas spécifique à l'homme ou à l'animal et sa présence dans la majorité des MRSA appartenant à la lignée CC398 a déjà été rapportée dans la littérature (Vrieling et al, 2020).

Tableau 21. Liste des facteurs de virulence identifiés par NGS dans les MRSA en 2021.

VAR ID	matrice	CC/ST/sp a-type	Exoenzymes				Evasion immunitaire humaine		toxines					toxines SE					
			aur	splA	splB	splE	sak	scn	hlgA	hlgB	hlgC	lukD	lukE	sea	sek	selw	selx	seq	seh
737	veaux	CC398 t011	X							X	X	X						X	
738	veaux	CC398 t011	X							X	X	X						X	
739	veaux	CC398 t011	X							X	X	X						X	
740	veaux	CC398 t011	X							X	X	X						X	
741	veaux	CC398 t011	X							X	X	X						X	
742	veaux	CC398 t011	X							X	X	X						X	
746	veaux	CC398 t011	X							X	X	X						X	
751	veaux	CC398 t011	X							X	X	X						X	
752	veaux	CC398 t011	X							X	X	X						X	
753	veaux	CC398 t011	X							X	X	X						X	
755	veaux	CC398 t011	X							X	X	X						X	
756	veaux	CC398 t011	X							X	X	X						X	
758	veaux	CC398 t011	X							X	X	X						X	
759	veaux	CC398 t011	X							X	X	X							
764	veaux	CC398 t011	X							X	X	X						X	
787	veaux	CC398 t011	X							X	X	X						X	
788	veaux	CC398 t011	X							X	X	X						X	
793	veaux	CC398 t011	X							X	X	X						X	

VAR ID	matrice	CC/ST/spa-type	Exoenzymes				Evasion immunitaire humaine		toxines					toxines SE					
			aur	splA	splB	splE	sak	scn	hlgA	hlgB	hlgC	lukD	lukE	sea	sek	selw	selx	seq	seh
748	veaux	CC398 t034	X							X	X	X						X	
757	veaux	CC398 t034	X							X	X	X						X	
761	veaux	CC398 t034	X							X	X	X						X	
762	veaux	CC398 t034	X							X	X	X						X	
795	veaux	CC398 t034	X							X	X	X						X	
763	veaux	CC398 t1451	X							X	X	X						X	
789	veaux	CC398 t1456	X							X	X	X						X	
754	veaux	CC398 t2370	X						X	X	X							X	
760	veaux	CC398 t5210	X							X	X	X						X	
744	veaux	CC398 t6228	X							X	X	X						X	
708	veaux	CC1 ST1 t386	X	X	X		X	X	X	X	X	X	X	X			X	X	X
735	vaches laitières	CC398 t011	X							X	X	X						X	
736	vaches laitières	CC398 t011	X							X	X	X						X	
743	vaches laitières	CC398 t011	X							X	X	X						X	
745	vaches laitières	CC398 t011	X							X	X	X						X	
747	vaches laitières	CC398 t011	X							X	X	X						X	
750	vaches laitières	CC398 t011	X							X	X	X						X	
797	vaches laitières	CC398 t011	X							X	X	X						X	
749	vaches laitières	CC398 t034	X							X	X	X						X	
796	vaches laitières	CC398 t034	X							X	X	X						X	
707	vaches laitières	CC8 ST239 t037	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
785	vaches laitières	CC8 ST239 t037	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
786	vaches laitières	CC8 ST239 t037	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
705	bovins viandeux	CC8 ST239 t037	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
706	bovins viandeux	CC8 ST239 t037	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
765	bovins viandeux	CC398 t011	X							X	X	X						X	

Le tableau est organisé par catégories de bovins (matrice) puis par complexe clonal (CC) et spa-types et ensuite par numéro interne VAR croissant. Les gènes de virulence détectés dans la collection de génomes de MRSA sont classés selon les catégories suivantes de facteurs de virulence qu'ils encodent: exoenzymes, facteurs de virulence impliqués dans l'évasion du système immunitaire humain, toxines et entérotoxines staphylococciques (SE). La croix dans chaque colonne indique la détection du gène de virulence indiqué en tête de colonne.

- **Typage MLST et cgMLST des MRSA n'appartenant pas au CC398**

En 2021, 6 MRSA isolées de bovins en Belgique n'appartenaient pas au complexe clonal CC398 d'après la PCR. Ceci a été confirmé par le NGS et leur complexe clonal ainsi que le sequence-type ont été caractérisés. Cinq souches appartenaient au complexe clonal CC8, au ST239 et spa-type t037 (n=2 bovins viandeux et n=3 vaches laitières). La sixième souche, isolée de veaux, a été caractérisée comme appartenant au CC1 ST1 et t386. Toutes les autres souches séquencées ont été confirmées comme appartenant au CC398 et les spa-types ont été confirmés par NGS.

Les 5 MRSA appartenant à la lignée CC8-ST239-t037 présentait le même phénotype de résistance « STR-SMX-RIF-PEN-CHL-ERY-FOX-KAN-TET » et les mêmes mutations associées à la résistance au sulfaméthoxazole et à la rifampicine (respectivement folP_F17L et rpoB p.H481N/rpoB p.S529L). Il est à noter d'ailleurs que ce sont les seules souches pour lesquelles une résistance phénotypique à la rifampicine a été observée durant ce monitoring en 2021. Ces 5 souches CC8-ST239-t037 portaient également toutes les mêmes gènes de virulence (Tableau 21). Vu les similitudes phénotypiques et génotypiques de ces 5 souches, un typage génétique plus précis, par cgMLST, a été réalisé afin d'évaluer leur degré de parenté. Comme illustré dans le Tableau 22, au maximum 13 allèles sur 2118 loci (0.006%) étaient différents entre ces 5 souches. Ces 5 souches sont probablement apparentées. Des investigations épidémiologiques seront effectuées ultérieurement à ce rapport.

Tableau 22. Nombre d'allèles différents entre les profils cgMLST des 5 isolats MRSA CC8 ST239 t037.

	cgmlst-VAR-786	cgmlst-VAR-785	cgmlst-VAR-707	cgmlst-VAR-706	cgmlst-VAR-705
cgmlst-VAR-786	0	2	13	6	2
cgmlst-VAR-785	2	0	13	6	2
cgmlst-VAR-707	13	13	0	9	13
cgmlst-VAR-706	6	6	9	0	6
cgmlst-VAR-705	2	2	13	6	0

Ce tableau de distances d'allèles a été calculé sur base des 2118 loci restants après avoir élevé les loci de basse qualité. Les chiffres indiquent le nombre d'allèles différents entre les profils cgMLST des 5 isolats.

3.2.8.4. Discussion

La prévalence des MRSA dans les fermes dans les différentes catégories de bovins est restée stable pendant la période 2012-2021. En 2021, celle-ci était très élevée chez les veaux (54.5%, n=79/145 ; IC95% [46.4-62.6%]), modérée chez les vaches laitières (11.7%, n=15/128 ; IC95% [6.1-17.3%]) et faible chez les bovins viandeux (4.7%, n=4/85 ; IC95% [1.8-11.5%]). Au total, 98 souches de MRSA ont été isolées et caractérisées.

Le complexe clonal CC398, principalement associé aux animaux de rente (LA-MRSA), était prédominant chez les veaux et vaches laitières. Chez les bovins viandeux il a été observé dans la moitié des souches (n=2/4). Comme observé en 2012, 2015 et 2018, le spa-type majoritaire en 2021 était t011. Chez les veaux, à l'exception d'une souche, toutes étaient associées au CC398 et aux spa-types t011 (n=65), t034 (n=6), t1451 (n=1), t1456 (n=1), t2346 (n=1), t2370 (n=1), t3423 (n=1), t5210 (n=1) et t6228 (n=1). Les spa-types t1451 et t3423 bien que peu fréquents, ont été retrouvés chez les bovins en 2012, 2015, 2018 et 2021. Les spa-types t2346, t2370 et t5210 ont par contre été observés pour la première fois chez les bovins en 2021.

Une souche isolée de veaux appartenait au CC1/ST1, présentant une cassette SCCmec IV (2B) et un spa-type t386. Cette combinaison CC1/t386-IV MRSA a été associée aux CA-MRSA (Deurenberg *et al.*, 2007) et a déjà été rapportée dans diverses études dans le monde et dans différents hôtes notamment dans les hôpitaux en Palestine (Hadyeh *et al.*, 2019), en Europe chez un hérisson (Ruiz-Ripa *et al.*, 2019) et dans d'autres isolats d'animaux ou d'humains isolés en Europe et au Moyen-Orient (Earls *et al.*, 2021). Cet isolat de veaux présentant un génotype CA-MRSA observé en 2021 lors de la surveillance en Belgique portait plusieurs gènes de virulence dont des gènes associés au cluster d'évasion immunitaire humain, plusieurs gènes associés à des toxines et à des exoenzymes. Il était par contre négatif génétiquement pour la toxine PVL. Il était résistant à 6 familles d'antibiotiques (STR-PEN-CHL-CLI-ERY-FOX-KAN-TET). C'est la première fois que ce spa-type t386 est observé dans le cadre du monitoring des MRSA chez les bovins en Belgique.

Parmi les 15 MRSA isolées de vaches laitières, 12 d'entre-elles appartenait au CC398 (dont 10 avaient un spa-type t011 et 2 un spa-type t034) et 3 appartenait au CC8/ST239 associé au spa-type t037. Chez les bovins viandeux (n=4), 2 présentaient un profil CC398/t011 tandis que les 2 souches restantes appartenait au CC8/ST239 et présentaient un spa-type t037. Le spa-type t037 a déjà été observé chez les bovins en 2012 et 2015 en Belgique.

La combinaison ST239/spa-type t037 est décrite dans la littérature pour être associée aux HA-MRSA et est observée partout dans le monde (Harris *et al.*, 2010). Au total, en 2021, 5 isolats appartenait à ce génotype HA-MRSA CC8-ST239-t037, 3 isolés de vaches laitières et 2 de bovins viandeux. Ils portaient tous les mêmes gènes de virulence dont les gènes *sak* et *scn* associés au cluster d'évasion immunitaire humain, plusieurs gènes associés à des toxines et exoenzymes mais pas ceux codant pour la toxine PVL. Ces isolats étaient résistants à 7 familles d'antibiotiques (profil phénotypique identique : « STR-SMX-RIF-PEN-CHL-ERY-FOX-KAN-TET »). Il est à noter que ce sont les seules souches pour lesquelles une résistance phénotypique à la rifampicine a été observée durant ce monitoring en 2021 et que la résistance à la rifampicine dans ces souches était associée aux mêmes mutations : *rpoB* p.H481N/*rpoB* p.S529L et a une MIC >0.5 mg/L (le changement d'ECOFF entre 2018 et 2021 pour cet antibiotique n'a pas eu d'impact sur l'interprétation de la résistance). D'après nos analyses génétiques approfondies (cgMLST), ces 5 souches seraient probablement apparentées. Une étude épidémiologique devra être réalisée afin d'investiguer cela.

Parmi les MRSA isolées de bovins en 2021, des résistances ont été détectées pour tous les antibiotiques, excepté pour le linézolide, l'acide fusidique, la mupirocine et la vancomycine. En effet, la résistance à la mupirocine observée en 2012 n'a plus été rapportée depuis 2015, dans toutes les catégories de bovins. Aucune souche résistante aux antibiotiques de derniers recours pour le traitement des infections humaines (i.e. linézolide et vancomycine) n'a été détectée au fil des ans chez les bovins (toutes catégories bovines confondues). Toutes les MRSA isolées, incluant les souches qui n'appartiennent pas au CC398, étaient résistantes à la céfoxitine, à la pénicilline, comme attendu pour des MRSA, et à la tétracycline, alors que la résistance à la tétracycline est en général associée aux LA-MRSA. La résistance à la tétracycline observée dans les souches CA ou HA-MRSA pourrait avoir été acquise chez l'animal mais cette hypothèse devrait être étudiée plus en profondeur. Cette hypothèse est d'autant plus probable pour les souches CC8-ST239-t037 car celles-ci portaient le gène *tet(M)*, qui est typique des LA-MRSA (Tegegne *et al.*, 2021). Par contre, la souche de génotype CC1 ST1-t386 ne portait par contre pas ce gène *tet(M)*. A l'inverse, la présence des gènes du cluster d'évasion du système immunitaire humain détectés dans les souches CA et HA-MRSA isolées en 2021 suggère un passage récent de l'homme à l'animal.

Entre 2012 et 2021, des diminutions significatives de pourcentages de résistance ont été observées pour certains antibiotiques parmi les isolats de veaux. Le faible nombre d'isolats collectés chaque année chez les vaches laitières et les bovins viandeux n'a pas permis d'évaluer s'il y avait des changements significatifs dans les prévalences de résistance pour ces catégories de bovins.

Chez les MRSA isolées de veaux, une diminution significative de la prévalence de la résistance a été observée en 2021 par rapport à 2012 pour la ciprofloxacine (-14.7%, de 42.6% à 27.9%), l'acide fusidique (-23.4%, 23.4 à 0.0%), la mupirocine (-6.4%, 6.4% à 0.0%), la rifampicine (-6.4%, 6.4% à 0.0%), le sulfaméthoxazole (-17.9%, de 25.5% à 7.6%) et la streptomycine (-47.8%, de 61.7% à 13.9%). Malgré une diminution significative du taux de résistance à la clindamycine (-10.5%, de 99.1% à 88.6%) et à l'érythromycine (-13.5%, de 98.3% à 84.8%) observée chez les veaux entre 2015 et 2018, ces résistances n'ont significativement pas changées depuis 2018. Les taux de résistance à la gentamicine et à la kanamycine semblaient stagner (non-significatif) chez les veaux en 2021, malgré la diminution significative (-26.5%, de 89.4% à 62.9% ; et -23.0%, de 89.4% à 66.4% respectivement) qui avait été observée entre 2012 et 2015 (voir Figure 37).

En 2021, à l'exception d'une souche, toutes les MRSA étaient multirésistantes à un nombre variant de 4 à 10 familles d'antimicrobiens différentes et incluant les bêta-lactames. La multirésistance observée était plus élevée chez les veaux et les vaches laitières, avec un maximum atteignant des résistances à 10 et 8 familles d'antimicrobiens différentes respectivement ; tandis que la multirésistance maximale

observée chez les bovins viandeux atteignait 7 résistances différentes. Parmi les 98 MRSA analysées, 36 phénotypes différents ont été observés. Ainsi, le profil de résistance le plus fréquemment observé (n=30, 28 veaux et 2 vaches laitières) en 2021 était : PEN-CLI-ERY-FOX-GEN-KAN-TET-TMP. Deux MRSA isolées de veaux résistaient à 10 familles d'antimicrobiens différentes et étaient caractérisées par le phénotype suivant : STR-PEN-CHL-CIP-CLI-ERY-FOX-SYN-TET-TIA-TMP (voir Tableau 19).

En plus de la caractérisation approfondie des souches CA et HA-MRSA ainsi que des facteurs de virulence associés, le NGS a permis d'identifier la diversité de marqueurs génétiques de la résistance observée dans un échantillon d'isolats de 2021 sélectionné pour être le plus varié possible.

Pour certains antibiotiques, particulièrement pour la clindamycine mais pas exclusivement, des profils variés de gènes de résistance codant pour la résistance à un même antibiotique ont été observés.

Dans cette petite collection de souches séquencées, la résistance à la ciprofloxacine, à la rifampicine et au sulfométhoxazole était associée à des mutations connues pour causer ces résistances. Aucun gène de résistance transférable connu pour la résistance à ces antibiotiques n'a été détecté dans cette collection de MRSA.

Le NGS permet de déterminer si les résistances détectées phénotypiquement peuvent potentiellement ou non être transférées à d'autres bactéries : les mutations seront transmises à leur descendance tandis que les gènes de résistance peuvent être mobilisés et transférés plus largement à d'autres bactéries. Ces résultats apportent donc des informations clés supplémentaires à la surveillance de l'antibiorésistance et complémentaires aux tests de susceptibilités phénotypiques.

Nos résultats de séquençage ont montré que la présence d'un gène de résistance n'est pas toujours associée à un phénotype résistant, comme cela a notamment été observé pour certaines souches sensibles à la clindamycine ou à la gentamicine ou la kanamycine. Cela rappelle que la détection d'un gène de résistance ne signifie pas que ce gène sera exprimé et que la souche qui le porte aura un phénotype résistant.

Aussi, les bases de données actuelles de gènes de résistance ou de mutations connues pour conférer la résistance aux antibiotiques ne sont pas toujours complètes ou certains mécanismes de résistance sont encore inconnus. Ceci a pour conséquence que dans certains cas, la prédiction de la résistance aux antibiotiques sur base du séquençage n'est pas parfaite. Ceci a été observé ici notamment pour les 3 isolats résistants au synergide qui portaient uniquement un gène *erm*, alors que ces gènes ne confèrent habituellement pas à eux seuls la résistance au synergide. De même, aucun gène de résistance connu pour être associé au phénotype correspondant n'a été détecté dans un isolat résistant à la gentamicine et un autre résistant à la kanamycine. Aussi, les déterminants de la résistance au sulfaméthoxazole ne sont pas tous inclus dans les bases de données actuelles telles que PointFinder et ResFinder. La prédiction de la résistance à cet antibiotique sur base des séquences génomiques est donc peu aisée et malgré une analyse génomique approfondie, certaines souches résistantes au sulfaméthoxazole seraient non détectées si des analyses phénotypiques ne sont pas réalisées en complément du NGS, comme observé ici pour 4 des 9 isolats résistants au sulfaméthoxazole. Au global, sans compter les phénotypes résistants à la pénicilline et à la céfoxitine et en comptant individuellement les phénotypes de résistance aux 3 molécules d'aminoglycosides (streptomycine, kanamycine et gentamicine), 270 phénotypes individuels de résistance ont été observés dans les 44 MRSA séquencés. La présence de gènes de résistance ou de mutations expliquant le phénotype résistant a été observée dans 96.7% (n=261/270) des phénotypes individuels observés.

La présence de MRSA chez les animaux producteurs de denrées alimentaires, en particulier lorsqu'il s'agit de souches associées aux lignées CA ou HA-MRSA porteuses de nombreux gènes de virulence, représente un risque pour la santé publique. De plus, le nombre élevé de souches multirésistantes parmi les MRSA isolées d'animaux (99.0%, n=97/98 chez les isolats de bovins en 2021) est également important pour la santé publique. En plus du caractère zoonotique des MRSA, les MRSA constituent également un risque de santé publique en tant que réservoir de gènes de résistance. Il est donc essentiel de continuer à surveiller la résistance et multirésistance au sein des MRSA isolées d'animaux.

3.2.9. Surveillance antimicrobienne d'*Enterococcus faecium* et *Enterococcus faecalis* isolées à partir de faeces de poulets de chair, de dindes, de poules reproductrices, de poules pondeuses, de veaux et de porcs

3.2.9.1. Prévalences d'*Enterococcus faecalis* et *Enterococcus faecium* isolées à partir d'échantillons de poulets de chair, dindes, poules reproductrices, poules pondeuses, veaux et porcs.

À partir de 303 échantillons de poulets de chair, *E. faecalis* a été isolée dans 204 échantillons (**67.3%**) et *E. faecium* dans 160 échantillons (**52.8%**). Au sein d'échantillons de poules pondeuses et poules reproductrices, *E. faecium* a été plus souvent isolée qu'*E. faecalis*. Sur 165 échantillons de poules reproductrices, *E. faecium* a été isolée dans 128 échantillons (**77.6%**) et *E. faecalis* dans 28 échantillons (**17.0%**). De même, sur 250 échantillons de poules pondeuses, *E. faecium* a été isolée dans 181 de ces échantillons (soit **72.4%**) et *E. faecalis* dans 78 (soit **31.2%**). Parmi 301 échantillons de veaux, *E. faecium* a été isolée dans **61.8%** de ces échantillons (N=186) tandis qu'*E. faecalis* a été isolée dans **35.5%** des cas (N=107). A partir de 300 échantillons de porcs, *E. faecium* a été isolée jusqu'à 3 fois plus souvent que *E. faecalis* avec N=183 (**61.0%**) et N=58 (**19.3%**) respectivement (voir Figure 41).

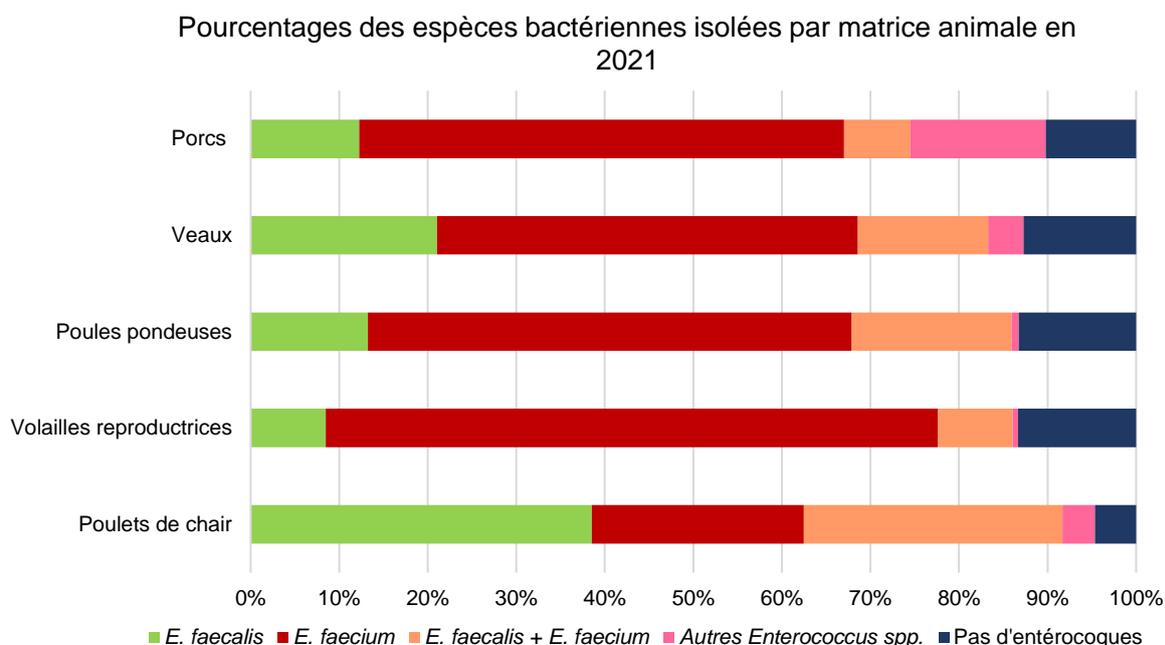


Figure 41. Prévalences d'isolement d'*Enterococcus faecalis* et *Enterococcus faecium* selon la matrice animale en 2021.

3.2.9.2. Résistance antimicrobienne chez *Enterococcus faecium* et *Enterococcus faecalis* isolées à partir d'échantillons de poulets de chair, dindes, poules reproductrices et poules pondeuses.

- Echantillons de poulets de chair récoltés à l'abattoir

Un total de 329 tests de susceptibilité aux antimicrobiens a été réalisé après isolement d'*Enterococcus faecalis* (N=169) et *Enterococcus faecium* (N=160) à partir d'échantillons de poulets de chair.

Au sein de ces échantillons, des niveaux de résistance extrêmement élevés ont été observés pour l'érythromycine, la quinupristine/dalfopristine et la tétracycline. En effet, **91.1%** de *E. faecalis* et **70.0%** des *E. faecium* ont montré une résistance à la tétracycline ; ainsi que **81.7%** des souches *E. faecalis* et **71.9%** des souches *E. faecium* à l'érythromycine ; et **81.3%** des souches *E. faecium* résistantes à la quinupristine/dalfopristine. De plus, l'occurrence de la résistance à l'ampicilline était modérée, observée

dans **18.8%** des souches *E. faecium*, uniquement. Les niveaux de résistance observés au chloramphénicol (**1.2%** et **2.5%**) et à la ciprofloxacine (**1.2%** et **3.8%**) étaient faibles, respectivement chez *E. faecalis* et *E. faecium*.

De même, observée uniquement chez *E. faecalis*, la résistance à la gentamicine était très faible (**0.6%**). Suite à la modification du seuil de résistance (de 4 à 8 mg/L) à la daptomycine appliqué pour *E. faecium*, cette résistance auparavant observée était absente des souches isolées de poulets de chair en 2021. La résistance à la daptomycine était également absente chez *E. faecalis*. Une souche *E. faecalis* isolée d'échantillons de poulets de chair présentait une résistance au linézolide, caractérisée par une concentration minimale inhibitrice de 8 mg/L. Aucune résistance à la teicoplanine, à la tigécycline ou à la vancomycine n'a été observée chez les poulets de chair en 2021 (voir Figure 42).

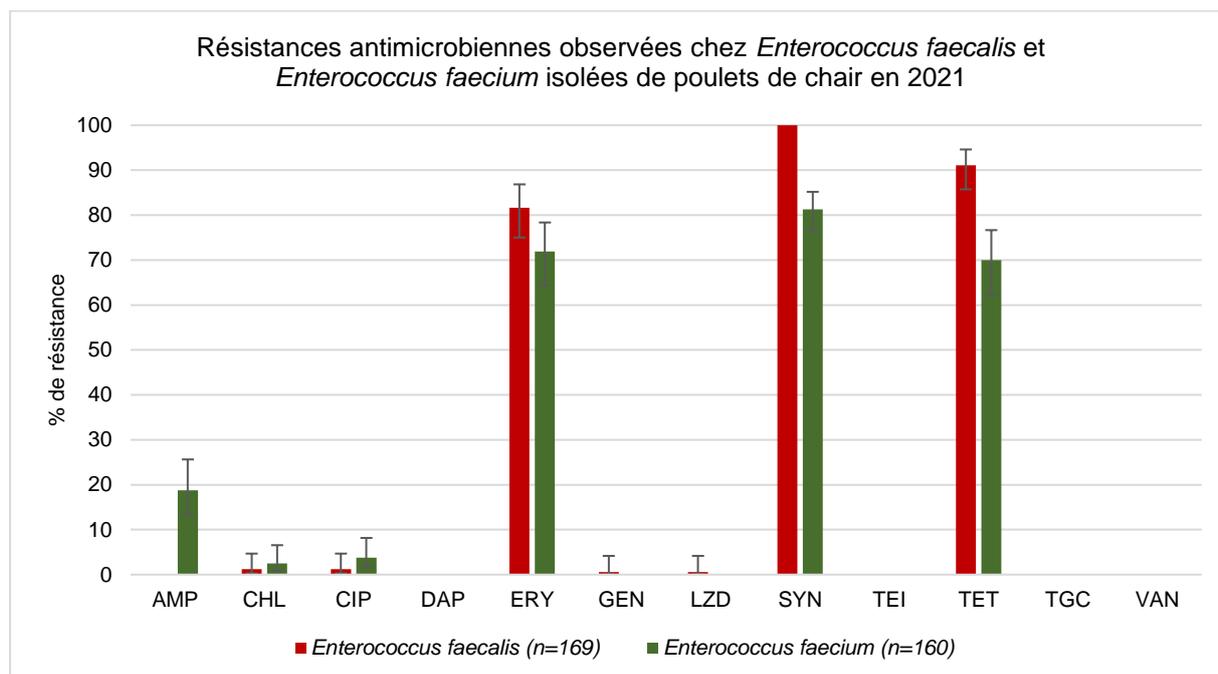


Figure 42. Pourcentages de résistance aux antimicrobiens chez *Enterococcus faecalis* (N=169) et *Enterococcus faecium* (N=160) isolées de poulets de chair à l'abattoir en 2021.

Basés sur les cut-offs épidémiologiques selon le comité européen de la susceptibilité antimicrobienne (EUCAST) pour les antimicrobiens suivants : ampicilline (AMP), chloramphénicol (CHL), ciprofloxacine (CIP), daptomycine (DAP), érythromycine (ERY), gentamicine (GEN), linézolide (LZD), quinupristine/dalfopristine (synercid, SYN), teicoplanine (TEI), tétracycline (TET), tigécycline (TGC) et vancomycine (VAN).

- Echantillons de poules reproductrices récoltés à la ferme

Un total de 153 tests de susceptibilité aux antimicrobiens a été réalisé après isolement d'*Enterococcus faecalis* (N=28) et *Enterococcus faecium* (N=125) à partir d'échantillons de poules reproductrices.

Au sein des échantillons isolés de poules reproductrices, un taux de résistance extrêmement élevé à la tétracycline (**75.0%**) et élevé à l'érythromycine (**32.1%**) ont été observés chez *E. faecalis*. Chez *E. faecium*, un taux de résistance extrêmement élevé à la quinupristine/dalfopristine (**84.8%**) a été observé ainsi qu'un taux élevé à la tétracycline (**44.0%**) et modéré à l'érythromycine (**12.8%**). Un taux modéré de résistance à l'ampicilline (**10.4%**) a également été observé au sein de souches *E. faecium* uniquement, cette résistance étant absente chez *E. faecalis*. Un taux de résistance très faible au chloramphénicol a été observé chez *E. faecium* (**0.8%**), cette résistance était absente chez *E. faecalis*. De même, un faible taux de résistance à la ciprofloxacine (**8.0%**) a été observé chez *E. faecium*, uniquement. Aucune résistance à la gentamicine n'a été observée au sein des souches isolées de poules reproductrices en 2021.

Suite à la modification du seuil de résistance (de 4 à 8 mg/L) à la daptomycine chez *E. faecium*, cette résistance auparavant observée était absente des souches isolées de poules reproductrices en 2021.

Cette résistance était également absente chez *E. faecalis*. Une souche *E. faecalis* isolée d'échantillons de poules reproductrices présentait une résistance au linézolide, caractérisée par une concentration minimale inhibitrice de 8 mg/L. Aucune résistance à la teicoplanine, à la tigécycline ou à la vancomycine n'a été observée chez les poules reproductrices en 2021 (voir Figure 43).

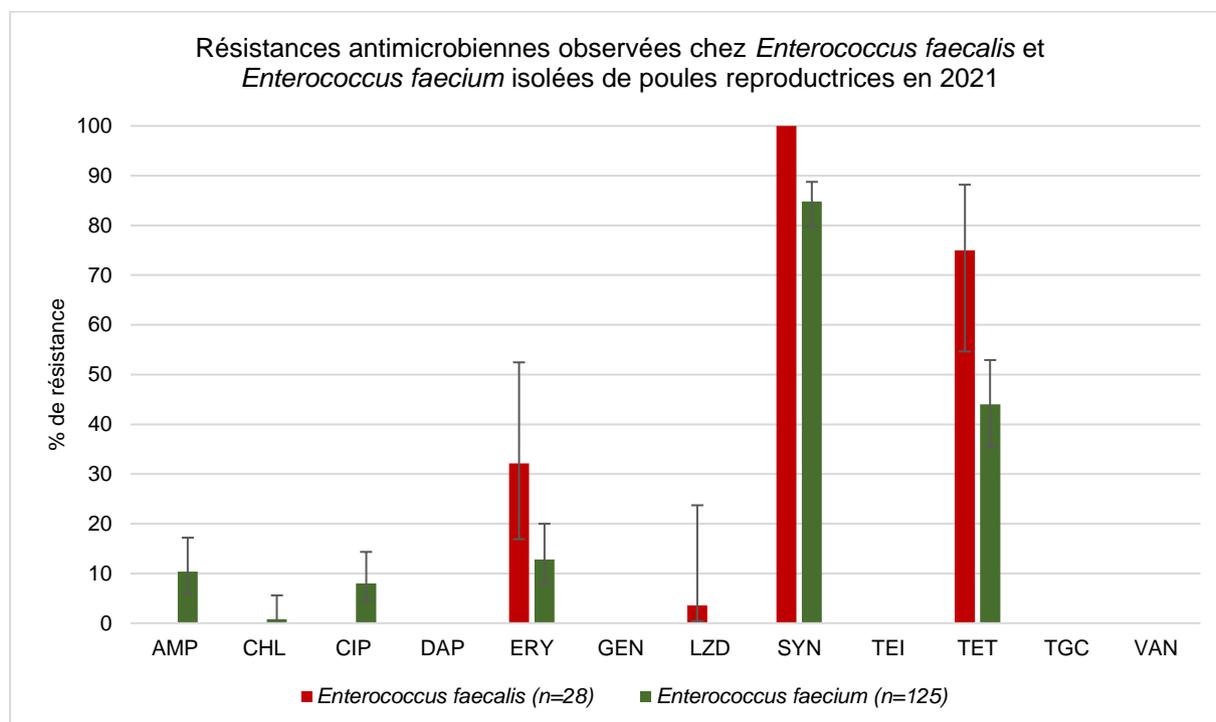


Figure 43. Pourcentages de résistance aux antimicrobiens chez *Enterococcus faecalis* (N=28) et *Enterococcus faecium* (N=125) isolées de poules reproductrices à la ferme en 2021.

Basés sur les cut-offs épidémiologiques selon le comité européen de la susceptibilité antimicrobienne (EUCAST) pour les antimicrobiens suivants : ampicilline (AMP), chloramphénicol (CHL), ciprofloxacine (CIP), daptomycine (DAP), érythromycine (ERY), gentamicine (GEN), linézolide (LZD), quinupristine/dalfopristine (synercid, SYN), teicoplanine (TEI), tétracycline (TET), tigécycline (TGC) et vancomycine (VAN).

- Échantillons de poules pondeuses récoltés à la ferme

Un total de 249 tests de susceptibilité aux antimicrobiens a été réalisé après isolement d'*Enterococcus faecalis* (N=78) et *Enterococcus faecium* (N=171) à partir d'échantillons de poules pondeuses.

Un taux de résistance très élevé à la tétracycline (**51.3%**) et élevé à l'érythromycine (**28.2%**) a été observé chez *E. faecalis*. Au sein des souches *E. faecium*, un taux de résistance très élevé à la quinupristine/dalfopristine (**57.9%**), ainsi qu'un taux modéré à la tétracycline (**14.6%**) et à l'érythromycine (**12.9%**) ont été observés. De plus, de faibles taux de résistance au chloramphénicol et à la gentamicine ont également été retrouvés chez *E. faecalis* uniquement (**3.8%** et **1.3%** respectivement). De même, de faibles taux de résistance à l'ampicilline (**7.0%**) et à la ciprofloxacine (**5.3%**) ont été observés chez *E. faecium* uniquement (voir Figure 44).

Suite à la modification du seuil de résistance (de 4 à 8 mg/L) à la daptomycine chez *E. faecium*, cette résistance auparavant observée était absente des souches isolées de poules pondeuses tandis qu'un faible taux de résistance (**1.3%**) a été observée chez *E. faecalis* en 2021. Aucune résistance au linézolide, à la teicoplanine, à la tigécycline ou à la vancomycine n'a été observée chez les poules pondeuses en 2021.

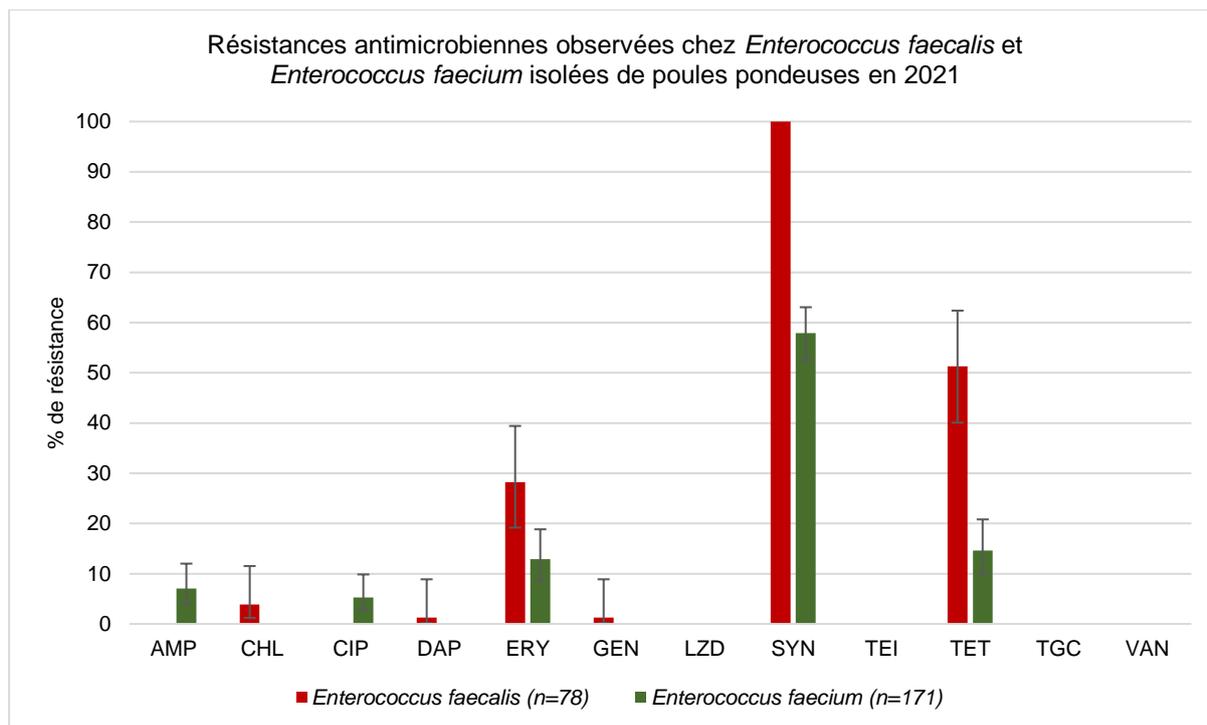


Figure 44. Pourcentages de résistance aux antimicrobiens chez *Enterococcus faecalis* (N=78) et *Enterococcus faecium* (N=171) isolées de poules pondeuses à la ferme en 2021.

Basés sur les cut-offs épidémiologiques selon le comité européen de la susceptibilité antimicrobienne (EUCAST) pour les antimicrobiens suivants : ampicilline (AMP), chloramphénicol (CHL), ciprofloxacine (CIP), daptomycine (DAP), érythromycine (ERY), gentamicine (GEN), linézolide (LZD), quinupristine/dalfopristine (synercid, SYN), teicoplanine (TEI), tétracycline (TET), tigécycline (TGC) et vancomycine (VAN).

3.2.9.3. Résistance antimicrobienne chez *Enterococcus faecium* et *Enterococcus faecalis* isolées à partir d'échantillons de veaux

Un total de 277 tests de susceptibilité aux antimicrobiens a été réalisé après isolement d'*Enterococcus faecalis* (N=107) et *Enterococcus faecium* (N=170) à partir des échantillons de veaux.

Au sein des échantillons de veaux, des taux de résistance extrêmement élevés ont été observés pour la tétracycline (**96.3%**) et l'érythromycine (**82.2%**) chez *E. faecalis*. En ce qui concerne la résistance à la quinupristine/dalfopristine, bien qu'elle soit intrinsèque chez *E. faecalis*, le taux était de **99.1%** chez *E. faecalis* isolées de veaux, sur base du seuil de résistance fixé à > 0.5 mg/L par l'EFSA (<https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.2903/sp.efsa.2021.EN-6652>). Des taux de résistance extrêmement élevés à la quinupristine/dalfopristine (**76.5%**), et élevés à la tétracycline (**41.8%**) et l'érythromycine (**34.7%**) ont été observés chez *E. faecium*. Contrairement à un taux de résistance élevé observé chez *E. faecalis* (**44.9%**), la résistance au chloramphénicol était absente chez *E. faecium*.

Un taux de résistance modéré à la gentamicine (**10.3%**) a été observé chez *E. faecalis* tandis que celui-ci était faible chez *E. faecium* (**2.9%**). Les taux de résistance observés à la ciprofloxacine étaient faibles chez *E. faecalis* et *E. faecium* (**5.6%** et **4.1 %** respectivement), ainsi que le taux de résistance à l'ampicilline (**7.1%**) observé chez *E. faecium* uniquement (voir

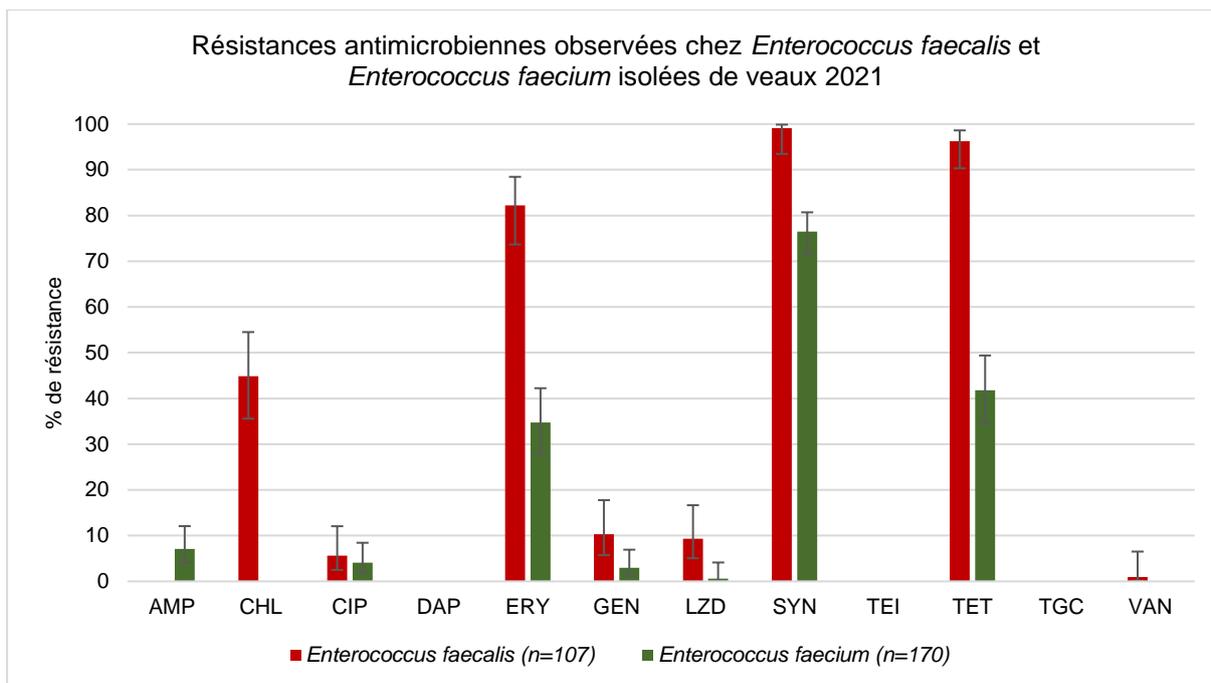


Figure 45).

Suite à la modification du seuil de résistance (de 4 à 8 mg/L) à la daptomycine chez *E. faecium*, cette résistance était absente des souches *E. faecium*, ainsi que des souches *E. faecalis* isolées de veaux en 2021. Au total, 11 souches (10 *E. faecalis* et 1 *E. faecium*) ont montré une résistance au linézolide, caractérisées par une concentration minimale inhibitrice de 8 mg/L. Une souche *E. faecalis* a montré une résistance à la vancomycine, caractérisée par une concentration minimale inhibitrice de 8 mg/L. Aucune résistance à la teicoplanine ou à la tigécycline n'a été observée en 2021.

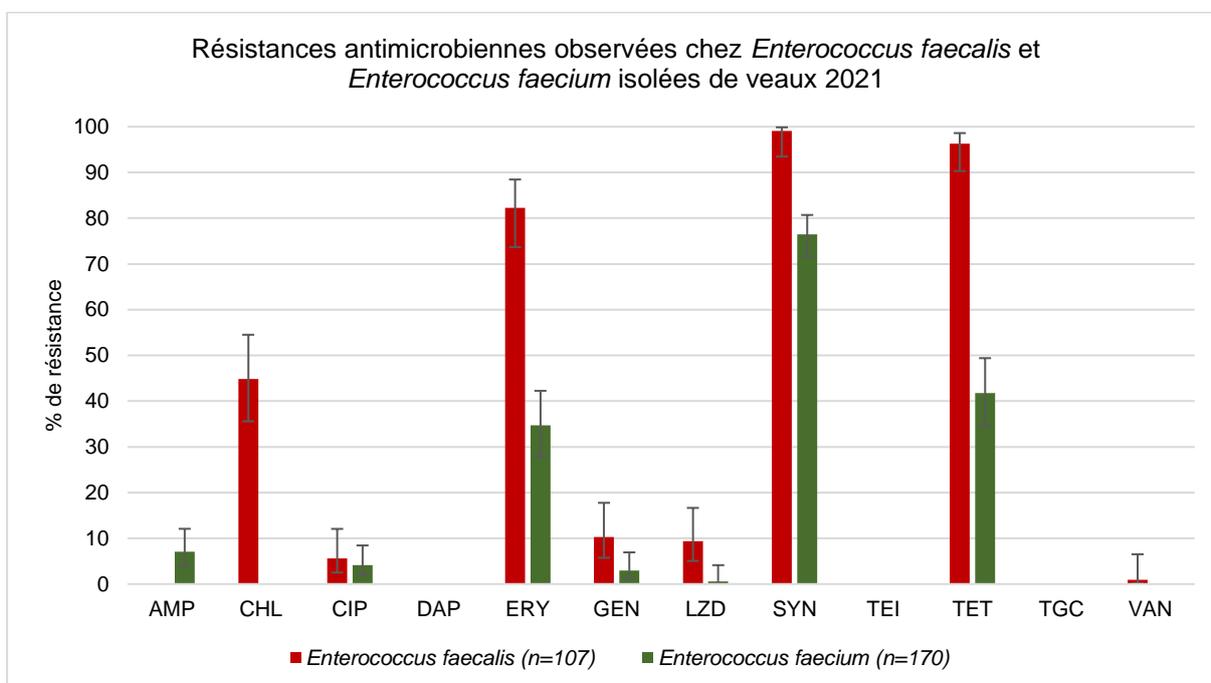


Figure 45. Pourcentages de résistance aux antimicrobiens chez *Enterococcus faecalis* (N=107) et *Enterococcus faecium* (N=170) isolées de veaux à l'abattoir en 2021.

Basés sur les cut-offs épidémiologiques selon le comité européen de la susceptibilité antimicrobienne (EUCAST) pour les antimicrobiens suivants : ampicilline (AMP), chloramphénicol (CHL), ciprofloxacine (CIP), daptomycine (DAP), érythromycine (ERY), gentamicine (GEN), linézolide (LZD), quinupristine/dalfopristine (synercid, SYN), teicoplanine (TEI), tétracycline (TET), tigécycline (TGC) et vancomycine (VAN).

3.2.9.4. Résistance antimicrobienne chez *Enterococcus faecium* et *Enterococcus faecalis* isolées à partir d'échantillons de porcs

Un total de 233 tests de susceptibilité aux antimicrobiens a été réalisé après isolement d'*Enterococcus faecalis* (N=57) et *Enterococcus faecium* (N=176) à partir d'échantillons de porcs.

Au sein des échantillons de porcs, un taux de résistance très élevé à la tétracycline (**57.9%**), et un taux de résistance élevé à l'érythromycine (**22.8%**) ont été observés chez *E. faecalis*. Chez *E. faecium*, un pourcentage de résistance extrêmement élevé à la quinupristine/dalfopriline (**81.3%**) et élevé à la tétracycline (**48.3%**) ont été observés, tandis que le taux de résistance à l'érythromycine était faible (**9.7%**). Le taux de résistance observé au chloramphénicol était faible chez *E. faecalis* (**7.0%**) tandis qu'aucune résistance n'a été observée chez *E. faecium*. Un taux de résistance faible à l'ampicilline (**5.7%**) a été observé chez *E. faecium* tandis qu'aucune résistance n'a été observée chez *E. faecalis*. De plus, un taux de résistance faible à la gentamicine (**1.8%**) a été observé chez *E. faecalis* tandis que cette résistance était absente chez *E. faecium*. Enfin, les taux de résistance à la ciprofloxacine (**1.8%** et **1.1%**) étaient faibles chez *E. faecalis* et *E. faecium* respectivement (voir

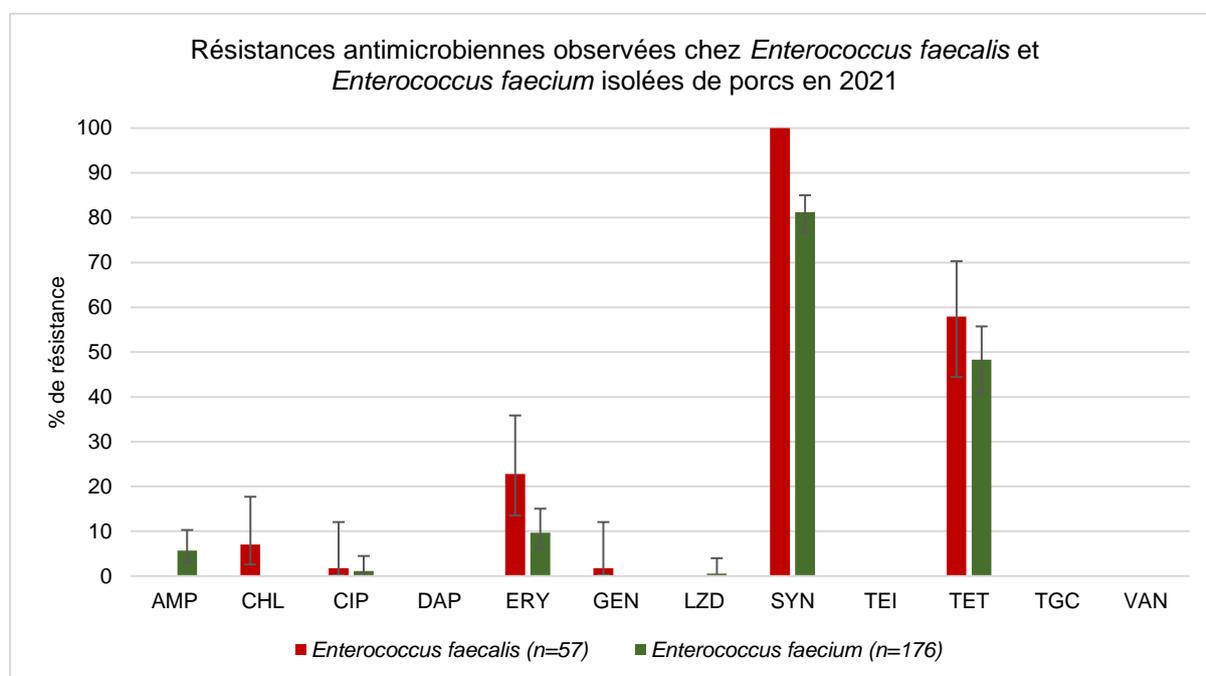


Figure 46).

Suite à la modification du seuil de résistance (de 4 à 8 mg/L) à la daptomycine chez *E. faecium*, cette résistance était absente des souches *E. faecium*, ainsi que des souches *E. faecalis*, isolées de porcs. En 2021, une souche *E. faecium* isolée d'échantillons de porcs a montré une résistance au linézolide, caractérisée par une concentration minimale inhibitrice de 8 mg/L. Aucune résistance à la teicoplanine, à la tigécycline ou à la vancomycine n'a été observée en 2021.

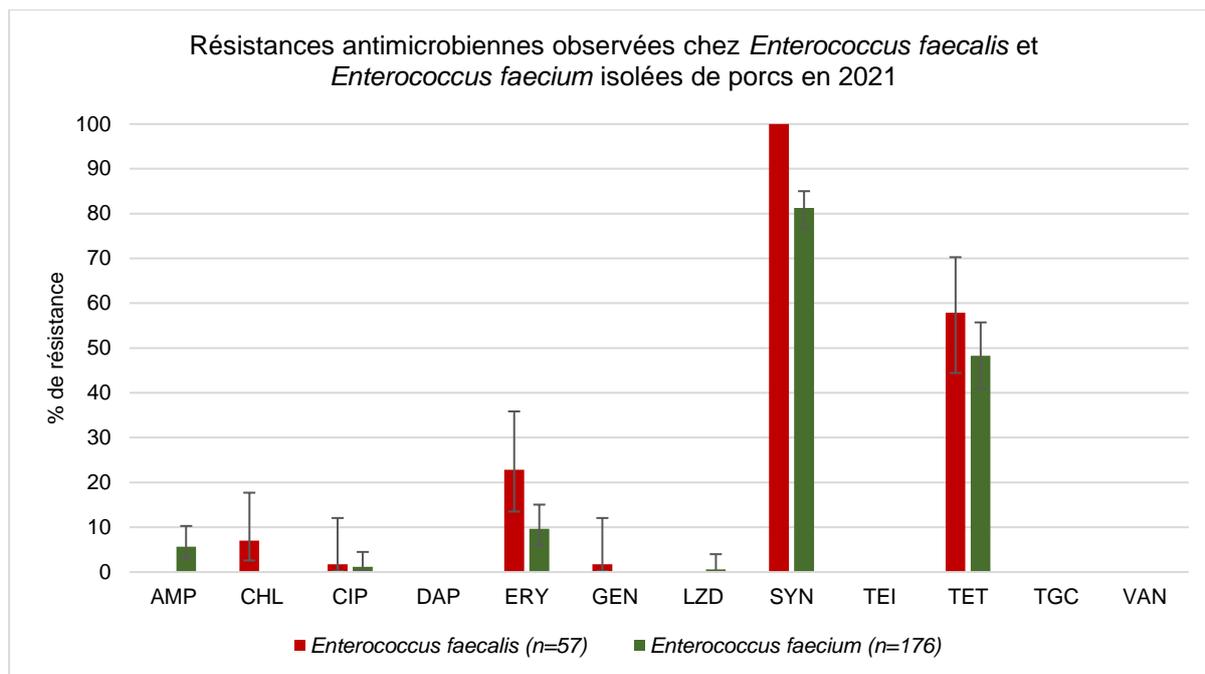


Figure 46. Pourcentages de résistance aux antimicrobiens chez *Enterococcus faecalis* (N=57) et *Enterococcus faecium* (N=176) isolées de porcs à l'abattoir en 2021.

Basés sur les cut-offs épidémiologiques selon le comité européen de la susceptibilité antimicrobienne (EUCAST) pour les antimicrobiens suivants : ampicilline (AMP), chloramphénicol (CHL), ciprofloxacine (CIP), daptomycine (DAP), érythromycine (ERY), gentamicine (GEN), linézolide (LZD), quinupristine/dalfopristine (synercid, SYN), teicoplanine (TEI), tétracycline (TET), tigécycline (TGC) et vancomycine (VAN).

3.2.9.5. Comparaison des pourcentages de résistance antimicrobienne observés entre les différentes catégories animales

De manière globale, les résistances à la tétracycline, à l'érythromycine et à la quinupristine/dalfopristine étaient les plus observées chez *Enterococcus faecalis* et *Enterococcus faecium* en 2021 au sein des différentes catégories animales.

Chez *E. faecalis*, des résistances au chloramphénicol, à la ciprofloxacine, à la daptomycine, à l'érythromycine, à la gentamicine, à la quinupristine/dalfopristine, au linézolide, à la tétracycline et à la

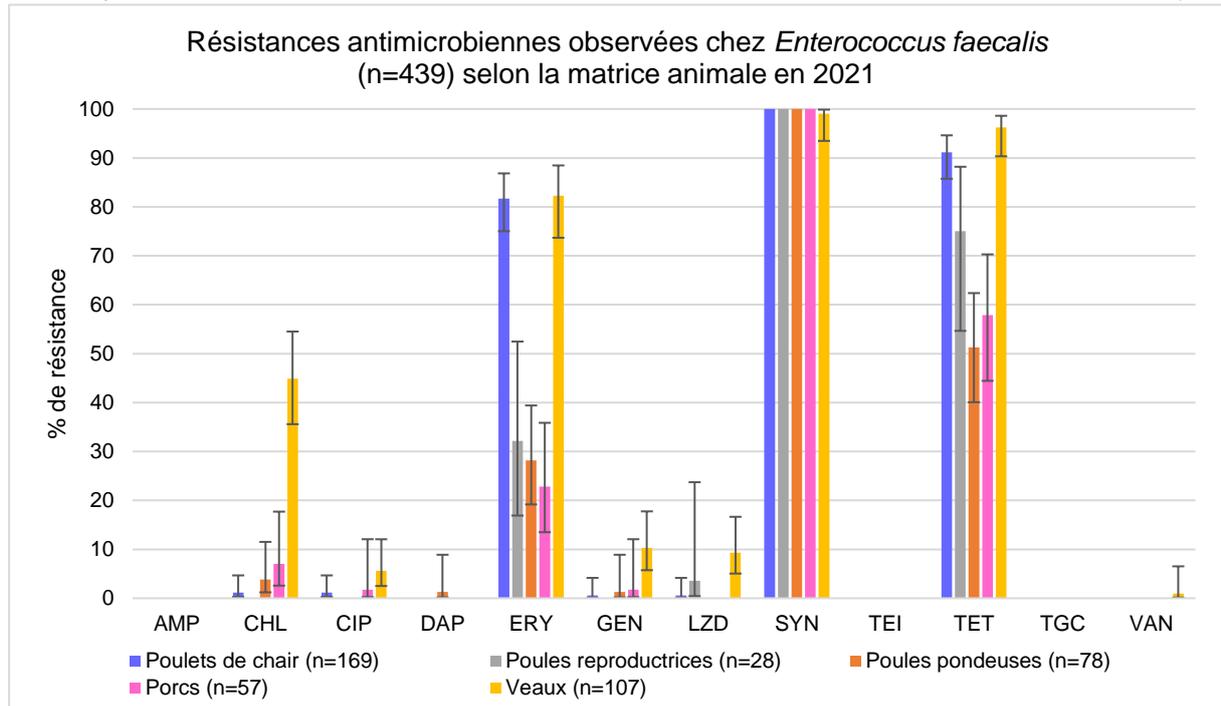


Figure 47). Un taux de résistance extrêmement élevé à la tétracycline a été observé chez les souches isolées de poulets de chair (**91.1%**), poules reproductrices (**75.0%**) et veaux (**96.3%**). Celui-ci était également très élevé chez les poules pondeuses (**51.3%**) et les porcs (**57.9%**). Au sein de souches *E. faecalis* isolées de poulets de chair (**81.7%**) et de veaux (**82.2%**) a également été observé un taux de résistance extrêmement élevé à l'érythromycine. Celui-ci était élevé chez *E. faecalis* isolées de poules reproductrices (**32.1%**), poules pondeuses (**28.2%**) et de porcs (**22.8%**). De plus, chez les *E. faecalis* isolées de veaux un taux de résistance élevé au chloramphénicol a été observé (**44.9%**) tandis que cette résistance était faible chez les poulets de chair (**1.2%**), les poules pondeuses (**3.8%**) et les porcs (**7.0%**), et absente des poules reproductrices. Un taux de résistance modéré à la gentamicine a aussi été retrouvé chez les souches isolées de veaux (**10.3%**) tandis que faible chez les porcs (**1.7%**) et les poules pondeuses (**1.3%**) et très faible chez les poulets de chair (**0.6%**) (voir

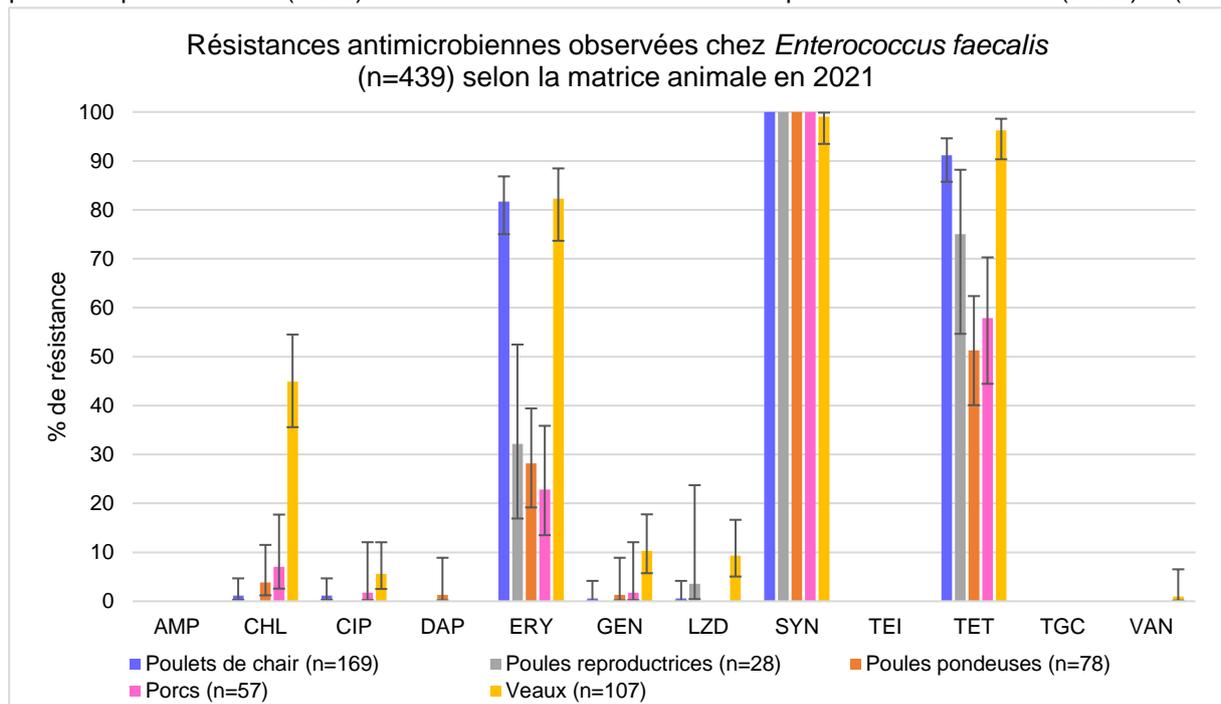


Figure 47). De faibles taux de résistance à la ciprofloxacine et à la daptomycine ont également été observés chez *E. faecalis*. De faibles taux de résistance au linézolide (**0.6%** des poulets de chair, **3.6%** des poules reproductrices et **9.3%** des veaux) ainsi qu'une très faible résistance à la vancomycine (**0.9%** des veaux) ont également été observés. Aucune résistance à l'ampicilline, à la teicoplanine ou à la tigecycline n'a été observée chez *E. faecalis* en 2021.

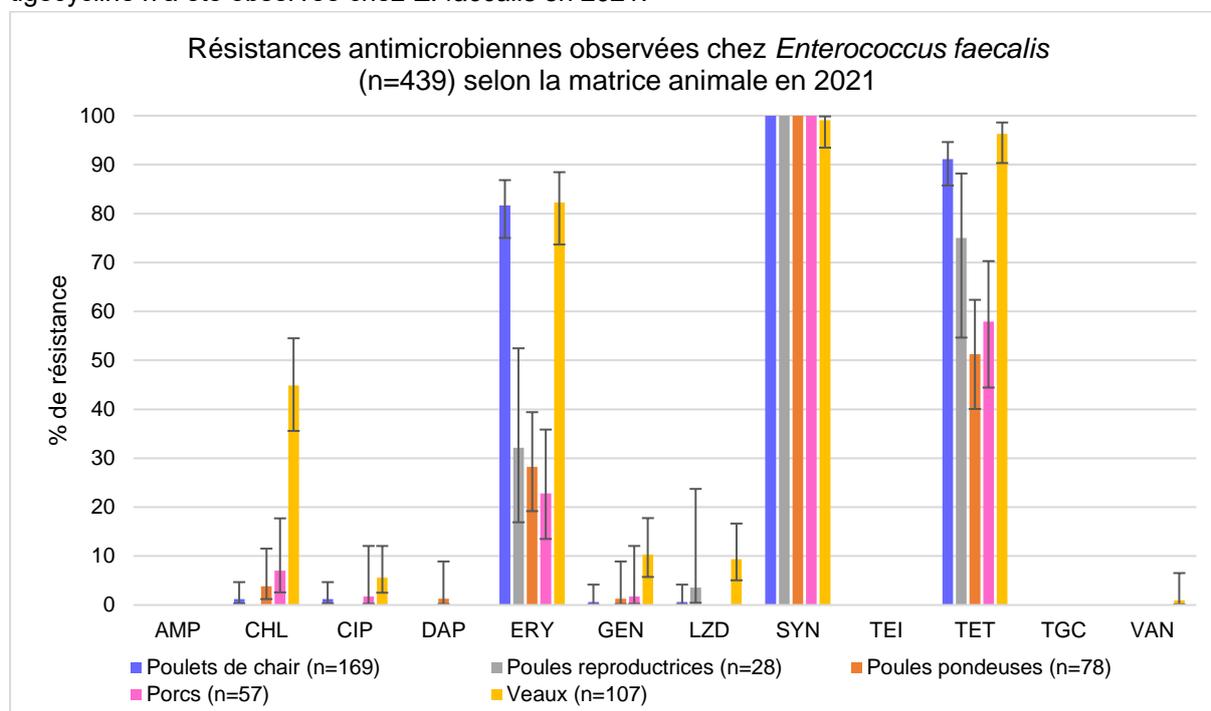


Figure 47. Pourcentages de résistance aux antimicrobiens chez *Enterococcus faecalis* selon la catégorie animale.

Basés sur les cut-offs épidémiologiques selon le comité européen de la susceptibilité antimicrobienne (EUCAST) pour les antimicrobiens suivants : ampicilline (AMP), chloramphénicol (CHL), ciprofloxacine (CIP), daptomycine (DAP), érythromycine (ERY), gentamicine (GEN), linézolide (LZD), quinupristine/dalfopristine* (SYN), teicoplanine (TEI), tétracycline (TET), tigecycline (TGC) et vancomycine (VAN). *Une résistance intrinsèque à la quinupristine/dalfopristine est présente chez *Enterococcus faecalis* caractérisée par des concentrations minimales inhibitrices variées.

Chez *E. faecium*, des résistances à l'ampicilline, au chloramphénicol, à la ciprofloxacine, à l'érythromycine, à la gentamicine, au linézolide, à la quinupristine/dalfopristine et à la tétracycline ont été observées (voir Figure 48). Un taux de résistance extrêmement élevé à la quinupristine/dalfopristine a été observé chez les souches isolées de poulets de chair (**81.3%**), poules reproductrices (**84.8%**), porcs (**81.3%**) et veaux (**76.5%**). Celui-ci était très élevé chez les poules pondeuses (**57.9%**). Le taux de résistance à la tétracycline observé chez *E. faecium* était variable : très élevé chez les poulets de chair (**70.0%**) ; élevé chez les poules reproductrices (**44.0%**), les porcs (**48.3%**) et veaux (**41.8%**) ; ainsi que modéré chez les poules pondeuses (**14.6%**). De même, la résistance à l'érythromycine était extrêmement élevée chez les poulets de chair (**71.9%**) et élevée chez les veaux (**34.7%**). Celle-ci était modérée à faible dans les autres catégories animales. Un taux de résistance faible à modéré à l'ampicilline a été observé, avec le taux le plus élevé observé chez les poulets de chair (**18.8%**, modéré). De faibles (voire très faibles) taux de résistance au chloramphénicol, à la ciprofloxacine et à la gentamicine ont également été observés chez *E. faecium*. Un très faible taux de résistance au linézolide a été observé, chez **0.6%** des porcs et **0.6%** des veaux. Aucune résistance à la daptomycine, teicoplanine, tigecycline ou à la vancomycine n'a été observée chez *E. faecium* en 2021.

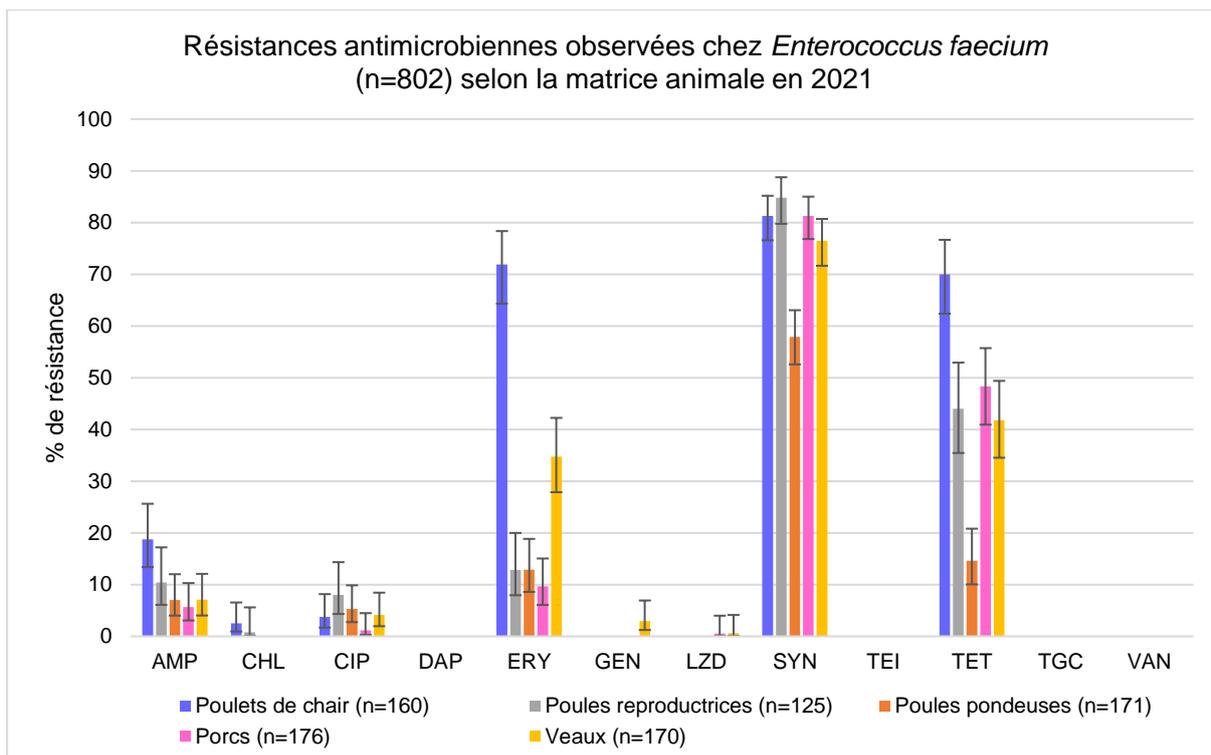


Figure 48. Pourcentages de résistance aux antimicrobiens chez *Enterococcus faecium* selon la catégorie animale.

Basés sur les cut-offs épidémiologiques selon le comité européen de la susceptibilité antimicrobienne (EUCAST) pour les antimicrobiens suivants : ampicilline (AMP), chloramphénicol (CHL), ciprofloxacine (CIP), daptomycine (DAP), érythromycine (ERY), gentamicine (GEN), linézolide (LZD), quinupristine/dalfopristine* (SYN), teicoplanine (TEI), tétracycline (TET), tigecycline (TGC) et vancomycine (VAN).

3.2.9.6. Comparaison des pourcentages de résistance antimicrobienne observés en 2019, 2020 et 2021 chez *Enterococcus faecalis* et *Enterococcus faecium* par espèce animale

De manière générale, les taux de résistance observés chez *Enterococcus faecalis* et *Enterococcus faecium* isolées des différentes matrices animales étudiées semblaient stables depuis 2019 (voir Figure

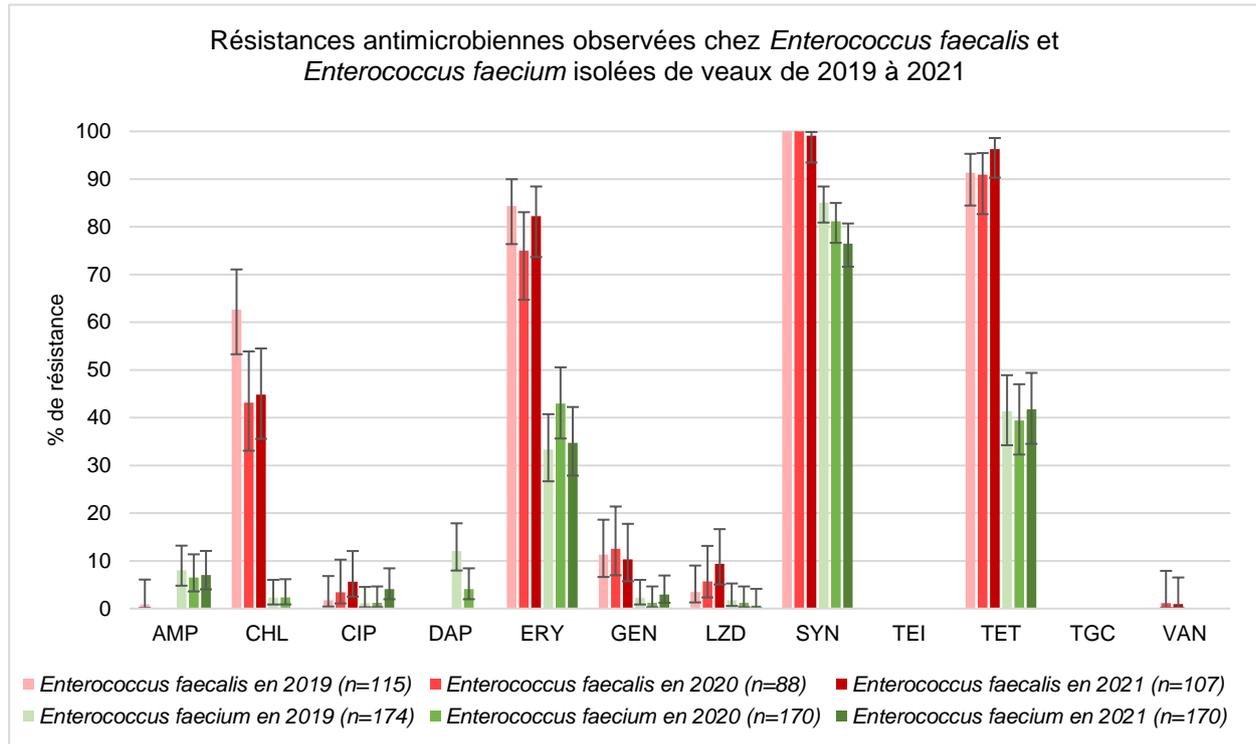


Figure 53), à l'exception de diminutions significatives du taux de résistance à certains antimicrobiens observées en 2021.

En effet, le taux de résistance au chloramphénicol a significativement diminué de **17.7%** (de 62.6% à 44.9%) et de **14.4%** (21.4% à 7.0%) depuis 2019 chez *E. faecalis* isolées de veaux et de porcs, respectivement (voir Figure 53 et Figure 52). Une diminution significative de **18.3%** (41.1% à 22.8%) du taux de résistance à l'érythromycine a été observée chez *E. faecalis* isolées de porcs depuis 2019 (voir Figure 52). Chez *E. faecium* isolées de poulets de chair, une diminution significative de **10.2%** (29.0% à 18.8%) de la résistance à l'ampicilline a été observée en 2021 par rapport à 2019 (voir Figure 49). Le taux de résistance à la quinupristine/dalfopristine a également significativement diminué (**-8.6%**) depuis 2019 (85.1% à 76.5%) chez *E. faecium* isolées de veaux (voir Figure 53). En 2021, la résistance à la daptomycine était absente des *E. faecium* de toutes les catégories animales expliquant ainsi la diminution significative observée du taux de cette résistance en 2021 (**-23.7%** chez les poulets de chair, **-8.4%** chez les poules reproductrices, **-13.1%** chez les poules pondeuses, **-9.0%** chez les porcs et **-12.1%** chez les veaux). Cette diminution est en corrélation avec la modification du seuil de cette résistance au sein de cette espèce (de 4 à 8 mg/L) en 2021. Aucune résistance à la teicoplanine ou à la tigecycline n'a été observée au cours des années étudiées.

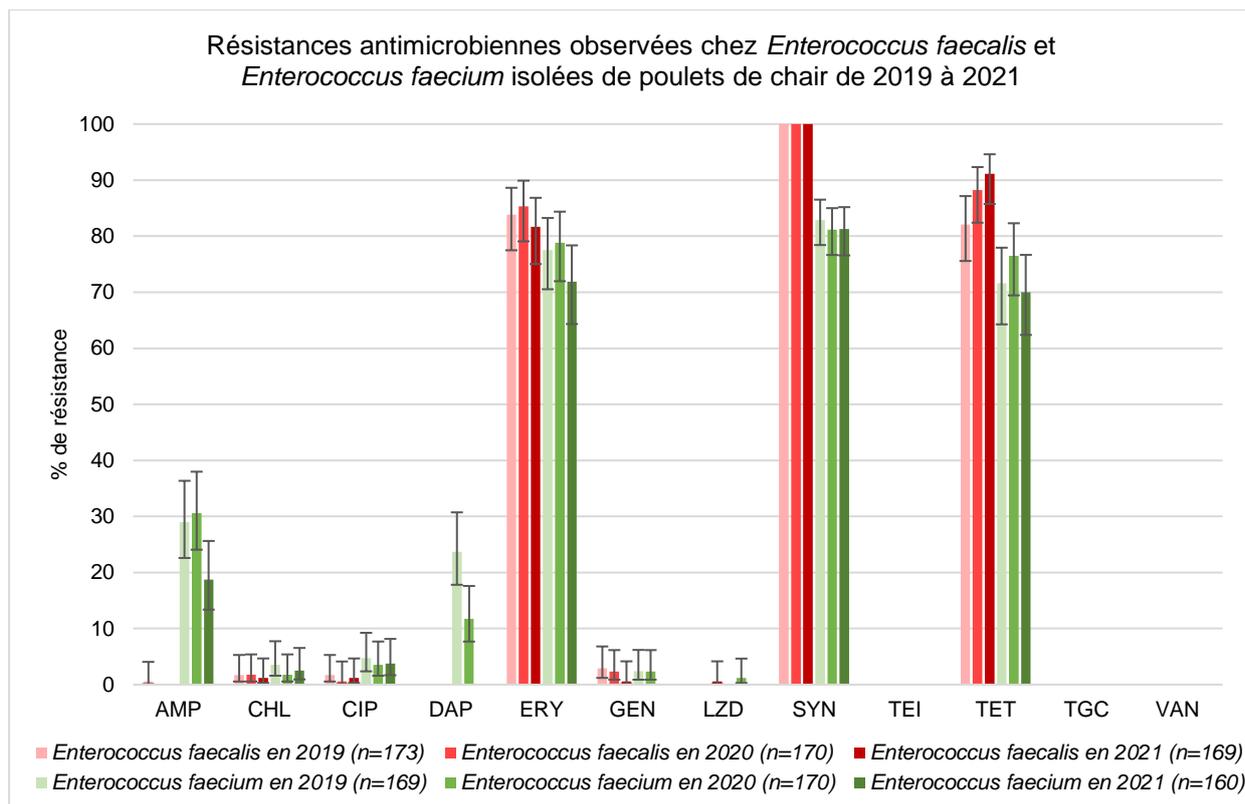


Figure 49. Pourcentages de résistance aux antimicrobiens chez *Enterococcus faecalis* et *Enterococcus faecium* isolées de poulets de chair de 2019 à 2021.

Basés sur les cut-offs épidémiologiques selon le comité européen de la susceptibilité antimicrobienne (EUCAST) pour les antimicrobiens suivants : ampicilline (AMP), chloramphénicol (CHL), ciprofloxacine (CIP), daptomycine (DAP), érythromycine (ERY), gentamicine (GEN), linézolide (LZD), quinupristine/dalfopristine (synercid, SYN), teicoplanine (TEI), tétracycline (TET), tigécycline (TGC) et vancomycine (VAN).

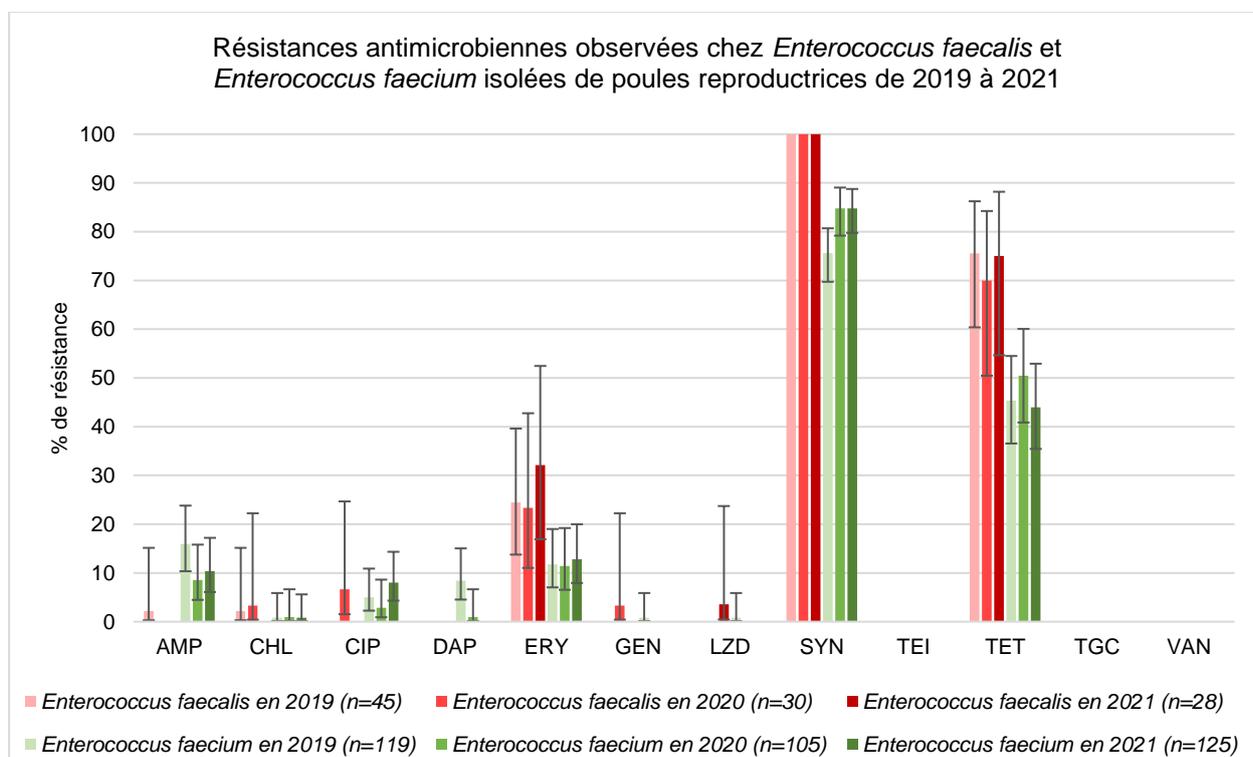


Figure 50. Pourcentages de résistance aux antimicrobiens chez *Enterococcus faecalis* et *Enterococcus faecium* isolées de poules reproductrices de 2019 à 2021.

Basés sur les cut-offs épidémiologiques selon le comité européen de la susceptibilité antimicrobienne (EUCAST) pour les antimicrobiens suivants : ampicilline (AMP), chloramphénicol (CHL), ciprofloxacine (CIP), daptomycine (DAP), érythromycine (ERY), gentamicine (GEN), linézolide (LZD), quinupristine/dalfopristine (synercid, SYN), teicoplanine (TEI), tétracycline (TET), tigécycline (TGC) et vancomycine (VAN).

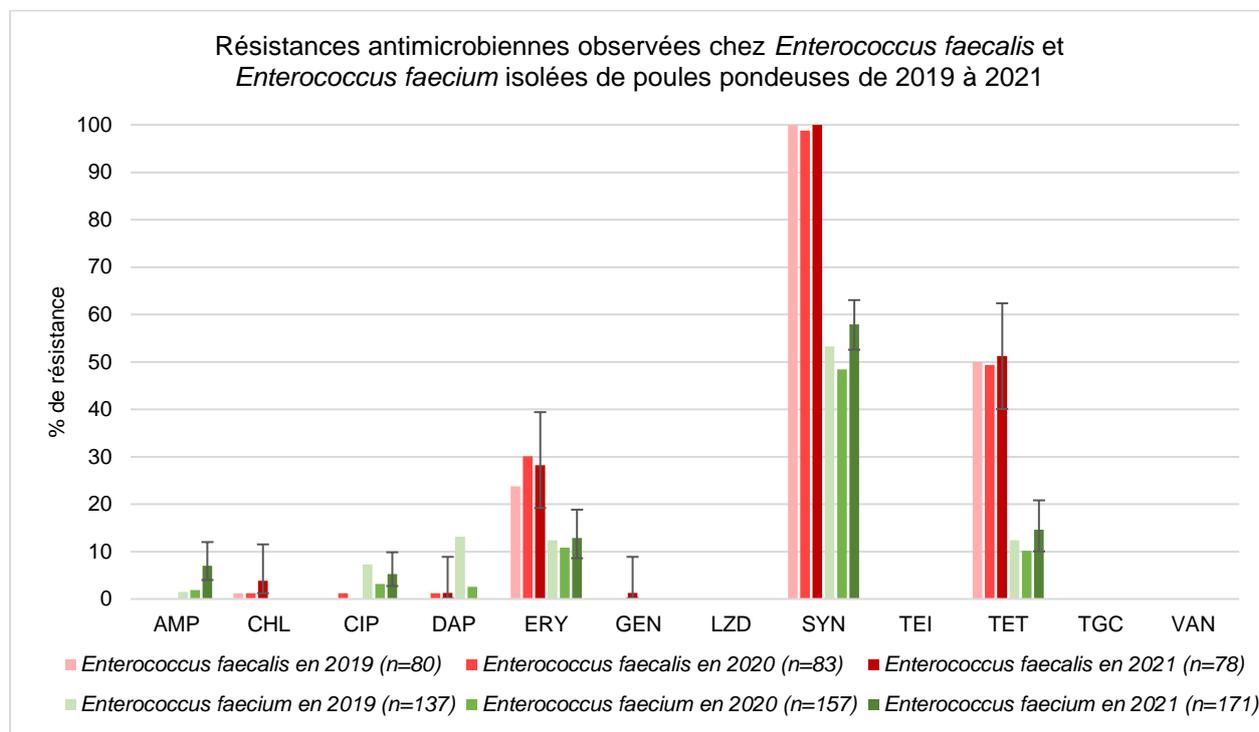


Figure 51. Pourcentages de résistance aux antimicrobiens chez *Enterococcus faecalis* et *Enterococcus faecium* isolées de poules pondeuses de 2019 à 2021.

Basés sur les cut-offs épidémiologiques selon le comité européen de la susceptibilité antimicrobienne (EUCAST) pour les antimicrobiens suivants : ampicilline (AMP), chloramphénicol (CHL), ciprofloxacine (CIP), daptomycine (DAP), érythromycine (ERY), gentamicine (GEN), linézolide (LZD), quinupristine/dalfopristine (synercid, SYN), teicoplanine (TEI), tétracycline (TET), tigécycline (TGC) et vancomycine (VAN).

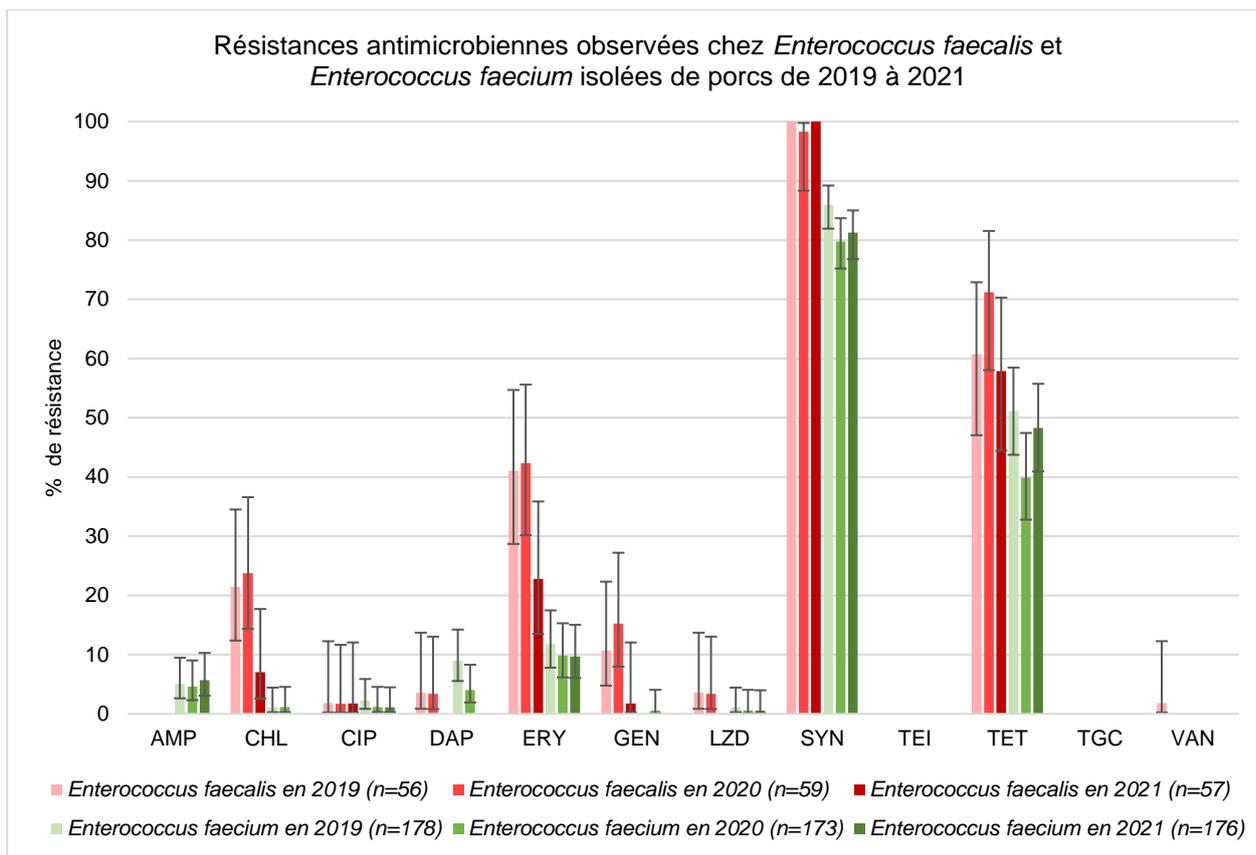


Figure 52. Pourcentages de résistance aux antimicrobiens chez *Enterococcus faecalis* et *Enterococcus faecium* isolées de porcs de 2019 à 2021.

Basés sur les cut-offs épidémiologiques selon le comité européen de la susceptibilité antimicrobienne (EUCAST) pour les antimicrobiens suivants : ampicilline (AMP), chloramphénicol (CHL), ciprofloxacine (CIP), daptomycine (DAP), érythromycine (ERY), gentamicine (GEN), linézolide (LZD), quinupristine/dalfopristine (synercid, SYN), teicoplanine (TEI), tétracycline (TET), tigécycline (TGC) et vancomycine (VAN).

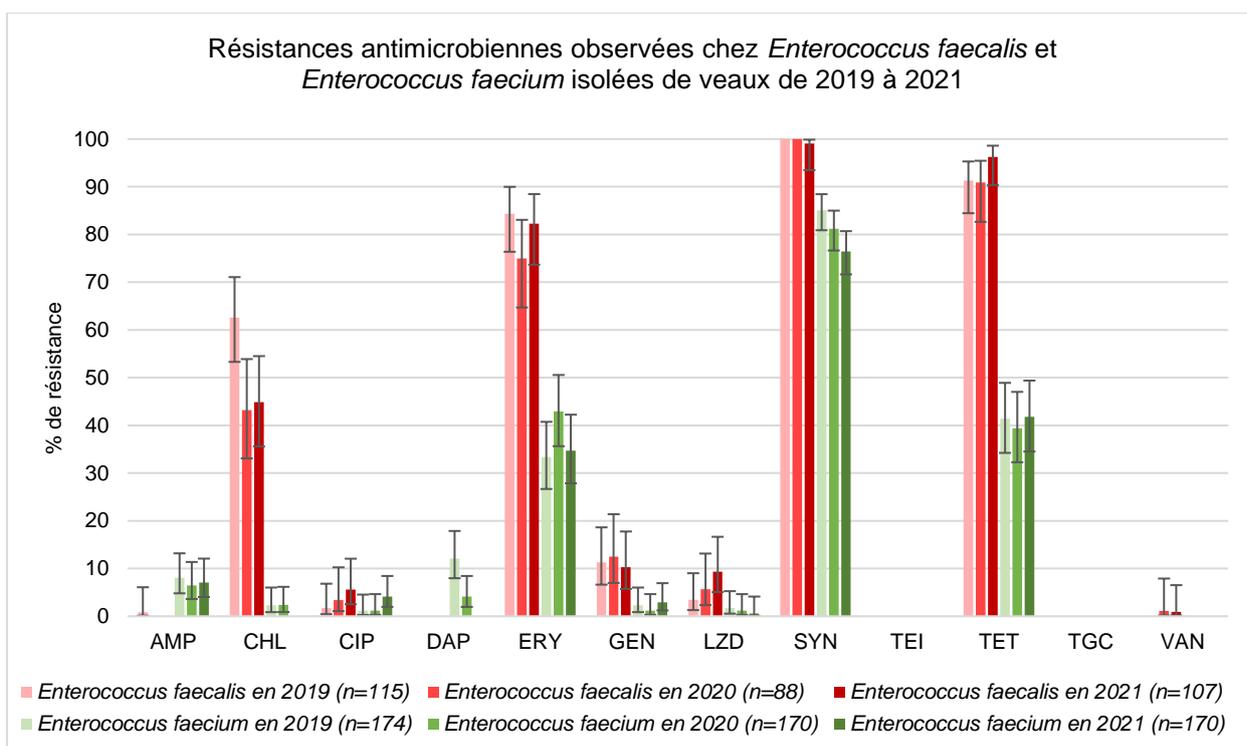


Figure 53. Pourcentages de résistance aux antimicrobiens chez *Enterococcus faecalis* et *Enterococcus faecium* isolées de veaux de 2019 à 2021.

Basés sur les cut-offs épidémiologiques selon le comité européen de la susceptibilité antimicrobienne (EUCAST) pour les antimicrobiens suivants : ampicilline (AMP), chloramphénicol (CHL), ciprofloxacine (CIP), daptomycine (DAP), érythromycine (ERY), gentamicine (GEN), linézolide (LZD), quinupristine/dalfopristine (synercid, SYN), teicoplanine (TEI), tétracycline (TET), tigécycline (TGC) et vancomycine (VAN).

3.2.9.7. Multirésistance observée chez *Enterococcus faecalis* et *Enterococcus faecium*, par espèce animale

A noter que la résistance à la quinupristine/dalfopristine, intrinsèque chez *E. faecalis*, a été comptabilisée uniquement chez *Enterococcus faecium* pour le calcul de la multirésistance et la comparaison des profils de résistances observés entre *Enterococcus faecalis* et *Enterococcus faecium*.

En 2021, le plus grand nombre de souches multirésistantes a été observé chez les veaux (54.2% d'*E. faecalis*) et chez les poulets de chair (60.6% d'*E. faecium*). Les souches *E. faecalis* isolées de poulets de chair étaient principalement résistantes à 1 (17.2%) ou 2 (76.3%) antimicrobiens, tandis que 12.5%, 18.1%, 43.1% et 17.5% des souches *E. faecium* résistaient à 1, 2, 3 ou 4 antimicrobiens respectivement. Les souches isolées de poules reproductrices et poules pondeuses étaient globalement moins résistantes. En effet, 42.9% et 33.3% de souches *E. faecalis* et 36.8% et 45.6% de souches *E. faecium* résistaient à 1 antimicrobien ainsi que 28.6% et 21.8% de souches *E. faecalis* et 34.4% et 14.6% de souches *E. faecium* résistantes à 2 antimicrobiens différents, respectivement. Au sein des échantillons de porcs, 36.8% des souches *E. faecalis* étaient résistantes à 1, 15.8% à 2, 5.3% à 3 et 1.8% à 4 antimicrobiens différents ; de même que 41.5% (1 résistance), 32.4% (2 résistances), 11.9% (3 résistances) et 1.1% (4 résistances) des souches *E. faecium*, respectivement. Chez les veaux, les souches *E. faecalis* résistaient à 1 (13.1%), 2 (29.9%), 3 (41.1%), 4 (12.2%) ainsi qu'à 5 (0.9%) antimicrobiens différents. De même, 51.8%, 25.3%, 13.5%, 2.4% et 1.8% de souches *E. faecium* isolées de veaux étaient résistantes à 1, 2, 3, 4 et 5 antimicrobiens respectivement. Les souches isolées de veaux présentaient le plus grand nombre de résistances, avec 1.2% de *E. faecium* résistantes à 6 antimicrobiens différents (voir

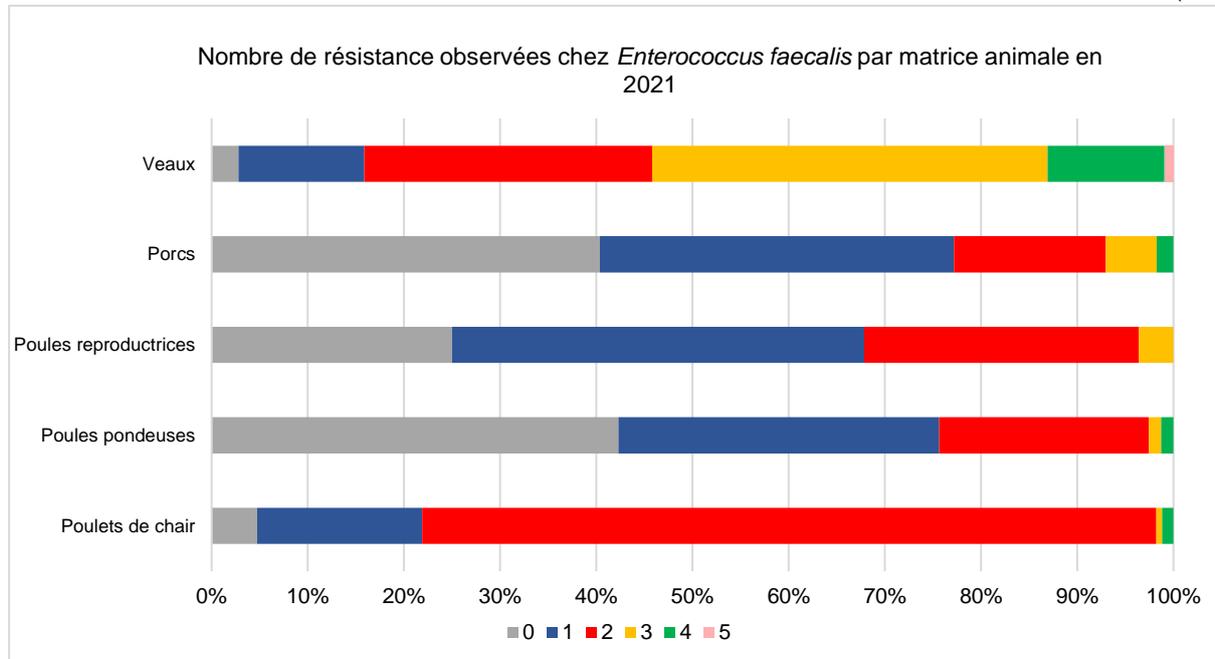


Figure 54 et Figure 55).

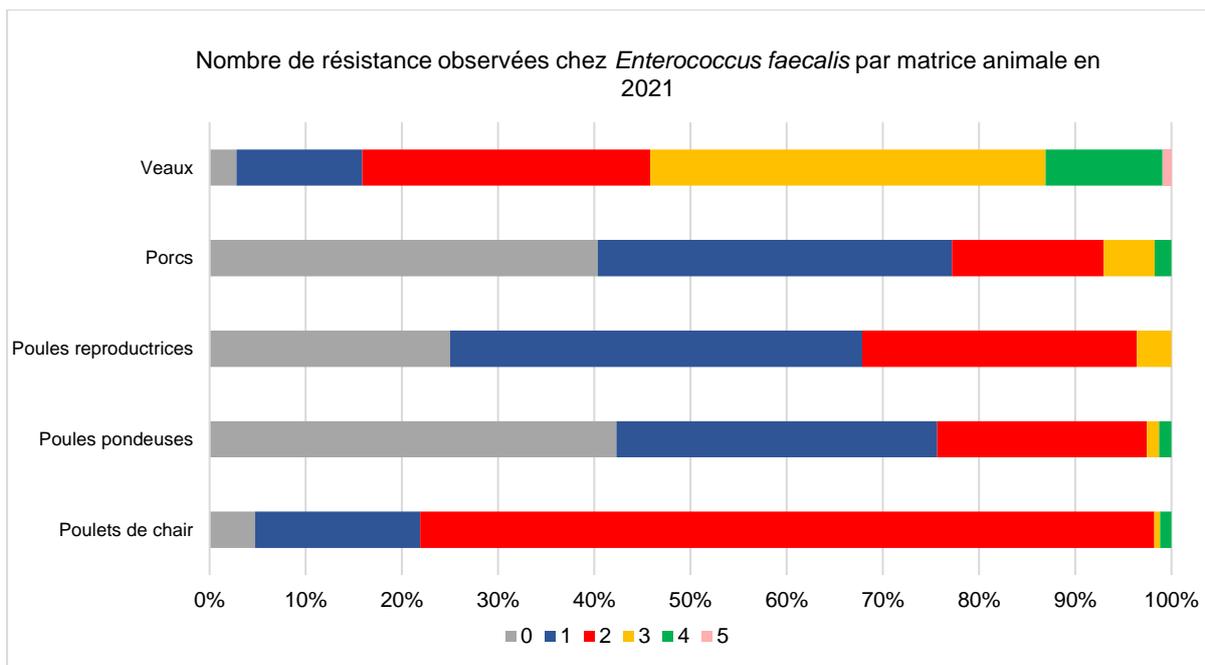


Figure 54. Pourcentages d'*Enterococcus faecalis* isolées de poulets de chair, dindes, poules reproductrices, poules pondeuses, porcs et veaux selon le nombre de résistances observées.

La légende des couleurs indique le nombre de famille d'antibiotiques auxquels les souches résistent, l'abscisse indique le pourcentage de souches résistantes au nombre correspondant d'antibiotiques. Une souche est considérée comme multirésistante lorsqu'elle résiste à minimum 3 familles d'antibiotiques différentes. La résistance à la quinupristine/dalfopristine chez *Enterococcus faecalis* n'a pas été prise en compte dans le calcul de multirésistance.

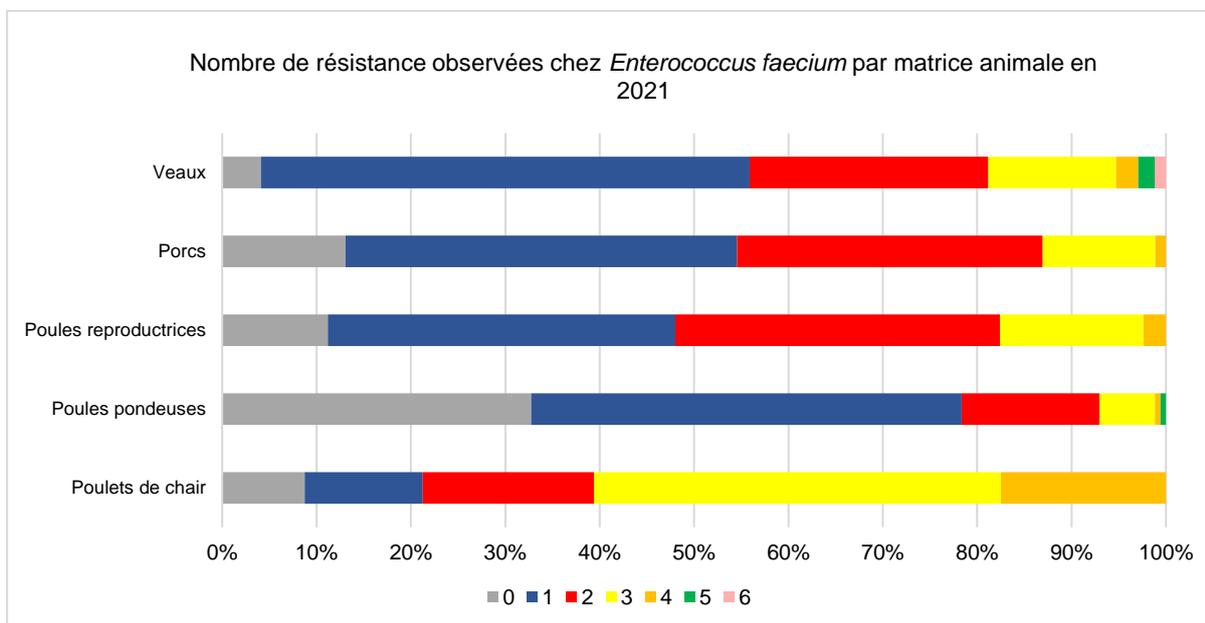


Figure 55. Pourcentages d'*Enterococcus faecium* isolées de poulets de chair, dindes, poules reproductrices, poules pondeuses, porcs et veaux selon le nombre de résistances observées.

La légende des couleurs indique le nombre de famille d'antibiotiques auxquels les souches résistent, l'abscisse indique le pourcentage de souches résistantes au nombre correspondant d'antibiotiques. Une souche est considérée comme multirésistante lorsqu'elle résiste à minimum 3 familles d'antibiotiques différentes.

De manière générale, la multirésistance (≥ 3 antimicrobiens différents) était plus souvent observée chez *E. faecium*. En effet, **60.6%**, **17.6%**, **7.0%** et **13.1%** des souches *E. faecium* isolées de poulets de chair, poules reproductrices, poules pondeuses et porcs respectivement, étaient multirésistantes contre **1.8%**,

3.6%, 2.6% et 7.0% des souches *E. faecalis*. Les souches isolées de veaux étaient l'exception avec 54.2% d'*E. faecalis* multirésistantes contre 18.8% d'*E. faecium* (voir Tableau 23 et Tableau 24).

Tableau 23. Nombre de souches selon les différents profils de résistance observés par catégorie animale, chez *Enterococcus faecalis* en 2021.

Poulets de chair (n=169)			Poules pondeuses (n=78)			Poules reproductrices (n=28)		
MDR	Profils	N	MDR	Profils	N	MDR	Profils	N
4	CHL ERY LZD TET	1	4	CHL ERY GEN TET	1	3	ERY LZD TET	1
4	CHL ERY GEN TET	1	3	DAP ERY TET	1	2	ERY TET	8
3	CIP ERY TET	1	2	CHL ERY	1	1	TET	12
2	CIP ERY	1	2	CHL TET	1			
2	ERY TET	128	2	ERY TET	15			
1	ERY	6	1	ERY	4			
1	TET	23	1	TET	22			
Porcs (n=57)			Veaux (n=107)					
MDR	Profils	N	MDR	Profils	N			
4	CHL ERY GEN TET	1	5	CHL CIP ERY LZD TET	1			
3	CHL ERY TET	3	4	CHL CIP ERY TET	3			
2	CIP TET	1	4	CHL ERY GEN TET	2			
2	ERY TET	8	4	CHL ERY LZD TET	8			
1	ERY	1	3	CHL CIP TET	1			
1	TET	20	3	CHL ERY TET	34			
			3	ERY GEN TET	9			
			3	ERY TET VAN	1			
			2	CIP LZD	1			
			2	ERY TET	31			
			1	TET	13			

La colonne MDR « Multi-Drug resistance » correspond à la multirésistance à savoir le nombre de résistances observées à chaque famille d'antimicrobiens. Le nombre N correspond au nombre de souches présentant le profil de résistance. La résistance à la quinupristine/dalfopristine n'a pas été prise en compte dans la table de profils de résistance observés chez *E. faecalis*.

Tableau 24. Nombre de souches selon les différents profils de résistance observés par catégorie animale, chez *Enterococcus faecium* en 2021.

Poulets de chair (n=160)			Poules pondeuses (n=171)			Poules reproductrices (n=125)		
MDR	Profils	N	MDR	Profils	N	MDR	Profils	N
4	AMP CIP ERY SYN	1	5	AMP CIP ERY SYN TET	1	4	AMP ERY SYN TET	2
4	AMP ERY SYN TET	24	4	AMP ERY SYN TET	1	4	AMP CIP SYN TET	1
4	CHL ERY SYN TET	2	3	AMP CIP SYN	1	3	AMP CIP SYN	1
4	CIP ERY SYN TET	1	3	AMP CIP TET	1	3	AMP SYN TET	5
3	AMP ERY SYN	1	3	AMP ERY SYN	2	3	CIP SYN TET	3
3	AMP SYN TET	2	3	AMP ERY TET	1	3	ERY SYN TET	10
3	CHL ERY TET	2	3	CIP ERY TET	1	2	AMP SYN	4
3	CIP ERY SYN	1	3	ERY SYN TET	3	2	CHL SYN	1
3	CIP SYN TET	1	2	AMP SYN	5	2	CIP SYN	3
3	ERY SYN TET	62	2	CIP SYN	3	2	CIP TET	1
2	AMP SYN	1	2	ERY SYN	10	2	ERY SYN	4
2	AMP TET	1	2	SYN TET	7	2	SYN TET	30
2	CIP SYN	1	1	CIP	2	1	CIP	1
2	ERY SYN	14	1	ERY	1	1	SYN	42
2	ERY TET	4	1	SYN	62	1	TET	3
2	SYN TET	8	1	TET	9			
1	CIP	1						
1	ERY	3						
1	SYN	11						
1	TET	5						
Porcs (n=176)			Veaux (n=170)					
MDR	Profils	N	MDR	Profils	N			
4	AMP ERY SYN TET	1	6	AMP CIP ERY GEN SYN TET	1			
4	ERY LZD SYN TET	1	5	ERY GEN LZD SYN TET	1			
3	AMP SYN TET	9	5	AMP ERY GEN SYN TET	2			
3	CIP SYN TET	2	5	AMP CIP ERY SYN TET	1			
3	ERY SYN TET	10	4	AMP CIP ERY TET	1			
2	ERY SYN	4	4	AMP ERY SYN TET	2			
2	ERY TET	1	4	ERY GEN SYN TET	1			
2	SYN TET	52	3	AMP SYN TET	5			
1	SYN	64	3	CIP SYN TET	1			
1	TET	9	3	ERY SYN TET	17			
			2	CIP SYN	1			
			2	CIP TET	2			
			2	ERY SYN	11			
			2	ERY TET	19			
			2	SYN TET	10			
			1	ERY	3			
			1	SYN	77			
			1	TET	8			

La colonne MDR « Multi-Drug resistance » correspond à la multirésistance à savoir le nombre de résistances observées à chaque famille d'antimicrobiens. Le nombre N correspond au nombre de souches présentant le profil de résistance.

3.2.9.8. Investigation par NGS de souches *Enterococcus faecalis* et *Enterococcus faecium* isolées en 2021

- Critères de sélection

En 2021, 36 entérocoques (21 *E. faecalis* et 15 *E. faecium*) isolées de poulets de chair (n=4), poules reproductrices (n=1), poules pondeuses (n=4), porcs (n=3) et veaux (n=24) ont été investiguées par séquençage. Chaque souche a été sélectionnée selon son profil phénotypique, indépendamment de la matrice animale et présentait au moins l'un de critères suivants : résistance au linézolide, résistance à la vancomycine, souche caractérisée par une concentration minimale inhibitrice (MIC) au linézolide de 4 mg/L (seuil de résistance au linézolide, voir EFSA 2022 ;page 116) et/ou présence de minimum 4 résistances différentes.

- Typage MLST des entérocoques

Via séquençage, le typage des entérocoques par Multi Locus Sequence Typing (MLST) a permis d'identifier 27 sequence-types (STs) différents dont 19 STs ont été observés une seule fois, 7 STs (ST12, 19, 41, 283, 314, 330 et 631) observés dans 2 souches différentes dont certaines avaient le même phénotype et 1 ST (22) observé dans 3 souches (2 isolées de veaux et 1 isolée de porcs) présentant des phénotypes différents (voir Tableau 25). Afin de déterminer si les souches présentant un même ST étaient génétiquement liées, leurs profils cgMLST (« core genome MLST ») ont été comparés. Cette comparaison a permis de mettre en évidence une similarité génétique observée entre certaines de ces souches. En effet, la comparaison des 2 *E. faecalis* (VAR 808 et VAR 844) isolées de veaux caractérisées par un ST631 et un même phénotype de résistance (voir Tableau 25) a montré que ces souches étaient proches génétiquement ; de même que les 2 *E. faecalis* (VAR 767 et VAR 848) isolées de veaux caractérisées par un ST314 et un profil phénotypique identique. Bien que présentant des profils phénotypiques de résistance différents, les 2 *E. faecium* (VAR 801 et VAR 811) isolées de poules pondeuses et présentant un ST12 ont également été identifiées comme génétiquement proches l'une de l'autre. De plus, la comparaison des 3 *E. faecium* présentant un ST22 (avec VAR 800 et VAR 806, 2 souches isolées de veaux et VAR 781, 1 isolée de porcs) a montré que seules les 2 souches isolées de veaux étaient génétiquement liées.

Tableau 25. Liste des entérocoques séquencées par NGS en 2021 et leur profil phénotypique obtenu à partir de l'étude de susceptibilité antimicrobienne.

Sciensano VAR ID	Espèce	Phénotype	ST	Matrice animale
VAR-773	<i>E. faecalis</i>	ERY SYN TET (LZD =4)	32	porcs
VAR-807	<i>E. faecalis</i>	ERY LZD SYN TET	234	poules reproductrices
VAR-849	<i>E. faecalis</i>	ERY SYN TET VAN	1070	veaux
VAR-774	<i>E. faecalis</i>	ERY GEN SYN TET	248	veaux
VAR-847	<i>E. faecalis</i>	CHL ERY SYN TET	19	veaux
VAR-775	<i>E. faecalis</i>	CHL ERY SYN TET	47	veaux
VAR-808	<i>E. faecalis</i>	CHL ERY GEN SYN TET	631	veaux
VAR-844	<i>E. faecalis</i>	CHL ERY GEN SYN TET	631	veaux
VAR-803	<i>E. faecalis</i>	CHL ERY GEN SYN TET	16	porcs
VAR-802	<i>E. faecalis</i>	CHL ERY LZD SYN TET	19	veaux
VAR-846	<i>E. faecalis</i>	CHL ERY LZD SYN TET	25	veaux
VAR-770	<i>E. faecalis</i>	CHL ERY LZD SYN TET	41	veaux
VAR-845	<i>E. faecalis</i>	CHL ERY LZD SYN TET	41	veaux
VAR-848	<i>E. faecalis</i>	CHL ERY LZD SYN TET	314	veaux
VAR-767	<i>E. faecalis</i>	CHL ERY LZD SYN TET	314	veaux
VAR-799	<i>E. faecalis</i>	CHL ERY LZD SYN TET	283	veaux
VAR-809	<i>E. faecalis</i>	CHL ERY LZD SYN TET	283	veaux
VAR-771	<i>E. faecalis</i>	CHL ERY LZD SYN TET	1167	poulets de chair
VAR-804	<i>E. faecalis</i>	CHL CIP SYN TET	480	veaux
VAR-772	<i>E. faecalis</i>	CHL CIP ERY SYN TET	330	veaux
VAR-768	<i>E. faecalis</i>	CHL CIP ERY LZD SYN TET	330	veaux

VAR-778	<i>E. faecium</i>	SYN (LZD=4)	9	poules pondeuses
VAR-801	<i>E. faecium</i>	TET (LZD=4)	12	poules pondeuses
VAR-811	<i>E. faecium</i>	SYN TET (LZD=4)	12	poules pondeuses
VAR-780	<i>E. faecium</i>	AMP CIP ERY TET	80	veaux
VAR-784	<i>E. faecium</i>	AMP ERY SYN TET	56	veaux
VAR-782	<i>E. faecium</i>	AMP ERY SYN TET	266	poules pondeuses
VAR-783	<i>E. faecium</i>	AMP ERY SYN TET	1091	poulets de chair
VAR-805	<i>E. faecium</i>	AMP ERY SYN TET	1287	poulets de chair
VAR-800	<i>E. faecium</i>	ERY GEN SYN TET	22	veaux
VAR-781	<i>E. faecium</i>	CHL ERY SYN TET	22	porcs
VAR-779	<i>E. faecium</i>	CHL ERY SYN TET	14	poulets de chair
VAR-806	<i>E. faecium</i>	ERY GEN LZD SYN TET	22	veaux
VAR-810	<i>E. faecium</i>	AMP ERY GEN SYN TET	30	veaux
VAR-776	<i>E. faecium</i>	AMP CIP ERY GEN SYN TET	868	veaux

Basé sur les cut-offs épidémiologiques selon le comité européen de la susceptibilité antimicrobienne (EUCAST) pour les antimicrobiens suivants : ampicilline (AMP), chloramphénicol (CHL), ciprofloxacine (CIP), daptomycine (DAP), érythromycine (ERY), gentamicine (GEN), linézolide (LZD), quinupristine/dalfopristine (synercid, SYN), teicoplanine (TEI), tétracycline (TET), tigécycline (TGC) et vancomycine (VAN). Les souches ont été classées selon les caractéristiques suivantes: 1) l'espèce bactérienne, 2) le phénotype, 3) le ST et 4) la matrice.

- Génotypage de la résistance antimicrobienne observée

Le séquençage des entérocoques a mis en évidence la présence de gènes de résistance expliquant le phénotype résistant dans **96.8%** (n=149/154) des phénotypes individuels de résistance observés (voir Tableau 26).

Toutes les souches résistantes au linézolide analysées (n=12) ont été caractérisées par la présence du gène *optrA* (n=11 avec 9 isolées de veaux, 1 de poulet de chair et 1 de poule reproductrice) ou de la combinaison des gènes *optrA/poxxA* (n=1 isolée de veaux). Une souche *E. faecalis* isolée de veaux présentait une résistance à la vancomycine, caractérisée par la présence du cluster *vanA*, également retrouvé dans une autre souche *E. faecium* isolée de veaux mais sensible à la vancomycine et caractérisée par une concentration minimale inhibitrice de 4 mg/L (seuil de résistance). La résistance à l'érythromycine (n=32) a été caractérisée par la présence de *ermB* (n=8), *msrC* (n=1), *ermB/vatD* (n=1), *ermA/msrC* (n=1), *ermB/msrC* (n=4), *ermA/ermB* (n=10), *ermA/ermB/msrC* (n=4) et *ermB/ermT/msrC* (n=1). Aucun gène connu pour conférer la résistance à l'érythromycine n'a été détecté dans les 2 dernières souches qui avaient un phénotype résistant. Sur 19 souches résistantes au chloramphénicol, 18 portaient au moins un gène de résistance à savoir *cat* (n=3), *cat_{C194}* (n=1), *cat_{C221}* (n=2), *cat/fexA/optrA* (n=4), *cat_{C221}/fexA/optrA* (n=3), *fexA/optrA* (n=4) et *fexB/optrA/poxxA* (n=1). Aucun gène n'a été détecté dans la dernière souche résistante. La résistance à la quinupristine/dalfopristine (SYN) a été caractérisée par la présence des gènes *IsaA* (n=20) ou *IsaA/IsaE* (n=1) chez *E. faecalis* (n= 21) et par la présence de *IsaE* (n=1), *msrC* (n=5) ou *IsaE/msrC* (n=6) chez *E. faecium* (n=12). Le gène *aac(6')-aph(2'')* connu pour conférer la résistance à la gentamicine a été retrouvé dans 8 sur 9 des souches résistantes investiguées par NGS. Aucun gène n'a été détecté dans la dernière souche résistante à la gentamicine. Toutes les souches résistantes à la tétracycline séquencées (n=36) portaient au moins un gène de résistance, à savoir *tetM* (n=8) ou la combinaison de 2 gènes *tetL/tetM* (n=32) (voir Tableau 26). Aucun gène n'a été identifié expliquant la résistance à l'ampicilline observée dans 8 *E. faecium* des souches séquencées. Cependant, la résistance à l'ampicilline chez *E. faecium* peut être due à une production accrue de PBP5 suite à la présence de mutations dans la sous-unité bêta de cette protéine, ce qui a été observé dans 7 des 8 *E. faecium* résistantes. La résistance à la ciprofloxacine, et de manière générale les fluoroquinolones, est caractérisée par la présence de mutations dans les gènes *parC* et *gyrA* et largement décrites chez les gram-négative. Des mutations ont été observées au sein de nos 4 souches résistantes (n=5/5). Plus précisément, chaque souche présentait au moins une mutation dans *parC* et une mutation dans *gyrA*, avec les mutations observées suivantes : *parC* p.S80I (n=3, décrite chez *Enterococcus* spp. (Lopez *et al.*, 2011)), *parC* p.V801I (n=1),

parC p.A391V (n=1), gyrA p.S83Y (n=2, décrite également chez *Salmonella* spp. (Macias-Farrer *et al.*, 2018)), gyrA p.N708D (n=2), gyrA p.E87G (n=1, décrite chez *Enterococcus* spp. (Lopez *et al.*, 2011)), gyrA p.D759N (n=1).

Le séquençage a également permis de mettre en évidence la présence de gènes de résistance chez des souches caractérisées par un phénotype sensible au linézolide ou à la vancomycine. Les gènes *fex* et *cat* étant inductibles (Schwarz *et al.*, 2016), l'hypothèse que les gènes *optrA* et *poxtA* le soient également pourrait expliquer leur présence au sein de 6 sur 10 (6 *E. faecium* isolées de poules pondeuses (n=3), veaux (n=2) et poulets de chair (n=1) et 4 *E. faecalis* isolées de veaux (n=3) et porcs (n=1)) souches sensibles phénotypiquement au linézolide (3 *E. faecium* isolées de veaux (n=1) et poulets de chair (n=1) et 3 *E. faecalis* isolées de porcs (n=1) et veaux (n=2)) et caractérisées par une concentration minimale inhibitrice de 4 mg/L (seuil de résistance). De même, la présence de séquences d'insertion (IS) en amont des éléments génétiques *vanHAX* a été décrit pour réprimer leur transcription et explique le phénotype sensible même en présence du cluster *vanA* (Sivertsen *et al.*, 2016), comme observé ici.

A noter que la plupart de ces gènes sont détectables avec un bead-array développé par le LNR dont la publication est en cours de reviewing.

En plus de la résistance aux antimicrobiens, le séquençage des entérocoques a permis de mettre en évidence la présence du gène *clpL* au sein de 7 *E. faecalis* isolées de veaux. En effet, ce gène code pour une protéase rapportée dans la littérature pour être largement présente au sein des bactéries Gram-positives (*L. monocytogenes*, *Streptococcus*) et d'être impliquée dans de nombreux mécanismes tels que la résistance aux stress, aux désinfectants ou aux antibiotiques (Jana *et al.*, 2021 ; Pöntinen *et al.*, 2017). Aussi, à notre connaissance, *clpL* n'a pas encore été décrit chez *Enterococcus* spp.

Tableau 26. Liste des gènes de résistance identifiés par NGS par phénotype résistant observé chez les entérocoques en 2021.

Sciensa- no ID	Espèce	Matrice animale	CHL	ERY	GEN	LZD	SYN	TET	VAN
VAR-767	<i>E. faecalis</i>	veaux	<i>fexA, optrA</i>	<i>ermA, ermB</i>		<i>optrA</i>	<i>IsaA</i>	<i>tetL, tetM</i>	
VAR-768	<i>E. faecalis</i>	veaux	<i>cat, fexA, optrA</i>	-		<i>optrA</i>	<i>IsaA</i>	<i>tetL, tetM</i>	
VAR-770	<i>E. faecalis</i>	veaux	<i>fexA, cat_{C221}, optrA</i>	<i>ermB</i>		<i>optrA</i>	<i>IsaA</i>	<i>tetM</i>	
VAR-771	<i>E. faecalis</i>	poulets de chair	<i>cat, fexA, optrA</i>	<i>ermA, ermB</i>		<i>optrA</i>	<i>IsaA</i>	<i>tetL, tetM</i>	
VAR-772	<i>E. faecalis</i>	veaux	<i>cat</i>	<i>ermB</i>			<i>IsaA</i>	<i>tetL, tetM</i>	
VAR-773	<i>E. faecalis</i>	porcs	<i>fexA, optrA</i>	<i>ermA, ermB</i>		<i>optrA*</i>	<i>IsaA</i>	<i>tetL, tetM</i>	
VAR-774	<i>E. faecalis</i>	veaux		<i>ermB</i>	<i>aac(6') - aph(2'')</i>		<i>IsaA</i>	<i>tetL, tetM</i>	
VAR-775	<i>E. faecalis</i>	veaux	<i>cat_{C221}</i>	<i>ermB</i>			<i>IsaA</i>	<i>tetL, tetM</i>	
VAR-802	<i>E. faecalis</i>	veaux	<i>fexA, optrA</i>	<i>ermA, ermB</i>		<i>optrA</i>	<i>IsaA</i>	<i>tetL, tetM</i>	
VAR-803	<i>E. faecalis</i>	porcs	<i>cat</i>	-	<i>aac(6') - aph(2'')</i>		<i>IsaA, IsaE</i>	<i>tetM</i>	
VAR-804	<i>E. faecalis</i>	veaux	<i>cat</i>				<i>IsaA</i>	<i>tetL, tetM</i>	
VAR-807	<i>E. faecalis</i>	poules repro- ductrices	<i>fexA, optrA</i>	<i>ermB</i>		<i>optrA</i>	<i>IsaA</i>	<i>tetL, tetM</i>	
VAR-808	<i>E. faecalis</i>	veaux	<i>cat, fexA, optrA</i>	<i>ermA, ermB</i>	<i>aac(6') - aph(2'')</i>	<i>optrA*</i>	<i>IsaA</i>	<i>tetL, tetM</i>	

VAR-809	<i>E. faecalis</i>	veaux	<i>fexA, optrA</i>	<i>ermA, ermB</i>		<i>optrA</i>	<i>lsaA</i>	<i>tetM</i>	
VAR-844	<i>E. faecalis</i>	veaux	<i>cat, fexA, optrA</i>	<i>ermA, ermB</i>	-	<i>optrA*</i>	<i>lsaA</i>	<i>tetL, tetM</i>	
VAR-845	<i>E. faecalis</i>	veaux	<i>catp_{C221}, fexA, optrA</i>	<i>ermA, ermB</i>		<i>optrA</i>	<i>lsaA</i>	<i>tetM</i>	
VAR-846	<i>E. faecalis</i>	veaux	-	<i>ermB</i>		*	<i>lsaA</i>	<i>tetL, tetM</i>	
VAR-847	<i>E. faecalis</i>	veaux	<i>catp_{C221}</i>	<i>ermB</i>			<i>lsaA</i>	<i>tetL, tetM</i>	
VAR-848	<i>E. faecalis</i>	veaux	<i>fexA, optrA</i>	<i>ermA, ermB</i>		<i>optrA</i>	<i>lsaA</i>	<i>tetL, tetM</i>	
VAR-849	<i>E. faecalis</i>	veaux		<i>ermB, ermB, vatD</i>			<i>lsaA</i>	<i>tetM</i>	<i>vanA</i>
VAR-776	<i>E. faecium</i>	veaux	<i>fexA, capC221, optrA</i>	<i>ermB, msrC</i>	<i>aac(6') - aph(2'')</i>	<i>optrA*</i>	<i>lsaE, msrC</i>	<i>tetL, tetM</i>	
VAR-777	<i>E. faecium</i>	veaux	<i>cat</i>	<i>ermB, msrC</i>	<i>aac(6') - aph(2'')</i>		<i>lsaE, msrC</i>	<i>tetL, tetM</i>	
VAR-778	<i>E. faecium</i>	poules pondeuses				*	<i>msrC</i>		
VAR-779	<i>E. faecium</i>	poulets de chair	<i>catp_{C194}</i>	<i>ermA, ermB</i>			<i>lsaE</i>	<i>tetL, tetM</i>	
VAR-780	<i>E. faecium</i>	veaux		<i>ermB, ermT, msrC</i>			<i>msrC</i>	<i>tetL, tetM</i>	<i>vanA</i>
VAR-781	<i>E. faecium</i>	porcs	<i>fexB, optrA, poxtA</i>	<i>ermA, msrC</i>		<i>optrA, poxtA</i>	<i>lsaE, msrC</i>	<i>tetL, tetM</i>	
VAR-782	<i>E. faecium</i>	poules pondeuses		<i>ermB, msrC</i>			<i>msrC</i>	<i>tetM</i>	
VAR-783	<i>E. faecium</i>	poulets de chair		<i>ermA, ermB, msrC</i>			<i>msrC</i>	<i>tetM</i>	
VAR-784	<i>E. faecium</i>	veaux		<i>ermB, msrC</i>			<i>msrC</i>	<i>tetL, tetM</i>	
VAR-799	<i>E. faecalis</i>	veaux	<i>fexA, capC221, optrA</i>	<i>ermB</i>		<i>optrA</i>	<i>lsaA</i>	<i>tetL, tetM</i>	
VAR-800	<i>E. faecium</i>	veaux	<i>fexB, optrA, poxtA</i>	<i>ermA, ermB, msrC</i>	<i>aac(6') - aph(2'')</i>	<i>optrA, poxtA*</i>	<i>lsaE, msrC</i>	<i>tetL, tetM</i>	
VAR-801	<i>E. faecium</i>	poules pondeuses				*		<i>tetM</i>	
VAR-805	<i>E. faecium</i>	poulets de chair	<i>fexA, optrA</i>	<i>msrC</i>		<i>optrA*</i>	<i>lsaE, msrC</i>	<i>tetL, tetM</i>	
VAR-806	<i>E. faecium</i>	veaux	<i>fexB, optrA, poxtA</i>	<i>ermA, ermB, msrC</i>	<i>aac(6') - aph(2'')</i>	<i>optrA, poxtA</i>	<i>lsaE, msrC</i>	<i>tetL, tetM</i>	
VAR-810	<i>E. faecium</i>	veaux		<i>ermA, ermB, msrC</i>	<i>aac(6') - aph(2'')</i>		<i>msrC</i>	<i>tetL, tetM</i>	
VAR-811	<i>E. faecium</i>	poules pondeuses				*		<i>tetM</i>	

Chaque case orangée correspond à la présence de la résistance phénotypique à l'antimicrobien cité, avec les antimicrobiens suivants : chloramphénicol (CHL), érythromycine (ERY), gentamicine (GEN), linézolide (LZD), quinupristine/dalfopristine (synercid, SYN), tétracycline (TET) et vancomycine (VAN). Chaque gène retrouvé par NGS est indiqué en dessous de chaque antimicrobien auquel il confère la résistance. Les gènes présents dans les cases blanches sont des gènes de résistance observés dans des souches dont le phénotype pour l'antibiotique correspondant était sensible. La présence d'un tiret « - » indique un phénotype résistant pour lequel aucun gène de résistance n'a été détecté par NGS. La présence d'une astérisque « * » signifie que la concentration minimale inhibitrice au linézolide de la souche considérée était de 4 mg/L, la concentration au seuil de résistance pour cet antibiotique.

- Facteurs de virulence

De manière générale, la virulence est un trait commun des *Enterococcus* spp. indépendamment de leur origine (animale, humaine, environnementale ou alimentaire) leur permettant de s'adapter à leur environnement. Les différents facteurs de virulence identifiés au sein des entérocoques assurent

différentes fonctions telles que l'adhésion à un hôte ou à un environnement non-biologique, la conjugaison/formation du pili, la formation d'un biofilm protecteur ou une activité cytolitique permettant la colonisation ou l'apport de nutriments (Selleck *et al.*, 2019 ; Soheili *et al.*, 2014 ; Semedo *et al.*, 2003). De plus, la présence de certains facteurs de virulence, bien que leur rôle précis dans la pathogénicité ne soit pas entièrement connu, a été particulièrement associée aux *Enterococcus faecalis* isolées d'infections (Mannu *et al.*, 2003). En effet, les facteurs de virulence tels que esp, cyl ou agg, situés sur des îlots de pathogénicité, ont été associés à une virulence plus importante de par leur fonction (cytolitique, agrégation, gélatinase) et la fréquence plus élevée de leur présence chez les souches cliniques (Selleck *et al.*, 2019, Rathnayake *et al.*, 2012; Mannu *et al.*, 2003).

L'analyse de 36 entérocoques a montré qu'un plus grand nombre de facteurs de virulence a été retrouvé chez *E. faecalis* par rapport à *E. faecium* (voir Tableau 27), indépendamment de l'origine animale de ces souches comme décrit ailleurs (Jimenez *et al.*, 2013 ; Rathnayake *et al.*, 2012). Toutes les souches investiguées par NGS en 2021 portaient au moins deux facteurs de virulence, à savoir efaAfs/efaAfm (rôle d'adhésines) et ace/acm (rôle dans la colonisation et formation du biofilm) spécifiques de *E. faecalis* et *E. faecium* respectivement. Parmi toutes les souches analysées, une seule (*E. faecalis* isolée de porcs) était caractérisée par la présence du facteur de virulence cyl, connu pour son activité cytolitique. Il est important de noter que l'activité cytolitique de ce facteur de virulence dépend de la transcription d'un opéron composé de 6 gènes différents (*cylLL*, *cylLS*, *cylM*, *cylB*, *cylA*, et *cylI*) (Selleck *et al.*, 2019 ; Semedo *et al.*, 2003), qui n'ont pas tous été retrouvés au sein de cette souche. À l'inverse, l'adhésine esp observée fréquemment chez les souches cliniques *E. faecium* (Selleck *et al.*, 2019 ; Rathnayake *et al.*, 2012 ; Mannu *et al.*, 2003) n'a pas été isolée au sein des souches isolées d'animaux producteurs d'aliments en 2021.

Tableau 27. Liste des facteurs de virulence identifiés par NGS chez les entérocoques en 2021.

Sciensa- no ID	Espèce	efaA	ElrA	SrtA	Acm/ Ace	ccf/cob/cad	camE	agg	tpx	ebp	hyl	gelE	fsr	cyl					
VAR-768	<i>E. faecalis</i>	efaAfs	ElrA	SrtA	ace	cCF10	cOB1	cad	camE	agg	tpx	ebpA	ebpB	ebpC	hylA	hylB	gelE	fsrB	-
VAR-767 VAR-771 VAR-772 VAR-775 VAR-807 VAR-848	<i>E. faecalis</i>	efaAfs	ElrA	SrtA	ace	cCF10	cOB1	cad	camE	-	tpx	ebpA	ebpB	ebpC	hylA	hylB	gelE	fsrB	-
VAR-773	<i>E. faecalis</i>	efaAfs	ElrA	SrtA	ace	cCF10	cOB1	cad	camE	agg	tpx	ebpA	ebpB	ebpC	hylA	-	gelE	fsrB	-
VAR-845 VAR-846	<i>E. faecalis</i>	efaAfs	ElrA	SrtA	ace	cCF10	cOB1	cad	camE	agg	tpx	ebpA	ebpB	ebpC	hylA	-	gelE	-	-
VAR-770	<i>E. faecalis</i>	efaAfs	ElrA	SrtA	ace	cCF10	cOB1	cad	camE	agg	tpx	ebpA	ebpB	ebpC	hylA	-	gelE	-	-
VAR-808	<i>E. faecalis</i>	efaAfs	ElrA	SrtA	ace	cCF10	cOB1	cad	camE	-	tpx	ebpA	ebpB	ebpC	-	hylB	gelE	fsrB	-
VAR-803	<i>E. faecalis</i>	efaAfs	ElrA	SrtA	ace	cCF10	cOB1	cad	camE	agg	tpx	ebpA	ebpB	ebpC	hylA	-	-	-	cylL
VAR-774 VAR-799 VAR-804	<i>E. faecalis</i>	efaAfs	ElrA	SrtA	ace	cCF10	cOB1	cad	camE	agg	tpx	ebpA	ebpB	ebpC	hylA	-	-	-	-
VAR-844	<i>E. faecalis</i>	efaAfs	ElrA	SrtA	ace	cCF10	cOB1	cad	camE	-	tpx	ebpA	ebpB	ebpC	-	hylB	gelE	-	-
VAR-849	<i>E. faecalis</i>	efaAfs	ElrA	SrtA	ace	cCF10	cOB1	cad	camE	-	tpx	ebpA	ebpB	ebpC	hylA	hylB	-	-	-
VAR-847	<i>E. faecalis</i>	efaAfs	-	SrtA	ace	cCF10	cOB1	cad	camE	agg	tpx	ebpA	ebpB	ebpC	-	hylB	gelE	-	-
VAR-802	<i>E. faecalis</i>	efaAfs	-	SrtA	ace	cCF10	cOB1	cad	camE	-	tpx	ebpA	ebpB	ebpC	-	hylB	gelE	fsrB	-
VAR-809	<i>E. faecalis</i>	efaAfs	-	SrtA	ace	cCF10	cOB1	cad	camE	agg	tpx	ebpA	ebpB	ebpC	hylA	-	-	-	-
VAR-782	<i>E. faecium</i>	efaAfm	-	SrtA	acm	cCF10	cOB1	-	-	-	-	ebpA	-	-	-	-	-	-	-
VAR-781	<i>E. faecium</i>	efaAfm	-	-	acm	-	-	-	-	-	-	-	-	-	hylB	-	-	-	-
VAR-776 VAR-777 VAR-778 VAR-779 VAR-780	<i>E. faecium</i>	efaAfm	-	-	acm	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

3.2.9.9. Discussion

Lors de la surveillance des entérocoques en 2021, 1308 tests d'identification MALDI-TOF ont été réalisés à partir de 1319 échantillons prélevés chez la volaille, les porcs et les veaux, les 11 échantillons restant n'ayant pas montré de croissance d'entérocoques. *Enterococcus faecium* a été plus fréquemment isolée qu'*E. faecalis* au sein des échantillons de poules reproductrices (**77.6%**), poules pondeuses (**72.4%**), veaux (**61.8%**) et porcs (**61.0%**). A l'inverse, *Enterococcus faecalis* a été isolée plus fréquemment qu'*E. faecium* au sein des échantillons de poulets de chair (**67.3%**) (voir Figure 41). Les prévalences des espèces bactériennes par catégorie animale observées en 2021 étaient similaires à celles observées les années précédentes. Après identification de l'espèce bactérienne, 439 tests de susceptibilité antimicrobienne chez *Enterococcus faecalis* ainsi que 802 tests de susceptibilité antimicrobienne chez *Enterococcus faecium* ont été réalisés.

Dans l'ensemble, les pourcentages de résistance observés chez *Enterococcus faecalis* et *Enterococcus faecium* au sein des différentes matrices animales étudiées semblent stables depuis 2019. En 2021, les résistances à la tétracycline, à l'érythromycine et à la quinupristine/dalfopristine étaient toujours les résistances les plus observées, à la fois chez *E. faecalis* et *E. faecium*, en taux variable selon la matrice animale. Cependant, des diminutions significatives du taux de résistance au chloramphénicol chez *E. faecalis* isolées de veaux et de porcs (**-17.7%** et **-14.4%** respectivement, voir Figure 49 à Figure 53) et du taux de résistance à l'érythromycine chez *E. faecalis* isolées de porcs (**-18.3%**) ont été observées en 2021 par rapport à 2019. Malgré une diminution significative de la résistance à la quinupristine/dalfopristine (**-8.6%**) observée chez *E. faecium* isolées de veaux depuis 2019, celle-ci restait extrêmement élevée en 2021. Bien qu'en diminution, la résistance au chloramphénicol était particulièrement élevée chez *E. faecalis* isolées de veaux (**44.9%**). La résistance à l'ampicilline n'a été observée qu'au sein des *E. faecium* en 2021, avec une diminution significative (**-10.2%**) observée chez les poulets de chair en 2021 par rapport à 2019.

Certaines résistances aux antimicrobiens d'importance critique pour la santé humaine ont également été observées en 2021. La résistance au linézolide a été observée dans 14 souches, à savoir 12 souches *E. faecalis* (1 isolées de poulets de chair, 1 isolée de poules reproductrices et 10 isolées de veaux) et 2 souches *E. faecium* (1 isolée de veaux et 1 isolée de porcs). De plus, un isolat *E. faecalis* provenant de veaux et résistant à la vancomycine a également été rapporté. En 2021, aucune résistance à la daptomycine n'a été observée, expliquant ainsi la diminution significative observée cette année du taux de cette résistance chez *E. faecium* isolées de toutes les matrices animales. Cette diminution est en corrélation avec la modification du seuil de résistance chez *E. faecium* (de 4 à 8 mg/L). Aucune résistance à la teicoplanine ou à la tigecycline n'a été observée durant la période 2019-2021.

En général, un plus grand nombre de souches multirésistantes a été observé chez les veaux (**54.2%** d'*E. faecalis*) et chez les poulets de chair (**60.6%** d'*E. faecium*). De plus, les souches accumulant le plus de résistances antimicrobiennes différentes étaient celles isolées de veaux, avec un maximum de 5 et 6 résistances différentes observées chez *E. faecalis* et *E. faecium*, respectivement. À l'inverse, un certain pourcentage des souches ne présentait aucune résistance, principalement celles isolées de poules pondeuses, poules reproductrices et porcs (**42.3%**, **25.0%** et **40.4%** d'*E. faecalis* et **32.8%**, **11.2%** et **13.1%** d'*E. faecium*, respectivement).

En 2021, une investigation par NGS de 36 entérocoques a été réalisée sur base de la résistance antimicrobienne phénotypique observée. Le séquençage de ces souches a apporté des informations génétiques quant à leur résistance antimicrobienne, leur typage et leur virulence.

Le typage des souches a révélé l'identification de 27 sequence-types (STs) différents, suggérant la présence d'une certaine diversité génétique au sein des entérocoques isolées d'animaux. Comme décrit par Timmermans *et al.* (2022), une diversité de sequence-types (ST 22, 25, 41, 234, 283, 314, 330 et 1167) a été observée au sein des entérocoques résistantes au linézolide.

Le séquençage a également mis en évidence la présence de gènes de résistance expliquant le phénotype résistant dans **96.8%** (n=149/154) des phénotypes individuels observés et a permis de caractériser génétiquement les résistances d'intérêt humaine, comme les résistances aux antibiotiques critiques. La résistance au linézolide (LZD) en 2021 était caractérisée par la présence de gènes transférables, comme déjà observé en 2019 (Timmermans *et al.*, 2021). Toutes les souches résistantes analysées (n=12) portaient au minimum un gène, à savoir *optrA* (n=11, 9 veaux, 1 poule reproductrice et 1 poulet de chair) ou une combinaison des gènes *optrA/poxxA* (n=1, porc). De plus, *optrA* et *poxxA* ont également été observés au sein de souches sensibles (n=6/10) au linézolide présentant une concentration minimale inhibitrice de 4 mg/L. La détection de ces gènes dans des souches considérées comme sensibles d'après les normes officielles a déjà été décrite chez Timmermans *et al.* (2021). L'hypothèse que les gènes *optrA* et *poxxA* pourraient être inductibles pourrait expliquer leur présence au sein de souches sensibles phénotypiquement au linézolide. En plus de la résistance au linézolide, ces gènes confèrent aussi une résistance aux phénicolés et aux phénicolés et à la tétracycline, respectivement. Ainsi, ils ont pu être sélectionnés de façon croisée (phénomène de sélection croisée) impliquant l'utilisation d'un des antibiotiques auxquels ils confèrent une résistance, autre que le linézolide (non-utilisé chez les animaux). La résistance à la vancomycine observée en 2021 (1 *E. faecalis* isolée de veaux) était caractérisée par la présence du cluster *vanA*, ensemble de gènes également retrouvé chez une *E. faecium* sensible à la vancomycine isolée de veaux. La présence de séquence d'insertion en amont de ce gène pourrait expliquer le phénotype sensible observé dans ce dernier cas. De fait, la détection d'un gène n'est pas toujours associée à un phénotype résistant (altération de l'expression).

Cette étude a permis de mettre en évidence la présence du gène *clp* impliqué notamment dans la résistance aux désinfectants au sein de 7 *E. faecalis* isolées de veaux. À côté de la résistance aux antibiotiques, la résistance aux désinfectants est aussi importante à caractériser et à surveiller.

La virulence, un trait commun des *Enterococcus* spp. a été caractérisée par NGS. Différents facteurs de virulence ont été identifiés au sein des entérocoques, assurant différentes fonctions (adhésion, conjugaison, formation du biofilm, activité cytolitique, colonisation) et leur permettant de s'adapter à leur environnement. En 2021, l'analyse des 36 entérocoques a révélé la présence d'un plus grand nombre de facteurs de virulence chez *E. faecalis* par rapport à *E. faecium*, indépendamment de l'origine animale. Toutes les souches investiguées portaient au moins deux facteurs de virulence, *efaAfs/efaAfm* et *ace/acm* spécifiques de *E. faecalis* et *E. faecium* respectivement. Aucun facteur de virulence associé à une pathogénicité élevée et décrite chez les souches humaines (p.ex. *esp*, *agg*, *cyl*) n'a été retrouvé, à l'exception de l'opéron *cyl* connu pour son activité cytolitique mais retrouvé incomplet au sein d'une *E. faecalis* isolée de porcs.

De manière générale, le séquençage et le phénotypage sont deux méthodes complémentaires. En effet, une utilisation seule du NGS pourrait apporter une information erronée, comme dans l'identification d'un gène de résistance au sein d'une souche présentant un phénotype sensible. À l'inverse, une résistance phénotypique observée n'est pas toujours expliquée par NGS, particulièrement si de nouveaux mécanismes de résistance sont impliqués. Ainsi, les différents mécanismes de résistance (gènes de résistances, mutations) ont été mis en évidence par séquençage, de même que le phénomène de résistance croisée observé avec l'identification des gènes *optrA* et *poxxA* au sein de souches résistantes au linézolide et également au sein de certaines souches considérées comme sensibles au linézolide (avec une MIC = 4 mg/L) en 2021.

3.3. SÉQUENÇAGE DU GÉNOME ENTIER CHEZ LES E. COLI BLSE (ESBL) ISOLÉS DE LA PRODUCTION PRIMAIRE ET LES VIANDES FRAICHES

3.3.1. Présence des gènes de résistance aux antibiotiques : analyse des résultats

La Figure 56 et le Tableau 28 montrent le nombre et le pourcentage des isolats contenant au moins un gène de résistance par famille d'antibiotique.

Le Tableau 29 montre le nombre d'isolats et le pourcentage par gène et par matrice, chez la production primaire et chez le secteur de la distribution.

Limite de l'analyse :

Puisque le nombre d'isolats par matrice alimentaire varie largement entre les trois catégories d'animaux, les comparaisons des pourcentages entre les matrices doivent être interprétées avec précaution.

Afin de faire des analyses compréhensibles et de pouvoir en tirer des conclusions, les matrices de viande fraîche de volaille, FT DIS 819-821 ont été analysées ensemble, ainsi que les FT DIS 809 porc-bœuf (au vu du nombre limité d'isolats).

Dans l'ensemble des données analysées, différentes constatations générales ont été observées par famille d'antibiotiques :

- En ce qui concerne les gènes de résistance associés aux β -lactames (bla), tous les isolats de caeca de volaille, caeca de porc, caeca de veau et viande fraîche de porc/bœuf ont été confirmés en tant que producteurs de BLSE (enzymes β -lactamases à spectre étendu) portant des gènes acquis de résistance des familles *bla_{CTX-M}*, *bla_{SHV}*, *bla_{TEM}*, *bla_{OXA}*. Pour cinq isolats provenant de la viande fraîche de volaille, aucun gène de résistance aux céphalosporins de troisième/quatrième génération ni aucune mutation chromosomique connue n'ont été identifiés.
- Aucun gène conférant de la résistance aux carbapénèmes n'a été retrouvé parmi les 281 génomes analysés.
- La résistance aux aminoglycosides associée au gène de résistance *aadA* (aminoglycoside adényl transférase) a été trouvée dans le génome de 99% des isolats. Ce gène confère de la résistance à certains aminoglycosides, comme la streptomycine et la spectinomycine. Les gènes de résistance à la gentamicine *aac(3)*, *aac(6)* ont été trouvés dans 12.8% des isolats tandis que le gène de résistance à l'amikacine *aac(6')-Ib*, rarement rencontré, a été retrouvé dans 1 isolat.
- Au niveau de la résistance aux macrolides, tous les isolats portaient au moins un gène conférant la résistance à cette famille. Parmi les génomes analysés de 281 isolats, tous portaient le gène *mdf(A)* qui code pour une protéine de transporteurs membranaires. A noter que l'expression de ce gène induit la résistance à un spectre très large d'antibiotiques, y compris les désinfectants d'ammoniums quaternaires (Zang *et al.* 2020, Zou *et al.* 2014).
- Des gènes de résistance aux phénicolés, *catA* ou *cmlA* ou *floR* ont été trouvés dans 61% des isolats de caeca de volaille, 44% des isolats de caeca de porc, 73% des isolats de caeca de veau, chez 53% des isolats de viande fraîche de volaille et 80% des isolats de viande fraîche de bœuf/veau.
- En ce qui concerne les sulfamides, des gènes de résistance (*sul1* ou *sul2* ou *sul3*) ont été trouvés dans 85.5 % des isolats de caeca de volaille, 55.5% des isolats de caeca de porc, 73% des isolats de caeca de veau, dans 86.2% des isolats de viande fraîche de volaille et 40% des isolats de viande fraîche de bœuf/veau.

- Des gènes conférant de la résistance à la tétracycline, *tet(A)* ou *tet(B)* ou *tet(M)* ont été retrouvés dans 74.4% des isolats de caeca de volaille, 44% % des isolats de caeca de porc, 73% % des isolats de caeca de veau, dans 68.7%% des isolats de viande fraiche de volaille et 80% des isolats de viande fraiche de porc/bœuf.
- La résistance à la triméthoprine est associée au gène de résistance (*dfra*) dans 64.4% des isolats de caeca de volaille, 44% % des isolats de caeca de porc, 82% % des isolats de caeca de veau, dans 69.3%% des isolats de viande fraiche de volaille et 20% des isolats de viande fraiche de porc/bœuf.
- En ce qui concerne la colistine, le gène de résistance plasmidique *mcr 1.1* a été retrouvé dans le génome de 4 isolats, un provenant de caeca de porc, un isolé à partir de la viande fraiche de volaille et deux isolés à partir de la viande fraiche de bœuf.
- La résistance plasmidique à la fluoroquinolone est associée au gène plasmidique (PMQR, plasmid mediated quinolone resistance) *qnrS* qui a été retrouvé dans 24.4% des isolats de caeca de volaille, 11% % des isolats de caeca de porc, 45.5% % des isolats de caeca de veau, dans 18.67%% des isolats de viande fraiche de volaille et 40% des isolats de viande fraiche de porc/bœuf.
- Parmi les 281 génotypes analysés aucun ne portait le gène de résistance plasmidique à la tigécycline, *tet (X)*.
- La présence de gènes conférant de la résistance aux désinfectants, *qaCE*, *sitABCa* été retrouvée dans 82% des isolats de caeca de volaille, 66.6% % des isolats de caeca de porc, 90.9% % des isolats de caeca de veau, dans 75.3%% des isolats de viande fraiche de volaille et 40% des isolats de viande fraiche de porc/bœuf.

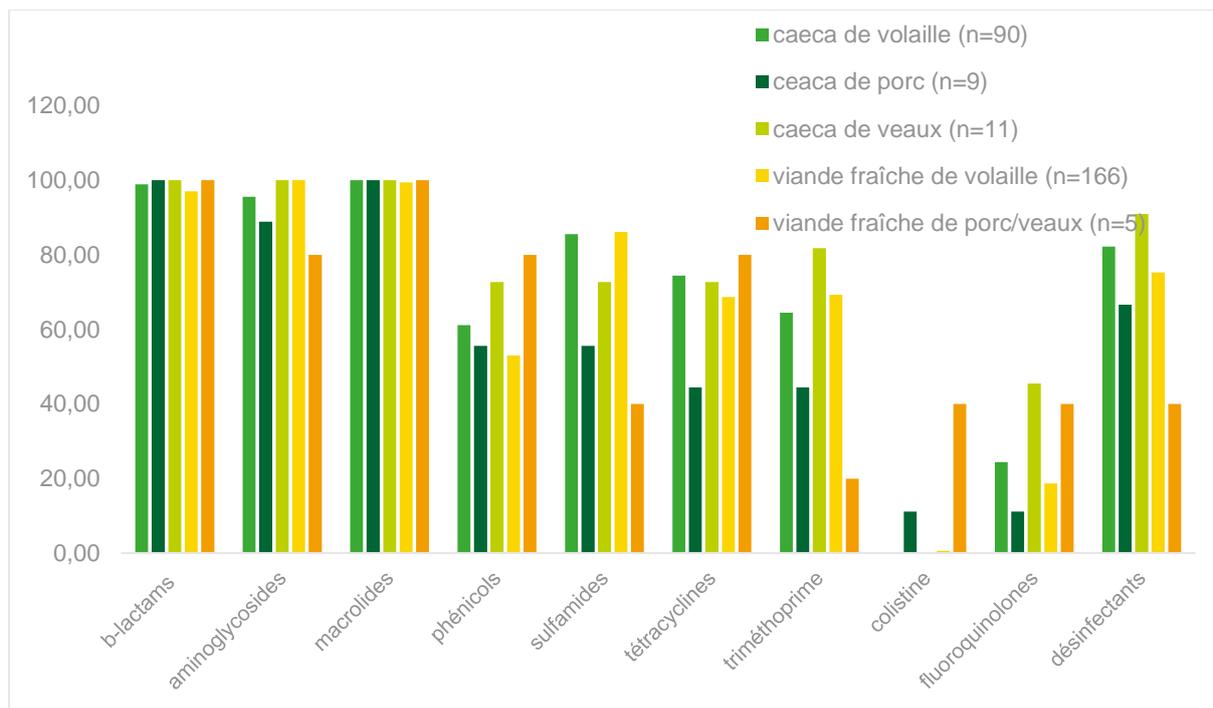


Figure 56. Pourcentage d'isolats contenant au moins un gène de résistance par famille d'antibiotiques.

Tableau 28. Nombre d'isolats par matrice contenant au moins un gène de résistance conférant à la résistance à la famille d'antibiotiques correspondante.

	PRI 019		PRI 035		PRI 036		DIS 819-821		DIS 809	
	caeca de volaille (n=90)	%	caeca de porc (n=9)	%	caeca de veau (n=11)	%	viande fraîche de volaille (n=166)	%	viande fraîche de porc/veau (n=5)	%
β-lactams	89	98,89	9	100,00	11	100,00	161	96,99	5	100
aminoglycosides	86	95,56	8	88,89	11	100,00	166	100,00	4	80
macrolides	90	100,00	9	100,00	11	100,00	165	99,40	5	100
phénicolés	55	61,11	5	55,56	8	72,73	88	53,01	4	80
sulphonamides	77	85,56	5	55,56	8	72,73	143	86,14	2	40
tétracycline's	67	74,44	4	44,44	8	72,73	114	68,67	4	80
trimethoprim	58	64,44	4	44,44	9	81,82	115	69,28	1	20
colistine	0	0,00	1	11,11	0	0,00	1	0,60	2	40
fluoroquinolones	22	24,44	1	11,11	5	45,45	31	18,67	2	40
disinfectants	74	82,22	6	66,67	10	90,91	125	75,30	2	40

Tableau 29. Nombre d'isolats par gène de résistance et par matrice.

Famille d'antibiotique	Gène	PRI 019 (n=90)		PRI 035 (n=9)		PRI 036 (n=11)		DIS 819+DIS 821 (n=166)		DIS 809 (n=5)	
			%		%		%		%		%
aminoglycoside	aac(3)-IIa	0	0,00	0	0,00	1	9,09	1	0,60	1	20
aminoglycoside	aac(3)-IIId	10	11,11	0	0,00	4	36,36	13	7,83	1	20

Famille d'antibiotique	Gène	PRI 019 (n=90)		PRI 035 (n=9)		PRI 036 (n=11)		DIS 819+DIS 821 (n=166)		DIS 809 (n=5)	
			%		%		%		%		%
aminoglycoside	aac(3)-IV	0	0,00	1	11,11	0	0,00	0	0,00	0	0
aminoglycoside	aac(3)-VIa	0	0,00	0	0,00	0	0,00	2	1,20	0	0
aminoglycoside	aac(6')-Ib3	0	0,00	2	22,22	0	0,00	0	0,00	0	0
aminoglycoside	aadA1	44	48,89	1	11,11	2	18,18	81	48,80	0	0
aminoglycoside	aadA1*	4	4,44	1	11,11	0	0,00	1	0,60	0	0
aminoglycoside	aadA13	0	0,00	0	0,00	0	0,00	1	0,60	0	0
aminoglycoside	aadA17	16	17,78	0	0,00	0	0,00	31	18,67	0	0
aminoglycoside	aadA2	12	13,33	1	11,11	1	9,09	29	17,47	0	0
aminoglycoside	aadA22	5	5,56	1	11,11	0	0,00	4	2,41	0	0
aminoglycoside	aadA24	0	0,00	0	0,00	0	0,00	2	1,20	0	0
aminoglycoside	aadA2b	6	6,67	1	11,11	3	27,27	8	4,82	1	20
aminoglycoside	aadA5	4	4,44	1	11,11	0	0,00	17	10,24	0	0
aminoglycoside	ant(2'')-Ia	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	1	20
aminoglycoside	ant(3'')-Ia	3	3,33	1	11,11	0	0,00	6	3,61	0	0
aminoglycoside	aph(3'')-Ib	12	13,33	3	33,33	1	9,09	13	7,83	1	20
aminoglycoside	aph(3'')-Ib*	5	5,56	0	0,00	10	90,91	3	1,81	2	40
aminoglycoside	aph(3')-Ia	4	4,44	1	11,11	10	90,91	5	3,01	2	40
aminoglycoside	aph(3')-Ia*	0	0,00	0	0,00	0	0,00	1	0,60	0	0
aminoglycoside	aph(4)-Ia	0	0,00	1	11,11	0	0,00	0	0,00	0	0
aminoglycoside	aph(6)-Id	17	18,89	3	33,33	11	100,00	16	9,64	3	60
beta-lactam	blaCARB-2	0	0,00	0	0,00	0	0,00	2	1,20	0	0

Famille d'antibiotique	Gène	PRI 019 (n=90)		PRI 035 (n=9)		PRI 036 (n=11)		DIS 819+DIS 821 (n=166)		DIS 809 (n=5)	
			%		%		%		%		%
beta-lactam	blaCMY-2	0	0,00	0	0,00	0	0,00	1	0,60	0	0
beta-lactam	blaCTX-M-1	11	12,22	1	11,11	4	36,36	32	19,28	1	20
beta-lactam	blaCTX-M-14	0	0,00	2	22,22	0	0,00	1	0,60	0	0
beta-lactam	blaCTX-M-15	0	0,00	0	0,00	2	18,18	2	1,20	0	0
beta-lactam	blaCTX-M-3	0	0,00	0	0,00	0	0,00	1	0,60	0	0
beta-lactam	blaCTX-M-32	1	1,11	1	11,11	4	36,36	2	1,20	1	20
beta-lactam	blaCTX-M-55	12	13,33	1	11,11	0	0,00	19	11,45	1	20
beta-lactam	blaCTX-M-61	1	1,11	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0
beta-lactam	blaCTX-M-65	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	1	20
beta-lactam	blaDHA-1	0	0,00	0	0,00	0	0,00	1	0,60	0	0
beta-lactam	blaOXA-1	0	0,00	0	0,00	1	9,09	0	0,00	1	20
beta-lactam	blaOXA-10	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	1	20
beta-lactam	blaSHV-12	46	51,11	1	11,11	0	0,00	70	42,17	0	0
beta-lactam	blaSHV-2	1	1,11	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0
beta-lactam	blaTEM-1	31	34,44	3	33,33	5	45,45	43	25,90	1	20
beta-lactam	blaTEM-135	0	0,00	0	0,00	0	0,00	1	0,60	0	0
beta-lactam	blaTEM-15	0	0,00	1	11,11	0	0,00	0	0,00	0	0
beta-lactam	blaTEM-176	0	0,00	0	0,00	2	18,18	0	0,00	0	0
beta-lactam	blaTEM-52	16	17,78	1	11,11	1	9,09	33	19,88	1	20
beta-lactam	blaTEM-like	7	7,78	0	0,00	0	0,00	7	4,22	0	0
colistine	mcr-1.1	0	0,00	1	11,11	0	0,00	1	0,60	2	40

Famille d'antibiotique	Gène	PRI 019 (n=90)		PRI 035 (n=9)		PRI 036 (n=11)		DIS 819+DIS 821 (n=166)		DIS 809 (n=5)	
			%		%		%		%		%
désinfectant	qacE	31	34,44	3	33,33	6	54,55	37	22,29	1	20
désinfectant	sitABCD	63	70,00	4	44,44	6	54,55	111	66,87	2	40
fosfomycine	fosA3	0	0,00	0	0,00	0	0,00	1	0,60	0	0
fosfomycine	fosA7	0	0,00	0	0,00	0	0,00	2	1,20	0	0
macrolide	erm(42)	0	0,00	0	0,00	0	0,00	1	0,60	0	0
macrolide	erm(B)	0	0,00	3	33,33	0	0,00	2	1,20	0	0
macrolide	lnu(F)	73	81,11	1	11,11	3	27,27	118	71,08	1	20
macrolide	lnu(G)	13	14,44	2	22,22	4	36,36	20	12,05	0	0
macrolide	mdf(A)	90	100,00	9	100,00	11	100,00	166	100,00	5	100
macrolide	mef(C)	0	0,00	1	11,11	0	0,00	0	0,00	0	0
macrolide	mph(A)	7	7,78	4	44,44	5	45,45	13	7,83	1	20
macrolide	mph(B)	10	11,11	0	0,00	1	9,09	4	2,41	0	0
macrolide	mph(E)	0	0,00	0	0,00	4	36,36	2	1,20	0	0
macrolide	mph(G)	0	0,00	1	11,11	0	0,00	0	0,00	0	0
macrolide	msr(E)	0	0,00	0	0,00	4	36,36	2	1,20	0	0
phénicol	catA1	20	22,22	1	11,11	1	9,09	15	9,04	1	20
phénicol	catA2	0	0,00	0	0,00	1	9,09	0	0,00	0	0
phénicol	cml	0	0,00	0	0,00	0	0,00	2	1,20	0	0
phénicol	cmlA1	38	42,22	2	22,22	0	0,00	68	40,96	1	20
phénicol	floR	0	0,00	2	22,22	7	63,64	5	3,01	3	60
Fluoroquinolone	qnrB19	3	3,33	0	0,00	0	0,00	0	0,00	1	20

Famille d'antibiotique	Gène	PRI 019 (n=90)		PRI 035 (n=9)		PRI 036 (n=11)		DIS 819+DIS 821 (n=166)		DIS 809 (n=5)	
			%		%		%		%		%
Fluoroquinolone	qnrB4	0	0,00	0	0,00	0	0,00	1	0,60	0	0
Fluoroquinolone	qnrS1	19	21,11	1	11,11	5	45,45	28	16,87	2	40
Fluoroquinolone	qnrS2	0	0,00	0	0,00	0	0,00	1	0,60	0	0
Fluoroquinolone	qnrS3	1	1,11	0	0,00	0	0,00	1	0,60	0	0
rifampicine	ARR-2	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	1	20
sulfamide	sul1	28	31,11	2	22,22	6	54,55	37	22,29	1	20
sulfamide	sul2	31	34,44	3	33,33	2	18,18	54	32,53	1	20
sulfamide	sul3	46	51,11	2	22,22	3	27,27	85	51,20	1	20
tétracycline	tet(31)	0	0,00	1	11,11	0	0,00	0	0,00	0	0
tétracycline	tet(A)	61	67,78	4	44,44	4	36,36	105	63,25	3	60
tétracycline	tet(A)-like	2	2,22	0	0,00	0	0,00	2	1,20	0	0
tétracycline	tet(B)	7	7,78	0	0,00	8	72,73	7	4,22	1	20
tétracycline	tet(M)	0	0,00	0	0,00	0	0,00	3	1,81	0	0
triméthoprim	dfrA1	10	11,11	0	0,00	2	18,18	16	9,64	0	0
triméthoprim	dfrA1-like	15	16,67	2	22,22	3	27,27	13	7,83	0	0
triméthoprim	dfrA12	31	34,44	1	11,11	1	9,09	58	34,94	0	0
triméthoprim	dfrA14	1	1,11	0	0,00	1	9,09	5	3,01	0	0
triméthoprim	dfrA16	0	0,00	0	0,00	0	0,00	2	1,20	0	0
triméthoprim	dfrA17	4	4,44	1	11,11	0	0,00	18	10,84	0	0
triméthoprim	dfrA36	0	0,00	0	0,00	1	9,09	0	0,00	1	20
triméthoprim	dfrA5	0	0,00	0	0,00	1	9,09	2	1,20	0	0

Famille d'antibiotique	Gène	PRI 019 (n=90)		PRI 035 (n=9)		PRI 036 (n=11)		DIS 819+DIS 821 (n=166)		DIS 809 (n=5)	
			%		%		%		%		%
triméthoprim	dfrA8	2	2,22	0	0,00	0	0,00	1	0,60	0	0

3.3.2. Analyse génétique des souches *E. coli* productrices de β -lactamase à spectre étendu (BLSE/ESBL)

La résistance aux β -lactamines chez les bactéries Gram négatives est majoritairement due à la sécrétion des enzymes BLAs, qui hydrolysent la liaison amide du cycle β -lactame.

Les premières β -lactamases (pénicillinases à spectre étroit) plasmidiques (TEM-1/2, SHV-1) ont été initialement décrites dans les années 60 chez *Escherichia coli* et *Klebsiella pneumoniae* et ont très vite été diffusées parmi d'autres espèces (entérobactéries, *Haemophilus influenzae*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Pseudomonas aeruginosa*). La première β -lactamase capable d'hydrolyser les céphalosporines à spectre élargi SHV-2, (mutant ponctuel de SHV-1) a été décrite en 1985 dans une souche de *K. pneumoniae* en Allemagne. Du fait de l'élargissement de leur spectre d'activité, ces enzymes ont été appelées « β -lactamases à spectre étendu» (BLSE) À ce jour, il existe de nombreux variants de ces différents gènes, codant pour des enzymes ayant différents profils de résistance, toutes espèces bactériennes confondues : *bla*_{TEM} (240 +), *bla*_{SHV} (220+), *bla*_{OXA} (940+) et *bla*_{CTX-M} (240+) (Naas *et al.*, 2017).

La Figure 57 montre la répartition de ces gènes de résistance codant des enzymes de type BLSE y inclus le gène codant pour les pénicillinases à spectre étroit de type TEM-1.

51% des isolats provenant de matière fécale de poulet de chair portaient un gène de résistance codant pour des enzymes de la famille SHV-12 seule (27/90, 30%) ou en combinaison avec d'autres gènes de résistance tels que SHV-12/TEM-52 (2/90, 2.25%) et SHV-12/TEM-1 (17/90, 19.10%). Ce gène est le plus prévalent suivi de TEM-52 (14/90,15.73%), CTX-M-55 seul et/ou combiné, CTX-M-55/TEM-1 (12/90, 13.48%) et CTX-M-1 seul et/ou combiné CTX-M-1/TEM-1 (11/90, 12.36%).

Parmi les 9 isolats de matière fécale de porc, 8 portaient des gènes de résistance du type BLSE et 1 portait une mutation chromosomique au niveau du promoteur AmpC. Chez les isolats provenant de porc, la famille CTX-M était présente dans 62% (5/9) des isolats. Les clusters suivants ont été trouvés, CTX-M cluster 1 (CTX-M-1,CTX-M-32, CTX-M-55) 37,5% (3/9), cluster 9 (CTX-M-14) 25% (2/9), suivi des familles TEM-52 (12.5%, 1/9), TEM-15 (12.5%,1/9) et SHV-12 (12.5%,1/9).

Chez les isolats provenant de matière fécale de veau, tous les isolats sauf un (90.9%, 10/11) portaient un gène de résistance de la famille CTX-M- cluster 1 (CTX-M-1, CTX-M-15, CTX-M-32) seul, ou combiné avec d'autres gènes de résistance, type OXA-1, et TEM-176. Le seul isolat restant portait un gène de résistance de la famille TEM-52.

En ce qui concerne les isolats provenant de la viande fraîche de volaille de la chaîne de distribution, sur 166 isolats séquencés, tous sauf 5 ont été bien confirmés comme portant des gènes de résistance aux céphalosporines de 3^{ème} ou 4^{ème} génération ou comme portant une mutation chromosomique associée au phénotype AmpC. Pour les 5 isolats pour lesquels des gènes connus n'ont pas été attribués, les valeurs MIC montrent une dilution supérieure à la valeur-seuil et tous portaient seulement le gène de résistance TEM-1 ou TEM*-1-like (β -lactames de spectre non étendu) qui confère de la résistance aux pénicillines et céphalosporines de première génération. Parmi les 161 isolats confirmés, 43% (69/161) portaient le gène de résistance de la famille SHV-12 suivi de 34% (55/161) qui portaient

le gène de résistance de la famille CTX-M cluster 1 (CTX-M 1, CTX-M-15, CTX-M-32, CTX-M-55) seul ou en combinaison avec TEM-1 ou SHV-12, et 17% (28/161) de la famille TEM-52. En ce qui concerne les gènes de résistance associés au phénotype AmpC, un isolat portait le gène de résistance CMY-2 et un isolat portait le gène de résistance DHA-1.

Pour les isolats provenant de la viande fraîche de veau et de bœuf, 80% (4/5) des isolats portaient des gènes de résistance de la famille CTX-M cluster 1 (CTX-M 1, CTX-M-15, CTX-M-32, CTX-M-55, CTX-M-65) seuls ou en combinaison avec des gènes OXA-1, OXA-10. Un seul isolat portait le gène de résistance de la famille TEM-52.

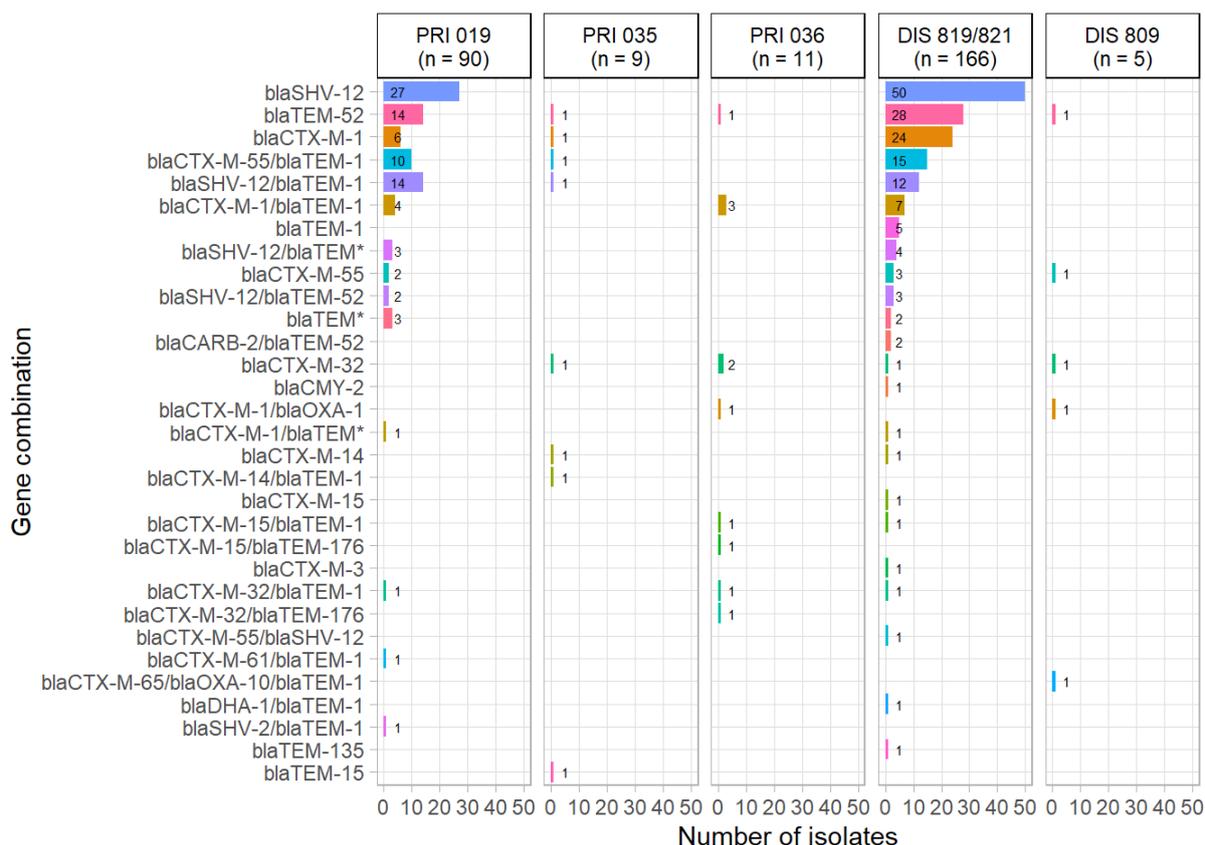


Figure 57. Gènes codant pour des enzymes du type BLSE.

3.3.3. Co-résistance des ESBL aux fluoroquinolones

La résistance aux fluoroquinolones (ciprofloxacine) est conférée par la présence de gènes de résistance plasmidique (PMQR). Plus de 100 variants ont été décrits chez les Enterobacteriaceae, et regroupés en 5 familles, *qnrA*, *qnrB*, *qnrC*, *qnrD*, *qnrS*. Chez les *E. coli* ESBL analysés, les familles *qnrS* et *qnrB* ont été retrouvées.

Parmi les *E. coli* ESBL analysés par matrice, 24.4% (22/90) des isolats provenant de caeca de volaille, 11.1% (1/9) de caeca de porc, 45.45% (5/11) de caeca de veau, 18% (31/166) de viande fraîche de volaille et 40% (2/5) de viande fraîche de porc/bœuf présentaient de la co-résistance avec la présence de gènes de résistance de la famille *qnr*.

Parmi les isolats d'*E. coli* ESBL provenant de matière fécale de poulet de chair qui présentaient de la co-résistance aux fluoroquinolones, la combinaison la plus prédominante était *qnrS/bla_{CTXM-55}* seule et/ou avec *bla_{TEM-1}* (54%, 12/22) suivi de *qnrS/bla_{SHV-12}* seule ou avec *bla_{TEM-1}* (27%, 6/22). En ce qui concerne les isolats provenant de la viande fraîche de volaille, la combinaison la plus prédominante était *qnrS/bla_{CTX-M-55}* (54%, 17/31) suivi de *qnrS/bla_{SHV-12}* y inclus avec la combinaison *bla_{TEM-1}* (22.5%, 7/31).

Pour les autres matrices de la production primaire et la viande fraîche, une diversité de combinaisons ont été retrouvés (Fig x). En ce qui concerne les isolats de matière fécale de veau, le gène *qnrS* est associé à la présence de *bla*_{CTX-M} cluster 1 (CTX-M -1, CTX-M -15, CTX-M -32).

Il semble que la combinaison du gène *qnrS* chez les *E. coli* ESBL portant le gène de résistance de la famille CTX-M-55 est assez fréquemment retrouvée.

D'après les résultats de NGS, ces deux gènes se trouvent dans le même contig. Ainsi, la présence de ces gènes dans les mêmes éléments génétiques mobiles (plasmides ou intégrons) pourrait expliquer la co-résistance aux β-lactamines et aux fluoroquinolones.

La Figure 58 montre les combinaisons des ESBL et des gènes de résistance aux fluoroquinolones retrouvés par matrice alimentaire.

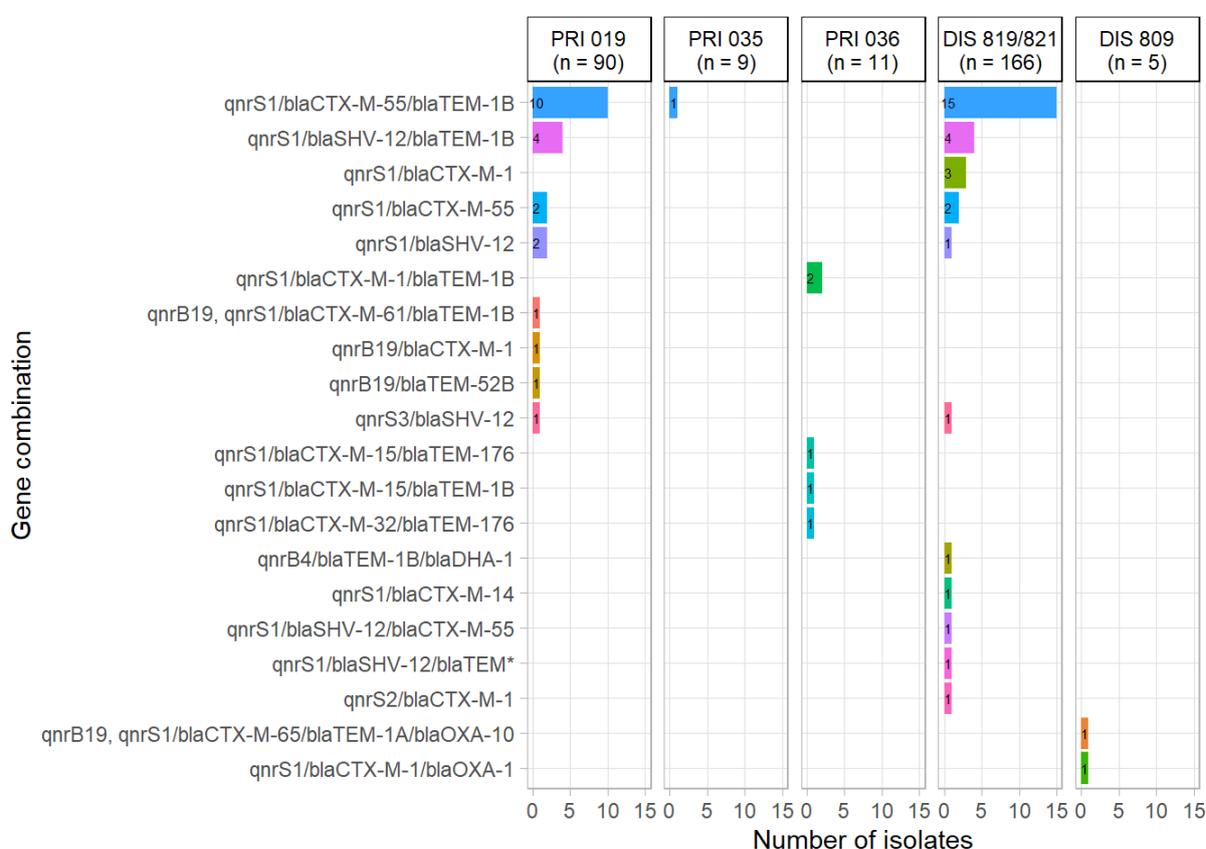


Figure 58. Gènes codant pour la co-résistance aux fluoroquinolones chez les *E. coli* ESBL.

3.3.4. Co-résistance des ESBL aux macrolides

La résistance aux macrolides est associée aux trois mécanismes de résistance qui sont, eux, associés aux différentes familles de gènes. Le gène *erm* (B), modifie le site d'action de l'antibiotique, le gène *mph* (A, B, E, G) qui code pour des enzymes modifiant la structure du macrolide et le troisième mécanisme de résistance est l'acquisition de gènes codant pour une protéine d'efflux actif, *mef* (A, C), *msr* (A, E)

Parmi les ESBL analysés par matrice, 18 % (17/90) des isolats provenant de caeca de volaille, 44.4% (4/9) de caeca de porc, 81.8% (9/11) de caeca de veau, 12% (20/166) de viande fraîche de volaille et 20% (1/5) de viande fraîche de porc/bœuf portaient au moins un gène de résistance aux macrolides de type *erm* (B), ou *mph* (A, B, E, G) ou *mef* (A, C) ou *msr* (A, E).

Parmi les isolats de *E. coli* ESBL provenant de matière fécale de poulet de chair qui présentaient de la co-résistance, aux macrolides, la combinaison la plus présente est *mph(B)/bla_{SHV-12}* (47%, 8/17) suivie de *mph(A)/bla_{TEM-52}* (35.3%,6/17). En ce qui concerne les isolats provenant de la viande fraîche de volaille, la combinaison la plus prédominante retrouvée est *mph(A)/bla_{TEM-52}* (45%, 9/20). Dans les 55% restant (11 isolats), 10 combinaisons différentes ont été retrouvées et sont détaillées dans la Figure 59. La combinaison la plus prédominante retrouvée chez les *ESBL* provenant de caeca de poulet de chair et contenant des gènes de résistance aux macrolides est *mph (B)/bla_{SHV-12}* (47%, 8/17) suivi de *mph(A)/ bla_{TEM-52}* (35%, 6/17).

La Figure 59 montre les combinaisons des ESBL et des gènes de résistance aux macrolides par matrice alimentaire.

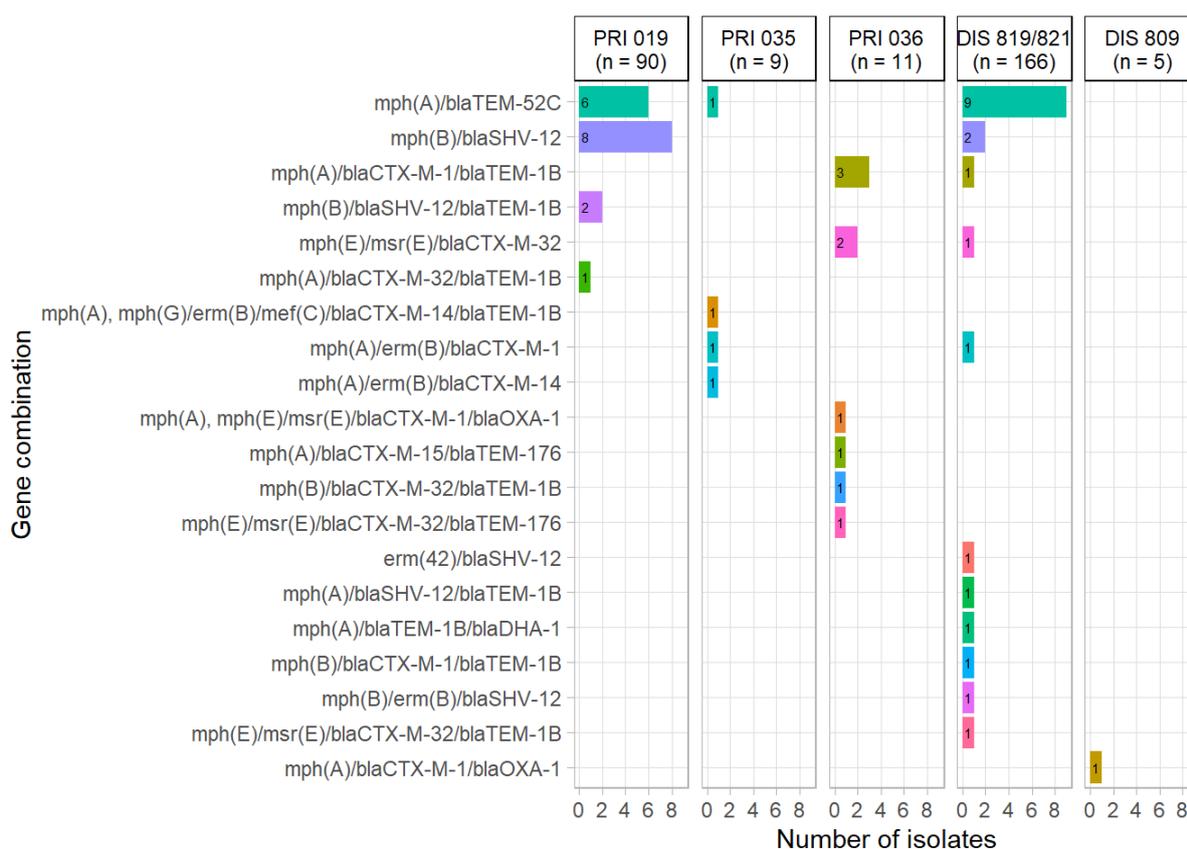


Figure 59. Gènes codant pour la co-résistance aux macrolides chez les *E.coli* ESBL.

3.3.5. Co-résistance des ESBL à la colistine

Parmi les 281 *E. coli* ESBL analysés seulement 4 isolats ont été révélés porteurs des gènes de résistance plasmidiques à la colistine, un provenant de caeca de porc, un de viande fraîche volaille et deux de la viande fraîche de porc/bœuf. Tous portaient le gène de résistance *mcr 1.1*. Pour 5 isolats avec une résistance phénotypique à la colistine, des mutations chromosomiques ont été trouvées sur des gènes *pmrB* qui pourraient être impliqués dans la résistance à la colistine (Hao *et al.* 2022) .

3.3.6. Co-résistance des ESBL aux aminoglycosides

Il existe trois classes d'enzymes qui inactivent les aminoglycosides et rendent les bactéries résistantes. Ces enzymes appelées aminoglycosides modifying enzymes (AME) sont associées aux différents types d'aminoglycosides. Ces trois familles comprennent les aminoglycoside N-acetyltransferases (AAC), les

aminoglycosides O-nucleotidyltransferases (ANT) et les aminoglycosides O-phosphotransférases (APH). Les gènes codant pour ces enzymes se retrouvent dans des plasmides qui peuvent contenir plusieurs gènes de résistance aux différents aminoglycosides.

D'après les résultats du séquençage des génomes des *E. coli* ESBL, la présence des gènes codant pour une, deux ou trois familles d'enzymes (AME) est représentée dans la Figure 60. Des gènes de résistance aux aminoglycosides ont été retrouvés dans 76% (69/90), 70% (117/166), 63.6% (7/11) et 55.5% (5/9), 40% (2/5) des isolats de caeca de volaille, viande fraîche de volaille, caeca de veau, caeca de porc et viande fraîche de porc/bœuf respectivement.

Au vu de la grande diversité des sous-familles d'aminoglycosides retrouvée la représentation graphique de la co-résistance aux ESBL et aux aminoglycosides n'est pas visuellement illustrative. Le nombre de combinaisons retrouvées avec les gènes de résistance ESBL est détaillé dans la Figure 60. La combinaison la plus prédominante est *aadA1/bla_{SHV-12}* dans les caeca de volaille ainsi que dans la viande fraîche de volaille et suivie de *aac(3)/aadA/bla_{CTX-M-55}* chez les caeca de volaille et *aadA/bla_{CTX-M-1}* chez la viande fraîche de volaille. Le gène qui confère de la résistance à l'amikacine a été retrouvé chez les caeca de porc (*aac(6')-Ib*).



Figure 60. Gènes codant pour les résistances aux aminoglycosides chez les *E.coli* ESBL.

3.3.7. Co-résistance des ESBL aux désinfectants.

Le gène *qacE* impliqué dans la résistance aux ammoniums quaternaires bactéricides a été retrouvé parmi les *E. coli* ESBL. Ce gène codant pour un système d'efflux actif à travers la membrane.

Le taux le plus élevé de co-résistance aux ammoniums quaternaire par la présence du gène *qacE* a été retrouvé chez les *E coli* ESBL provenant de matière fécale de veaux (6/11, 54.5%), suivi de matière fécale de poulet de chair 34%, (31/90), porc (33%,3/9) viande fraîche de volaille (22.3%, 37/166) et viande fraîche de porc/veaux (20%,1/5). Parmi les isolats de matière fécal de poulet de chair qui présentait de la co-résistance, la combinaisons la plus présente est *qacE* /SHV-12 (14/31, 45%), suivi de *qacE* /CTX-M cluster 1 (9/31, 29%) et de *qacE*/TEM-52 (22%, 7/31). En ce qui concerne la viande

fraiche de volaille, la combinaison la plus fréquemment rencontrée est *qacE*/CTX-M cluster 1 (17/37, 46%) suivie de *qacE*/TEM-52 (9/37, 24%) et *qacE*/SHV-12 (8/37, 22%). Toutes les combinaisons retrouvées qui comportent de gènes de résistance ESBL et le gène *qacE* sont présentées dans la Figure 61.

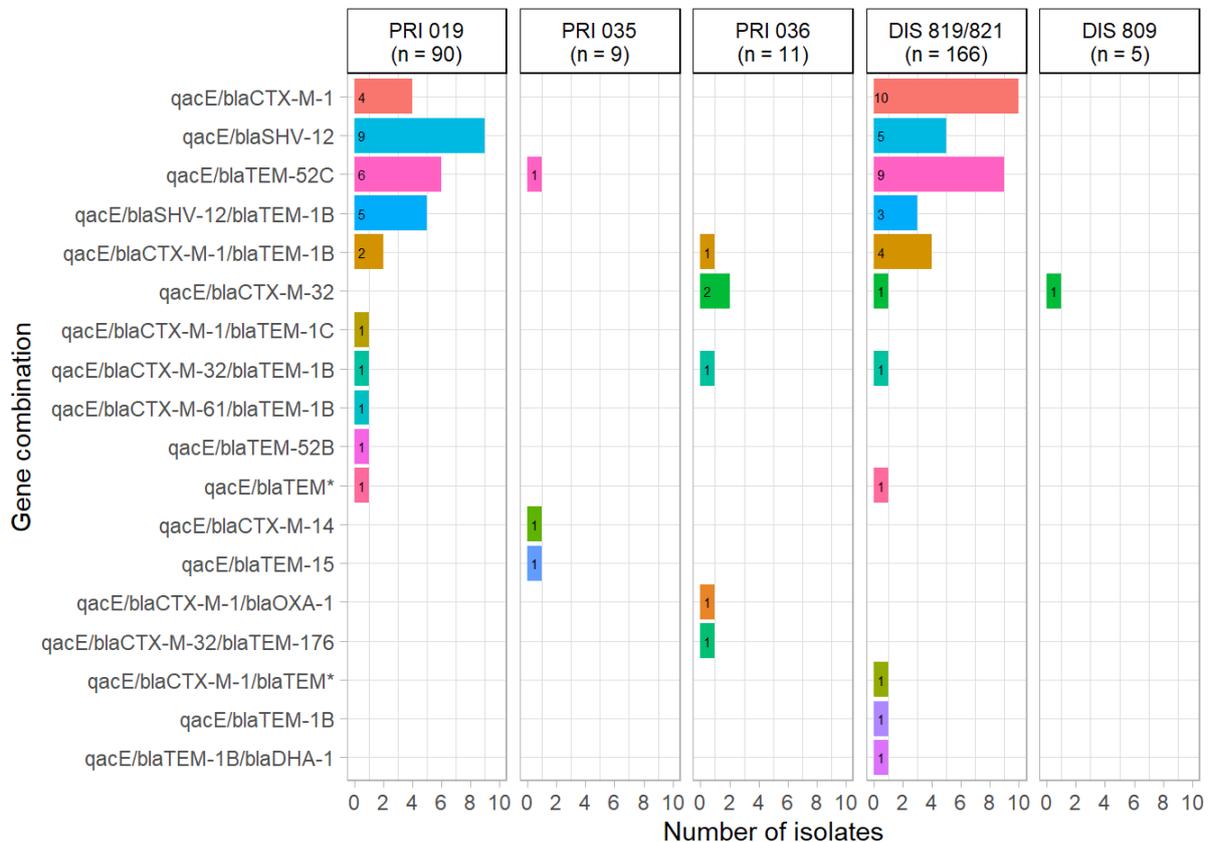


Figure 61. Gènes codant pour les résistances aux désinfectants chez les *E.coli* ESBL.

3.3.8. Dendrogrammes réalisés à partir du core genome MLST d'*E. coli* ESBL

L'arbre phylogénétique a été généré sur base du cgMLST. Afin de pouvoir les visualiser sur un même dendrogramme, toutes les souches provenant des caeca de porc (n=9) et de veau (n=11) ont été sélectionnées pour l'analyse (au vu du nombre très limité de souches). En ce qui concerne les souches provenant de caeca de volaille et de viande fraiche de volaille une sélection aléatoire a été réalisée parmi les isolats stratifiés par matrice alimentaire (Figure 62).

Une comparaison de phénotype et génotype est illustré dans les dendrogrammes.

3.3.8.1. Analyse parmi les isolats de la production primaire

L'arbre phylogénétique généré permet de mettre en évidence des clusters spécifiques aux catégories d'animaux, porcs, veaux ou volailles (Figure 62). A noter que on ne trouve pas de cluster qui regroupe des souches provenant de ces trois catégories, c'est-à-dire que les *E. coli* ESBL n'ont pas un lien de parenté au sein de la production primaire.

Parmi les trois catégories d'animaux, de nombreux clusters ont été observés chez les *E. coli* ESBL provenant de caeca de volaille. En général, une grande diversité de lignages est retrouvée dans cette catégorie d'animaux. Parmi les 90 isolats séquencés, 35 séquences types (ST) différentes ont été retrouvées et 8 isolats appartiennent à des STs qui ne sont pas encore décrits dans la base de données

(<https://cge.food.dtu.dk/services/MLST/>). Le ST3773 est le plus prédominant (n=12) suivi de ST 177 (n=11). Le ST 58 est le seul ST qui a été retrouvé parmi toutes les catégories de la production primaire, volaille (n=2), porc (n=1), veau (n=1) et dans la viande fraîche de volaille (n=2).

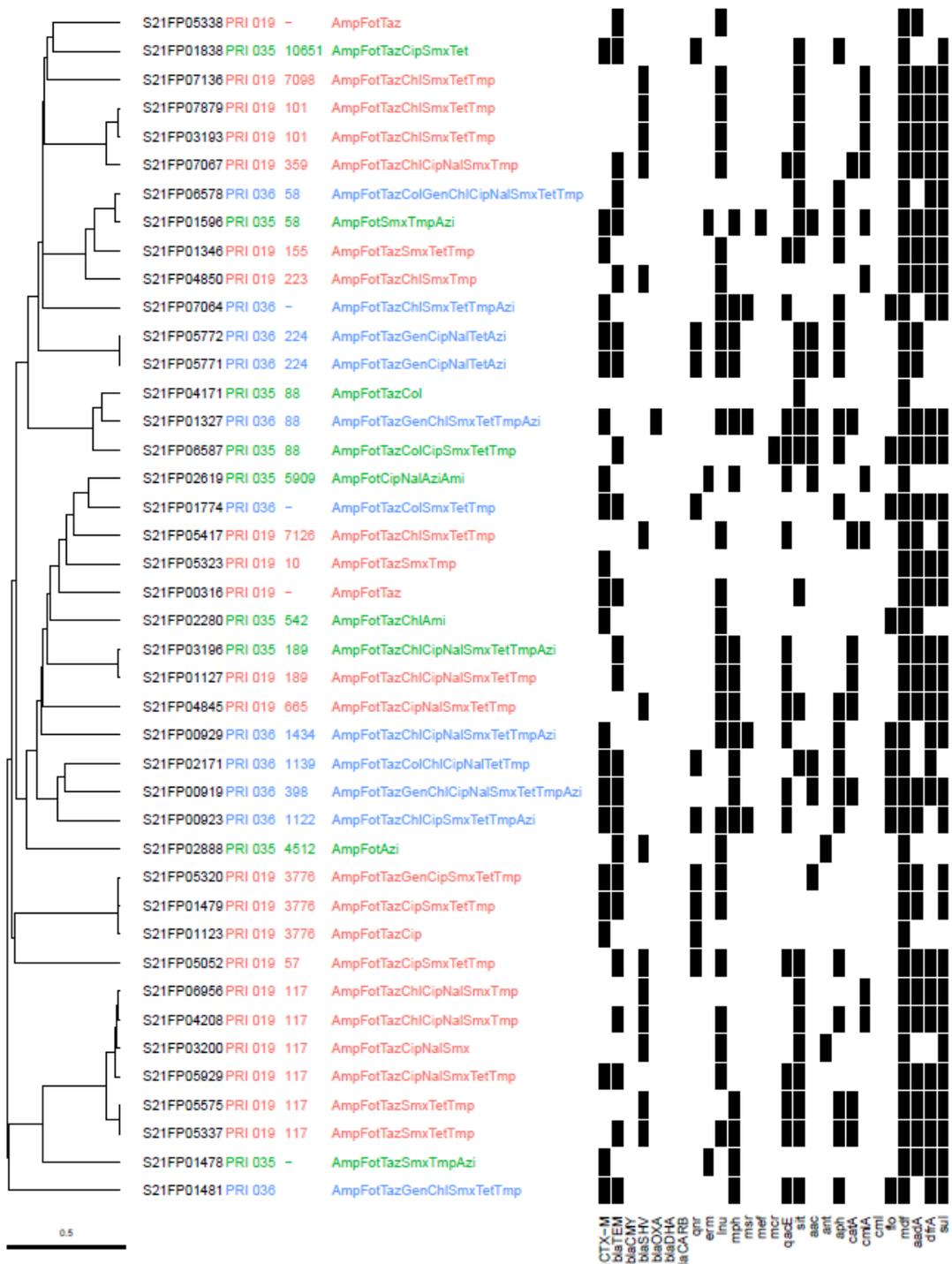


Figure 62. Dendrogramme basé sur le cgMLST des isolats de *E. coli* ESBL issus de la production primaire, caeca de volaille (22), caeca de porc (n=9), caeca veaux (n=11).

Le carré noir indique la présence du gène de résistance indiqué.

3.3.8.2. Analyse comparative parmi les isolats provenant de caeca de volaille et viande fraîche de volaille

Le dendrogramme réalisé à partir du core genome MLST parmi les isolats de caeca de volaille (n=22) et de viande fraîche de volaille (n=41) montre des clusters en fonction de leurs similarités. Plusieurs clusters ont été retrouvés avec le même profil phénotypique et le même contenu génétique (Figure 63). D'après l'analyse cgMLST il y a des souches identiques qui se retrouvent dans les caeca de volaille et dans les viandes fraîches indiquant une contamination de la carcasse pendant les opérations à l'abattoir. Le lien de parenté est clairement démontré dans le dendrogramme.

En effet, 21 ST identiques ont été trouvés dans les deux matrices (caeca de volaille et viande fraîche de volaille) avec le ST3776 étant le plus prédominant suivi de ST 101.

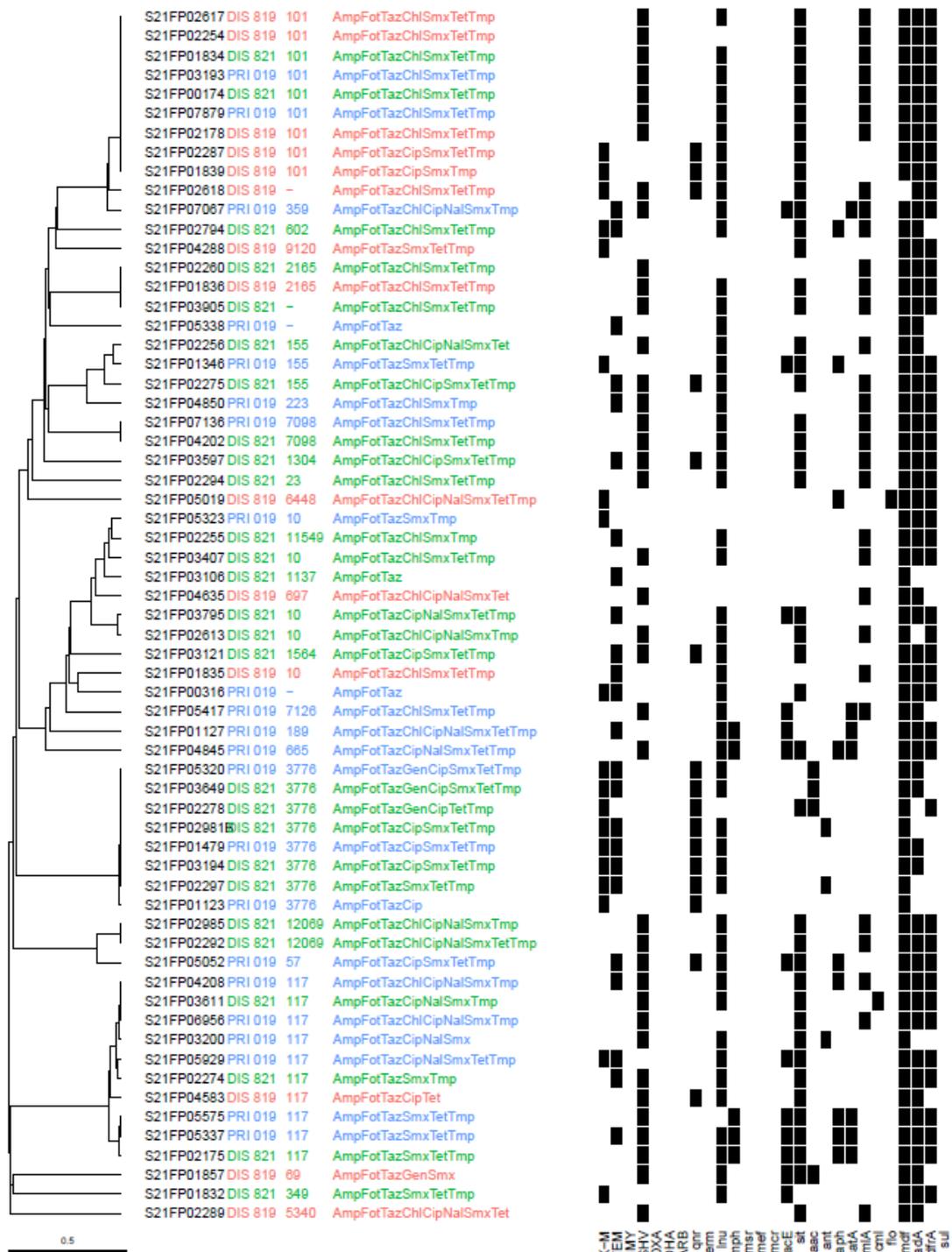


Figure 63. Dendrogramme basé sur le cgMLST des isolats de *E. coli* ESBL issus de caeca de volaille (PRI, n=22) et de viande fraîche de volaille (DIS, n=41).

Le carré noir indique la présence du gène de résistance indiqué.

4. Conclusion

En 2021, l'entrée en vigueur de la décision d'exécution de la Commission européenne 2020/1729 a modifié le monitoring des résistances aux antibiotiques chez *E. coli*, *Salmonella* spp, *Campylobacter* spp. et MRSA. Ceci notamment par l'ajout de nouveaux antibiotiques à ce monitoring, à savoir l'amikacine pour *E. coli* et *Salmonella* spp. et l'ertapénème et le chloramphénicol pour *Campylobacter* spp. En ce qui concerne les MRSA, la liste d'antibiotiques testés est restée inchangée mais la gamme de concentrations testées a été adaptée pour plusieurs antibiotiques (Tableau 7).

La surveillance de la résistance aux antimicrobiens chez *Campylobacter coli* et *Campylobacter jejuni* isolés de la viande de volaille et des matières fécales de veau a été réalisée en 2021. Les tendances montrent que le profil prédominant de résistance comprend la ciprofloxacine, la tétracycline et l'ertapénème (l'un des deux antibiotiques ajoutés en 2021). Les isolats de *C. coli* montraient également des résistances à l'érythromycine, principalement dans la matière fécale de veau, tandis que cette résistance est faible chez *C. jejuni*. De manière générale, on constate que les taux de résistance sont plus élevés chez *C. coli* que chez *C. jejuni*.

La surveillance de *C. coli* dans les matières fécales de porc a également été réalisée en 2021. On constate à nouveau un profil de résistance comprenant la tétracycline (taux extrêmement élevé), la ciprofloxacine, l'érythromycine, l'ertapénème et la gentamicine (taux faible).

En ce qui concerne la surveillance de *Salmonella* spp. dans les matrices alimentaires, le sérovar prédominant était Enteritidis. On constate en 2021 une augmentation progressive de la résistance à la plupart des antibiotiques dont les fluoroquinolones. Un isolat a été détecté comme résistant aux céphalosporines de 3^{ème} génération et a été confirmé comme ayant un phénotype BLSE. Au niveau des *Salmonella* spp. isolés à partir des matières fécales de porc, le sérovar prédominant étaient Monophasic Typhimurium, suivi de Derby puis Typhimurium. Les taux de résistance les plus importants étaient ceux à l'ampicilline, au sulfaméthoxazole et à la tétracycline. Les résistances aux fluoroquinolones étaient faibles.

La surveillance des bactéries commensales indicatrices *E. coli* provenant d'échantillons caecaux prélevés à l'abattoir sur les poulets de chair, les dindes, les porcs d'engraissement et les veaux de boucherie et sur les volailles et bovins de moins d'un an prélevés en exploitation a été réalisée en 2020. En général, le taux de résistance aux antibiotiques non critiques (sulfaméthoxazole, triméthoprime, tétracycline) est le plus élevé chez les isolats provenant des poulets de chair suivis des veaux de boucherie et ensuite des porcs d'engraissement. Chez les isolats provenant de la volaille, le taux de résistance aux fluoroquinolones est élevé mais continue de diminuer en 2021.

En ce qui concerne les antibiotiques de dernier recours, la résistance détectée au méropénème, à la colistine, à la tigécycline, et à l'azithromycine se situe entre 0-10% avec aucun isolat résistant aux carbapénèmes dans les espèces d'animaux de production. Aucun isolat n'était non plus résistant à l'amikacine, l'antibiotique ajouté à la surveillance des *E. coli* et *Salmonella* en 2021.

Les *E. coli* isolées chez les bovins de moins d'un an en exploitation présentent une résistance beaucoup plus faible, voire nulle, à toutes les antibiotiques testés.

Une surveillance spécifique d'*E. coli* productrices de BLSE, AmpC ou de carbapénémases a été menée dans les populations de poulets de chair, de porcs d'engraissement et de veaux de boucherie et dans les viandes fraîches de poulets de chair, de dindes, de porcs et de bœufs. Comme chez les *E. coli*

indicatrices, on retrouve chez les *E. coli* productrices de BLSE des résistances aux antibiotiques non critiques et aux fluoroquinolones plus élevées pour les isolats provenant de la volaille, à l'exception de la tétracycline pour laquelle la résistance est plus élevée chez les veaux. Concernant les antibiotiques de dernier recours, les isolats provenant de toutes les espèces d'animaux ont une résistance inférieure à 10% ou nulle, à l'exception de la résistance à l'azithromycine chez les isolats provenant de matière fécale de veau (le taux étant de 10,3%). Aucun isolat n'est résistant aux carbapénèmes. On retrouve des taux faibles de résistance à l'amikacine dans les isolats provenant de matière fécale de volaille et de porc. Chez toutes les espèces incluses dans la surveillance spécifique, le profil phénotypique très largement prédominant des isolats était BLSE certains isolats montraient également un profil AmpC ou BLSE et AmpC combiné.

En 2021, 281 *E. coli* producteurs d'ESBL, ou AmpC ont été séquencés afin de caractériser le contenu génétique de ceux-ci. L'analyse par séquençage du génome complet (WGS) de ces souches a permis d'étudier la diversité génétique présente, ainsi que la mise en évidence des gènes de résistance.

En tout, 98.57% (277/281) des isolats ont été relevés comme porteurs de gènes de résistance aux β -lactames ou de mutations connues conférant un phénotype du type ESBL ou AmpC. Les familles les plus répandues sont du type SHV-12 (41.63%, 117/281) suivi de CTXM-cluster 1 (34.5%, 97/281), et TEM-52 (18.5%, 52/281). A noter qu'aucun gène conférant de la résistance aux carbapénèmes n'a été retrouvé parmi les 281 génomes analysés.

La co-résistance aux antibiotiques critiques (Critically important antibiotics, CIA) a été adressée et différentes combinaisons de gènes de résistance ont été relevés. Parmi eux, la combinaison du gène *qnrS* chez les *E. coli* ESBL portant le gène de résistance de la famille CTX-M-55. Ces deux gènes se trouvent localisés dans le même élément mobile ce qui implique que l'usage d'une famille d'antibiotiques suffit alors à maintenir (co-sélectionner) les mécanismes de résistance qui se trouvent sur le même élément mobile.

En ce qui concerne d'autres CIA, la co-résistance à la colistine (confirmée par la présence du gène *mcr 1.1*) a été trouvée chez les *E. coli* ESBL multirésistants portant différents mécanismes, du type bla_{CTX-M-cluster 1}, bla_{TEM-52}, *qnrS*, *qnrB*, *aph(3'')-Ib*, *sul*, *tet*, et même les gènes qui confèrent de la résistance aux désinfectant du type ammonium quaternaire *qacE*.

A noter que parmi les 281 génotypes analysés aucun ne portait le gène de résistance plasmidique à la tigécycline, *tet (X)*.

L'analyse phylogénétique montre une grande diversité dans les types séquentiels (ST pour *sequence types*) identifiés, avec quelques ST plus présents, ST3776 étant le plus prédominant suivi de ST 101 chez les caeca de volaille et la viande fraîche de volaille.

La surveillance des MRSA a été réalisée chez les bovins en 2021. La prévalence des MRSA dans les fermes dans les différentes catégories de bovins est restée stable pendant la période 2012-2021. En 2021, celle-ci était très élevée chez les veaux (54.5%), modérée chez les vaches laitières (11.7%) et faible chez les bovins viandeux (4.7%). Le complexe clonal CC398, principalement associé aux animaux de rente (LA-MRSA), était prédominant chez les veaux et vaches laitières. Chez les bovins viandeux il a été observé dans la moitié des souches (n=2/4). Comme observé précédemment, le spa-type majoritaire en 2021 était t011, connu dans la littérature pour être associé aux LA-MRSA. Toutes les souches MRSA isolées en 2021 étaient résistantes à la tétracycline, ce qui est également caractéristique des LA-MRSA. Cependant, toutes les MRSA isolées en 2021 n'étaient pas LA-MRSA. En effet, une souche isolée de veaux présentait un génotype CA-MRSA (CC1-ST1-t386) et 5 souches appartenaient au génotype HA-MRSA CC8-ST239-t037, 3 isolées de vaches laitières et 2 de bovins viandeux. C'est la première fois que ce spa-type t386 est observé chez les bovins en Belgique. Le spa-type t037 a quant à lui déjà été observé chez les bovins en 2012 et 2015 en Belgique. La présence des gènes du cluster d'évasion du système immunitaire humain détectés dans les souches CA et HA-MRSA isolées en 2021 suggère un passage récent de l'homme à l'animal. Parmi les MRSA isolées de bovins en 2021, des résistances ont été détectées pour tous les antibiotiques, excepté pour le linézolide, la vancomycine, l'acide fusidique et la mupirocine. En effet, la résistance à la mupirocine observée en 2012 n'a plus été rapportée depuis 2015, dans toutes les catégories de bovins. Aucune souche résistante aux antibiotiques de derniers recours pour le traitement des infections humaines (i.e.

linézolide et vancomycine) n'a été détectée au fil des ans chez les bovins (toutes catégories bovines confondues). Entre 2012 et 2021, des diminutions significatives de pourcentages de résistance ont été observées pour la ciprofloxacine, l'acide fusidique, la mupirocine, la rifampicine, le sulfaméthoxazole et la streptomycine parmi les isolats de veaux. En 2021, à l'exception d'une souche, toutes les MRSA étaient multirésistantes à un nombre variant de 4 à 10 familles d'antimicrobiens différentes et incluant les bêta-lactames. La multirésistance observée était plus élevée chez les veaux et les vaches laitières, avec un maximum atteignant des résistances à 10 et 8 familles d'antimicrobiens différentes respectivement. Le profil de résistance le plus fréquemment observé (n=30, 28 veaux et 2 vaches laitières) était : PEN-CLI-ERY-FOX-GEN-KAN-TET-TMP.

Le séquençage NGS de 44 isolats de MRSA en 2021 a permis la caractérisation approfondie des souches CA et HA-MRSA ainsi que des facteurs de virulence associés et de montrer que les 5 souches HA-MRSA seraient probablement apparentées. Ce séquençage a également permis d'identifier la diversité de marqueurs génétiques de la résistance associés aux phénotypes. Dans cette petite collection de souches séquencées, la résistance à la ciprofloxacine, à la rifampicine et au sulfométhoxazole était associée à des mutations tandis que pour les autres phénotypes résistants des gènes de résistance a priori transférables ont été observés. Nos résultats de séquençage ont montré que la présence d'un gène de résistance n'est pas toujours associée à un phénotype résistant, comme cela a notamment été observé pour certaines souches sensibles à la clindamycine, à la gentamicine ou la kanamycine. Cela rappelle que la détection d'un gène de résistance ne signifie pas que ce gène sera exprimé et que la souche qui le porte aura un phénotype résistant. Aussi, les bases de données actuelles de gènes de résistance ou de mutations connues pour conférer la résistance aux antibiotiques ne sont pas toujours complètes ou certains mécanismes de résistance sont encore inconnus. Ceci a pour conséquence que dans certains cas, la prédiction de la résistance aux antibiotiques sur base du séquençage n'est pas parfaite et la détermination phénotypique de la résistance reste encore complémentaire. Néanmoins, la présence de gènes de résistance ou de mutations expliquant le phénotype résistant a été observée dans la majorité (96.7%, n=261/270) des phénotypes individuels de résistance observés parmi les 44 MRSA.

La présence de MRSA chez les animaux producteurs de denrées alimentaires, en particulier lorsqu'il s'agit de souches associées aux lignées CA ou HA-MRSA porteuses de nombreux gènes de virulence, représente un risque pour la santé publique. En plus du caractère zoonotique des MRSA, les MRSA constituent également un risque de santé publique en tant que réservoir de gènes de résistance. Il est donc essentiel de continuer à surveiller la résistance et multirésistance au sein des MRSA isolées d'animaux.

En 2021, la surveillance des *Enterococcus faecalis* et *Enterococcus faecium* chez les animaux producteurs de denrées alimentaires a continué. Cette année, les prévalences des espèces d'entérocoques par catégorie animale étaient similaires à celles observées en 2019 et 2020. En effet, *Enterococcus faecium* a été plus fréquemment isolée qu'*E. faecalis* au sein des échantillons de poules reproductrices (77.6%), poules pondeuses (72.4%), veaux (61.8%) et porcs (61.0%). A l'inverse, *Enterococcus faecalis* a été isolée plus fréquemment qu'*E. faecium* au sein des échantillons de poulet de chair (67.3%). Les tests de susceptibilité antimicrobienne réalisés cette année ont montré que, dans l'ensemble, les pourcentages de résistance observés chez *Enterococcus faecalis* et *Enterococcus faecium* au sein des différentes matrices animales étudiées restent stables depuis 2019. Les résistances à la tétracycline, à l'érythromycine et à la quinupristine/dalfopristine étaient les résistances les plus observées, à la fois chez *E. faecalis* et *E. faecium*, en taux variable selon la matrice animale. Des diminutions significatives du taux de résistance au chloramphénicol chez *E. faecalis* isolées de veaux

et de porcs (-17.7% et -14.4% respectivement, voir Figure 49 à

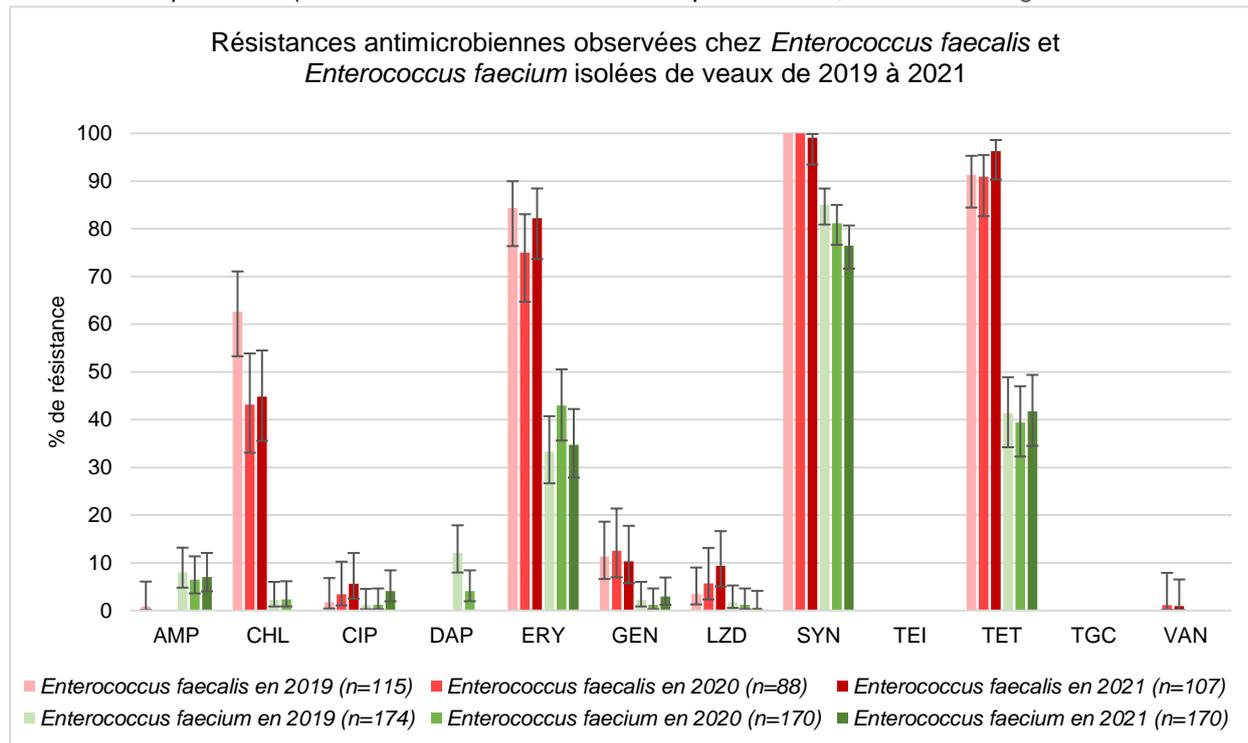


Figure 53) et du taux de résistance à l'érythromycine chez *E. faecalis* isolées de porcs (-18.3%) ont été observées en 2021 par rapport à 2019. Malgré une diminution significative de la résistance à la quinupristine/dalfopristine (-8.6%) observée chez *E. faecium* isolées de veaux depuis 2019, celle-ci restait extrêmement élevée en 2021. Chez *E. faecium* isolées de poulets de chair, une diminution significative (-10.2%) de la résistance à l'ampicilline a également été observée en 2021. Des souches résistantes au linézolide ont également été observées en 2021, à savoir 12 *E. faecalis* isolées de veaux (n=10), poules reproductrices (n=1) et poulets de chair (n=1) et 2 *E. faecium* isolées de porcs (n=1) et veaux (n=1). Une souche *E. faecalis* isolée de veaux en 2021 était résistante à la vancomycine. Aucune résistance à la teicoplanine, à la daptomycine ou à la tigecycline n'a été observée en 2021. En conclusion, au sein d'une même matrice animale, les résistances antimicrobiennes observées peuvent varier selon l'espèce bactérienne étudiée. En général, un plus grand nombre de souches multirésistantes était observé chez les veaux (54.2% d'*E. faecalis*) et chez les poulets de chair (60.6% d'*E. faecium*). De plus, les souches accumulant le plus de résistances antimicrobiennes différentes étaient celles isolées de veaux, avec un maximum de 5 et 6 résistances différentes observées chez *E. faecalis* et *E. faecium*, respectivement.

Cette année, une investigation par NGS de 36 entérocoques a été réalisée afin de caractériser génétiquement la résistance antimicrobienne observée. Celle-ci a révélé la diversité génétique des souches étudiées avec 27 ST différents identifiés et un nombre de facteurs de virulence variable (de 2 à 17 facteurs différents) selon l'espèce bactérienne. Complémentaire du phénotypage, le séquençage a permis d'identifier les mécanismes de résistance au sein des entérocoques isolées d'animaux en Belgique en 2021. En effet, la présence de gènes de résistance ou de mutations expliquant le phénotype résistant a été observée dans 96.8% (n=149/154) des phénotypes individuels observés. La résistance au linézolide a été caractérisée par la présence des gènes *optrA* et *poxtA*, deux gènes également identifiés au sein de souches sensibles à cet antibiotique. Le cluster *vanA* conférant la résistance à la vancomycine a été identifié au sein d'une *E. faecalis* présentant un phénotype résistant à cet antibiotique, ainsi qu'au sein d'une *E. faecium* présentant un phénotype sensible.

5. Liste des figures

Figure 1. Evolution de la résistance chez <i>C. jejuni</i> isolés à partir de la viande de volaille (2014-2021).	20
Figure 2. Pourcentage de sensibilité et de résistance à une ou plusieurs familles d'antimicrobiens chez <i>C. jejuni</i> (2014-2021).	21
Figure 3. Taux de résistance aux antimicrobiens chez <i>Campylobacter jejuni</i> (n=45) et <i>Campylobacter coli</i> (n=23) isolés de la viande de volaille en 2021.	21
Figure 4. Pourcentage d'isolats de <i>Salmonella</i> par sérovar dans les matrices alimentaires en 2021.	22
Figure 5. Evolution des taux de résistance aux antimicrobiens des <i>Salmonella</i> spp. isolées à partir de denrées alimentaires en 2021 (n=50).	23
Figure 6. Taux de résistance aux antimicrobiens des <i>Salmonella</i> spp. isolées à partir de feed en 2021 (n=28).	24
Figure 7. Pourcentage de résistance au premier panel d'agents antimicrobiens chez <i>E. coli</i> isolées à partir de la viande de poulet de chair (DIS 819 et DIS 821) en 2021 (n=167).	25
Figure 8. Evolution de la résistance chez les <i>E. coli</i> isolées à partir de la viande de poulet de chair entre 2017-2021.	25
Figure 9. Pourcentage des phénotypes obtenus grâce au deuxième panel d'antimicrobiens chez <i>E. coli</i> BLSE isolées à partir de la viande de volaille (DIS 819 et DIS 821) en 2021.	26
Figure 10. Pourcentage de résistance au premier panel d'agents antimicrobiens chez <i>E. coli</i> BLSE isolées à partir du lait cru de vache (2017-2021).	27
Figure 11. Pourcentage des phénotypes obtenus grâce au deuxième panel d'antimicrobiens chez <i>E. coli</i> BLSE isolées à partir du lait cru de vache en 2021 (n=25).	27
Figure 12. Pourcentage de résistance au premier panel d'agents antimicrobiens chez <i>E. coli</i> BLSE isolées à partir de légumes en 2021.	28
Figure 13. Evolution de la résistance chez les <i>E. coli</i> isolées à partir de la viande de bœuf entre 2017-2021.	29
Figure 14. Evolution de la résistance chez les <i>E. coli</i> isolées à partir de la viande de porc entre 2017-2021.	30
Figure 15. Taux de résistance chez les <i>E. coli</i> isolées à partir de la viande de dinde en 2021 (n=33).	30
Figure 16. Pourcentage de résistance au panel d'agents antimicrobiens chez <i>Campylobacter coli</i> isolés de la matière fécale de porcs en 2021 (n=165).	31
Figure 17. Pourcentage de résistance au panel d'agents antimicrobiens chez <i>Campylobacter</i> spp. isolés de la matière fécale de veaux en 2021 (n=218).	32
Figure 18. Comparaison des pourcentages de résistance au panel d'agents antimicrobiens chez <i>Campylobacter coli</i> (n=72) et <i>Campylobacter jejuni</i> (n=146) isolés de la matière fécale de veaux en 2021.	32
Figure 19. Pourcentage d'isolats de <i>Salmonella</i> par sérovar dans la matière fécale de porcs en 2021.	33
Figure 20 Taux de résistance aux antimicrobiens des <i>Salmonella</i> spp. isolées à partir de matière fécale de porcs en 2021 (n=45).	33
Figure 21. Pourcentage de résistance au premier panel d'agents antimicrobiens chez <i>E. coli</i> indicatrices isolées à partir des contenus caecaux de poulets de chair (2017-2021).	36
Figure 22. Pourcentage de résistance au premier panel d'agents antimicrobiens chez <i>E. coli</i> indicatrices isolés à partir des contenus caecaux de porc d'engraissement (2017-2021).	37
Figure 23. Pourcentage de résistance au premier panel d'agents antimicrobiens chez <i>E. coli</i> indicatrices isolées à partir des contenus caecaux des bovins (2016-2021).	38
Figure 24. Pourcentage de résistance au premier panel d'agents antimicrobiens chez <i>E. coli</i> indicatrices isolées à partir de matière fécale de bovins (2017-2021).	39
Figure 25. Pourcentage de résistance au premier panel d'agents antimicrobiens chez <i>E. coli</i> indicatrices isolées à partir des contenus caecaux des poules reproductrices (2019-2021).	40
Figure 26. Pourcentage de résistance au premier panel d'agents antimicrobiens chez <i>E. coli</i> indicatrices isolées à partir des contenus caecaux des poules pondeuses (2019-2021).	40
Figure 27. Pourcentage de résistance au premier panel d'agents antimicrobiens chez <i>E. coli</i> BLSE isolées à partir des contenus caecaux de poulets de chair (2016-2021).	41
Figure 28. Pourcentage des phénotypes obtenus grâce au deuxième panel d'agents antimicrobiens chez <i>E. coli</i> BLSE isolées à partir des contenus caecaux de poulets de chair en 2021.	42
Figure 29. Pourcentage de résistance au premier panel d'agents antimicrobiens chez <i>E. coli</i> BLSE isolées à partir de matières fécales de porc (2016-2021).	43
Figure 30. Pourcentage des phénotypes obtenus grâce au deuxième panel d'agents antimicrobiens chez <i>E. coli</i> BLSE isolées à partir de matières fécales de porc en 2021.	43
Figure 31. Pourcentage de résistance au premier panel d'agents antimicrobiens chez <i>E. coli</i> BLSE isolés à partir de matières fécales de veaux (2016-2021).	44

Figure 32. Pourcentage des phénotypes obtenus grâce au deuxième panel d'agents antimicrobiens chez <i>E. coli</i> BLSE isolés à partir de matières fécales de veaux en 2021.	45
Figure 33. Prévalences de la résistance antimicrobienne chez <i>Staphylococcus aureus</i> résistants à la méthicilline (n=79) isolées de veaux à la ferme.	47
Figure 34. Prévalences de la résistance antimicrobienne chez <i>Staphylococcus aureus</i> résistants à la méthicilline (n=4) isolées de bovins viandeux.	48
Figure 35. Prévalences de la résistance antimicrobienne chez <i>Staphylococcus aureus</i> résistants à la méthicilline (n=15) isolées de vaches laitières.	49
Figure 36. Prévalences de la résistance antimicrobienne observées chez <i>Staphylococcus aureus</i> résistants à la méthicilline (n=98) selon la catégorie animale.	50
Figure 37. Prévalences de résistance observées chez les MRSA isolées de veaux en 2012 (n=47), 2015 (n=116), 2018 (n=79) et 2021 (n=79).	51
Figure 38. Prévalences de résistance observées chez les MRSA isolées de bovins viandeux en 2012 (n=19), 2015 (n=16), 2018 (n=9) et 2021 (n=4).	52
Figure 39. Prévalences de résistance observées chez les MRSA isolées de vaches laitières en 2012 (n=12), 2015 (n=10), 2018 (n=13) et 2021 (n=15).	53
Figure 40. Pourcentages de MRSA isolées de veaux (n=79), bovins viandeux (n=4) et vaches laitières (n=15) selon le nombre de résistances observées.	54
Figure 41. Prévalences d'isolement d' <i>Enterococcus faecalis</i> et <i>Enterococcus faecium</i> selon la matrice animale en 2021.	71
Figure 42. Pourcentages de résistance aux antimicrobiens chez <i>Enterococcus faecalis</i> (N=169) et <i>Enterococcus faecium</i> (N=160) isolées de poulets de chair à l'abattoir en 2021.	72
Figure 43. Pourcentages de résistance aux antimicrobiens chez <i>Enterococcus faecalis</i> (N=28) et <i>Enterococcus faecium</i> (N=125) isolées de poules reproductrices à la ferme en 2021.	73
Figure 44. Pourcentages de résistance aux antimicrobiens chez <i>Enterococcus faecalis</i> (N=78) et <i>Enterococcus faecium</i> (N=171) isolées de poules pondeuses à la ferme en 2021.	74
Figure 45. Pourcentages de résistance aux antimicrobiens chez <i>Enterococcus faecalis</i> (N=107) et <i>Enterococcus faecium</i> (N=170) isolées de veaux à l'abattoir en 2021.	75
Figure 46. Pourcentages de résistance aux antimicrobiens chez <i>Enterococcus faecalis</i> (N=57) et <i>Enterococcus faecium</i> (N=176) isolées de porcs à l'abattoir en 2021.	76
Figure 47. Pourcentages de résistance aux antimicrobiens chez <i>Enterococcus faecalis</i> selon la catégorie animale.	77
Figure 48. Pourcentages de résistance aux antimicrobiens chez <i>Enterococcus faecium</i> selon la catégorie animale.	78
Figure 49. Pourcentages de résistance aux antimicrobiens chez <i>Enterococcus faecalis</i> et <i>Enterococcus faecium</i> isolées de poulets de chair de 2019 à 2021.	79
Figure 50. Pourcentages de résistance aux antimicrobiens chez <i>Enterococcus faecalis</i> et <i>Enterococcus faecium</i> isolées de poules reproductrices de 2019 à 2021.	79
Figure 51. Pourcentages de résistance aux antimicrobiens chez <i>Enterococcus faecalis</i> et <i>Enterococcus faecium</i> isolées de poules pondeuses de 2019 à 2021.	80
Figure 52. Pourcentages de résistance aux antimicrobiens chez <i>Enterococcus faecalis</i> et <i>Enterococcus faecium</i> isolées de porcs de 2019 à 2021.	81
Figure 53. Pourcentages de résistance aux antimicrobiens chez <i>Enterococcus faecalis</i> et <i>Enterococcus faecium</i> isolées de veaux de 2019 à 2021.	82
Figure 54. Pourcentages d' <i>Enterococcus faecalis</i> isolées de poulets de chair, dindes, poules reproductrices, poules pondeuses, porcs et veaux selon le nombre de résistances observées.	82
Figure 55. Pourcentages d' <i>Enterococcus faecium</i> isolées de poulets de chair, dindes, poules reproductrices, poules pondeuses, porcs et veaux selon le nombre de résistances observées.	83
Figure 56. Pourcentage d'isolats contenant au moins un gène de résistance par famille d'antibiotiques.	94
Figure 57. Gènes codant pour des enzymes du type BLSE.	100
Figure 58. Gènes codant pour la co-résistance aux fluoroquinolones chez les <i>E.coli</i> ESBL.	101
Figure 59. Gènes codant pour la co-résistance aux macrolides chez les <i>E.coli</i> ESBL.	102
Figure 60. Gènes codant pour les résistances aux aminoglycosides chez les <i>E.coli</i> ESBL.	104
Figure 61. Gènes codant pour les résistances aux désinfectants chez les <i>E.coli</i> ESBL.	104
Figure 62. Dendrogramme basé sur le cgMLST des isolats de <i>E. coli</i> ESBL issus de la production primaire, caeca de volaille (22), caeca de porc (n=9), caeca veaux (n=11).	106
Figure 63. Dendrogramme basé sur le cgMLST des isolats de <i>E. coli</i> ESBL issus de caeca de volaille (PRI, n=22) et de viande fraîche de volaille (DIS, n=41).	107

6. Liste des tableaux

Tableau 1. Panel de substances antimicrobiennes testées (EUCAMP3) et seuils d'interprétation pour <i>Campylobacter jejuni</i> .	9
Tableau 2. Panel de substances antimicrobiennes testées (EUCAMP3) et seuils d'interprétation pour <i>Campylobacter coli</i> .	9
Tableau 3. Panel de substances antimicrobiennes (premier panel EUVSEC3) testées et seuils d'interprétation pour <i>Salmonella</i> spp.	9
Tableau 4. Panel de substances antimicrobiennes (deuxième panel EUVSEC2) testées et seuils d'interprétation pour <i>Salmonella</i> spp.	10
Tableau 5. Panel de substances antimicrobiennes (premier panel EUVSEC3) testées et seuils d'interprétation pour <i>E. coli</i> indicatrice.	11
Tableau 6. Panel de substances antimicrobiennes (deuxième panel EUVSEC2) testées et seuils d'interprétation pour <i>E. coli</i> indicatrice.	11
Tableau 7. Panel de substances antimicrobiennes testées, concentrations minimales et maximales testées (panel EUST2) et seuils d'interprétation pour <i>Staphylococcus aureus</i> .	11
Tableau 8. Panel de substances antimicrobiennes testées, concentrations minimales et maximales testées et seuils d'interprétation pour <i>Enterococcus faecalis</i> et <i>Enterococcus faecium</i> .	12
Tableau 9. Critères de classification des enzymes du type β -lactamases selon l'EFSA.	13
Tableau 10. Distribution par matrice alimentaire et fiche technique des isolats d' <i>E. coli</i> ESBL analysés par WGS.	17
Tableau 11. Nombre d'isolats analysés pour leur résistance aux antimicrobiens par programme en 2021 (denrées alimentaires).	18
Tableau 12. Nombre d'isolats de <i>Campylobacter</i> spp. identifiés par MALDI-TOF en 2021.	19
Tableau 13. Nombre d'isolats et matrices d'origine de <i>Campylobacter jejuni</i> et <i>Campylobacter coli</i> testés pour leur sensibilité aux antimicrobiens en 2021.	20
Tableau 14. Nombre d'isolats de <i>Salmonella</i> par matrice alimentaire et par sérovar en 2021.	22
Tableau 15. Nombre total d'isolats d' <i>E. coli</i> commensaux et BLSE/AmpC/Carbapénémases, isolés d'animaux producteurs d'aliments, analysés pour la sensibilité aux antimicrobiens en 2021.	34
Tableau 16. Nombre d'échantillons testés pour la présence d' <i>E. coli</i> commensales.	35
Tableau 17. Prévalences de MRSA dans les différentes catégories animales, selon l'année de la surveillance.	45
Tableau 18. Nombre d'échantillons MRSA et % des différents spa-types observés dans les différentes catégories animales.	46
Tableau 19. Nombre de souches selon les différents profils de résistance observés par catégorie animale, chez les bovins en 2021.	55
Tableau 20. Liste des gènes de résistance identifiés par NGS par phénotype résistant observé dans les 44 isolats de MRSA séquencés en 2021.	58
Tableau 21. Liste des facteurs de virulence identifiés par NGS dans les MRSA en 2021.	66
Tableau 22. Nombre d'allèles différents entre les profils cgMLST des 5 isolats MRSA CC8 ST239 t037.	68
Tableau 23. Nombre de souches selon les différents profils de résistance observés par catégorie animale, chez <i>Enterococcus faecalis</i> en 2021.	84
Tableau 24. Nombre de souches selon les différents profils de résistance observés par catégorie animale, chez <i>Enterococcus faecium</i> en 2021.	84
Tableau 25. Liste des entérocoques séquencés par NGS en 2021 et leur profil phénotypique obtenu à partir de l'étude de susceptibilité antimicrobienne.	86
Tableau 26. Liste des gènes de résistance identifiés par NGS par phénotype résistant observé chez les entérocoques en 2021.	88
Tableau 27. Liste des facteurs de virulence identifiés par NGS chez les entérocoques en 2021.	90
Tableau 28. Nombre d'isolats par matrice contenant au moins un gène de résistance conférant de la résistance à la famille d'antibiotiques correspondante.	94
Tableau 29. Nombre d'isolats par gène de résistance et par matrice.	95

7. Abréviations

AmpC : céphalosporines du type AmpC
AMR : Résistance aux antimicrobiens
BLSE : bêta-lactamases à spectre étendu / élargi
CA-MRSA : community-associated MRSA
cgMLST : core-genome MLST
CMI : Concentration minimale inhibitrice
ESBL : bêta-lactamases à spectre étendu / élargi
EU-RL-AR : Laboratoire de référence européen pour la résistance aux antimicrobiens
HA-MRSA: hospital-associated MRSA
LA-MRSA: livestock-associated MRSA
MDR : multi-drug resistance/multirésistance
MLST : Multi Locus Sequence Typing
RAM : Résistance aux antimicrobiens
ST : sequence-type, type séquentiel

8. Références

Bogaerts B, Nouws S, Verhaegen B et al. Validation strategy of a bioinformatics whole genome sequencing workflow for Shiga toxin-producing *Escherichia coli* using a reference collection extensively characterized with conventional methods. *Microb Genom*2021; 7:mgen000531.

CLSI. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically. 11th ed. CLSI standard M07. Wayne, PA : Clinical and Laboratory Standards Institute ; 2018.

Crombé, F., Argudín, M.A., Vanderhaeghen, W., Hermans, K., Haesebrouck, F. and Butaye, P. 2013. Transmission dynamics of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in pigs. *Frontiers in Microbiology*, 4-57.

Decision 2013/652/EU on the monitoring and reporting of antimicrobial resistance in zoonotic and commensal bacteria. Official Journal of the European Union 14.11.2013

Deurenberg R.H., Vink C., Kalenic S., Friedrich A.W., Bruggeman C.A., Stobberingh E.E. 2007. The molecular evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clin Microbiol Infect* 2007; 13: 222–235.

Dubin, G. (2002). Extracellular Proteases of *Staphylococcus* spp. *Biological Chemistry*, 383(7-8). doi:10.1515/bc.2002.116
10.1515/bc.2002.116

Earls MR, Steinig EJ, Monecke S, Samaniego Castruita JA, Simbeck A, Schneider-Brachert W, Vremeră T, Dorneanu OS, Loncaric I, Bes M, Lacombe A, Prat Aymerich C, Wernery U, Armengol-Porta M, Blomfeldt A, Duchene S, Bartels MD, Ehrlich R, Coleman DC. Exploring the evolution and epidemiology of European CC1-MRSA-IV: tracking a multidrug-resistant community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clone. *Microb Genom*. 2021 Jul;7(7):000601. doi: 10.1099/mgen.0.000601. PMID: 34223815; PMCID: PMC8477393.

European Food Safety Authority; Technical specifications on the harmonised monitoring and reporting of antimicrobial resistance in *Salmonella*, *Campylobacter* and indicator *Escherichia coli* and

Enterococcus spp. Bacteria transmitted through food. EFSA Journal 2012; 10(6):2742. [64 pp.] doi:10.2903/j.efsa.2012.2742. Available online: www.efsa.europa.eu/efsajournal

European Food Safety Authority; Technical specifications on the harmonised monitoring and reporting of antimicrobial resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in food-producing animals and food. EFSA Journal 2012; 10(10):2897. [56 pp.] doi:10.2903/j.efsa.2012.2897. Available online: www.efsa.europa.eu/efsajournal

European Union Summary Report on Antimicrobial Resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2019–2020. EFSA Journal 2022;20(3):7209. DOI : 10.2903/j.efsa.2022.7209. Available online: www.efsa.europa.eu/efsajournal

European Medicines Agency (EMA): Categorisation of antibiotics in the European Union - Answer to the request from the European Commission for updating the scientific advice on the impact on public health and animal health of the use of antibiotics in animals. 2020. https://www.ema.europa.eu/en/documents/report/categorisation-antibiotics-european-union-answer-request-european-commission-updating-scientific_en.pdf.

Farrera GuadalupePatriciaMací, Montes de Oca Jiménez R, Varela Guerrero J, Tenorio Borroto E, Rivera Ramírez F, Monroy Salazar HG, Yong Angel G, Salem AZM, Antibiotics susceptibility of quinolones against Salmonella spp. strains isolated and molecular sequenced from pigs: Target gyrA gene detection, Microbial Pathogenesis (2018), doi: 10.1016/j.micpath.2017.11.067.

Griffith E. C., Wallace M. J., Wu Y., Kumar G., Gajewski S., Jackson P., et al. (2018). The structural and functional basis for recurring sulfa drug resistance mutations in *Staphylococcus aureus* dihydropteroate synthase. Front. Microbiol. 9:1369. 10.3389/fmicb.2018.01369

Hadyeh E., Azmi K., Seir R.A., Abdellatief I., Abdeen Z. 2019. Molecular Characterization of Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* in West Bank-Palestine. Front Public Health. 2019; 7: 130. doi: 10.3389/fpubh.2019.00130.

Harris SR, Feil EJ, Holden MT, Quail MA, Nickerson EK, et al. Evolution of MRSA during hospital transmission and intercontinental spread. Science. 2010;327:469–474.

Hetem DJ, Bootsma MCJ, Troelstra A, Bonten MJM. 2013. Transmissibility of Livestock-associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Emerg Infect Dis* 19(11): 1797–1802.

Jana B et Biswas I. Significance of individual domains of ClpL: a novel chaperone from *Streptococcus mutans*. Biochemistry. PMC 2021 September 15.

Jiménez et al.: Antibiotic resistance, virulence determinants and production of biogenic amines among enterococci from ovine, feline, canine, porcine and human milk. BMC Microbiology 2013 13:288.

Kahl BC, Mellmann A., Deiwick S., Peters G. and Harmsen D. 2005. Variation of the Polymorphic Region X of the Protein A Gene during Persistent Airway Infection of Cystic Fibrosis Patients Reflects Two Independent Mechanisms of Genetic Change in *Staphylococcus aureus*. JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY 43 (1):502–505.

Köck R, Schaumburg F, Mellmann A, Koksal M, Jurke A, et al. 2013. Livestock-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) as Causes of Human Infection and Colonization in Germany. PLoS ONE 8(2): e55040. doi:10.1371/journal.pone.0055040

Li J, Jiang N, Ke Y, Feßler AT, Wang Y, Schwarz S, Wu C. 2017. Characterization of pig-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Veterinary microbiology 201:183-187.

Lopez M, Tenorio C, Del Campo R, Zarazaga M et Torres C. Characterization of the mechanisms of fluoroquinolone Resistance in Vancomycin-Resistant enterococci of Different Origins. *Journal of Chemotherapy*, Vol. 23 - n. 2 (87-91) – 2011.

Mannu L, Paba A, Daga E, Comunian R, Zanetti S, Duprè I et Sechi L A. Comparison of the incidence of virulence determinants and antibiotic resistance between *Enterococcus faecium* strains of dairy, animal and clinical origin. *International Journal of Food Microbiology* 88 (2003) 291– 304.

Nurjadi D, Zizmann E, Chanthalangsy Q, Heeg K et Boutin S (2021) Integrative Analysis of Whole Genome Sequencing and Phenotypic Resistance Toward Prediction of Trimethoprim-Sulfamethoxazole Resistance in *Staphylococcus aureus*. *Front. Microbiol.* 11:607842. doi: 10.3389/fmicb.2020.60784.

Oliveira D, Borges A, Simões M (2018). *Staphylococcus aureus* Toxins and Their Molecular Activity in Infectious Diseases. *Toxins*. 2018;10(6):252. doi: 10.3390/toxins10060252.

Pöntinen A, Aalto-Araneda M, Lindström M, Korkeala H. 2017. Heat resistance mediated by pLM58 plasmid-borne ClpL in *Listeria monocytogenes*. *mSphere* 2:e00364-17.

Rathnayake I U, Hargreaves M, Huygens F. Antibiotic resistance and virulence traits in clinical and environmental *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* isolates *Systematic and Applied Microbiology* 35 (2012) 326– 333.

Ruiz-Ripa L., Alcalá L., Simon C., Gomez P., Mama O.M., Rezusta A., Zarazaga M. Torres C. 2019. Diversity of *Staphylococcus aureus* clones in wild mammals in Aragon, Spain, with detection of MRSA ST130-mecC in wild rabbits. *J Appl Microbiol.* 2019 Jul;127(1):284-291. doi: 10.1111/jam.14301.

Schwarz S, Shen J, Kadlec K, Wang Y, Brenner Michael G, Feßler A T et Vester B. Lincosamides, Streptogramins, Phenicol, and Pleuromutilins: Mode of Action and Mechanisms of Resistance. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2016;6:a027037.

Selleck E M, Van Tyne T et Gilmore M S. Pathogenicity of Enterococci. *Microbiol Spectr.* 2019 July ; 7(4).

Semedo T, Almeida Santos M, Silva Lopes M F, Figueiredo Marques J F, Barreto Crespo M T et Tenreiro R. Virulence Factors in Food, Clinical and Reference Enterococci: A Common Trait in the Genus? *System. Appl. Microbiol.* 26, 13–22 (2003).

Sharma M, Nunez-Garcia J, Kearns AM, Doumith M, Butaye PR, Argudín MA, Lahuerta-Marin A, Pichon B, AbuOun M, Rogers J, Ellis RJ, Teale C and Anjum MF. 2016. Livestock-Associated Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* (LA-MRSA) Clonal Complex(CC)398 Isolated from UK Animals belong to European Lineages. *Front. Microbiol.*7:1741.

Sivertsen A, Pedersen T, Larssen KW, Bergh K, Rønning TG, Radtke A, Hegstad K. 2016. A silenced vanA gene cluster on a transferable plasmid caused an outbreak of vancomycin-variable enterococci. *Antimicrob Agents Chemother* 60:4119 –4127.

Soheili S, Ghafourian S, Sekawi Z, Neela V, Sadeghifard N, Ramli R et Hamat R A. Wide Distribution of Virulence Genes among *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* Clinical Isolates. *Hindawi Publishing Corporation The Scientific World Journal* Volume 2014, Article ID 623174, 6 pages.

Stegger M, Lindsay JA, Moodley A, Skov R, Broens EM and Guardabassi L. 2011. Rapid PCR Detection of *Staphylococcus aureus* Clonal Complex 398 by Targeting the Restriction-Modification System Carrying sau1-hsdS1. *JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY* 49 (2):732–734.

Tegegne HA, Koláčková I, Florianová M, Wattiau P, Gelbíčová T, Boland C, Madec J-Y, Haenni M, Karpíšková R. 2021. Genomic insights into methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* spa type t899 isolates belonging to different sequence types. *Appl Environ Microbiol* 87:e01994-20. <https://doi.org/10.1128/AEM.01994-20>.

Timmermans M, Bogaerts B, Vanneste K, De Keersmaecker S C J, Roosens N H C, Kowalewicz C, Simon G, Argùdin M A, Deplano A, Hallin M, Wattiau P, Fretin D, Denis O et Boland C. Large diversity of linezolid-resistant isolates discovered in food-producing animals through linezolid selective monitoring in Belgium in 2019. *J Antimicrob Chemother* 2022; 77: 49–57.

Vandendriessche S, Vanderhaeghen W, Soares FV, Hallin M, Catry B, Hermans K, Butaye P, Haesebrouck F, Struelens MJ, Denis O. 2013. Prevalence, risk factors and genetic diversity of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carried by humans and animals across livestock production sectors. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 68(7):1510-1516.

Vrieling M, Tuffs SW, Yebra G, van Smoorenburg MY, Alves J, Pickering AC, Park JY, Park N, Heinrichs DE, Benedictus L, Connelley T, Seo KS, McCormick JK, Fitzgerald JR. 2020. Population Analysis of *Staphylococcus aureus* Reveals a Cryptic, Highly Prevalent Superantigen SEIW That Contributes to the Pathogenesis of Bacteremia. *mBio*. 2020 Oct 27;11(5):e02082-20. doi: 10.1128/mBio.02082-20.

World Health Organization. 2019. Critically important antimicrobials for human medicine, 6th revision. Geneva. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.

9. Remerciements

Ce travail a été financé par le FAVV-AFSCA. Nous remercions Mickael Cargnel pour son aide dans l'analyse statistique de nos données. Nous remercions également le service Transversal Activities in Applied Genomics de Sciensano pour les réactions de séquençage et le développement et la maintenance des outils et des pipelines Galaxy utilisés pour les analyses NGS.