Antibiorésistance en santé animale en France : caractérisation à des fins d'évaluation et de lutte et mises en perspective dans un contexte One Health

Clémence Boireau

▶ **To cite this version:**

Clémence Boireau. Antibiorésistance en santé animale en France : caractérisation à des fins d'évaluation et de lutte et mises en perspective dans un contexte One Health. Médecine vétérinaire et santé animale. Université de Lyon, 2019. Français. NNT : 2019LYSE1114 . tel-02305431

HAL Id: tel-02305431
https://theses.hal.science/tel-02305431

Submitted on 4 Oct 2019

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

N° d'ordre NNT : 2019LYSE1114

THÈSE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE LYON

Opérée au sein de
L'Université Claude Bernard Lyon 1

École Doctorale N° 341
Évolution, Écosystèmes, Microbiologie, Modélisation

Spécialité de doctorat : Épidémiologie, Antibiorésistance, Surveillance

Soutenue publiquement le 05/09/2019, par :

Clémence BOIREAU BOURÉLY

Antibiorésistance en santé animale en France : caractérisation à des fins d'évaluation et de lutte et mises en perspective dans un contexte *One Health*

Devant le jury composé de :

VANHEMS, Philippe, PU-PH, CHU de Lyon, Hospices civils de Lyon	Président du jury
GUATTEO, Raphaël, Professeur, ONIRIS	Rapporteur
PAUL, Mathilde, Maître de Conférences, ENVT	Rapporteur
ROBERT, Jérôme, PU-PH, Hôpital Universitaire Pitié Salpêtrière	Examinateur
GAY, Émilie, Chargée de recherches, ANSES	Directrice de thèse
LEBLOND, Agnès, Professeur, VetAgro Sup	Co-directrice de thèse

RÉSUMÉ

L'antibiorésistance est une préoccupation majeure et globale de santé publique. La problématique de recherche de cette thèse visait à fournir au gestionnaire une aide à la décision pour la mise en œuvre et l'évaluation des mesures de lutte contre l'antibiorésistance en santé animale. Pour espérer limiter le phénomène et le gérer, il faut en connaître la dynamique d'évolution : la surveillance des résistances se positionne donc comme un enjeu clé de la lutte. En premier lieu, ces travaux ont déterminé, au travers d'une enquête populationnelle et d'une approche sociologique, dans quelles mesures les données collectées par le réseau d'épidémiosurveillance de l'antibiorésistance des bactéries pathogènes animales (Résapath) pouvaient être utilisées pour répondre à la problématique. La représentativité et la couverture du Résapath estimées satisfaisantes, l'évolution des résistances a été investiguée avec des modèles additifs généralisés à partir des données de surveillance. La mise en parallèle des tendances des résistances avec les mesures de maîtrise a illustré l'impact positif des changements de pratique sur l'évolution des résistances. Enfin, dans la perspective du concept *One Health,* qui prône une approche intégrée et collaborative de la santé, le rapprochement entre les dynamiques des résistances chez les animaux et chez l'Homme a été exploré, en se basant sur les données du réseau MedQual en médecine de ville. Les tendances des résistances ont évolué de manière spécifique à chaque espèce, sans dynamique commune entre l'Homme et les animaux. Les efforts pour lutter contre l'antibiorésistance doivent donc être menés de concert, tant en médecine humaine que vétérinaire.

MOTS-CLÉS

Antibiorésistance, surveillance, série temporelle, santé animale, Résapath, MedQual, *One Health*

INTITULÉ ET ADRESSE DES LABORATOIRES

Anses Laboratoire de Lyon
Unité Épidémiologie et Appui à la Surveillance
31 Avenue Tony Garnier
69007 Lyon

INRA Clermont-Ferrand-Theix-Lyon
Unité mixte de recherche, Épidémiologie des maladies Animales et zoonotiques
1 Avenue Bourgelat
69280 Marcy L'Étoile

TITLE

Antimicrobial resistance in animal health in France: characterization for assessment and control purposes in a One Health perspective

ABSTRACT

Antimicrobial resistance is a major and global public health concern. In this context, the research problem was to provide decision support to the risk manager for the implementation and assessment of control measures in animal health. To limit and manage the phenomenon, we must know the dynamic of its evolution: the surveillance is therefore a key element in the fight against antimicrobial resistance. At first, using a population survey and a sociological approach, this research determined to what extent the data collected by the French surveillance network of antimicrobial resistance in diseased animals (RESAPATH) could be used to answer the research problem. Since the representativeness and the coverage of the RESAPATH were considered satisfactory, surveillance data were used to characterize the dynamics of the resistances and generalized additive models were developed. The comparison of resistance trends and control measures underscored the positive impact of changes in practices on the evolution of resistances. Finally, in the context of the 'One Health' concept that advocates an integrated and collaborative approach to health, the parallel was drawn between resistances in isolates from animals and humans. Data from the French surveillance network of antimicrobial resistance of bacteria isolated in community (MedQual) were analysed. Resistance dynamics were specific to each species. These results advocate that the efforts to fight antimicrobial resistance must be carried in all sectors and for all species, both in human and veterinary medicine.

KEY WORDS

Antimicrobial resistance, surveillance, time-series, animal Health, RESAPATH, MedQual, One Health

REMERCIEMENTS

Monsieur Philippe Vanhems, je vous remercie de m'avoir fait l'honneur de présider le jury de ma thèse universitaire.

Madame Mathilde Paul, je vous remercie vivement d'avoir accepté d'être rapporteur de ma thèse universitaire. Je vous remercie pour votre regard d'expert et vos conseils enrichissants.

Monsieur Raphaël Guatteo, je vous remercie chaleureusement d'avoir accepté d'être rapporteur de ma thèse universitaire.

Monsieur Jérôme Robert, je vous remercie de m'avoir fait l'honneur d'examiner mes travaux de thèse en acceptant de participer au jury. Je vous remercie pour l'impulsion transversale et intégrée de la surveillance de l'antibiorésistance que vous initiez par l'ONERBA.

J'adresse ma profonde reconnaissance à Emilie Gay et Agnès Leblond, directrices de ma thèse universitaire qui m'ont donné l'opportunité de réaliser ces travaux et qui ont guidé mes pas tout au long de ce projet passionnant.

Je remercie chaleureusement Jocelyne Caillon, Sonia Thibaut et Thomas Coeffic, qui ont pris part à ce projet avec enthousiasme. Merci pour votre disponibilité, votre pédagogie pour m'expliquer les subtilités du réseau MedQual et votre sympathie.

Je remercie également Nicolas Fortané pour ses conseils pratiques et avisés, son sens pointu de l'analyse sociologique et ses explications passionnées.

J'exprime ma gratitude au personnel de l'ENSV, en particulier à Sylvie Miallet, Sébastien Gardon et Chantal Masse pour leur suivi tout au long de cette thèse.

J'adresse mes sincères remerciements à tous mes collègues de l'équipe du Résapath, de l'unité EAS de l'Anses et de l'Unité EpiA de l'Inra qui ont partagé mon quotidien pendant ces trois superbes années, en particulier à Géraldine Cazeau, Nathalie Jarrige, Christelle Philippon, Mathilde Saussac, Carole Sala, Sofia Mlala, Pauline de Jerphanion, Viviane Hénaux, Claire Chauvin, Marisa Haenni, Agnese Lupo, Céline Dupuy, Isabelle Stubljar, Constance Rousselot, Gwenaël Vourc'h, Pierre Villard, Eric Morignat, Julien Cauchard, Jean-Luc Vinard, Adler Moukouboulou, Rodolphe Mader, Jean-Yves Madec, Jean-Phillipe Amat, Pascal Hendrikx, Didier Calavas et Xavier Bailly.
Un très grand merci pour votre accueil chaleureux, votre gentillesse, vos précieux conseils scientifiques et méthodologiques, votre écoute et votre bonne humeur qui ont fait de ces trois années de thèse, un magnifique souvenir.

Je remercie enfin tous les membres de ma famille et mes amis pour leur soutien indéfectible.

À Alfred, merci d'être toujours là, présent,

Quels que soient les courants, les marées ou les vents.

TABLE DES MATIÈRES

Introduction 15

PREMIÈRE PARTIE - ÉTAT DE l'ART 19

Chapitre I - Contexte : l'antibiorésistance et sa surveillance 21

A- La résistance bactérienne aux antibiotiques 21

B- La caractérisation de la résistance d'une souche bactérienne 32

C- La surveillance de l'antibiorésistance en santé animale 40

D- La lutte contre l'antibiorésistance 47

Chapitre II - Des besoins identifiés à la problématique de la thèse 55

A- L'antibiorésistance : quels enjeux ? 55

B- De la connaissance épidémiologique de l'antibiorésistance en santé animale à l'identification de besoins de recherche 59

C- Problématique de la thèse 65

D- Objectifs et questions de recherche 65

SECONDE PARTIE - TRAVAUX DE RECHERCHE 67

Chapitre I - Le Résapath : fonctionnement, objet de la surveillance et représentativité 69

A- Choix du matériel de recherche 69

B- Fonctionnement du Résapath 69

C- Questions de recherche et objectifs 71

D- Caractérisation du réseau et de son objet de surveillance 71

Chapitre II - Caractérisation de l'antibiorésistance à partir des données du Résapath : possibilités et limites 97

A- Questions de recherche et objectifs 97

B- Les données collectées par le Résapath 97

C- Caractérisation de la résistance à partir des données de surveillance : exemples en filières équine et canine 99

Chapitre III - Evolution temporelle des résistances pour l'évaluation des mesures de maîtrise 111

A- Questions de recherche et objectif 111

B- La méthode de modélisation : les modèles additifs généralisés 111

C- Modélisation de l'évolution temporelle de l'antibiorésistance 116

D- Utilisation de la modélisation temporelle pour l'évaluation des mesures de maîtrise 120

Chapitre IV - Mise en perspective des niveaux de résistance et des tendances dans un contexte *One Health* 129

A- Questions de recherche et objectifs 129

B- Matériels et méthode 130

C- Résultats 132

D- Discussion 136

Chapitre V - Discussion générale 141

A- Surveillance temporelle des résistances : quelles pistes pour une alerte précoce en santé animale ? 141

B- Une surveillance spatiale des résistances en santé animale : quelles perspectives ? 144

C- Autres pistes d'évolution pour la surveillance des résistances chez les bactéries pathogènes en santé animale 148

D- Quels enjeux d'avenir pour la surveillance de l'antibiorésistance en santé animale ? 153

Conclusion 159

Références 161

Annexes 183

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADN	Acide désoxyribonucléique
AIC	Antibiotique d'importance critique
ALEA	Animal Level of Exposure to Antimicrobials (indicateur du niveau d'exposition des animaux aux antibiotiques)
Anses	Agence nationale de sécurité sanitaire, de l'alimentation, de l'environnement et du travail
ANSM	Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé
ANMV	Agence nationale du médicament vétérinaire
ARMA	Autoregressive Moving Average (modèle autorégressif et moyenne mobile)
ARN	Acide ribonucléique
BDNI	Base de données nationale d'identification
BLSE	Bêta-lactamase à spectre étendu
C3G	Céphalosporine de troisième génération
C4G	Céphalosporine de quatrième génération
CA-SFM	Comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie
CHU	Centre hospitalier universitaire
CMI	Concentration minimale inhibitrice
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CNRP	Centre national de référence des pneumocoques
DGAl	Direction générale de l'Alimentation
DGS	Direction générale de la Santé
EARS-Net	European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (Réseau européen de surveillance de la résistance bactérienne aux antibiotiques)
EARSS	European Antimicrobial Resistance Surveillance System (Système européen de surveillance de la résistance bactérienne aux antibiotiques)
ECDC	European Center for Disease prevention and Control (Centre européen de prévention et de contrôle des maladies)
EFSA	European Food Safety Authority (Autorité Européenne de Sécurité des Aliments)
EMA	European Medicines Agency (Agence européenne des médicaments)
ESAC-Net	European Surveillance of Antimicrobial Consumption Network (Réseau européen de surveillance de la consommation d'antibiotiques)
ESCMID	European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (Société européenne de microbiologie clinique et des maladies infectieuses)
EUCAST	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (Comité européen des antibiogrammes)
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations (Organisation des Nations unies pour l'alimentation et l'agriculture)
GAM	Generalised Additive Model (Modèle additif généralisé)
GAMM	Generalised Additive Mixed model (Modèle additif généralisé à effet mixe)
HAI-Net	Healthcare-associated Infections Surveillance Network (Réseau de surveillance des infections associées aux soins)
INRA	Institut national de la recherche agronomique
LAAF	Loi d'Avenir pour l'Agriculture, l'Alimentation et la Forêt
LPS	Lipopolysaccharides
LNR	Laboratoire national de référence
NAC	Nouveaux animaux de compagnie
OIE	Organisation mondiale de la santé animale (anciennement Office international

	des épizooties)
OMS	Organisation mondiale de la santé
ONERBA	Observatoire national de l'épidémiologie de la résistance aux antibiotiques
PCR	Polymerase Chain Reaction (amplification en chaîne par polymérase)
PLP	Protéines de liaison aux pénicillines
Résapath	Réseau d'épidémiosurveillance de l'antibiorésistance des bactéries pathogènes animales
S/I/R	Sensible / Intermédiaire / Résistant (résultat d'antibiogramme)
SARM	*Staphylococcus aureus* résistants à la méticilline
SPF	Santé Publique France
UE	Union Européenne
UDP-GlcNAc	Uridine diphosphate N-acetylglucosamine

INDEX DES FIGURES

Figure 1 : Les différentes cibles d'action des antibiotiques en relation avec l'organisation structurelle, fonctionnelle et la physiologie de la bactérie 26

Figure 2 : Découverte des antibiotiques et histoire concomitante de l'identification des résistances [15-18] 30

Figure 3 : Mécanismes de résistance des bactéries aux antibiotiques 31

Figure 4 : Étapes de réalisation d'un antibiogramme par diffusion en milieu gélosé 34

Figure 5 : Interprétation du résultat d'antibiogramme par diffusion en milieu gélosé 37

Figure 6 : Illustration de la distribution de CMI des sous-populations sauvages, intermédiaires et résistantes d'une espèce bactérienne 39

Figure 7 : Interconnexion des communautés microbiennes et voies de transfert des résistances ou des bactéries résistantes [74,93,95,96] 57

Figure 8 : Fonctionnement du Résapath 70

Figure 9 : Différents stades de sélection jusqu'à l'intégration d'un résultat d'antibiogramme dans la base de données du Résapath 72

Figure 10 : Visées de l'antibiogramme en médecine vétérinaire 78

Figure 11 : Schéma illustrant les liens entre facteurs et catégories de facteurs de recours à l'antibiogramme, d'après les propos des enquêtés 82

Figure 12 : Effectifs d'animaux (à gauche) et nombre d'antibiogrammes collectés par le Résapath (à droite) en 2015, par filière animale et par département ou région (découpage administratif avant 2015) 93

Figure 13 : Evolution du nombre d'antibiogrammes collectés par le Résapath par espèce animale de 2007 à 2017 98

Figure 14 : Nombre d'isolats collectés pour les cinq bactéries les plus fréquemment isolées de chevaux sur la période 2012-2016 en France d'après les données du Résapath 101

Figure 15 : Distribution spatiale par région administrative des proportions (en %) de multirésistance des souches de *S. pseudintermedius* isolées d'otites canines de 2012 à 2016 105

Figure 16 : Proportions de multirésistance des souches de *S. pseudintermedius* isolées d'otites canines de 2012 à 2016, estimées par région administrative avec représentation des intervalles de confiance à 95 % en rouge 106

Figure 17 : Chronogramme de la proportion mensuelle de souches *E. coli* résistantes au ceftiofur en filière bovine de 2005 à 2014 et corrélogrammes des fonctions d'autocorrélation et d'autocorrélation partielle associées à la série brute 114

Figure 18 : Tendances de la résistance des souches *S. uberis* isolées de mammites bovines en France de 2006 à 2016 118

Figure 19 : Tendances de la résistance au ceftiofur des souches *E. coli* isolées de poulets de chair, de poules pondeuses, de veaux, de porcelets et de truies de 2006 à 2016 et identification temporelle des principaux événements relatifs en antibiorésistance.....123

Figure 20 : Evolution de l'indicateur de niveau d'exposition des animaux aux antibiotiques (ALEA) chez les bovins et les porcs, tous types de production confondus, sur la période 2006-2016 en France [293] 124

Figure 21 : Tendances des résistances à l'amoxicilline (A), aux sulfamides-triméthoprime (B) et à la gentamicine (C) chez les souches *E. coli* isolées chez l'Homme, les chiens, les chats, les porcelets, les poulets de chair, les poules pondeuses, les dindes et les veaux, entre 2014 et 2017 134

Figure 22 : Tendances des résistances aux céphalosporines de troisième génération (A) et aux fluoroquinolones (B) chez les souches *E. coli* isolées chez l'Homme, les chiens, les chats, les porcelets, les poulets de chair, les poules pondeuses, les dindes et les veaux, entre 2014 et 2017 .136

INDEX DES TABLEAUX

Tableau 1 : Principales molécules antibiotiques rencontrées en médecine vétérinaire avec leurs spectres d'activité (partie 1) 23

Tableau 2 : Principales molécules antibiotiques rencontrées en médecine vétérinaire avec leurs spectres d'activité (partie 2) 24

Tableau 3 : Types de résistance en fonction du niveau d'étude considéré 28

Tableau 4 : Avantages et inconvénients des principales méthodes de détection de sensibilité bactérienne 36

Tableau 5 : Synthèse sur les facteurs de risque d'antibiorésistance en santé animale (partie 1) 62

Tableau 6 : Synthèse sur les facteurs de risque d'antibiorésistance en santé animale (partie 2) 63

Tableau 7 : Critères de sélection des participants 73

Tableau 8 : Sujets de discussion au cours des entretiens 75

Tableau 9 : Nombre d'entretiens par secteur et zone géographique 76

Tableau 10 : Déterminants du recours à l'antibiogramme mentionnés par les enquêtés par filière (partie 1) 80

Tableau 11 : Déterminants du recours à l'antibiogramme mentionnés par les enquêtés par filière (partie 2) 81

Tableau 12 : Nombre d'antibiogrammes réalisés par les 72 laboratoires adhérents au Résapath et par les 37 laboratoires vétérinaires non-adhérents ayant fourni leurs nombres d'antibiogrammes réalisés en 2015 91

Tableau 13 : Bactéries ou genres bactériens les plus fréquemment isolés en contexte pathologique par espèce animale d'après les résultats d'antibiogrammes collectés par le Résapath en 2017 99

Tableau 14 : Proportion de résistance (en %) des souches isolées de chevaux sur la période 2012-2016 par pathologie et comparaisons entre proportions 102

Tableau 15 : Antibiotiques et familles d'antibiotiques associées pour la caractérisation de la multirésistance des souches de *S. pseudintermedius* chez le chien 104

Tableau 16 : Liste des mesures et des initiatives relatives à la lutte contre l'antibiorésistance en santé animale entre 2006 et 2016 en France 125

Tableau 17 : Antibiotiques sélectionnés et classes d'antibiotiques correspondantes 131

Tableau 18 : Résistance (en pourcentage avec intervalle de confiance à 95 %) des souches *E. coli* isolées en France sur la période 2014-2017 chez l'Homme et chez les animaux 133

Introduction

Dix millions de morts par an. C'est l'estimation du nombre de décès imputables à l'antibiorésistance autour du globe à l'horizon 2050, si l'évolution du phénomène n'est pas enrayée. Pourtant, dès l'aube de leur industrialisation à la fin de la seconde guerre mondiale, les antibiotiques ont permis de sauver des millions de vies. À partir de 1942, les grandes firmes pharmaceutiques d'Amérique du Nord s'engagèrent dans la production massive de la pénicilline, antibiotique mis en évidence par Alexander Fleming en 1928. Depuis plus de 70 ans, l'antibiothérapie est le moyen de défense majeur contre les infections microbiennes. Jusque dans les années 1980, de nombreux antibiotiques sont découverts permettant le traitement de maladies bactériennes infectieuses diverses comme les méningites ou les endocardites. Des maladies bactériennes mortelles telles que la tuberculose, la pneumonie, la diphtérie, la syphilis ou encore le tétanos peuvent désormais être traitées grâce aux antibiotiques. C'est la véritable heure de gloire de ces molécules : leur efficacité remarquable s'accompagne de leur utilisation massive et répétée en santé humaine comme en santé animale. Mais la croyance en un progrès constant grâce aux antibiotiques n'est qu'illusion. Ponctuelles au départ, les résistances sont devenues rapidement massives et préoccupantes, constituant aujourd'hui l'un des principaux enjeux de santé publique à travers le monde. De plus en plus d'infections causées par des microorganismes résistants ne répondent pas aux traitements conventionnels et, dans certains cas, même les antibiotiques de dernier recours ont perdu leur efficacité. Parallèlement, la recherche et le développement d'antibiotiques novateurs ont fortement ralenti, aggravant le phénomène au cours des dernières décennies.

La prise de conscience de la gravité du phénomène est relativement récente. Depuis les années 2000, les plans et recommandations au sujet de la lutte et de la surveillance de l'antibiorésistance, comme du bon usage des antibiotiques, se sont multipliés, tant en médecine humaine que vétérinaire, au niveau national, à l'échelle européenne et internationale, notamment avec la création d'une task-force transatlantique entre l'Union Européenne et les États-Unis pour la coopération dans la lutte contre l'antibiorésistance. Les grandes organisations internationales ont émis des recommandations pour limiter le phénomène et la surveillance des résistances chez les bactéries d'origine animale, humaine et environnementale apparaît indispensable. La santé humaine est menacée non seulement par les bactéries pathogènes résistantes propres à l'espèce, mais également par les résistances développées par les bactéries pathogènes animales ou environnementales. En sus, une approche transversale et intégrée de la lutte est prônée, suivant le concept *One Heatlh* soutenu par l'alliance tripartite OIE-FAO-OMS (Organisation mondiale de la santé animale - Organisation des Nations unies pour l'alimentation et l'agriculture - Organisation

mondiale de la santé). La lutte contre les résistances doit nécessairement être envisagée dans une approche holistique, associant santé animale, santé humaine et environnement.

La surveillance de l'antibiorésistance, c'est-à-dire la collecte systématique de données permettant le suivi des niveaux de résistance des bactéries, se positionne véritablement comme un outil de connaissance et d'aide à la décision pour le gestionnaire, par exemple pour limiter l'usage des molécules présentant des niveaux élevés de résistance. Associée aux contrôles des pratiques d'usage et aux actions de maîtrise, elle est considérée comme une solution pour contrer l'évolution du phénomène, tant en santé humaine qu'en santé animale. En France, des dispositifs de surveillance des résistances chez les bactéries existent déjà depuis plusieurs années, en particulier le réseau d'épidémiosurveillance de l'antibiorésistance des bactéries pathogènes animales, le Résapath, créé en 1982. Mais, à l'heure actuelle, la caractérisation épidémiologique du phénomène d'antibiorésistance reste relativement sommaire, avec des estimations nationales annuelles des niveaux de résistance.

Par conséquent il nous est apparu nécessaire de caractériser plus finement la résistance en santé animale en France, d'investiguer la distribution spatiale des niveaux de résistance, de décrire les associations de résistance et la multirésistance, mais aussi d'étudier le phénomène dans sa complexité temporelle, c'est-à-dire en le décomposant en tant que série temporelle. Il serait alors envisageable de mettre en regard les dynamiques d'évolution des résistances en santé animale et humaine afin de documenter le parallélisme couramment admis entre les différentes espèces et d'approcher la réalité et l'ampleur du lien Homme-animal. En sus, en présentant une vision conjointe de l'évolution de l'antibiorésistance, approche particulièrement importante dans un contexte où les efforts pour diminuer les niveaux de résistance doivent être conjugués, de tels travaux constitueraient une base solide pour orienter les mesures de maîtrise prises par les décideurs, évaluer les stratégies de contrôle existantes et optimiser les recommandations aux prescripteurs. C'est précisément l'objet de ce travail de thèse qui vise, au travers de la caractérisation de résistance bactérienne en santé animale en France, à fournir une aide à la décision au gestionnaire pour la mise en œuvre et l'évaluation des mesures de lutte contre l'antibiorésistance.

Dans une première partie bibliographique, nous revenons sur les différentes caractéristiques des antibiotiques, leurs mécanismes d'action pour mieux aborder ensuite le concept d'antibiorésistance et sa définition. Après avoir présenté l'historique des résistances des bactéries aux antibiotiques, nous détaillons les différentes méthodes de caractérisation des résistances des bactéries vis-à-vis des antibiotiques *in vitro*. Nous dressons ensuite l'état des lieux de la surveillance de l'antibiorésistance en santé humaine et en santé animale, et précisons les stratégies

et programmes de lutte développés en France. Le rappel du contexte général de la thèse, la présentation des enjeux liés à la lutte contre l'antibiorésistance, et l'état des lieux de la connaissance épidémiologique actuelle de l'antibiorésistance en santé animale, sont autant d'éléments nous permettant d'identifier les besoins en termes de recherche.

La deuxième partie de la thèse est axée sur les travaux de recherche qui ont été menés. La première étape a consisté à étudier dans quelles mesures les données de surveillance du Résapath peuvent servir à répondre à la problématique de recherche. Forts de ces premiers résultats, les niveaux de monorésistance, de multirésistance et la distribution spatiale des niveaux de résistance en santé animale ont été caractérisés. Pour approcher la dynamique de l'antibiorésistance, nous avons ensuite investigué l'évolution temporelle des résistances. L'analyse des séries temporelles a été l'occasion d'examiner l'impact des mesures de maîtrise de l'antibiorésistance sur l'évolution du phénomène dans les différentes filières de production animale. Dans une démarche intégrative et transversale suivant le concept *One Health*, nous avons appliqué les méthodes de décomposition de séries temporelles à des données de surveillance en santé humaine pour nourrir le parallèle entre épidémiologie de l'antibiorésistance en santé humaine et animale. Enfin, dans le dernier chapitre de cette thèse, sur la base des différentes recherches effectuées et des résultats obtenus, nous discutons de la portée de ces travaux dans le cadre général de la surveillance de l'antibiorésistance en santé animale en France et des perspectives de recherches mises en lumière.

PREMIÈRE PARTIE

ÉTAT DE l'ART

Synthèse bibliographique et contexte de la thèse

Chapitre I - Contexte : l'antibiorésistance et sa surveillance

Dans cette partie bibliographique, les différentes caractéristiques des antibiotiques et leurs mécanismes d'action sont présentés, avant de détailler le concept d'antibiorésistance, l'historique des résistances des bactéries aux antibiotiques et les différentes méthodes de caractérisation des résistances des bactéries vis-à-vis des antibiotiques. L'état des lieux de la surveillance de l'antibiorésistance en santé humaine et en santé animale ainsi que les stratégies de lutte et leurs enjeux sont alors exposés.

A- La résistance bactérienne aux antibiotiques

La compréhension des mécanismes de résistance des bactéries vis-à-vis des antibiotiques est indissociable de la connaissance des modes d'action des antibiotiques eux-mêmes.

1. Les antibiotiques

1.1 Définitions

En 1947, Waksman, microbiologiste américain, proposa de qualifier d'antibiotique toute substance chimique d'origine naturelle capable de « *l'inhibition de la croissance ou de l'activité métabolique des bactéries et d'autres microorganismes*»[1] [1]. Il définit en outre une substance antibiotique comme une substance chimique produite par des micro-organismes et capable d'inhiber le développement ou de détruire les bactéries et d'autres micro-organismes [2] [1]. *Stricto sensu*, le mot antibiotique tel que défini par Waksman se réfère uniquement aux substances naturellement produites par un microorganisme et n'inclut pas les composés antimicrobiens synthétiques ou semi-synthétiques [2]. En 1957, Turpin et Velu proposèrent une définition plus globale du terme antibiotique comme : « *tout composé chimique, élaboré par un organisme vivant ou produit par synthèse, à coefficient chimiothérapeutique élevé dont l'activité thérapeutique se manifeste à très faible dose d'une manière spécifique, par l'inhibition de certains processus vitaux, à l'égard des*

[1] Version originale : "*inhibiting the growth or the metabolic activities of bacteria and other microorganisms by a chemical substance of natural origin*"
[2] Version originale : "*a chemical substance, of microbial origin, that possesses antibiotic properties*".

virus, des microorganismes ou même de certains êtres pluricellulaires » [3]. À l'heure actuelle, plusieurs définitions coexistent encore ; elles diffèrent suivant la cible (limitation aux seules bactéries par exemple), le concept de toxicité (présence du concept de toxicité sélective notamment) ou encore l'origine de la substance (strictement bactérienne ou non). Par rapport à la définition générique proposée par Waksman, nous nous focalisons dans le cadre de cette thèse sur les composés chimiques dont l'activité thérapeutique se manifeste à très faible dose d'une manière spécifique par l'inhibition de certains processus vitaux à l'égard des bactéries.

1.2 Classifications

Les antibiotiques se différentient entre eux par leur origine (naturelle lorsqu'ils sont élaborés par des microorganismes telluriques, procaryotes ou eucaryotes, ou de synthèse), leur structure chimique (noyau bétalactame pour les antibiotiques de la famille des bétalactamines par exemple), leur spectre d'activité et leur mécanisme d'action. Les antibiotiques peuvent avoir des activités antibactériennes, antifongiques, voire antimitotiques. Dans ce manuscrit, seule l'activité antibactérienne intéresse notre propos. En fonction de l'effet antibactérien de la substance, on distingue [4,5] :

- les antibiotiques bactéricides qui entrainent la mort de la bactérie et donc une diminution de taille de la population bactérienne touchée (bétalactamines, aminosides, quinolones, association sulfamide-triméthoprime) ;
- les antibiotiques bactériostatiques qui conduisent à l'arrêt de la multiplication bactérienne et donc à la limitation de la croissance de la population bactérienne (chloramphénicol, macrolides, tétracyclines, lincosamides, sulfamides).

L'efficacité des antibiotiques bactéricides dépend soit du pic sérique de l'antibiotique, on parle d'antibiotique concentration-dépendant, soit de la durée pendant laquelle la concentration bactéricide est maintenue dans le sérum, on parle alors d'antibiotique temps-dépendant. L'effet des antibiotiques bactériostatiques est toujours considéré comme temps-dépendant.

Un autre type de classification des antibiotiques basée sur leur activité prend en compte leur spectre d'activité antibactérienne (Tableaux 1 et 2), c'est-à-dire l'ensemble des espèces bactériennes sauvages sensibles à l'antibiotique.

Tableau 1 : Principales molécules antibiotiques rencontrées en médecine vétérinaire avec leurs spectres d'activité (partie 1) [6]

Famille	Sous-famille	Génération / groupe	Molécules	Spectre
Aminosides	Aminoglycosides	-	Streptomycine, gentamicine, kanamycine, apramycine, néomycine	Spectre moyen (entérobactéries, staphylocoques et *Pseudomonas aeruginosa*)
	Aminocyclitol	-	Spectinomycine	Spectre moyen (mycoplasmes)
Dérivés des nitrofuranes	-		Nitrofurantoïne, furazolidone, furaltadone	Spectre large (surtout Gram négatif)
Dérivés des nitro-imidazolés	-	-	Métronidazole, dimétridazole, ronidazole	Spectre étroit (anaérobies)
Dérivés du noyau Benzyl-Pyrimidine	-	-	Triméthoprime	Spectre moyen
Béta-lactamines	Pénicillines	Groupe G	Benzylpénicilline (Pénicilline G)	Spectre moyen (cocci Gram positif et bacilles Gram négatif)
		Groupe A	Ampicilline, amoxicilline	Spectre moyen, inactivées par les pénicillinases staphylococciques
		Groupe M	Oxacilline, cloxacilline, nafcilline, dicloxacilline	Spectre moyen, résistantes aux pénicillinases
	Céphalosporines	1ère génération	Céfalexine, céfalotine, céfapirine, céfazoline	Spectre moyen (surtout Gram positif), résistantes aux pénicillinases
		2ème génération	Céfalonium	Spectre moyen (Gram positif et entérobactéries), résistantes aux pénicillinases
		3ème génération	Céfopérazone, ceftiofur, céfovécine	Spectre large, résistantes aux pénicillinases et aux céphalosporinases
		4ème génération	Cefquinome	Spectre large, stabilité face aux bêta-lactamases
Glycopeptides	-	-	Vancomycine	Spectre étroit (Gram positif)
Polypeptides	Polymyxines	Polymyxine B	Polymyxine	Spectre moyen (Gram négatif)
		Polymyxine E	Colistine	Spectre étroit (bacilles Gram négatif)
	Gramicidines	-	Bacitracine	Spectre étroit (bacilles Gram positif)

Tableau 2 : Principales molécules antibiotiques rencontrées en médecine vétérinaire avec leurs spectres d'activité (partie 2) [6]

Famille	Sous-famille	Génération / groupe	Molécules	Spectre
Macrolides et apparentés	Macrolides	1ère génération	Erythromycine, spiramycine, tylosine, tilmicosine	Spectre moyen (cocci Gram positif et bacilles Gram négatif)
	Triamilides	2ère génération	Tulathromycine, tylvalosine, gamithromycine	Spectre moyen (cocci Gram positif et bacilles Gram négatif)
	Lincosamides	-	Lincomycine, clindamycine, pirlymicine	Spectre moyen (cocci Gram positif et bacilles Gram négatif)
	Pleuromutilines	-	Tiamuline, valnémuline	Spectre moyen (cocci Gram positif et bacilles Gram négatif, *Mycoplasma)*
Tétracyclines	-	1ère génération	Oxytétracycline, chlortétracycline, tétracycline	Spectre large (Gram positif et négatif et anaérobies, *Chlamydia*, *Mycoplasma*, *Rickettsia*)
		2ère génération	Doxycycline	
Phénicolés	-	-	Florfénicol, chloramphénicol	Spectre large (Gram positif et négatif, *Chlamydia*, *Rickettsia*)
Rifamycine	-	-	Rifampicine	Spectre large (cocci Gram positif et négatif, *Rhodococcus equi)*
Sulfamides	-	-	Sulfadimidine, sulfadiméthoxine, sulfaguanidine, sulfadiazine	Spectre moyen (cocci Gram positif sauf entérocoques et Gram négatif)
Quinolones	-	1ère génération	Acide nalixidique, acide oxolinique	Spectre étroit (entérobactéries)
	Fluoroquinolones	2ème génération	Fluméquine	Spectre étroit (entérobactéries)
		3ème génération	Enrofloxacine, danofloxacine, marbofloxacine, difloxacine, pradofloxacine, orbifloxacine, ibafloxacine	Spectre large (entérobactéries, staphylocoques, streptocoques, *Pseudomonas, Mycoplasma*)

Ce spectre tient compte *(i)* de la distribution des concentrations minimales inhibitrices (CMI, valeur qui exprime l'activité antibactérienne intrinsèque *in vitro*) de l'antibiotique vis-à-vis des populations de souches d'un échantillon représentatif de l'espèce bactérienne, *(ii)* de la présence éventuelle de mécanismes de résistance naturelle et *(iii)* des caractéristiques pharmacodynamiques de l'antibiotique. Un antibiotique peut être dirigé contre un nombre restreint, voire une seule bactérie (spectre étroit) ou contre un grand nombre de bactéries différentes (large spectre). Au sein des quinolones par exemple, le spectre d'activité des molécules de première génération se concentre sur les entérobactéries, tandis que les fluoroquinolones de troisième génération couvrent à la fois les entérobactéries, les bactéries Gram positif dont les streptocoques, les bactéries intracellulaires et certains aérobies comme *Clostridium perfringens* [7].

1.3 Mode d'action

À la différence des antiseptiques, le mode d'action spécifique des antibiotiques leur confère une toxicité sélective et spécifique, donc généralement faible pour le patient traité. Les antibiotiques agissent sur des cibles ou des voies essentielles de la physiologie bactérienne (Encadré 1) et conduisent à des modifications morphologiques, structurales ou fonctionnelles des bactéries.

Encadré 1 – Rappel succinct de la morphologie et de la physiologie bactérienne

Les bactéries sont des organismes unicellulaires ubiquitaires procaryotes ; elles ne possèdent ni noyau, ni mitochondrie. De formes diverses (sphérique pour les coques, allongée, hélicoïdale, en bâtonnet pour les bacilles), elles mesurent généralement entre 0,5 et 5 µm de longueur. Les mycoplasmes font partie des plus petites bactéries et mesurent 0,3 µm (échelle des gros virus).

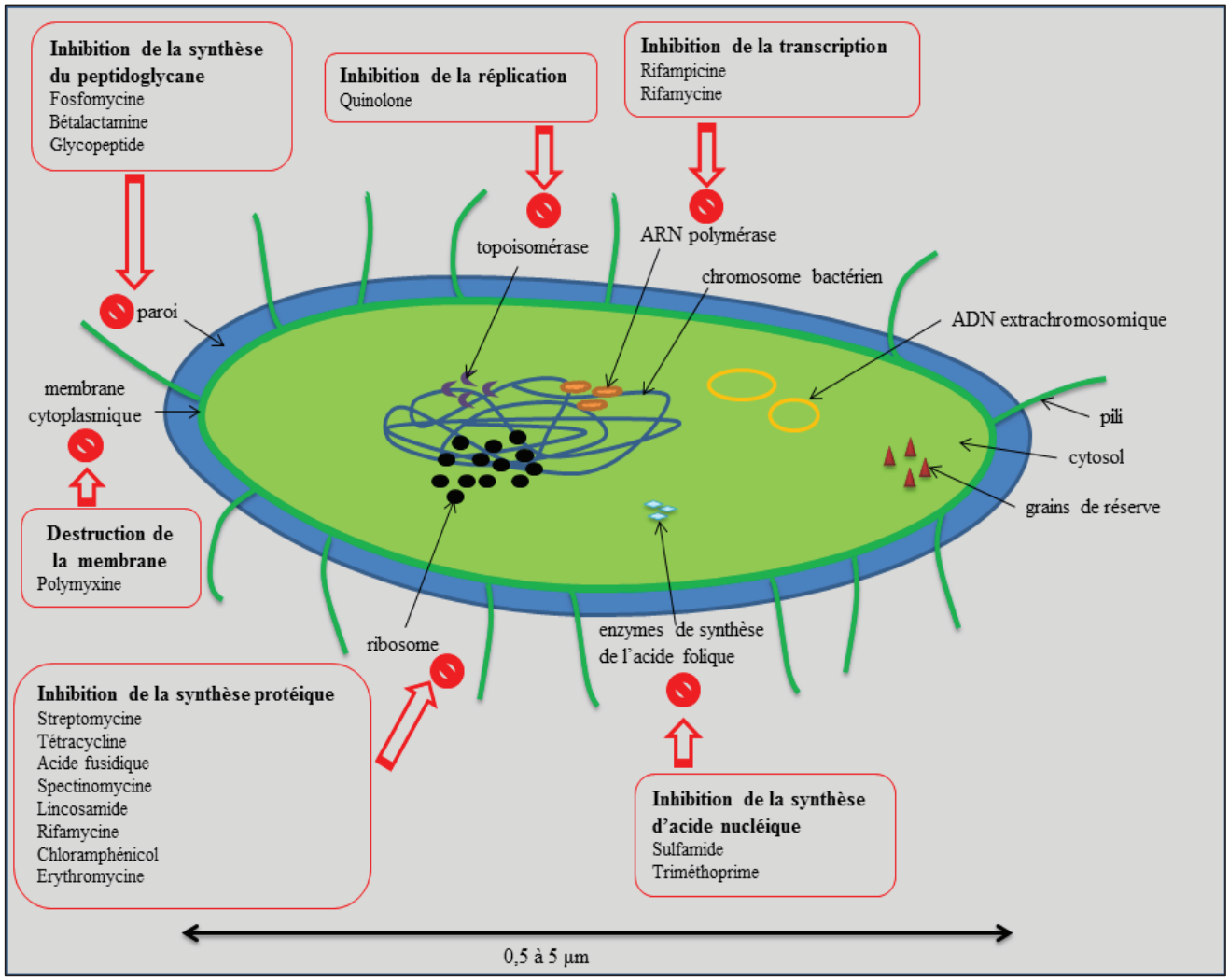
Les bactéries possèdent : un cytosol, un chromosome bactérien libre (parfois plusieurs), de l'ADN extra-chromosomique, de très nombreux ribosomes (activité de synthèse colossale), une membrane interne cytoplasmique (lieu de production de l'énergie) inclue dans la paroi bactérienne (sauf chez les mycoplasmes). La paroi protège la bactérie et lui confère sa forme. Sa structure permet de distinguer deux types de bactéries :

- les bactéries Gram positif possèdent une épaisse couche de peptidoglycane entourant la membrane interne cytoplasmique constituée d'une bicouche de phospholipides ponctuée de protéines ;
- les bactéries Gram négatif se composent d'une membrane interne cytoplasmique, entourée d'une fine couche de peptidoglycane elle-même entourée d'une membrane externe lipidique asymétrique (le feuillet externe est principalement constitué de lipopolysaccharides (LPS)).

La synthèse du peptidoglycane s'échelonne en trois phases : *(i)* une étape cytosolique qui aboutit à la synthèse d'UDP-GlcNAc, *(ii)* une étape de transport membranaire qui conduit les précurseurs à la face externe de la membrane interne, *(iii)* une étape pariétale qui aboutit à la polymérisation en maillage de l'unité de base par des liaisons β 1-4, assurée par des transpeptidases, des carboxypeptidases, des transglycosylases. La plupart de ces enzymes sont des protéines de liaisons aux pénicillines (PLP ou PBP en anglais pour *penicillin binding proteins).*

La Figure 1 ci-dessous illustre les différentes cibles d'action des antibiotiques par rapport à la structure de la bactérie.

Figure 1 : Les différentes cibles d'action des antibiotiques en relation avec l'organisation structurelle, fonctionnelle et la physiologie de la bactérie



Crédit : C. Bourély

En fonction des cinq cibles principales d'action des antibiotiques, on distingue [8–12] :

- **les inhibiteurs de la synthèse du peptidoglycane** : la fosfomycine (blocage de la synthèse d'UDP-GlcNAc), les bétalactamines (interaction de compétition par analogie structurale de l'extrémité D-Ala-D-Ala des précurseurs de peptidoglycane avec les PLP, enzymes de polymérisation pariétale du peptidoglycane), les glycopeptides (fixation à l'extrémité D-Ala-D-Ala des précurseurs et blocage de la polymérisation du peptidoglycane par encombrement stérique) ;
- **les inhibiteurs de la synthèse des acides nucléiques** : les sulfamides et le triméthoprime agissent par analogie structurale lors de la synthèse de l'acide tétrahydrofolique (précurseur

des bases puriques et pyrimidiques) en se fixant respectivement à la dihydroptéroate synthétase et à la dihydrofolate réductase (synergie d'action) ;

- **les inhibiteurs de la réplication de l'ADN** : les quinolones se lient au complexe Topoisomérase IV et ADN Gyrase et bloquent la religature des brins d'ADN après clivage ;
- **les inhibiteurs de la transcription de l'ADN en ARN**: la rifamycine bloque la synthèse d'ARN messager par occlusion stérique de l'ARN polymérase ;
- **les inhibiteurs de la synthèse protéique** : la tétracycline (blocage de la livraison de l'ARN de transfert sur le ribosome), la spectinomycine (blocage de la translocation du ribosome), le chloramphénicol (blocage de la liaison peptidique et de la terminaison de la synthèse), l'érythromycine (blocage de la sortie de la chaine peptidique du ribosome).

1.4 La courte heure de gloire des antibiotiques

Dès 1942, les grandes firmes pharmaceutiques d'Amérique du Nord s'engagèrent dans la production massive de la pénicilline, antibiotique mis en évidence par Alexander Fleming en 1928. Jusque dans les années 1980, de nombreux antibiotiques sont découverts permettant le traitement de maladies bactériennes infectieuses diverses (pneumonies, méningites, endocardites) [13]. C'est la véritable heure de gloire des antibiotiques : leur efficacité remarquable s'accompagne de leur utilisation massive et répétée en santé humaine comme en santé animale. Mais la croyance en un progrès constant grâce aux antibiotiques n'est qu'illusion. Ponctuelles au départ, les résistances sont devenues rapidement massives et préoccupantes, constituant aujourd'hui l'un des principaux enjeux de santé publique à travers le monde.

2. L'antibiorésistance

Depuis les travaux pionniers d'Alexander Fleming, de Paul Ehrlich et de Gerhard Domagk entre autres, les avantages des antibiotiques, qualifiés de « *médicaments miracles* » pour le traitement des maladies infectieuses [14] ont été considérés pour acquis en médecine. Mais ces dernières décennies, l'efficacité des antibiotiques a évolué de façon spectaculaire : de plus en plus de bactéries ont développé une résistance aux antibiotiques, de sorte que les traitements usuels peuvent devenir inefficaces, les infections persistent, augmentant ainsi le risque de propagation des infections vers d'autres personnes.

2.1 Définition

L'antibiorésistance est la capacité d'un micro-organisme bactérien à résister aux effets bactéricides ou bactériostatiques d'un antibiotique [8]. En fonction de la discipline considérée, la

notion d'antibiorésistance se décline différemment. D'un point de vue bactériologique, l'antibiorésistance caractérise une souche bactérienne dont la croissance n'est pas inhibée au contact d'une concentration d'antibiotique empêchant la multiplication d'une souche sauvage de la même espèce. En clinique, une souche est qualifiée de résistante si le traitement mis en place s'avère inefficace pour traiter l'infection dont elle est la cause. D'un point de vue épidémiologique, une souche est considérée résistante si sa CMI ou son diamètre d'inhibition ne se situe pas dans la distribution des CMI ou des diamètres de la population sauvage de son espèce.

Trois niveaux d'étude peuvent être considérés pour aborder la résistance aux antibiotiques : la bactérie, le support ADN ou le gène. Se déclinent ensuite différents types de résistance par niveau, comme l'illustre le Tableau 3.

Tableau 3 : Types de résistance en fonction du niveau d'étude considéré

Niveau	Type	Définition
Bactérie	Clinique	Expression de la résistance *in vivo* par l'échec thérapeutique
	Intrinsèque (ou naturelle)	Existence d'un ou de plusieurs mécanismes de résistance innés, propres à un taxon donné, définissant le spectre clinique de l'antibiotique
	Acquise	Acquisition d'un mécanisme de résistance pour une souche d'une espèce habituellement sensible
	Croisée	Fait référence au spectre d'inactivation lié à un même mécanisme de résistance vis-à-vis de plusieurs antibiotiques de la même famille, classe ou sous-groupe
Support d'ADN	Résistance transposable	Résistance liée à un déterminant génétique localisé sur un transposon lui-même intégré au chromosome bactérien ou à un plasmide
	Extrachromosomique (dont plasmidique)	Résistance à déterminisme génétique extra-chromosomique, le plus souvent en position cytoplasmique tel un ADN plasmidique
	Chromosomique	Résistance à déterminisme génétique chromosomique
	Associée	Résistance médiée par un fragment d'ADN porteur de plusieurs gènes de résistance à des antibiotiques de familles différentes (*resistance transfert factor*)
Gène	Génétique	Modification du patrimoine génétique entrainant des augmentations de CMI

La résistance intrinsèque ou naturelle, propre et commune à un taxon bactérien donné, se différencie des résistances acquises nouvelles. Par exemple, les macrolides comme l'érythromycine ne sont naturellement pas actifs sur les bacilles Gram négatif, les quinolones ne sont pas actives sur les bactéries Gram positif, les souches de *Klebsiella pneumoniae* présentent une résistance croisée naturelle aux aminopénicillines (ampicilline, amoxicilline) et aux carboxypénicillines (ticarcilline) ; il s'agit de résistances intrinsèques, innées, dont les déterminants sont inclus dans le patrimoine

génétique de la population sauvage bactérienne. *A contrario*, par l'acquisition d'un transposon conjugatif (type Tn1545), les souches de *Streptococcus pneumoniae* acquièrent la résistance croisée à l'érythromycine (gène erm(B)) et à la tétracycline (gène tet(M)), tandis que les souches sauvages sont sensibles à ces antibiotiques ; il s'agit ici de résistances acquises [15,16]. Dans la suite de ce manuscrit, c'est la résistance acquise des bactéries qui intéressera notre propos.

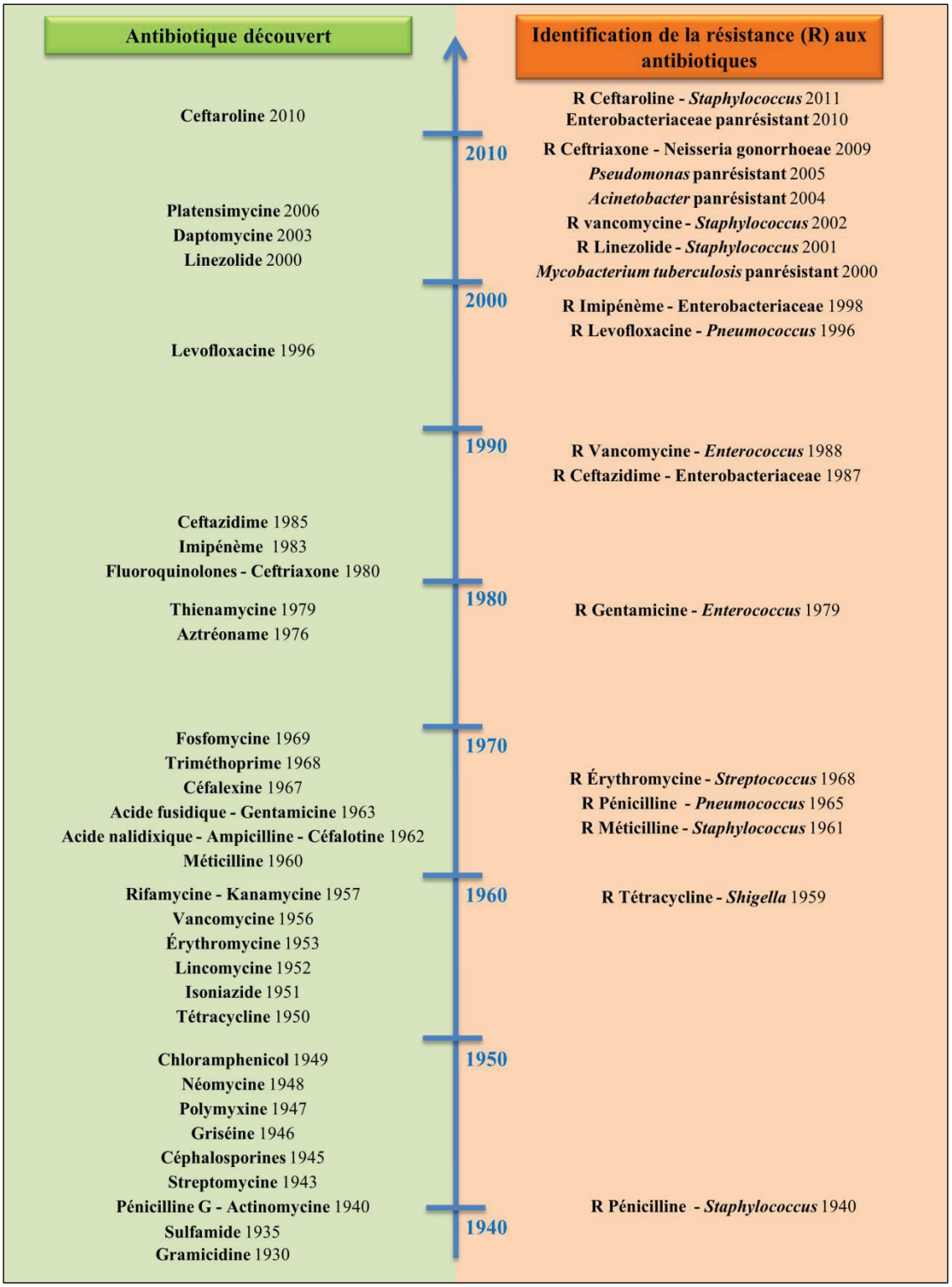
2.2 Historique et prise de conscience publique

La résistance est une réponse physiologique des bactéries qui s'est développée sous l'effet et la pression de sélection générée par l'utilisation des antibiotiques. Mais cette réponse est induite par des gènes de résistance qui existaient bien avant la découverte et l'utilisation des antibiotiques. En comparant un ensemble de gènes vieux de 30 000 ans codant des résistances aux bêtalactamines, aux tétracyclines et aux glycopeptides, avec des gènes plus récents, D'Costa *et al.* ont mis en évidence la similarité, la complexité et l'ancienneté des origines des mécanismes de résistance [17].

À la fin des années 1960, les succès sans précédent des premières antibiothérapies ont amené le chirurgien général américain William H. Stewart à faire cette déclaration célèbre : « *Il est temps de tourner la page sur les maladies infectieuses et de déclarer gagnée la guerre contre ces fléaux* »[3] [18]. L'euphorie n'a pas duré longtemps et ces « *molécules miracles* » ont commencé à perdre de leur efficacité en raison de l'émergence régulière de pathogènes résistants aux antibiotiques simultanément à leur utilisation généralisée [19]. Après le succès de la pénicilline pour le traitement des infections bactériennes des soldats au cours de la seconde guerre mondiale, l'émergence de souches résistantes a été détectée dès les années 1940. En 1960, l'antibiorésistance prend la forme d'un problème pandémique, les souches résistantes sont identifiées régulièrement sur tous les continents et la problématique s'accentue [2]. L'amplification du phénomène de résistance est réelle, mais la prise de conscience publique n'est pas concomitante car la découverte incessante de nouveaux antibiotiques discrédite la menace potentielle représentée par les résistances acquises [20]. Cependant, à la fin du XX^{ème} siècle, les découvertes d'antibiotiques s'essoufflent (Figure 2) aboutissant à une prise de conscience publique que les antibiotiques constituent une arme précieuse mais pas éternelle dans la lutte à mener contre les maladies infectieuses bactériennes. Notons qu'au cours des deux dernières décennies, une seule classe d'antibiotiques vraiment nouvelle avec un mode d'action novateur a été développée : les oxazolidinones [21].

[3] Version originale : "*it is time to close the book on infectious diseases and declare the war against pestilence won*"

Figure 2 : Découverte des antibiotiques et histoire concomitante de l'identification des résistances [15-18]



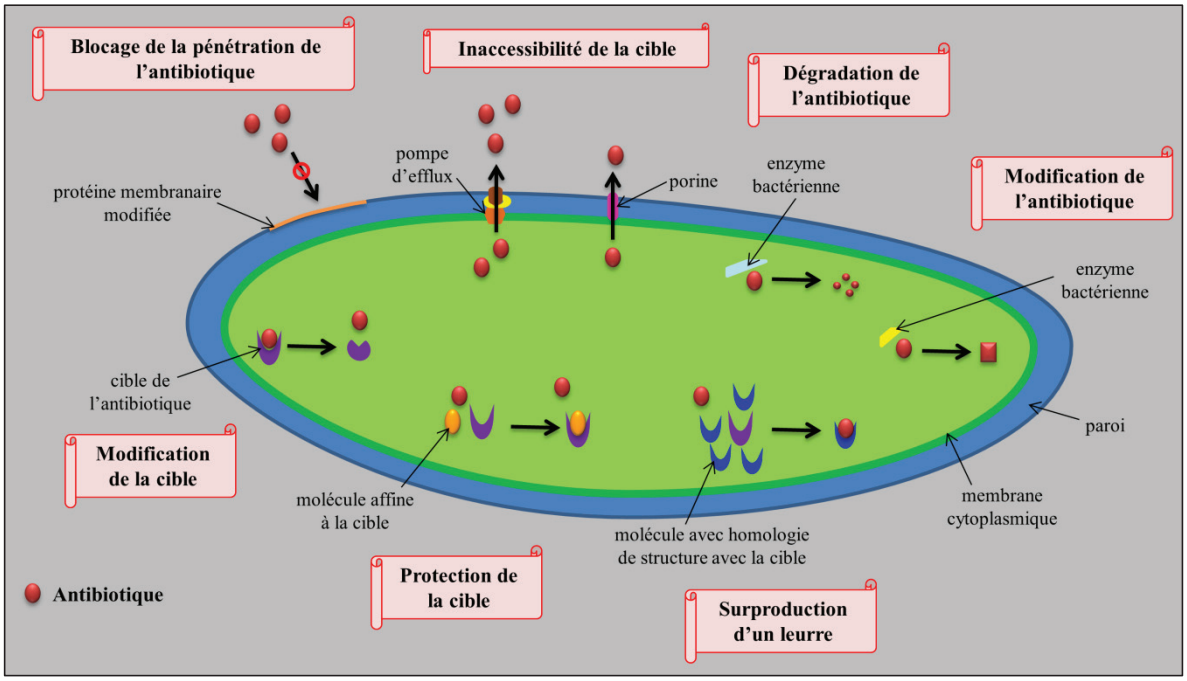
2.3 Mécanismes de résistance bactérienne

L'évolution des souches bactériennes vers la résistance est un phénomène naturel qui résulte de la pression de sélection sur la population bactérienne. Les mécanismes de résistance des bactéries aux antibiotiques ont une forte capacité d'évolution : les stratégies d'adaptation

bactériennes sont efficaces, aussi bien à court qu'à long terme [22]. De multiples mécanismes de résistance aux antibiotiques ont été identifiés chez les bactéries [8,10,12], ils peuvent être regroupés en sept grands types (Figure 3) [8] :

- altération de l'entrée de l'antibiotique à l'intérieur de la bactérie par réduction de la perméabilité de la paroi cellulaire (résistance aux carbapénèmes chez *Serratia marcescens*) ;
- élimination active de l'antibiotique par des pompes d'efflux (résistance aux fluoroquinolones et au triméthoprime chez *Pseudomonas aeruginosa*) ou élimination de l'antibiotique par des porines (perte de sensibilité aux bétalactamines) ;
- modification de la cible de l'antibiotique qui n'est plus reconnue par l'antibiotique (résistance aux fluoroquinolones chez les souches *Escherichia coli* par modification des sous-unités GyrA et ParC de l'ADN gyrase) ;
- protection de la cible de l'antibiotique, qui n'est plus accessible (protéine de protection de l'ADN gyrase conférant la résistance aux fluoroquinolones chez *Salmonella enterica* et protection du ribosome conférant la résistance à la tétracycline chez *Clostridium perfringens*);
- surproduction d'un leurre qui est affin pour l'antibiotique et va le lier, l'empêchant d'interagir avec sa cible (résistance à la daptomycine chez *Staphylococcus aureus* par libération de phospholipides membranaires) ;
- modification de l'antibiotique qui ne pourra plus se lier à sa cible (résistance au chloramphénicol ou à la fosfomycine chez *P. aeruginosa*) ;
- dégradation de l'antibiotique qui est inactivé (production de bétalactamases par les *Enterobacteriaceae* leur permettant de résister aux pénicillines).

Figure 3 : Mécanismes de résistance des bactéries aux antibiotiques



Crédit : C. Bourély

La résistance acquise peut résulter soit de mutation(s) chromosomique(s), soit de l'acquisition de déterminant(s) génétique(s) au sein des éléments génétiques transférables (plasmides, transposons, intégrons) [23]. La connaissance microbiologique des mécanismes d'antibiorésistance progresse constamment : de nouveaux gènes de résistance et de nouveaux vecteurs de transmission sont régulièrement décrits [8]. Ces différents éléments soulignent l'importance, dans le cadre des pratiques thérapeutiques, d'identifier les résistances acquises d'une souche bactérienne donnée, par exemple au travers de l'antibiogramme.

B- La caractérisation de la résistance d'une souche bactérienne

Historiquement, médecins et vétérinaires choisissaient un antibiotique de manière empirique. Mais le développement des résistances a conduit à revoir ces pratiques. L'identification du profil de résistance d'une souche bactérienne est alors devenue un outil d'aide à la décision thérapeutique assurant l'utilisation prudente des antibiotiques [24].

1. L'antibiogramme : définition

Une fois une bactérie isolée à partir d'un prélèvement biologique et identifiée par galerie API ou par spectromètre de masse (type Maldi-TOF *Matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight*) [25], le profil de résistance aux antibiotiques de cette bactérie peut être évalué afin d'orienter les choix thérapeutiques. Il existe différentes méthodes pour déterminer la sensibilité *in vitro* d'une bactérie vis-à-vis d'un antibiotique, ces tests biologiques de laboratoire sont appelés des antibiogrammes.

2. L'antibiogramme : techniques

Les techniques de détection de résistance phénotypique d'une bactérie sont diverses, les deux principales sont la détermination de la CMI et l'antibiogramme par diffusion en milieu gélosé.

2.1 Méthodes de détermination des concentrations minimales inhibitrices

Les méthodes de dilution en bouillon et en gélose ont pour principe de déterminer directement la CMI de l'antibiotique sur la bactérie testée. Comme la CMI ne correspond pas forcément à une valeur absolue, elle est approchée par la plus basse concentration qui empêche la croissance de la bactérie.

L'une des premières méthodes de test de sensibilité aux antimicrobiens était la méthode de dilution en bouillon [26] : une suspension bactérienne (à une concentration prédéterminée) est testée dans un milieu de croissance liquide vis-à-vis de concentrations variables d'antibiotiques (il s'agit habituellement de dilutions doublantes, par exemple 1, 2, 4, 8 et 16 µg / mL). Après incubation pendant une nuit à 35 °C, la turbidité des suspensions bactériennes est examinée pour évaluer la croissance bactérienne visible [27]. La plus faible concentration d'antibiotique empêchant la croissance représente la CMI. Cette technique peut être effectuée dans des tubes contenant un volume minimum de 2mL, on parle de macrodilution, ou bien dans de petits volumes à l'aide de plaques de microtitration, on parle de microdilution. La miniaturisation et la mécanisation du test par l'utilisation des plaques de 96 puits permettant d'analyser environ 12 antibiotiques dans une gamme de 8 dilutions ont rendu les tests de dilution de bouillon pratiques et populaires [27–29]. Des centaines de plaques identiques peuvent être préparées à partir d'un seul jeu de dilutions dans une période relativement brève. Actuellement, de nombreuses plaques de microtitration contenant des antibiotiques prédilués dans les puits sont commercialisées [30].

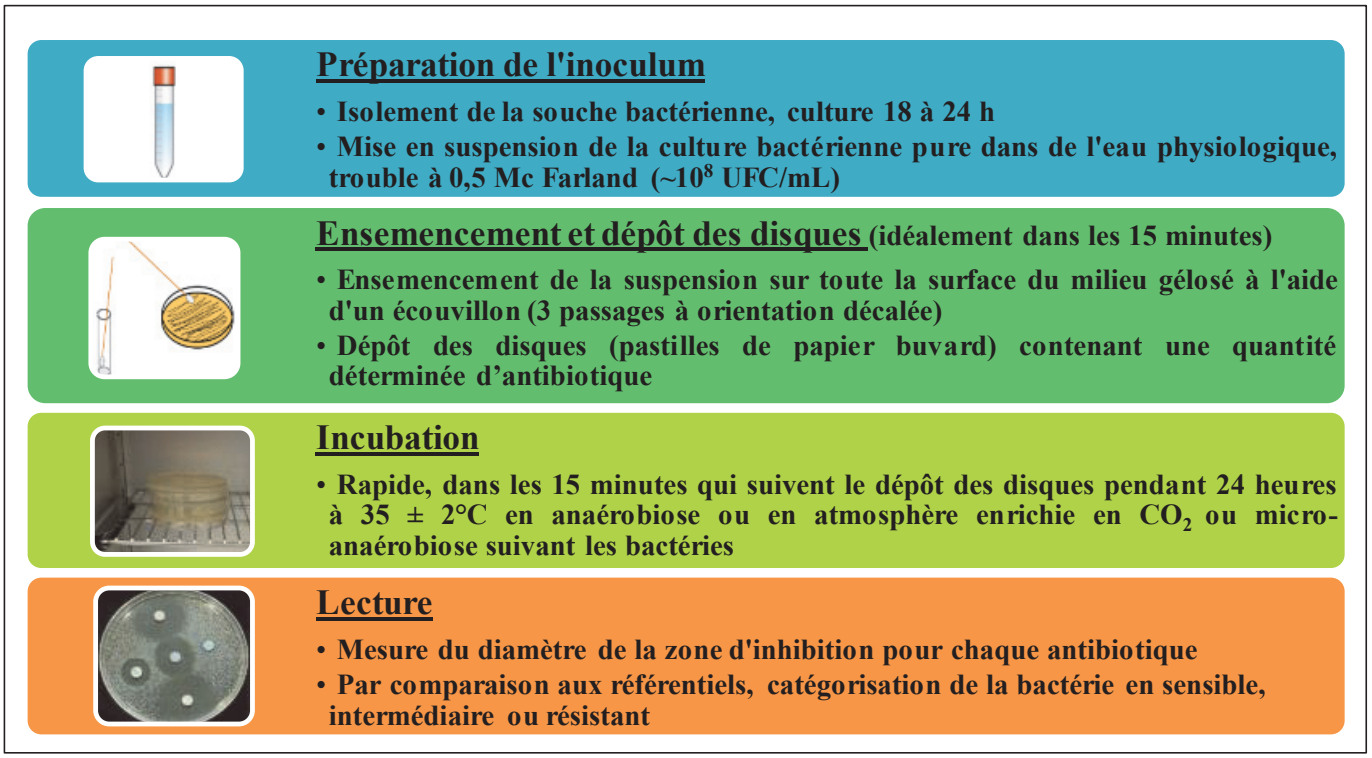
La dilution en milieu gélosé consiste en l'incorporation d'un antibiotique dans un milieu gélosé à des concentrations variables (dilutions en série de 2 en 2), suivie de l'ensemencement d'un inoculum bactérien à la surface de la gélose [31]. Cette dilution en gélose peut être recommandée comme méthode normalisée d'antibiogramme pour des organismes à croissance lente comme *Campylobacter* [32].

2.2 L'antibiogramme par diffusion en milieu gélosé

La réalisation d'un antibiogramme par diffusion en milieu gélosé suit un protocole de réalisation en quatre étapes décrites dans la Figure 4. Des disques pré-imprégnés des antibiotiques à tester sont déposés à la surface d'un milieu gélosé préalablement ensemencé avec un inoculum standardisé d'une culture bactérienne pure et préalablement identifiée.

Il existe différents milieux d'ensemencement. Pour les bacilles Gram négatif, *Staphylococcus* et *Enterococcus,* une gélose simple de Müeller-Hinton est utilisée. Pour les *Streptococcus*, *Haemophylus*, *Moraxella*, *Pasteurella*, *Listeria* et *Corynebacterium* la gélose de Müeller-Hinton additionnée de 5 % de sang de mouton est recommandée [33]. Les disques d'antibiotique sont déposés à la surface de la gélose et l'antibiotique diffuse de la pastille verticalement et horizontalement, de façon supposée homogène autour du disque, ce qui forme un gradient de concentration décroissante vers l'extérieur.

Figure 4 : Étapes de réalisation d'un antibiogramme par diffusion en milieu gélosé



Après incubation, des zones d'inhibition circulaires se forment autour des disques à la surface de la gélose : elles correspondent à une absence de culture, donc de croissance de la bactérie. Quand la concentration de l'antibiotique diffusant dans le milieu de culture devient si diluée qu'il ne peut plus inhiber la croissance de la bactérie testée, alors la zone d'inhibition de croissance est démarquée. Ainsi, la croissance de la bactérie se fait autour du disque en s'arrêtant à l'endroit où la concentration du gradient d'antibiotique dans la gélose est égale à la CMI. Le diamètre de la zone d'inhibition est donc corrélé à la CMI pour la combinaison bactérie / antibiotique.

L'antibiogramme en milieu gélosé permet en plus d'identifier des images de synergie ou d'antagonisme qui fournissent des indications précieuses pour l'identification du mécanisme moléculaire de résistance impliqué. La méthode par disque de diffusion est une méthode très fiable pour évaluer la résistance phénotypique d'une souche bactérienne. Cependant, il existe des situations spécifiques où la méthode n'est pas fiable : pour la détection de la résistance à la pénicilline G chez les streptocoques et pour la détection de la résistance à la colistine chez les *Enterobacteriacea* par exemple.

2.3 Autres méthodes d'identification des résistances

Les CMI des antibiotiques vis-à-vis des bactéries peuvent aussi être évaluées directement par la méthode d'antibiogramme par gradient ou E-test (bioMérieux AB BIODISK) [34]. Cette technique repose sur l'utilisation de bandelettes de plastique minces imprégnées avec un gradient de concentration d'antibiotique séché sur la face inférieure et marquées sur la face supérieure avec une échelle de concentration [35]. Jusqu'à 5 ou 6 bandes peuvent être placées de manière radiale à la surface d'une plaque d'agar appropriée de 150 mm qui a été inoculée avec une suspension bactérienne normalisée comme celle utilisée pour la diffusion sur disque. Après une nuit d'incubation, la CMI est déterminée par l'intersection entre la bande de test et la partie inférieure de la zone d'inhibition de la croissance bactérienne en forme d'ellipse sur la gélose [36]. Les laboratoires qui effectuent des E-tests doivent se référer aux critères d'interprétation donnés par les fabricants des bandes [37].

Les approches génotypiques pour la détection des gènes de résistance ont été développées afin d'améliorer la rapidité et la précision des antibiogrammes [38]. La prédiction de phénotypes de résistance se fait grâce à l'identification et à la caractérisation de gènes. Les techniques basées sur la génomique comparative, les sondes, l'amplification PCR (*Polymerase Chain Reaction*) ou le séquençage permettent d'améliorer la sensibilité, la spécificité et la rapidité de détection des gènes de résistance [39]. Elles sont utilisées en association avec les méthodes classiques de détection de résistance.

Au cours de la dernière décennie, plusieurs méthodes ont été proposées comme alternatives futures aux techniques classiques d'antibiogramme. Il s'agit par exemple des microcalorimètres (détection de la chaleur produite par des bactéries stressées) [40–42], de l'amplification par bactériophage (détection des phages se reproduisant dans les bactéries vivantes) [43,44], ou du FACS (*fluorescence-activated cell sorting*, mesure la différence de fluorescence entre des cellules mortes et vivantes) [30]. Dans certains cas, des essais de faisabilité ont d'ores et déjà été publiés [30], toutefois, ces nouvelles méthodes méritent encore d'être documentées et standardisées pour leur emploi en routine.

2.4 Comparaison des différentes techniques

Les méthodes de détection de sensibilité des agents pathogènes aux antibiotiques sont nombreuses. Le choix de la méthode dépend d'un panel de facteurs comme la praticité, la flexibilité, le coût, l'automatisation, la reproductibilité et l'exactitude. Le Tableau 4 dresse les avantages et inconvénients des techniques classiques d'antibiogramme. En médecine humaine,

l'antibiogramme est aujourd'hui typiquement réalisé soit par une technique manuelle classique (disque, E-test), soit à l'aide d'un automate, comme le Becton Dickinson Phoenix™, Siemens Micoscan WalkAway™ ou bioMérieux Vitek 2™, qui sont tous basés sur la méthode de microdilution [30]. En France, la technique la plus utilisée par les laboratoires d'analyses vétérinaires est l'antibiogramme par diffusion en milieu gélosé [45], pour des raisons de vitesse d'exécution, de coût et de souplesse dans le choix des antibiotiques à tester [46].

Tableau 4 : Avantages et inconvénients des principales méthodes de détection de sensibilité bactérienne [28,29,32,47]

Méthode	Avantages	Inconvénients
Diffusion par disque	Facile à mettre en œuvre, reproductible, coût faible (2-5 € par test), facilité de modification du panel de disques d'antibiotiques testés, images de synergie ou d'antagonisme qui orientent sur les mécanismes moléculaires impliqués, résultat en catégorie facilement interprétable par le clinicien	Manque de mécanisation ou d'automatisation, chronophage si mesure manuelle, contrainte liée au respect de l'espacement entre les disques d'antibiotiques, les bactéries à croissance fastidieuse ne sont pas toutes testables de manière précise, ne fonctionne pas pour certaines combinaisons bactérie-antibiotique
Dilution en bouillon	Résultats de CMI très fiables, méthode quantitative, automatisable, reproductible, pratique si automate	Méthode très laborieuse et chronophage si manuelle car nécessite du matériel et beaucoup de réactifs, coût de l'équipement et des plaques (9-18 €) si automate, peu de flexibilité sur le choix des antibiotiques
Dilution en gélose	Résultats de CMI très fiables, méthode quantitative, reproductible, possibilité de tester plusieurs bactéries sur la même gélose, semi-automatisable	Méthode très laborieuse et chronophage si manuelle, conservation limitée des géloses avec antibiotiques
E-test	Flexibilité, méthode quantitative, appropriée pour tester la résistance à un nombre limité d'antibiotiques chez des organismes à croissance particulière (milieu enrichi ou atmosphère spéciale)	Coût (1,7 à 2,6 € la bande pour un seul antibiotique), possibles anomalies pour certaines combinaisons bactérie / antibiotique

2.5 L'antibiogramme, un test *in vitro*

En sus des avantages et inconvénients propres à chaque technique, l'antibiogramme présente de manière générale un inconvénient majeur : il s'agit d'un test *in vitro*. Or une infection a plusieurs composantes dont sa localisation, les caractéristiques relatives au patient, l'inflammation des tissus cellulaires, le niveau de colonisation bactérienne, qui influent sur l'efficacité de l'antibiotique *in vivo*. Par conséquent, le résultat de l'antibiogramme ne garantit pas une efficacité *in vivo*, mais s'intègre à la réflexion clinique et doit être mis en regard du contexte épidémiologique avant toute décision thérapeutique.

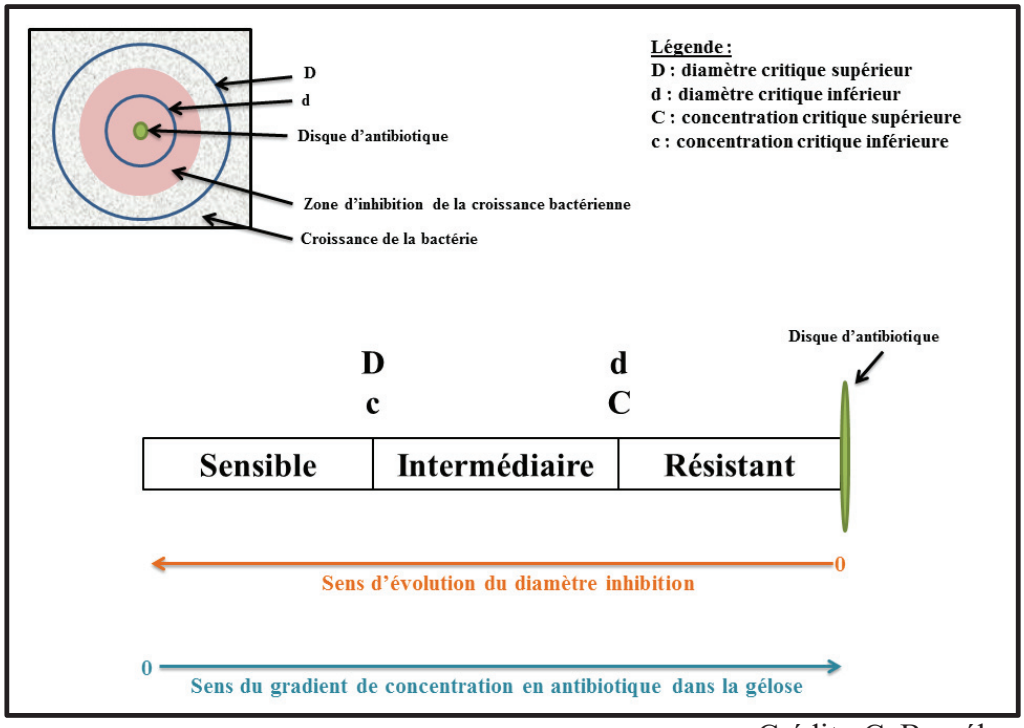
3. Interprétation des résultats d'antibiogrammes

3.1 Catégories SIR

Trois catégories cliniques ont été retenues pour l'interprétation des tests de sensibilité *in vitro*. Elles sont définies à partir des valeurs des concentrations critiques (la concentration critique inférieure « c », la concentration critique supérieure « C ») et des diamètres critiques (le diamètre critique supérieur « D » et le diamètre critique inférieur « d »). Au regard des concentrations et des diamètres critiques (Figure 5) trois catégories sont définies :

- les souches catégorisées sensibles ou « S » pour lesquelles la probabilité de succès thérapeutique est forte : la CMI de l'antibiotique testé est inférieure ou égale à la concentration critique inférieure « c », ce qui équivaut à un diamètre supérieur ou égal au diamètre critique « D » ;
- les souches catégorisées intermédiaires (rebaptisées en médecine humaine : sensibles sous conditions d'une forte exposition) ou « I » pour lesquelles les résultats obtenus *in vitro* ne sont pas prédictifs du succès thérapeutique : la CMI de l'antibiotique testé et le diamètre correspondant sont compris respectivement entre les deux concentrations critiques et entre les deux diamètres critiques ;
- les souches catégorisées résistantes ou « R » pour lesquelles il existe une forte probabilité d'échec thérapeutique quelles que soient la voie d'administration et la dose utilisée : la CMI de l'antibiotique testé est supérieure à la concentration critique supérieure « C », correspondant à un diamètre inférieur au diamètre critique inférieur « d ».

Figure 5 : Interprétation du résultat d'antibiogramme par diffusion en milieu gélosé



Crédit : C. Bourély

Les souches catégorisées « I » peuvent présenter un mécanisme de résistance dont l'expression *in vitro* n'est pas suffisante pour être catégorisée « R », et suffisamment faible pour qu'un traitement puisse, sous certaines conditions, être efficace. La catégorie intermédiaire correspond également à la zone tampon, permettant de prendre en compte les incertitudes biologiques et de mesure [33]. Sur la Figure 5, le diamètre de la zone d'inhibition de la souche bactérienne se situe entre le diamètre critique supérieur « D » et le diamètre critique inférieur « d » ; la souche serait donc catégorisée intermédiaire vis-à-vis de l'antibiotique testé.

Pour interpréter les tests de sensibilité à partir de la concentration inhibitrice ou de la mesure du diamètre d'inhibition obtenu, des référentiels sont établis et publiés par des comités d'experts reconnus. Ils présentent les valeurs critiques, valeurs seuils par rapport auxquelles les mesures obtenues doivent être comparées pour être interprétées.

3.2 Valeurs critiques et référentiels

Les valeurs critiques (Encadré 2) sont établies sur la base de plusieurs paramètres [33] : *(i)* la distribution des CMI ou des diamètres pour des populations de souches bactériennes définies, *(ii)* les paramètres de pharmacocinétique et de pharmacodynamie et notamment les évolutions des concentrations humorales et tissulaires obtenues avec des posologies recommandées dans le résumé des caractéristiques du produit, *(iii)* les essais cliniques confrontant les résultats *in vitro* et *in vivo* des antibiotiques, et *(iv)* la variabilité statistique des méthodes utilisées pour mesurer les CMI et les diamètres des zones d'inhibition.

En France, le Comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CA-SFM), comme le CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*) aux États-Unis, ou l'EUCAST (*European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*) en médecine humaine en Europe, publie un référentiel des valeurs critiques, à l'origine strictement dédié à la médecine humaine [33,48]. Depuis 2007, en regard des seuils critiques humains, le CA-SFM a été doté d'une section entière et en constante évolution dédiée à la lecture des antibiogrammes de souches vétérinaires [46]. Les règles de réalisation technique de l'antibiogramme en milieu gélosé en santé animale en France sont définies dans la norme AFNOR NF U47-107. Les seuils critiques présentés dans les recommandations vétérinaires du CA-SFM sont adaptés à cette norme [48]. Pour les molécules non présentées dans ces recommandations, il convient de se reporter aux seuils critiques dédiés à la médecine humaine et présentés dans le rapport de recommandation du CA-SFM 2013 [33].

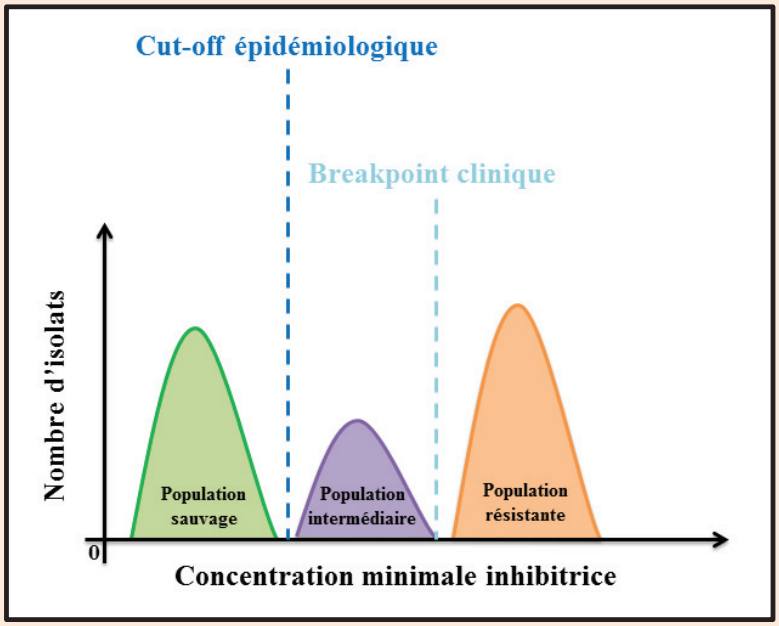
Encadré 2 – Notion de seuils : Breakpoints cliniques ou cut-off épidémiologiques ?

Breakpoints cliniques. Ces seuils indiquent au clinicien si l'organisme a des chances de répondre au traitement *in vivo*. Ils prennent en compte la pharmacocinétique et la pharmacodynamique, de telle sorte que si la CMI est inférieure au breakpoint clinique inférieur pour le pathogène identifié, alors le traitement devrait être efficace.

Cut-off épidémiologiques. Il s'agit du seuil de CMI au-dessus duquel le pathogène présente une diminution notable de sensibilité [37] qui le différencie de la population bactérienne sauvage. Ce seuil doit être basé sur l'étude d'un nombre suffisant d'isolats d'origine multicentrique pour identifier clairement la répartition des CMI de la population sauvage. Le cut-off épidémiologique se situe généralement sous le breakpoint clinique (Figure 6).

En définitive, les breakpoints cliniques ont un sens médical et visent à prédire la probabilité de succès d'un traitement antibiotique, ils ne permettent pas de détecter les résistances émergentes. Au contraire, les cut-off épidémiologiques visent à séparer la population bactérienne sauvage et la population ayant acquis un ou plusieurs mécanismes de résistance (conférant une résistance clinique ou pas) [49]. Même si ces deux paramètres sont très proches en pratique, ils ne sont pas déterminés de la même manière [37].

Figure 6 : Illustration de la distribution de CMI des sous-populations sauvages, intermédiaires et résistantes d'une espèce bactérienne



Au bilan, différentes méthodes permettent de détecter la sensibilité *in vitro* d'une bactérie vis-à-vis d'un antibiotique. Elles se différencient principalement par leurs praticités, leurs coûts de mise en œuvre et leurs possibilités d'automatisation. En médecine vétérinaire, l'antibiogramme par diffusion en milieu gélosé demeure la technique la plus utilisée par les laboratoires d'analyses. De façon générale, l'usage des tests de sensibilité est un moyen pour le prescripteur de suivre les résistances qu'il observe dans le cadre de sa pratique.

C- La surveillance de l'antibiorésistance en santé animale

Suivre l'évolution des résistances est essentiel pour la lutte contre l'antibiorésistance. La définition de la surveillance et ses objectifs sont présentés, avant d'aborder plus spécifiquement la surveillance de l'antibiorésistance et ses enjeux. Après un cadrage contextuel mondial et européen, les dispositifs de surveillance français en santé animale et en santé humaine sont présentés.

1. La surveillance épidémiologique : définition et objectifs

La surveillance épidémiologique (ou épidémiosurveillance) est considérée comme la méthode qui répond le mieux au besoin de connaissance régulière de la situation épidémiologique d'un phénomène et de projection de son évolution car elle est par définition durable. Elle se définit comme une « *méthode fondée sur des enregistrements permettant de suivre de manière régulière et prolongée l'état de santé ou les facteurs de risque d'une population définie, en particulier de déceler l'apparition de processus pathologiques et d'en étudier le développement dans le temps et dans l'espace, en vue de l'adoption de mesures appropriées de lutte* » [50]. La surveillance programmée ou active, qui résulte de l'acquisition de données planifiée selon une méthode, se distingue de la surveillance événementielle ou passive qui repose sur la déclaration spontanée des cas par les acteurs impliqués dans la surveillance.

La surveillance épidémiologique est un outil d'aide à la décision. Elle revêt quatre objectifs généraux [50] : *(i)* détecter l'apparition d'un phénomène en vue d'entreprendre une lutte précoce, *(ii)* permettre l'établissement d'une hiérarchie de l'importance des phénomènes sévissant sur une même population afin d'aider à définir des priorités d'action, *(iii)* déterminer l'importance réelle d'un phénomène et l'évolution de la situation, et *(iv)* évaluer les résultats des mesures de maîtrise et de lutte en suivant la dynamique du phénomène.

Afin de produire et transmettre de l'information utile, la surveillance épidémiologique nécessite la collaboration d'un ensemble de personnes et de structures, appelé dispositif de surveillance épidémiologique. Un dispositif de surveillance se définit comme un regroupement structuré de personnes, organismes et institutions ayant pour but d'assurer la surveillance d'un phénomène sur un territoire donné. Il se caractérise par les personnes impliquées, les modalités de fonctionnement (surveillance événementielle ou programmée) et le maillage de surveillance. Si un dispositif de surveillance est doté d'une organisation formalisée, d'une communication multidirectionnelle et est structuré autour d'un véritable maillage d'acteurs sur le terrain, il constitue alors un réseau de surveillance [51].

2. État des lieux de la surveillance de l'antibiorésistance

Depuis les années 2000, les plans et recommandations au sujet de la surveillance de l'antibiorésistance et du bon usage des antibiotiques se sont multipliés, tant en médecine humaine (Plans 2001-2005, 2007-2011, et 2011-2016 de la direction générale de la Santé (DGS)), que vétérinaire (Plans ÉcoAntibio 2012-2016 et 2017-2020), que ce soit au niveau national, à l'échelle européenne (Plan quinquennal d'action contre les résistances antimicrobiennes de 2011) ou internationale avec la création d'une task-force transatlantique entre l'Union Européenne (UE) et les États-Unis pour la coopération dans la lutte contre l'antibiorésistance. Si la surveillance de l'antibiorésistance mobilise autant les acteurs, c'est que les enjeux associés sont considérables [52].

2.1 De la nécessité de surveiller l'antibiorésistance

La surveillance de l'antibiorésistance est absolument nécessaire pour apporter de la connaissance sur le phénomène (notamment pour situer le problème dans une hiérarchie de priorité de santé publique) et orienter les mesures de maîtrise à mettre en place. Elle conduit par exemple à réduire l'emploi de certaines molécules en première intention, afin de préserver l'efficacité des antibiotiques disponibles pour la lutte contre les infections bactériennes.

Des profils de résistance similaires identifiés sur la même période (composante temporelle) ou dans des zones proches (composante spatiale) peuvent refléter les effets de variables explicatives, qui sont elles-mêmes structurées dans le temps et dans l'espace [53] ou peuvent fournir la preuve d'un mécanisme de diffusion. Bien que certaines variables explicatives puissent être enregistrées, d'autres ne sont pas mesurables ou sont encore inconnues. Dans ce contexte, la description quantitative de la dynamique temporelle et spatiale de l'antibiorésistance au travers de la surveillance contribue à la connaissance épidémiologique nécessaire pour lutter contre le phénomène [54] tout en servant d'indicateur pour les prescripteurs pour adapter au mieux l'antibiothérapie. De surcroît, la surveillance temporelle de l'antibiorésistance permet *(i)* de mettre en relation l'évolution du phénomène avec d'autres paramètres suivis (consommation d'antibiotiques par exemple), *(ii)* d'évaluer l'effet des mesures de maîtrise établies, *(iii)* et de moduler les mesures mises en place. Le suivi spatial de la dynamique de l'antibiorésistance permet quant à lui d'investiguer les zones géographiques ou les secteurs de production les plus impactés. La variabilité géographique de la prévalence de l'antibiorésistance reflète principalement les tendances nationales de l'usage des antimicrobiens [55]. En conséquence, le type et l'étendue des interventions nécessaires pour la prévention et la lutte ne sont probablement pas les mêmes pour toutes les régions. En outre, le développement et la mise en place d'outils de suivi permettent, en

plus de leur emploi dans le cadre de l'analyse de risque, d'évaluer l'efficacité locale des mesures mises en place par les filières ou les pouvoirs publics, pour lutter contre l'antibiorésistance.

2.2 Surveillance de l'antibiorésistance dans le monde et en Europe

La surveillance de l'antibiorésistance en santé animale ou humaine à l'échelle mondiale ou européenne s'appuie sur les dispositifs de surveillance mis en place par les pays au niveau national ou infranational [56]. L'OMS a commencé à définir les principes de base des réseaux de surveillance de la résistance aux antibiotiques chez les entérobactéries en 1978 [57] et les premiers dispositifs de surveillance se sont déployés dans les années 80.

2.2.1 Surveillance en santé humaine en Europe

En santé humaine, le Réseau européen de surveillance de la résistance bactérienne aux antibiotiques (EARS-Net, de l'anglais *European Antimicrobial Resistance Surveillance Network*) collecte depuis 1998 (anciennement EARSS, de l'anglais *European Antimicrobial Resistance Surveillance System*) des données sur la résistance bactérienne aux antibiotiques en Europe. Ce système de surveillance financé par l'UE regroupe les 28 États membres de l'UE ainsi que l'Islande et la Norvège qui transmettent les données de leurs laboratoires cliniques nationaux. Depuis 2010, ce réseau de surveillance est coordonné par le Centre Européen de prévention et de contrôle des maladies (ECDC). Le nombre de laboratoires nourrissant ce système de surveillance a continuellement augmenté depuis sa création, reflétant le renforcement de la surveillance de l'antibiorésistance dans les pays membres.

Les objectifs de l'EARS-Net sont :

- de collecter des données comparables, représentatives et précises sur l'antibiorésistance ;
- d'analyser temporellement et spatialement les tendances de l'antibiorésistance en Europe ;
- de produire des données d'antibiorésistance à jour pour nourrir les décisions politiques ;
- d'encourager la création, le maintien et l'amélioration des programmes de surveillance nationaux de l'antibiorésistance ;
- et de supporter les dispositifs nationaux dans leurs efforts d'amélioration de leur précision diagnostique en leur offrant annuellement une évaluation de la qualité.

À ces fins, le comité de coordination de l'EARS-Net travaille en relation étroite avec le Réseau européen de surveillance de la consommation d'antibiotiques (ESAC-Net, de l'anglais *European Surveillance of Antimicrobial Consumption Network*) et le Réseau de surveillance des infections associées aux soins (HAI-Net, de l'anglais *Healthcare-associated Infections Surveillance Network*) et en collaboration avec la Société européenne de microbiologie clinique et des maladies

infectieuses (ESCMID de l'anglais *European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*) en particulier avec l'EUCAST.

La surveillance effectuée à travers ce réseau cible les souches invasives isolées d'hémocultures ou de prélèvements de liquide céphalo-rachidien. Les bactéries surveillées sont *Streptococcus pneumoniæ* et *Staphylococcus aureus* depuis 1999, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis* et *Enterococcus faecium* depuis 2001, *Klebsiella pneumoniae* et *Pseudomonas aeruginosa* depuis 2005, *Acinetobacter spp*. depuis 2012. À l'exception de *S. pneumoniæ* qui est essentiellement responsable d'infections communautaires, les autres espèces bactériennes ciblées sont aussi et surtout responsables d'infections nosocomiales.

Les indicateurs produits par le réseau EARS-Net sont les proportions annuelles de résistance au sein de l'espèce et, pour certains antibiotiques, les proportions de souches de sensibilité diminuée. Depuis 2009, le réseau produit également un indicateur de la proportion de souches productrices de bêtalactamases à spectre élargi (BLSE) pour les entérobactéries résistantes aux céphalosporines de 3ème génération. Ce réseau constitue une source d'informations sur la résistance aux antibiotiques (niveau et évolution) à l'adresse des responsables politiques, des professionnels de santé, des scientifiques et du grand public.

2.2.2 Surveillance en santé animale

D'un point de vue règlementaire, seule la surveillance des bactéries zoonotiques est encadrée : la directive 2003/99/CE du Parlement Européen et du Conseil du 17 novembre 2003 sur la surveillance des zoonoses et des agents zoonotiques requiert des États membres la mise en place d'une surveillance de la résistance aux antibiotiques chez *Salmonella* et *Campylobacter*, principaux agents responsables de toxi-infections alimentaires collectives d'origine bactérienne, dont le réservoir est constitué par le tractus gastro-intestinal des mammifères (porcs, bovins) et des oiseaux (volailles domestiques). Elle recommande également de la développer chez d'autres agents bactériens si la résistance représente un risque pour la santé publique ou fournit des indications sur son évolution chez des espèces bactériennes dites indicatrices. Par définition, les plans de surveillance mis en place sont des programmes qui permettent d'obtenir une estimation de la contamination dans une production définie (population cible) et donc d'évaluer le niveau d'exposition du consommateur à ce danger. L'échantillonnage est représentatif de la population cible et les prélèvements sont réalisés de façon aléatoire au sein de cette population. Les espèces bactériennes ciblées par ces plans de surveillance sont des agents zoonotiques (*Salmonella* et *Campylobacter*) et des bactéries dites indicatrices (*E. coli* et les entérocoques) issues d'animaux de production (porcs, volailles, bovins).

La décision 2013/652/UE du 12 novembre 2013 concernant la surveillance et la présentation des rapports relatifs à la résistance aux antimicrobiens chez les bactéries zoonotiques et commensales compléte le dispositif de surveillance, dans l'objectif d'harmoniser les systèmes de surveillance entre États membres et de les rendre comparables dans un cadre technique équivalent. Entrée en vigueur le 1er janvier 2014, cette décision définit les couples espèces bactériennes / espèces animales à surveiller, les matrices (peau de cou pour les volailles par exemple), les stratégies d'échantillonnage (nombre de prélèvements à réaliser et nombre d'isolats à collecter), les agents antimicrobiens à inclure dans la surveillance, les plages de concentrations à utiliser pour les tests de sensibilité aux antibiotiques et les dispositions concernant le report des données. Ce texte impose également un calendrier conduisant à surveiller la filière avicole (poules pondeuses, poulets de chair, dindes d'engraissement, viandes fraîches de poulet et de dinde pour les prélèvements à la distribution) et la filière « animaux de boucherie » (porcs d'engraissement et bovins de moins d'un an à l'abattoir, viandes fraîches de porc et de bœuf pour les prélèvements à la distribution), alternativement tous les deux ans.

Les résultats de cette surveillance chez les animaux de production sont transmis par les États membres à l'Autorité européenne de sécurité des aliments (EFSA), puis analysés temporellement et spatialement à l'échelle nationale et présentés sous forme de rapport annuel [56]. Depuis 2010, l'EFSA réalise une analyse conjointe avec l'ECDC et édite un rapport comportant des données humaines concernant les bactéries zoonotiques [58]. Depuis 2015, un rapport conjoint entre ces deux agences et l'Agence européenne du médicament analyse et compare les données des consommations d'antibiotiques et de résistance chez l'Homme et chez les animaux (productions animales seulement) [55].

2.3 La surveillance de l'antibiorésistance en France

2.3.1 Surveillance en santé humaine en France

En France, les données sur les résistances des bactéries pathogènes humaines sont transmises chaque année à l'ECDC par Santé Publique France (SPF), en collaboration avec le Centre national de référence des pneumocoques (CNRP) et l'Observatoire National de la Résistance aux Antibiotiques (ONERBA). La contribution du CNRP porte sur le recueil des données sur *S. pneumoniae* à travers le Réseau des observatoires régionaux du pneumocoque qui regroupe près de 400 laboratoires. La contribution de l'ONERBA repose sur trois des réseaux de laboratoires fédérés au sein de cet observatoire (Azay-résistance aux antibiotiques, le réseau du Groupe des Microbiologistes d'Ile-de-France, REUSSIR-France) pour le recueil des données concernant *S. aureus, Enterococcus, E. coli, K. pneumoniae*, *P.aeruginosa et Acinetobacter.* Le réseau Azay-

résistance, regroupe une vingtaine de laboratoires de centres hospitaliers universitaires (CHU) ; le réseau Ile-de-France regroupe huit laboratoires de centres hospitaliers généraux (CHG) situés en Ile-de-France et le réseau Réussir regroupe une trentaine de laboratoires de CHU, CHG et établissements privés participant au service public hospitalier (PSPH).

L'ONERBA, créé en 1997 à l'initiative du CA-SFM, est une association dont les activités scientifiques et techniques reposent sur les réseaux de surveillance de la résistance fédérés en son sein. Ce système de surveillance rassemblait à sa création un réseau de médecine vétérinaire (le Résapath) et 10 réseaux de médecine humaine. Parmi ces derniers, deux étaient des réseaux de laboratoires d'analyses médicales de ville (AFORCOPI-BIO créé en 1986 et Epiville créé en 1990), quatre étaient des réseaux de laboratoires hospitaliers spécialisés dans les infections nosocomiales et quatre autres étaient des réseaux de laboratoires hospitaliers (REUSSIR-France créé en 1996, le Collège de Bactériologie-Virologie-Hygiène créé en 1989, le Réseau des hôpitaux des armées créé en 1985, et le réseau du Groupe des Microbiologistes d'Ile-de-France créé en 1986). Au cours des années, ce système s'est consolidé et en 2019 l'ONERBA regroupe, en plus des réseaux présents à sa création, un réseau de laboratoires de ville (Medqual créé en 2004), deux centres nationaux de référence (pour le pneumocoques et les mycobactéries), le Réseau des hygiénistes du Centre, le Réseau Collégial de Bactériologie-Virologie-Hygiène de Paris, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris et quatre réseaux de laboratoires hospitaliers (AZAY- Mycobactérie, AZAY- résistance aux antibiotiques, réseau des bactériologistes du Nord-Pas de Calais et le réseau des observatoires régionaux du pneumocoque).

Les objectifs de l'ONERBA se déclinent ainsi [59]:

- rassembler les informations disponibles sur l'évolution des résistances bactériennes aux antibiotiques en France chez l'Homme et chez l'animal, les analyser et les comparer à celles obtenues dans d'autres pays ;
- conseiller et agir pour améliorer la qualité des informations et les conditions de leur recueil ;
- mettre en place des études destinées à recueillir des informations non disponibles ou des études inter-réseaux [60] ;
- fournir aux autorités sanitaires, aux sociétés savantes et aux professionnels de santé les informations concernant l'évolution des résistances.

En définitive, l'ONERBA produit des données sur les résistances des bactéries d'origine humaine acquises en ville et en milieu hospitalier et d'origine animale. Il diffuse l'information par son site web (www.onerba.org) et *via* la parution d'un rapport publié par l'Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé (ANSM) et SPF. Mais chacun des réseaux de l'ONERBA a une identité, un fonctionnement et des objectifs qui lui sont propres. S'ils représentent

pour l'ONERBA tant une source de diversité que de richesse, ces disparités impliquent nécessairement une remise en cause de la portée des résultats produits et des comparaisons possibles (méthodologies, techniques d'identification des résistances et seuils critiques pouvant être différents). Aussi l'ONERBA a-t-il élaboré en 2001 des recommandations méthodologiques pour l'analyse des données et a organisé depuis des séances de formation pour l'appropriation de ces méthodes.

S'il existe en santé humaine une très grande diversité de réseaux collectant des données sur la résistance bactérienne aux antibiotiques partitionnés suivant leur localisation géographique, leur lieu de surveillance (ville *versus* hôpital) et leur pathogène ou infection d'intérêt, les dispositifs mis en place en santé animale sont en nombre beaucoup plus restreint.

2.3.2 Surveillance en santé animale en France

En France, la surveillance des résistances bactériennes en santé animale est assurée par trois dispositifs : les plans de surveillance programmée, le réseau *Salmonella* et le réseau d'épidémiosurveillance de l'antibiorésistance des bactéries pathogènes animales (Résapath) [61].

Pilotés par l'Europe dans le cadre de la surveillance à l'échelle européenne, les plans de surveillance de la résistance aux antibiotiques des bactéries sentinelles et zoonotiques chez les animaux de production sont mis en place annuellement par la Direction générale de l'Alimentation (DGAl) en collaboration avec le laboratoire national de référence (LNR) antibiorésistance à l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (Anses). La résistance aux antibiotiques est surveillée dans les denrées animales et d'origine animale, ciblant les entérocoques, *E. coli*, *Salmonella spp.* et *Campylobacter spp.* suivant les exigences de la règlementation européenne. Ces plans de surveillance sont mis en œuvre aux stades de l'abattoir, de l'atelier de découpe, de la distribution ou de l'élevage, pour les volailles, les porcs et les bovins [62]. D'après les recommandations, le plan de surveillance doit permettre d'obtenir chaque année un minimum de 170 isolats pour chaque combinaison espèce bactérienne / espèce animale (compte tenu de la prévalence de l'espèce bactérienne considérée pour les *Salmonella* et les *E. coli* indicatrices) et un échantillonnage d'au moins 300 prélèvements de caeca et 300 prélèvements de viandes fraîches dans chacune des populations animales cibles pour la surveillance spécifique des bactéries *E. coli* BLSE, AmpC, ou productrice de carbapénémase.

Depuis 1997, le réseau *Salmonella*, animé par le laboratoire de sécurité des aliments de l'Anses à Maisons-Alfort, recueille des souches de salmonelles isolées de l'alimentation, de l'environnement ou de produit animaux [61]. Ce réseau de surveillance événementielle ciblée vise à

collecter et à caractériser au niveau national les sérotypes de *Salmonella* d'origine non humaine isolés sur l'ensemble de la chaîne alimentaire afin de dégager les dynamiques d'évolution des principaux sérovars et de leur antibiorésistance.

Le Résapath est un réseau de surveillance passive ou évènementielle, créé en 1982 sous le nom de Résabo pour suivre la résistance des bactéries pathogènes chez les bovins et la quantifier. Il a depuis étendu la surveillance à toutes les espèces animales, y compris les animaux de compagnie et de loisir. Ce système, unique en Europe, collecte tous les résultats d'antibiogrammes réalisés par les laboratoires adhérents suite à la demande des vétérinaires praticiens dans le cadre de leur activité de soins [63]. Ce réseau est piloté au sein de l'Anses par deux sites, le laboratoire de Lyon et le laboratoire de Ploufragan-Plouzané-Niort.

Au bilan, la surveillance de l'antibiorésistance en santé animale et humaine à l'échelle mondiale ou européenne s'appuie sur les dispositifs de surveillance mis en place par les pays, dans le cadre de procédures réglementaires ou suite à des initiatives professionnelles. Ainsi en France, en santé animale, des dispositifs de surveillance des résistances chez les bactéries commensales, indicatrices, zoonotiques ou pathogènes existent et se complètent. De façon générale, la surveillance de l'antibiorésistance apparaît comme un outil indispensable pour comprendre la dynamique d'évolution des résistances, détecter des émergences et orienter de fait les mesures de maîtrise permettant de limiter le phénomène.

D- La lutte contre l'antibiorésistance

Depuis plus de deux décennies, l'OMS reconnaît la résistance aux antibiotiques comme une menace mondiale croissante pour la santé, incitant la communauté internationale à prendre des mesures pour réduire l'émergence et la propagation des résistances [2]. Ces dernières années, si l'antibiorésistance s'est hissée au rang des priorités parmi les menaces sanitaires au niveau mondial, elle demeure cependant un danger encore sous-évalué par le grand public, voire les professionnels eux-mêmes.

1. Une lutte globale et intégrée, l'aube du concept *One Health*

Le partage des communautés bactériennes et la possibilité de passage de résistances de bactéries animales à des bactéries portées par l'Homme expliquent les fondements des politiques publiques depuis les années 1990. La priorité est de préserver l'arsenal thérapeutique humain ; ce fut notamment le cas avec l'interdiction de l'usage de l'avoparcine en médecine vétérinaire en Europe en 1997 [64]. Jusque dans les années 2000, des réunions scientifiques nationales,

communautaires et internationales ont été organisées pour trancher sur le risque que représentait l'usage des antibiotiques en santé animale. À titre d'illustration, l'OMS anima une réunion à Berlin sur l'impact médical de l'utilisation des antibiotiques chez les animaux en 1997 [65], et une autre à Genève sur l'impact potentiel sur la santé humaine de l'utilisation des fluoroquinolones en production animale en 1998 [66]. Cette même année, l'UE organisa une conférence sur la menace microbienne. De ces échanges est ressorti la nécessité d'une approche globale et commune aux médecines humaine et vétérinaire pour lutter contre le phénomène, soulignant l'importance de la surveillance de l'utilisation des antibiotiques et des résistances des bactéries [67].

Cette vision transversale et intégrée de lutte pour la santé, comprenant la lutte contre l'antibiorésistance, a été adoptée en 2007 par l'alliance tripartite OIE-FAO-OMS sous le concept *One Health* ou « une seule santé ». Ce concept, qui s'inscrit dans une visée d'amélioration de la santé, soutient une approche intégrée qui met l'accent sur les interactions entre les animaux, les humains et leurs divers environnements, encourageant les collaborations, les synergies et l'enrichissement croisé de tous les secteurs et acteurs dont les activités peuvent avoir un impact sur la santé [68–70].

2. Stratégies de lutte

Dans la lutte contre l'antibiorésistance en santé animale et en santé humaine, quatre grandes stratégies sont prônées [71–73] :

- la prévention : l'usage raisonné des antibiotiques (aux bonnes dose, voie et durée d'administration pour la bactérie réellement à l'origine de l'infection et au moment approprié [52]), voire leur limitation pour diminuer la pression de sélection sur les bactéries [74], le développement et l'usage de la vaccination et la maîtrise de la transmission des bactéries ;
- la surveillance : des résistances des bactéries (pathogènes, zoonotiques ou commensales) et de la consommation d'antibiotiques;
- la recherche : en matière d'antibiorésistance (dynamique et mécanisme) et de la mise au point de nouvelles solutions thérapeutiques (antibiotiques ou alternatives) ;
- et la sensibilisation de tous les acteurs concernés (professionnels comme grand public).

Les réflexions conduites aux niveaux international, communautaire ou national sur les actions à entreprendre relatives aux problèmes de résistance reconnaissent l'antibiorésistance comme un problème majeur, complexe et de dimension internationale et s'accordent sur la nécessité de mettre en place des systèmes de suivi de l'antibiorésistance, en santé humaine et en santé animale, pour ce dernier secteur à la fois sur des bactéries isolées d'animaux sains destinés à la consommation

humaine, et sur des bactéries pathogènes animales. Les résultats de ce suivi peuvent être utilisés pour évaluer l'exposition des consommateurs à des bactéries résistantes et apprécier l'impact des pratiques d'utilisation des antibiotiques en élevage sur la résistance des bactéries de portage chez les animaux.

3. Programmes de lutte contre l'antibiorésistance en France

La prise de conscience des dangers liés à la sélection de bactéries résistantes aux antibiotiques a conduit les autorités nationales à développer des stratégies de lutte et des programmes de surveillance. En France, la lutte contre l'antibiorésistance en santé animale fut pendant longtemps dissociée de la lutte en santé humaine.

3.1 Lutte en santé humaine

Dès le début des années 2000, la problématique de l'utilisation massive des antibiotiques a été prise en compte et mise en évidence au niveau européen avec notamment l'adoption en novembre 2001 de la Recommandation 2002/77/CE du Conseil relative à l'utilisation prudente des agents antimicrobiens en médecine humaine. Dans ce contexte, la France fut invitée à mettre en place une stratégie de lutte, des dispositifs pérennes de surveillance, une prescription obligatoire pour l'usage de tous les antibiotiques et des bonnes pratiques en matière d'hygiène hospitalière et de vaccination. La direction générale en charge de la Santé a mis en place différents plans de lutte pluriannuels successifs depuis 2001 (plan national pour préserver l'efficacité des antibiotiques de 2001 à 2005, puis le second volet de 2007 à 2010, plan national d'alerte sur les antibiotiques de 2011 à 2016) afin de favoriser l'usage raisonné des antibiotiques et de renforcer l'hygiène dans les structures de soins à l'aide des précautions standards d'hygiène adoptées en routine pour tous les patients et des précautions complémentaires d'hygiène qui comprennent les soins personnalisés ou regroupés. Ces démarches ont été renforcées depuis la mise en œuvre en 2010 de la loi n° 2009-879 du 21 juillet 2009 portant réforme de l'hôpital et relative aux patients, à la santé et aux territoires, avec notamment la mise en place au sein de chaque établissement de santé d'une équipe opérationnelle d'hygiène et du coordonnateur de la gestion des risques associés aux soins. Des précautions spécifiques sont également suivies dans les hôpitaux pour les bactéries émergentes hautement résistantes aux antibiotiques que sont les *Enterococcus faceium* résistants aux glycopeptides (ERG) et les entérobactéries productrices de carbapénémases (EPC). En milieux communautaires et hospitaliers, les *Staphylococcus aureus* résistants à la méticilline (SARM) et les BLSE sont aussi surveillés.

Les campagnes de communication associées à ces plans d'action ont eu pour objectifs de casser l'image traditionnelle de toute puissance des antibiotiques (« *Les antibiotiques c'est pas automatique* ») et de rappeler que ces molécules sont un bien commun fragile, menacé et à préserver (« *Ils sont précieux, utilisons les mieux* »). En parallèle, la caisse nationale d'assurance maladie des travailleurs salariés a mis en place des campagnes d'information média, des supports d'édition pédagogiques, une exposition itinérante sur les microbes relayée par les caisses primaires d'assurance maladie, ainsi que des actions d'accompagnement des professionnels de santé. Par ailleurs, l'Assurance Maladie a signé avec des établissements de santé des accords de bon usage sur l'utilisation des antibiotiques. En dépit des différents plans d'action, l'utilisation d'antibiotiques en santé humaine reste excessivement élevée en France par rapport à la moyenne européenne [75]. Si les premiers plans ont conduit à une baisse d'usage des antibiotiques à la fois en ville et à l'hôpital, l'ANSM rapporte une croissance de l'utilisation depuis 2010 [75]. Face à cette recrudescence, la feuille de route lancée par le Comité interministérielle pour la Santé en novembre 2016 vise une baisse de 25 % de la consommation d'antibiotiques d'ici 2020.

3.2 Lutte en santé animale

En 2011, en concertation avec les organisations professionnelles agricoles et vétérinaires, les scientifiques et les représentants des laboratoires pharmaceutiques vétérinaires, le ministère en charge de l'Agriculture a mis en place le premier plan de lutte pluriannuel en santé animale : le plan ÉcoAntibio, effectif sur la période 2012-2016. Ce plan national de réduction du risque d'antibiorésistance en médecine vétérinaire avait pour but de favoriser un usage prudent et raisonné des antibiotiques et fixait des objectifs quantitatifs (réduction de 25 % de l'usage des antibiotiques en médecine vétérinaire en 5 ans) et des objectifs qualitatifs (réduction de l'usage des antibiotiques d'importance critique (AIC)). Il s'articulait autour de 40 mesures réparties en 5 axes :

- promouvoir les bonnes pratiques et sensibiliser les acteurs ;
- développer les alternatives évitant les recours aux antibiotiques ;
- renforcer l'encadrement des pratiques commerciales et des règles de prescription ;
- améliorer le dispositif de suivi de la consommation des antibiotiques et de l'antibiorésistance ;
- promouvoir la même approche à l'échelon européen et international.

Ce plan d'action a été suivi de différents textes exécutoires ou législatifs. Ainsi la lutte contre l'antibiorésistance figure à l'article 1 de la Loi d'Avenir pour l'Agriculture, l'Alimentation et la Forêt, promulguée le 13 octobre 2014. Dans cette loi, l'article 48 vient encadrer la commercialisation des antibiotiques, mettant un terme aux remises, rabais et ristournes lors de la

cession d'antibiotiques. Mais surtout, l'article 49 fixe un objectif de réduction de 25 % de la consommation d'AIC pour la fin 2016. Cet article appelait logiquement deux textes règlementaires : un arrêté listant les antibiotiques dits critiques (fluoroquinolones et céphalosporines de dernières générations - arrêté du 18 mars 2016) et un décret fixant les mesures de restriction de prescription de ces antibiotiques (réalisation préalable d'un antibiogramme justifiant de leur utilisation - décret du 16 mars 2016). Dans l'optique de réduire l'usage des antibiotiques et de contrôler les prescriptions, l'arrêté du 19 décembre 2014 a retiré au 1er janvier 2015 les antibiotiques de la liste positive des médicaments vétérinaires sur prescription accessibles aux groupements agréés. Par la suite, l'arrêté du 22 juillet 2015 sur les bonnes pratiques d'emploi des antibiotiques en médecine vétérinaire a stipulé les mesures d'emploi des antibiotiques auxquelles les vétérinaires devaient se conformer. Dans le but de favoriser la maîtrise des pathogènes en élevage et de soutenir la prévention des infections bactériennes, l'arrêté du 14 novembre 2016 ré-autorisa les autovaccins pour ruminants. Enfin, dans l'optique de surveiller la consommation d'antibiotiques en santé animale, le décret du 19 décembre 2016, sur la transmission des données de cessions des antibiotiques, a précisé la procédure de transmission par les établissements pharmaceutiques vétérinaires et les professionnels des données de cession des antibiotiques, l'objet de la déclaration, la périodicité et les modalités de transmission. Ce décret est valable depuis le 1er avril 2017.

En parallèle, des campagnes de communication ont été menées auprès des éleveurs et du grand public, notamment « *Les antibiotiques pour nous non plus c'est pas automatique* » (en association avec le Conseil national de l'ordre des vétérinaires) et « *Éleveurs devenez vaccin'acteurs* » (avec des organisations professionnelles vétérinaires, le Groupement de défense sanitaire France et le Syndicat de l'industrie du médicament et réactif vétérinaires).

Un second plan, le plan Écoantibio2, a été lancé officiellement par le ministre de l'agriculture le 19 avril 2017. Il vise à évaluer le premier plan, à le consolider, à le valoriser et à maintenir la dynamique de lutte et la mobilisation des acteurs. *A contrario* du premier, ce plan se veut davantage incitatif que réglementaire et il s'articule autour de quatre axes :

- développer des mesures de prévention des maladies infectieuses et faciliter le recours aux traitements alternatifs ;
- communiquer et former sur les enjeux de lutte contre l'antibiorésistance, sur la prescription raisonnée des antibiotiques et sur les autres moyens de maîtrise des maladies infectieuses ;
- mettre à disposition des outils d'évaluation et de suivi du recours aux antibiotiques, ainsi que des outils pour leur prescription et administration responsable ;
- s'assurer de la bonne application des règles de bon usage au niveau national et favoriser leur adoption aux niveaux européen et international.

3.3 Vers une lutte plus globale

La lutte conjointe et coordonnée entre santé animale, santé humaine et environnement apparaît inéluctable et indispensable pour contrecarrer le phénomène car la diffusion de bactéries et/ou de gènes de résistance impacte l'ensemble des différents secteurs d'activité. Ceci justifie une approche intersectorielle et interministérielle, selon l'approche globale *One Health* prônée par l'alliance tripartite OIE-FAO-OMS et concrétisée par le plan global de l'OMS [73], le plan d'action de la FAO [76] et la Stratégie de lutte contre l'antibiorésistance de l'OIE [72]. Appliquée à la politique publique nationale, cette approche s'inscrit nécessairement en étroite coordination avec les instances internationales qui ont fait de la maîtrise de l'antibiorésistance une priorité de santé publique (UE, G7 et G20, OMS, OIE, FAO). En 2014, un point d'étape d'évaluation du plan ÉcoAntibio publié par le Conseil général de l'alimentation, de l'agriculture et des espaces ruraux fait état d'une articulation insuffisante entre les différents secteurs humain, animal et environnemental pour espérer des actions de lutte efficaces. En janvier 2015, la Ministre en charge de la Santé confia au Dr Carlet la mission de constituer un groupe de travail spécial sur l'antibiorésistance afin de faire des propositions rapidement actionnables. Les conclusions et recommandations de ce groupe multidisciplinaire furent remises en septembre 2015 et aboutirent notamment à la mise en place du premier cabinet interministériel de l'antibiorésistance piloté par un délégué ministériel en charge de coordonner les actions de lutte contre l'antibiorésistance, et de promouvoir une dynamique forte et fédératrice de l'ensemble des secteurs concernés. Cet élan collectif a été amorcé lors du premier comité interministériel pour la santé en automne 2016 dont les mesures adoptées concernent principalement :

- la mise en place d'un programme pérenne de communication intersectorielle sur l'antibiorésistance, visant à modifier de manière durable la perception des antibiotiques par tous les publics concernés ;
- l'incitation des prescripteurs à une plus juste prescription des antibiotiques, associée à la mise à disposition d'outils, y compris de moyens diagnostiques appropriés en santé humaine et animale ;
- la coordination de la recherche et le soutien à un plan national de recherche intersectoriel, incluant l'analyse et la mesure d'impact de la résistance bactérienne dans l'environnement ;
- le renforcement de l'organisation de la surveillance, de l'utilisation des données (de consommation et de résistance) et la production d'indicateurs de suivi communs aux différents secteurs concernés ;
- et la coordination renforcée des plans en cours dans une optique *One Heath*, en cohérence avec les actions internationales.

BILAN

L'antibiorésistance correspond à la capacité d'une bactérie à résister aux effets bactéricides ou bactériostatiques d'un antibiotique. Les résistances acquises par mutations chromosomiques ou acquisition d'éléments génétiques transférables compromettent l'efficacité de l'arsenal thérapeutique contre les maladies infectieuses. La caractérisation du profil de sensibilité d'une souche bactérienne vis-à-vis de différents antibiotiques à l'aide d'un antibiogramme est utile pour orienter le choix des prescripteurs et peut servir d'outil de suivi des niveaux de résistance. Face au développement rapide des résistances, la Communauté internationale a émis des recommandations pour limiter le phénomène et la surveillance de l'antibiorésistance des bactéries d'origine animale, humaine et environnementale apparaît indispensable. En sus, une approche transversale et intégrée de la lutte en santé humaine, animale et environnementale est prônée, suivant le concept *One Health* soutenu par l'alliance tripartite OIE-FAO-OMS. En France, des dispositifs de surveillance des résistances chez les bactéries commensales, indicatrices, zoonotiques ou pathogènes sont mis en place en santé animale.

Chapitre II - Des besoins identifiés à la problématique de la thèse

Les enjeux liés à l'antibiorésistance, l'importance de sa surveillance et l'état des lieux de la connaissance épidémiologique actuelle de l'antibiorésistance en santé animale, sont autant d'éléments nous permettant d'identifier les besoins en termes de recherche et d'orienter de futurs travaux.

A- L'antibiorésistance : quels enjeux ?

La surveillance de l'antibiorésistance constitue une base indispensable pour gérer et limiter le phénomène par la caractérisation de sa dynamique d'évolution, la détection des émergences, l'identification des molécules les plus à risque, la mise en évidence de facteurs de risque ou encore l'évaluation des mesures de contrôle. Si la surveillance est essentielle c'est que les enjeux liés à l'antibiorésistance sont majeurs et pluriels.

1. Un enjeu de santé publique majeur et mondial

La préservation de l'efficacité des antibiotiques est cruciale. Leur utilisation a permis de réduire la mortalité infantile et d'augmenter l'espérance de vie [8]. De plus, les antibiotiques sont indispensables pour la chirurgie invasive et en support lors de la chimiothérapie. L'antibiorésistance constitue donc avant tout et surtout un problème de santé publique majeur [77] : elle engendre une augmentation de la morbidité et des maladies chroniques en médecine humaine, puisqu'elle restreint les possibilités de lutte effective contre les maladies bactériennes [78–80]. Les entérobactéries productrices de BLSE sont en augmentation constante en milieu hospitalier depuis dix ans [81]. Les phénomènes de multirésistance sont également de plus en plus fréquents et certaines souches sont même devenues totorésistantes comme *Neisseria gonorrhoeae* responsable de la gonorrhée en Afrique [52]. Le phénomène est en plus aggravé par le développement trop faible de nouveaux antibiotiques pour faire face aux situations d'échec thérapeutique [78].

L'antibiorésistance représente une cause directe et indirecte de mortalité, responsable d'environ 25 000 décès en Europe chaque année [81]. D'autres estimations dans la littérature suggèrent qu'elle engendrerait au moins 50 000 décès annuels en Europe et en Amérique du Nord [82–84]. Au niveau national, une estimation réalisée en 2015 par l'Institut de veille sanitaire fait état de 158 000 cas d'infections à bactéries multirésistantes par an, associés à 12 500 décès annuels.

En l'absence de mesures adaptées, un rapport britannique diffusé en 2016 stipule que l'antibiorésistance pourrait devenir la première cause de décès dans le monde à l'horizon 2050 avec 10 millions de morts par an, devant les cancers (8,2 millions de décès), le diabète (1,5 million de décès), les diarrhées (1,4 million de décès), et les accidents de la route (1,2 million de décès) [82].

Subséquemment, l'antibiorésistance est un problème économique : elle augmente le coût des soins du fait de la prolongation des séjours à l'hôpital et des soins plus intensifs requis [85–87]. Le surcoût se chiffre en milliards d'euros [52] ; pour l'UE ce coût annuel est estimé à 1,5 milliard d'euros [8].

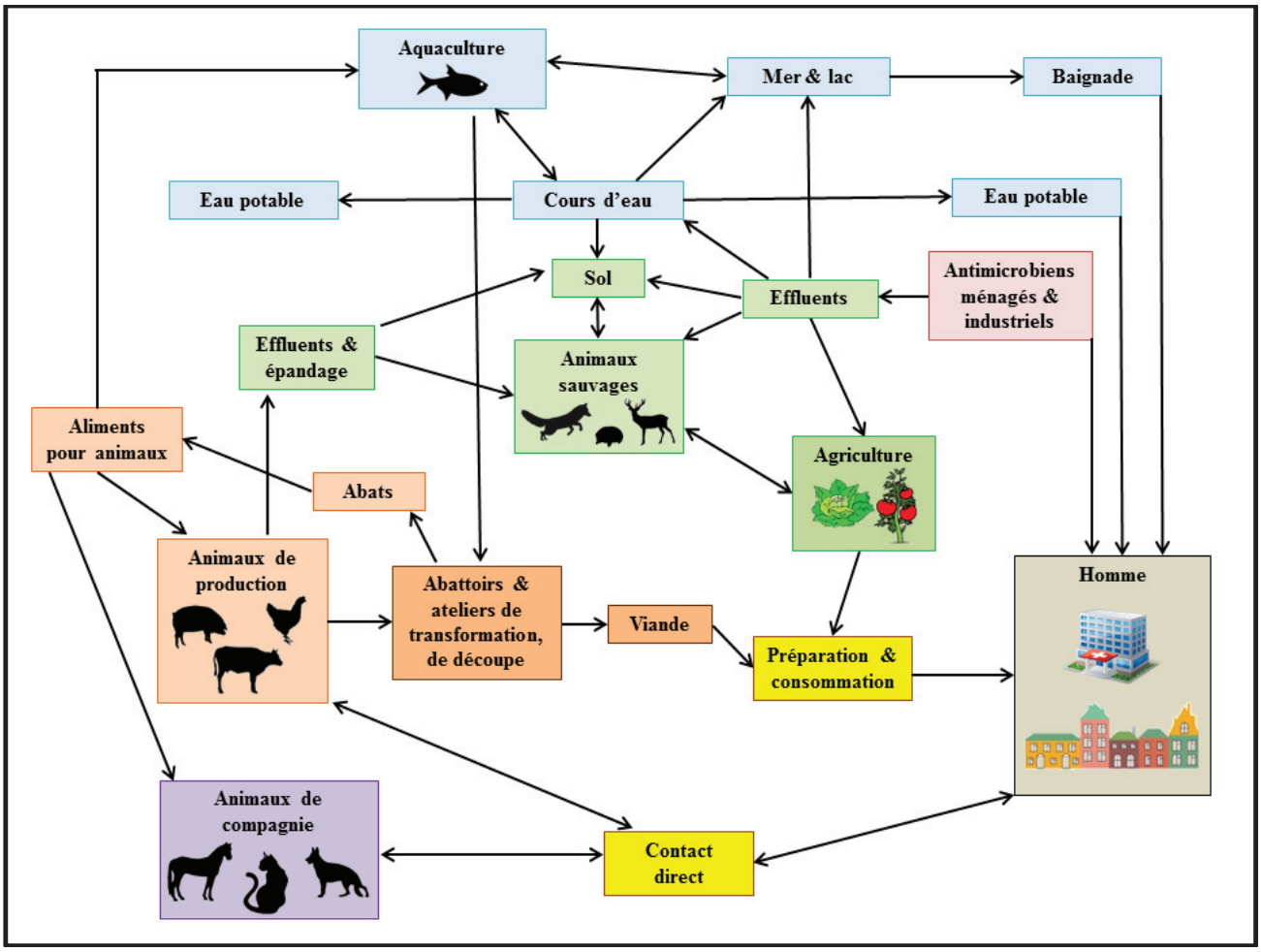
L'antibiorésistance est une problématique mondiale : l'émergence de résistance se produit sur tous les continents à travers le monde [19] et, au gré de la mondialisation et de l'intensification des échanges entre zones géographiques, les pathogènes résistants et les déterminants de résistance peuvent disséminer très rapidement à l'ensemble de la planète. En 2008, un groupe clonal de souches *E. coli* encore inconnu, de séquence type 131 (ST131), combinant résistance aux fluoroquinolones et production de BLSE dans de nombreux cas, a été identifié sur trois continents, en Europe, Asie et Amérique du Nord [88,89] . Aujourd'hui, le ST131 est la lignée prédominante des *E. coli* parmi les isolats extra-intestinaux à l'échelle mondiale [90]. De même, les métallo-enzymes de type « IMP », à l'origine de résistances à diverses bétalactamines dont les carbapénèmes, ont été détectées pour la première fois au Japon à la fin des années 1980. Depuis, plus de 20 allotypes IMP différents ont été décrits, chez les *Enterobacteriaceae* et autres bactéries Gram négatif (principalement chez *P. aeruginosa* et *Acinetobacter spp*). Différents variants de l'IMP, par exemple, IMP-1, IMP-4 et IMP-7, ont été détectés dans différentes zones géographiques du globe (Australie, Amérique, Asie, Europe, Afrique), ce qui montre leur potentiel de propagation intercontinentale [91].

2. Un enjeu global : transmission des résistances entre l'animal et l'Homme

Il n'y a pas d'étanchéité absolue entre les divers mondes bactériens, et les bactéries, qu'elles soient d'origine animale ou humaine, ne sauraient faire l'exception. La santé humaine est menacée non seulement par les bactéries pathogènes résistantes propres à l'espèce, mais également par les résistances développées par les bactéries pathogènes animales. Ces résistances peuvent se transmettre à l'Homme *via* l'alimentation, l'environnement ou le contact [92,93] (Figure 7): *(i)* par transfert interspécifique direct de bactéries zoonotiques *(ii)* mais aussi par transfert de matériel génétique entre bactéries humaines et animales [94]. En l'état actuel des connaissances, les

passerelles semblent toutefois limitées ou souvent maîtrisées *via* l'hygiène ou la cuisson des aliments par exemple.

Figure 7 : Interconnexion des communautés microbiennes et voies de transfert des résistances ou des bactéries résistantes [74,93,95,96]



Chaque flèche représente une voie par laquelle le flux de résistance peut se produire. Dans toutes les niches des concentrations variables d'antibiotiques ont été rapportées et exercent potentiellement une pression de sélection sur les bactéries pathogènes et commensales.

Dans une étude publiée en 1986, la nourseothricine (antibiotique de la famille des streptothricine) fut additionnée à l'alimentation des porcs en tant que facteur de croissance pendant deux ans dans plusieurs fermes. La résistance à la streptothricine médiée par un plasmide a été observée dans 33 % des coliformes provenant de porcs atteints de diarrhée et chez 18 % des employés et des familles des fermes porcines suivies [97]. Cette étude, comme d'autres sur l'usage de l'avoparcine en santé animale [98], confirme que les bactéries commensales humaines peuvent accumuler des gènes de résistance aux antibiotiques provenant de bactéries d'origine animale.

Concernant le transfert de résistances à des bactéries pathogènes humaines, le cas des SARM d'origine porcine appartenant au complexe clonal CC398 est instructif. Le clone CC398 a été associé à des cas d'infections staphylococciques sévères chez des éleveurs de porcs aux Pays-Bas en 2006. En raison de la prévalence quasi-nulle des infections de SARM dans les hôpitaux du

pays à cette époque, un lien de causalité a été établi : il s'agissait d'une exposition professionnelle des éleveurs à un clone prévalent dans la flore du porc sain. Si le passage de ce clone de l'animal à l'Homme a été démontré, sa portée épidémiologique semble assez réduite : à l'heure actuelle, sur un nombre très faible d'infections à SARM aux Pays-Bas, moins d'un tiers sont dues à ce clone [99,100]. De plus, ce cas souligne que les professionnels ou les personnes en contact étroit avec des animaux sont plus à risque que la population générale. À cet égard, d'autres études font état d'un risque zoonotique accru pour les vétérinaires et les familles d'éleveurs [101–104].

Si des cas ponctuels de passage animal-Homme de bactéries résistantes ont pu être documentés, le sens de la relation n'est ni unidirectionnel, ni indiscutable. La résistance aux pénicillines par production de pénicillinase a d'abord été rapportée chez des souches de staphylocoques d'origine humaine dans les années 1940. Très vite cette résistance s'est accrue jusqu'à se stabiliser autour de 70-85 % en médecine humaine. Cette proportion élevée est liée à la dissémination de plasmides porteurs du gène *blaZ* se propageant dans différentes clones de *Staphylococcus aureus* [105,106]. Plus tard, la production de pénicillinase a été identifiée chez des souches d'origine animale [107]. Dans le cas du gène *blaZ*, aucun argument ne permet de suggérer une origine animale du gène de résistance. Il s'agirait plutôt d'une propagation à l'échelon mondial de plasmides porteurs de *blaZ*, très vraisemblablement initialement présents chez des souches sélectionnées par l'usage de la pénicilline G chez l'Homme [108].

Chez la vache, un cas de mammite à un SARM d'origine humaine a été documenté en France. La prévalence très faible des mammites bovines dues à des souches de SARM avait laissé suspecter une transmission d'origine humaine, d'autant plus que le clone identifié était très prévalent en santé humaine (clone Géraldine) : l'éleveur, porteur sain, avait en effet contaminé la mamelle de la vache [109]. De même, lors d'infections chez le chien, l'identification de souches de SARM appartenant à des clones humains communautaires (clone USA 300 aux États-Unis) ou d'hôpitaux (clone Lyon en France), alors même que chez le chien les infections à staphylocoques à coagulase positive sont principalement dues à l'espèce *S. pseudintermedius,* fait supposer une origine humaine à la contamination [101,110–112]. En France, le cas d'un chien souffrant de complications dues à une infection par un clone humain USA 300 (endémique aux États-Unis mais rare en France) suite à une chirurgie orthopédique a fait l'objet d'une investigation épidémiologique. Cette dernière a révélé que durant la période entourant la chirurgie, le vétérinaire avait reçu chez lui sa sœur en convalescence après un séjour pour péritonite aiguë à l'hôpital aux États-Unis où elle habitait. L'hypothèse d'une transmission du clone USA 300 au vétérinaire par sa sœur colonisée, puis au chien lors de l'opération semble donc très probable [113]. Ce cas souligne

également que les animaux, constituant de potentiels réservoirs de résistance, peuvent jouer à la fois le rôle receveur ou de donneur de souches bactériennes résistantes [114–116].

3. Un enjeu pour les scientifiques et les décideurs

La résistance aux antibiotiques est un défi éminemment urgent pour la santé mondiale tant en médecine humaine que vétérinaire. Les experts médicaux avertissent sur un retour possible à une ère pré-antibiotique et le spectre des infections non-traitées devient une réalité [117,118]. Une base de données créée en 2009 a énuméré plus de 13 000 gènes de résistance potentiels, prédits à partir de séquences génomiques bactériennes [74,119]. Par ailleurs, les processus de résistance sont largement distribués dans le royaume microbien et ont été bien décrits pour une variété de commensaux et de pathogènes ; la plupart peuvent être diffusés par un ou plusieurs mécanismes de transfert de gènes. De fait, l'antibiorésistance est évidemment un enjeu scientifique : il s'agit à la fois de détecter au plus vite les résistances, de comprendre les mécanismes d'apparition, les modalités de transmission, l'évolution du phénomène et, également, de trouver des alternatives thérapeutiques ou de développer de nouvelles molécules antibactériennes.

Notons également que l'antibiorésistance constitue un enjeu en santé animale et par voie de conséquence, comme la santé des animaux contribue à la qualité et à la quantité des denrées d'origine animale, l'antibiorésistance est aussi un enjeu clé de sécurité alimentaire et de sécurité sanitaire des aliments [120]. Parallèlement, la perte de la maîtrise des maladies chez les animaux d'élevage peut compromettre le fonctionnement de filières entières, ainsi que les échanges commerciaux. L'antibiorésistance s'inscrit alors comme un problème économique et social pour le secteur agricole et agroalimentaire : les éleveurs doivent par exemple optimiser leur production dans un contexte rendu difficile, tout en limitant les intrants longtemps jugés indispensables.

Enfin pour les décideurs, nationaux comme supranationaux de tous les secteurs d'action publique concernés, la gestion de l'antibiorésistance est un véritable défi : il faut prendre le plus précocement possible la meilleure des décisions envisagées sur un sujet complexe.

B- <u>De la connaissance épidémiologique de l'antibiorésistance en santé animale à l'identification de besoins de recherche</u>

1. La dynamique de l'antibiorésistance

La dynamique du phénomène d'antibiorésistance peut être caractérisée temporellement ou spatialement [121], en s'intéressant aux monorésistances comme aux multirésistances. Dans son

dernier rapport, l'EFSA souligne des disparités nationales de prévalence de résistance [58]. Ces disparités entre États membres laissent supposer l'existence de facteurs de risque aux effets et importances variables suivant les pays. En outre, la dynamique géographique de l'antibiorésistance à une échelle plus fine a été investiguée dans plusieurs pays : des différences régionales des niveaux de résistance ont été rapportées en santé animale [54,121–123] comme en santé humaine [124–126] et reflètent l'expression de variables explicatives (zone d'élevage, type de production, mouvements d'animaux, densité urbaine). En définitive, le développement de méthodes appropriées permet de décrire, quantifier et étudier la dynamique d'évolution spatiale du phénomène d'antibiorésistance [123], de révéler la présence de facteurs de risque et d'orienter des investigations sanitaires. L'exploration spatiale de l'antibiorésistance n'a jamais été entreprise en France en santé animale. Pourtant, les données collectées par le réseau de surveillance Résapath pourraient peut-être servir à une analyse infranationale des niveaux de résistance, voire de la dynamique de la progression des résistances sur le territoire. La détection de variations pourrait indiquer la présence de facteurs de risque à large échelle, comme l'emploi de certaines molécules dans certaines régions. Des variations à une échelle plus fine, par exemple groupées sur des élevages avec les mêmes profils de résistances, pourraient indiquer un facteur de risque local, comme une conduite d'élevage particulière (taille des cheptels) ou un facteur environnemental (ruissellement des eaux de pâture) [121].

En santé animale, la dynamique temporelle de l'antibiorésistance a été caractérisée dans plusieurs pays dans le cadre d'études prospectives [127,128] ou rétrospectives [129–131] pour identifier l'évolution du phénomène de résistance au pas de temps de l'année. À l'instar de ces publications, la description de la dynamique temporelle du phénomène d'antibiorésistance en santé animale en France reste encore relativement sommaire, s'appuyant sur des techniques statistiques de première approche (tests de Chi2) [63]. Or, des méthodes d'analyses de données temporelles pourraient permettre d'approcher l'épidémiologie du phénomène d'antibiorésistance, d'extraire les tendances des résistances, la cyclicité potentielle du phénomène [128] et permettraient en sus d'établir des comparaisons entre les tendances des résistances des différentes espèces animales ou avec d'autres phénomènes (mesures de maîtrise, ventes d'antibiotiques, etc.). De telles recherches impliquent d'étudier le phénomène à un pas de temps plus fin que l'année. Les données utilisées jusqu'à présent dans la littérature [129–131] sont parcellaires et non adaptées pour envisager un découpage trimestriel ou mensuel. Pourtant, il existe en France des dispositifs de surveillance permettant la réalisation d'analyses de série temporelles, en particulier en santé animale le réseau Résapath. En santé humaine, le phénomène d'antibiorésistance a été investigué dans d'autres pays avec des méthodes de régressions [132–134] à partir de données récoltées dans des hôpitaux ou en milieu communautaire, afin de décrire l'évolution des résistances des bactéries pathogènes à des pas

de temps variables (mois ou année) et d'identifier des facteurs de risque comme les mesures d'hygiène. Toutefois, en l'état actuel des connaissances sur l'épidémiologie de l'antibiorésistance en santé animale en France, aucune comparaison n'est envisageable avec les phénomènes d'antibiorésistance en santé humaine, bien qu'un parallélisme soit supposé [103,135–138].

2. Facteurs de risque de la résistance aux antibiotiques

L'implication de l'usage des antibiotiques en élevage dans le développement des résistances a été démontrée dès les années 50, avec l'apparition de souches résistantes à la streptomycine, aux sulfamides ou aux tétracyclines peu de temps après leur commercialisation [2] (Figure 2). Toutefois, il a aussi été démontré que la propagation et le maintien de la résistance aux antibiotiques peuvent se produire, que la pression sélective générée par l'utilisation d'antimicrobiens soit présente ou non [139–141].

En santé animale, les facteurs associés à des risques de résistance chez les bactéries pathogènes ou commensales portées par les animaux de production comme les animaux de compagnie font l'objet d'une recherche de plus en plus intense ces dernières années. Certains facteurs sont biologiquement explicables comme les caractéristiques de la pression de sélection (temps de traitement, dose d'antibiotique), tandis que d'autres sont plus difficiles à interpréter comme les pratiques de gestion d'élevage.

Les Tableaux 5 et 6 listent les différents facteurs de risque de résistance identifiés en santé animale dans la littérature. Nuançons cependant : certains facteurs de risque mis en évidence pourraient jouer le rôle de facteur de confusion, plutôt que d'être la cause directe de la résistance aux antibiotiques. Par exemple, il a été démontré que l'origine de l'aliment, la désinfection des bâtiments, l'âge des animaux, le nombre d'animaux par lot, la gestion de l'élevage sont des facteurs influant le niveau d'infection en élevage de volailles [142–145]. De fait, le niveau de contamination des élevages pourrait potentiellement jouer le rôle de facteur de confusion dans la relation identifiée entre la taille des lots et le risque de sélection des résistances.

Tableau 5 : Synthèse sur les facteurs de risque d'antibiorésistance en santé animale (partie 1)

Espèce	Facteur de risque	Référence
Dinde	Présence d'animaux domestiques dans l'exploitation	[146]
	Non séparation des bandes dans des bâtiments distincts	[146]
	Bandes de grande taille	[146]
	Consommation d'antibiotiques	[146]
	Technicien ou fermier d'activité mixte	[146]
	Biosécurité faible	[146]
Poulet et poule pondeuse	Consommation d'antibiotiques	[147,148]
	Pas d'acidification de l'eau de boisson	[147]
	Plus de trois changements de ration par cycle de production / pratique d'élevage stressante	[39,147,149]
	Type de litière (paille plus à risque que les copeaux de bois) / type de logement (accès à l'extérieur plus à risque que sans accès à l'extérieur)	[39,147,149]
	Race (race Ross plus à risque que la race Cobb)	[147]
	Manque de biosécurité	[39]
Porc	Bonne hygiène des enclos	[150]
	Premiers stades de production / jeune âge	[150–152]
	Consommation d'antibiotiques	[150–156]
	Stress thermique	[157,158]
	Type de production (conventionnel plus à risque que biologique, post-sevreur-engraisseur et engraisseur plus à risque que naisseur-engraisseur)	[156,159,160]
	Elevage de grande taille	[156]
	Achat de porc	[156]
	Présence d'autres animaux dans l'élevage (bovins)	[156]
Ovin	Consommation d'antibiotiques	[161]
Cheval	Consommation d'antibiotiques	[162,163]
	Admission en service de soin intensif / Hospitalisation	[162,163]

Tableau 6 : Synthèse sur les facteurs de risque d'antibiorésistance en santé animale (partie 2)

Espèce	Facteur de risque	Référence
Bovin	Système d'élevage (agriculture conventionnelle plus à risque par rapport à l'agriculture biologique)	[164,165]
	Traitement antibiotique du lot entier	[166]
	Gestion intensive de l'élevage (plus d'un bâtiment d'élevage dans la ferme, alimentation des veaux exclusivement au biberon, alimentation des veaux par lait reconstitué, nombre de veaux par lot)	[166–168]
	Stockage du fumier dans le bâtiment / stockage du purin dans une fosse	[166,169]
	Hygiène d'élevage (mauvaise et bonne) / Manque de biosécurité	[166,169–171]
	Présence de mouches	[172]
	Age (veaux plus à risque que les vaches laitières)	[165,168,173–177]
	Type de production (vaches laitières plus à risque que les bovins allaitants, élevage conventionnel plus à risque que l'élevage biologique)	[24,164,165,173]
	Activité mixte de l'élevage / Présence d'autres animaux dans l'élevage (porcs)	[178–180]
	Mouvement d'animaux fréquents dans l'élevage / Achat d'animaux extérieurs	[167,170,173,180]
	Partage du transport d'animaux avec d'autres fermiers	[170]
	Grands lots d'engraissement	[167]
	Administration d'antibiotiques dans l'alimentation avant engraissement	[167]
	Consommation d'antibiotiques (consommation de céphalosporines dans les douze derniers mois, exposition à la pirlimycine)	[169,171,174,175,177,181–186]
	Voie d'administration des antibiotiques (dans l'alimentation plus à risque qu'orale, orale plus à risque que par injection)	[167,168,182,185,187]
	Pas d'isolement lors du vêlage	[170]
Chien et chat	Consommation d'antibiotiques dans le passé / nombre de traitements antibiotiques suivis	[188–192]
	Consommation de viande de volaille crue	[188]
	Infection chronique / animal malade	[190,192]
	Lieu de l'infection (sites chirurgicaux, peau et tissus mous plus à risque)	[190]
	Contact avec au moins deux humains malades / Contact avec au moins un humain revenant de l'hôpital	[192]
	Séjour d'hospitalisation dans le passé / Nombre de jours passés en clinique vétérinaire	[111,192,193]
	Implant chirurgical	[192]
	Chats plus à risque que les chiens	[111]
	Traitement topique pour les otites dans le passé / traitement avec des glucocorticoïdes	[111]

Par ailleurs, la biosécurité n'a pas toujours été identifiée comme un facteur protecteur de développement de résistance : une étude a montré qu'un réservoir propre était un facteur de risque de résistance au ceftiofur chez les poulets [147], une autre a mis en évidence que des mesures d'hygiène poussées chez les porcs à l'engraissement représentaient un facteur de risque de résistance à la tétracycline de certains coliformes [150], une troisième étude a montré que la présence de mesure d'hygiène à la ferme était associée à une faible prévalence des SARM chez les veaux de boucherie [171]. En plus de présager l'action de facteurs de confusion, ces études laissent supposer que les facteurs de risque de l'antibiorésistance sont nombreux et que les interactions entre facteurs sont complexes, rendant éminemment difficile l'établissement d'un lien direct valide entre un facteur et le développement de résistance.

BILAN

Considérant les enjeux liés à l'antibiorésistance et l'état actuel des connaissances, la recherche sur la résistance des bactéries aux antibiotiques doit nécessairement progresser, en particulier sur le plan épidémiologique. En France en santé animale, la caractérisation épidémiologique du phénomène d'antibiorésistance reste relativement sommaire. Pourtant les dispositifs de surveillance existants constituent des bases riches d'informations qui pourraient peut-être permettre une caractérisation temporelle et spatiale de l'antibiorésistance des différentes bactéries d'intérêt en santé animale et/ou en santé humaine. Il serait alors envisageable de mettre en regard les dynamiques d'évolution des résistances en santé animale et humaine afin de documenter le parallélisme couramment admis entre les différentes espèces et d'approcher la réalité et l'ampleur du lien Homme-animal. En sus, en assurant une vision conjointe de l'évolution de l'antibiorésistance, approche particulièrement importante dans un contexte où les efforts pour diminuer les niveaux de résistance doivent être couplés, de tels travaux constitueraient une base solide pour orienter les mesures de maîtrise prises par les décideurs, évaluer les stratégies de contrôle existantes et optimiser les recommandations aux prescripteurs.

C- Problématique de la thèse

La problématique de recherche de la thèse est la suivante : fournir une aide à la décision au gestionnaire pour la mise en œuvre et l'évaluation des mesures de lutte contre l'antibiorésistance en santé animale. À cet effet, il faut caractériser le phénomène en santé animale, décrire les niveaux de résistance et leurs évolutions pour détecter des émergences, identifier de potentiels facteurs de risques et évaluer les mesures de maîtrise.

D- Objectifs et questions de recherche

Les objectifs spécifiques de la thèse se déclinent de la façon suivante :

- déterminer l'origine des données de surveillance nécessaires à une telle recherche
- évaluer la représentativité et la couverture du dispositif de surveillance ;
- caractériser et décrire les données de surveillance ;
- caractériser les niveaux de résistance à l'échelle nationale voire infranationale et l'évolution temporelle de la proportion de souches bactériennes résistantes afin d'établir des tendances et d'évaluer l'efficacité des mesures de gestion mises en place ;
- comparer les résultats obtenus entre espèces animales et appliquer les méthodes précédemment développées à des données de surveillance en médecine humaine, afin de comparer les dynamiques (tendance et répartition géographique) et statuer sur le parallélisme supposé entre les phénomènes d'antibiorésistance en santé humaine et animale.

Les travaux menés pour répondre à ces différents objectifs sont présentés dans la deuxième partie du manuscrit. Les deux premiers chapitres de cette partie s'attachent à décrire dans quelle mesure les données de surveillance collectées par le Résapath peuvent servir à répondre à la problématique de recherche. Dans un premier chapitre, nous étudions l'origine des données de surveillance : nous détaillons le fonctionnement du Résapath, nous étudions le processus de recours à l'antibiogramme en médecine vétérinaire, pour enfin évaluer la représentativité et la couverture du dispositif de surveillance. À l'aune de ces premiers résultats, dans un deuxième chapitre, nous examinons plus précisément les données du Résapath : nous décrivons ces données, leurs natures, leurs spécificités et définissons les niveaux de monorésistance et de multirésistance. Nous avons alors l'occasion de décrire la distribution spatiale des niveaux de résistance en France. Dans un troisième chapitre, nous caractérisons l'évolution temporelle de la proportion de souches bactériennes résistantes à l'échelle nationale. L'analyse des séries temporelles est l'occasion d'examiner l'impact des mesures de maîtrise de l'antibiorésistance sur l'évolution du phénomène dans différentes filières de production. Enfin, dans un dernier chapitre, suivant les recommandations

de l'alliance tripartite OIE-FAO-OMS, nous mettons en application l'approche *One Health* afin de documenter le parallèle supposé entre épidémiologie de l'antibiorésistance en santés humaine et animale. À cet effet, les méthodes de décomposition de séries temporelles sont appliquées à des données de surveillance en santé humaine. À travers ce manuscrit de thèse, dans un souci de diversification des illustrations, nous avons choisi de présenter les résultats en ciblant à chaque fois des combinaisons de résistance différentes concernant l'espèce animale en jeu, la pathologie considérée et l'espèce bactérienne isolée.

SECONDE PARTIE

TRAVAUX DE RECHERCHE

Chapitre I - Le Résapath : fonctionnement, objet de la surveillance et représentativité

Avant toute recherche impliquant l'utilisation de données de surveillance, il est nécessaire de comprendre le fonctionnement du dispositif de surveillance et d'identifier clairement la population surveillée afin de détecter les biais qui pourraient impacter les résultats futurs ou leurs interprétations.

A- Choix du matériel de recherche

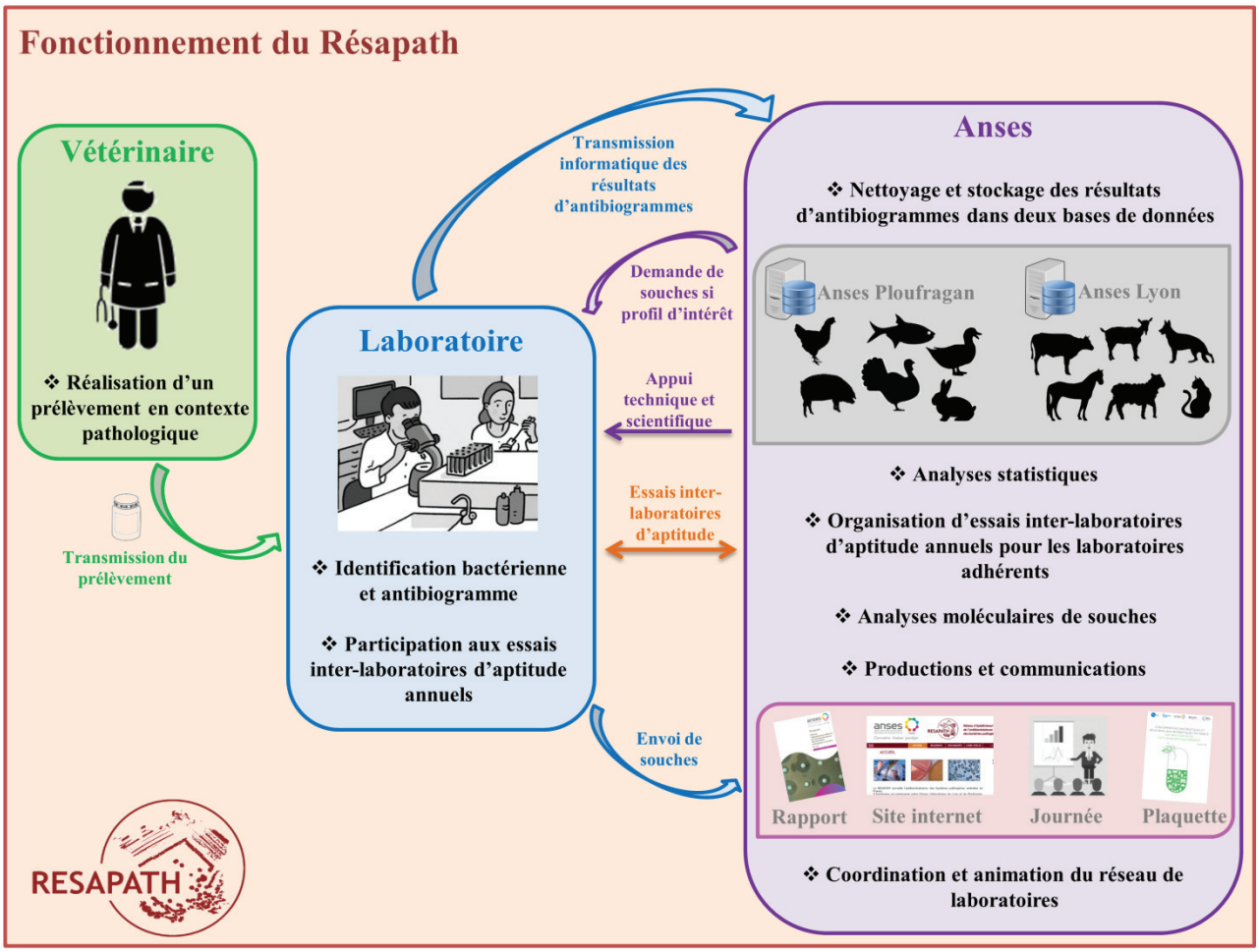
Pour répondre à la problématique de recherche et décrire l'évolution de la dynamique temporelle de l'antibiorésistance, il faut disposer de données collectées en continu sur une période de temps conséquente, soit au moins 4 ans [194]. Dans la première partie du manuscrit, nous avons vu qu'il existait en santé animale en France trois dispositifs de surveillance. Pour répondre à la problématique, nous avons choisi de nous appuyer sur les données du Résapath pour trois raisons : *(i)* les résultats d'antibiorésistance de ce dispositif concernent non seulement les animaux de production mais aussi les animaux de compagnie, contrairement aux plans de surveillance pilotés par l'Europe qui se focalisent uniquement sur trois espèces de production, *(ii)* ce réseau s'intéresse à un panel large d'espèces bactériennes à l'inverse du réseau Salmonella centré sur une seule espèce bactérienne, et enfin *(iii)* le Résapath, qui existe depuis plus de trente ans, dispose d'un recul suffisant pour s'interroger sur la dynamique temporelle de l'antibiorésistance.

B- Fonctionnement du Résapath

Le Résapath est un dispositif de surveillance dit événementiel ou passif, car il repose sur la transmission volontaire des résultats d'antibiorésistance par les acteurs de terrain (Figure 8). Le Résapath a pour objectif de suivre la résistance aux antibiotiques des bactéries pathogènes animales en France. Son fonctionnement est similaire aux dispositifs de surveillance de l'antibiorésistance en santé humaine en France, se focalisant sur les résistances des bactéries isolées en contexte pathologique. Cependant, à la différence de la multitude de dispositifs de surveillance en santé humaine, le Résapath est le seul réseau national de surveillance de l'antibiorésistance chez les pathogènes en santé animale. Le Résapath collecte tous les résultats d'antibiogrammes réalisés par ses laboratoires adhérents suite à la demande des vétérinaires praticiens dans le cadre de leur activité de soins. Au début de ces travaux de thèse en 2016, le dispositif de surveillance comptait 74

laboratoires adhérents transmettant au total sur l'année plus de 53 000 résultats d'antibiogrammes. Les laboratoires adhérents transmettent à l'Anses les résultats d'antibiogrammes sous forme électronique, le format papier ayant pris fin en décembre 2016. Les données sont alors vérifiées en termes de complétude des champs obligatoires et d'élimination des doublons, puis nettoyées pour permettre une harmonisation des formats de tous les champs. Les données sont enfin stockées dans deux bases de données en fonction de la filière d'origine. Les données d'antibiogrammes relatives aux filières porcine, avicole, cunicole ou piscicole sont compilées sur le site de l'Anses Ploufragan-Plouzané-Niort, tandis que celles de toutes les autres filières (bovine, ovine, caprine, équine, animaux de compagnies, animaux exotiques) sont stockées à l'Anses de Lyon. Les souches dont le profil de résistance est considéré atypique ou pertinent d'un point de vue santé publique sont demandées par l'Anses aux laboratoires. Ces souches permettent la constitution d'une souchothèque utile pour l'étude moléculaire des mécanismes de résistance. Afin de contrôler la qualité des données transmises par les laboratoires adhérents, l'Anses organise chaque année des essais inter-laboratoires d'aptitude. Ces essais sont obligatoires et gratuits pour tous les laboratoires adhérents qui peuvent également solliciter l'Anses pour obtenir un appui technique et scientifique sur la réalisation de l'antibiogramme et son interprétation.

Figure 8 : Fonctionnement du Résapath



Crédit : C. Bourély

C- Questions de recherche et objectifs

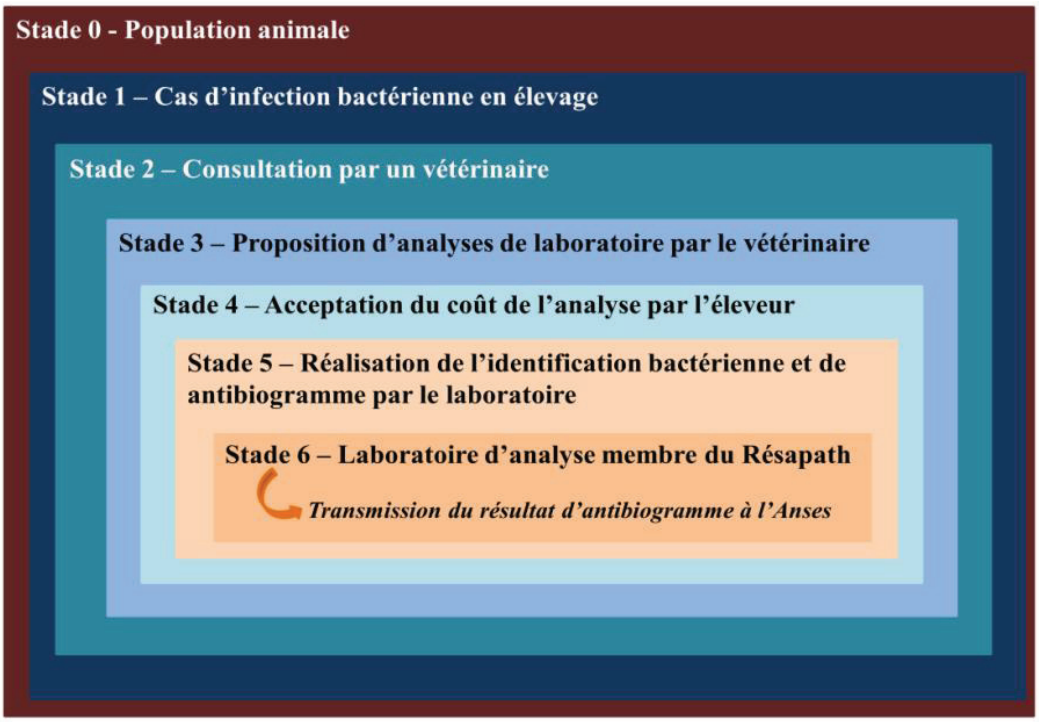
Pour répondre à la problématique de la thèse, le matériel de recherche utilisé est constitué par les données recueillies par le Résapath. Or, les données de surveillance événementielle sont potentiellement imparfaites et biaisées. Quelles sont les étapes du processus de recueil de ces données ? Quels sont les biais impactant l'objet de la surveillance et quelle est leur ampleur ? L'isolement bactérien, et à plus forte raison l'antibiogramme, ne sont pas des analyses systématiques dans le cadre de l'activité vétérinaire. Quels sont les déterminants conduisant au recours à l'antibiogramme dans les différentes filières de productions animales ? Surveille-t-on *in fine* le même phénomène pour chaque espèce animale à l'aide d'un seul et même outil de surveillance ?

L'objectif de ce chapitre consiste à caractériser le dispositif de surveillance par rapport à la population animale cible. Il s'agit plus précisément de caractériser l'objet de la surveillance du Résapath, c'est-à-dire le résultat d'antibiogramme, principalement par l'évaluation des déterminants du recours à l'antibiogramme, puis d'estimer la couverture du dispositif de surveillance pour évaluer sa représentativité.

D- Caractérisation du réseau et de son objet de surveillance

Le Résapath collige en routine les résultats d'antibiogrammes de ses laboratoires adhérents. Mais le processus de collecte, depuis le cas d'infection bactérienne dans l'élevage jusqu'à la transmission du résultat d'antibiogramme par le laboratoire (Figure 9), est sujet à de nombreuses variables qui peuvent impacter non seulement la nature des résultats produits à partir des données de surveillance mais aussi et surtout leur interprétation. Afin de caractériser les données du Résapath dans leur complexité, deux approches de recherche complémentaires ont été menées : une enquête sociologique et une analyse de la représentativité du Résapath. L'enquête sociologique permet d'identifier les facteurs qui influent ou sont susceptibles d'influer sur le recours à l'antibiogramme en santé animale en France, tandis que l'analyse de la représentativité évalue la part des antibiogrammes collectés par le Résapath par rapport à l'ensemble des antibiogrammes réalisés en médecine vétérinaire en France et par rapport à la distribution des effectifs d'animaux sur le territoire. Cette dualité d'approche permet d'identifier de façon fine la population animale surveillée et dans quelles mesures les données de surveillance peuvent servir de matériel de recherche.

Figure 9 : Différents stades de sélection jusqu'à l'intégration d'un résultat d'antibiogramme dans la base de données du Résapath



1. Processus de recours à l'antibiogramme en santé animale en France

1.1 Objectifs spécifiques

Contribuant à cibler l'antibiothérapie, l'antibiogramme constitue une aide thérapeutique pour raisonner la prescription et lutter contre le développement de phénomènes de résistance en médecine humaine comme en médecine vétérinaire [195]. Pourtant son usage n'est pas systémique en médecine vétérinaire lors d'infection bactérienne. Les facteurs de recours à l'antibiogramme en pratique vétérinaire ne sont que très peu documentés [196] et n'ont jamais été investigués par des approches permettant d'en explorer les déterminants. Or, une compréhension fine des facteurs incitatifs ou des freins à l'utilisation de ces examens complémentaires permettrait d'identifier les leviers d'action pour favoriser leur usage en pratique.

L'objectif de cette étude était d'identifier les déterminants du recours à l'antibiogramme en santé animale pour mieux comprendre comment l'utilisation de ces examens complémentaires s'articule dans la pratique des prescripteurs. Plus précisément, nous souhaitions décrire et comprendre les mécanismes du recours à l'antibiogramme par les vétérinaires et le processus décisionnel. Subséquemment, cette étude a permis d'évaluer l'impact du décret n° 2016-317 du 16 mars 2016 qui restreint l'usage des AIC (céphalosporines de dernières générations et

fluoroquinolones) à la réalisation préalable d'un antibiogramme. *In fine*, ces travaux contribuent à explorer le positionnement des vétérinaires français dans la lutte contre l'antibiorésistance et les défis auxquels ils sont confrontés dans un contexte réglementaire changeant.

1.2 Matériel et méthode

1.2.1 Design de l'étude

Nous avons choisi une approche qualitative, méthode adaptée pour comprendre la diversité et la profondeur des opinions des acteurs [197]. L'enquête a reposé sur des entretiens avec des vétérinaires exerçant dans l'un des quatre principaux secteurs de production animale en France : porcin, avicole, bovin (laitier et allaitant) et équin. Ces quatre secteurs étaient bien représentés dans les cinq régions administratives françaises retenues pour l'enquête: Bretagne, Normandie, Pays-de-la-Loire, Bourgogne-Franche-Comté et Auvergne-Rhône-Alpes. Les critères de sélection des enquêtés reposaient sur leur domaine d'expertise ainsi que la région dans laquelle ils pratiquaient (Tableau 7). Tous les vétérinaires répondant aux critères de sélection ont été répertoriés à partir de l'annuaire vétérinaire français (http://www.lepointveterinaire.fr/roy). Les participants ont ensuite été sélectionnés au hasard et contactés individuellement par téléphone et/ou par courrier électronique afin de leur fournir des informations sur l'objectif, la nature et le contexte de l'étude. Lorsque le consentement verbal du participant était obtenu, un entretien individuel était planifié. Seuls trois vétérinaires ont refusé d'être interviewés, sans donner les raisons de ces refus.

Tableau 7 : Critères de sélection des participants

Critère	Description
Critère de présélection des cliniques vétérinaires	- structure (clinique, hôpital, cabinet) avec des vétérinaires travaillant principalement dans l'un des quatre secteurs de production ciblés (bovin, porcin, avicole ou équin) - pour le secteur rural : structure avec au moins deux associés (ils sont spécialisés et *a priori* plus disponibles pour participer à l'enquête)
Critère de présélection des vétérinaires	- exclusivement praticien (pas d'enseignant, de vétérinaire inspecteur, d'employé de firmes industrielles ou de fonctionnaire) - travaillant principalement dans l'un des quatre secteurs de production ciblés - sélection possible de deux vétérinaires exerçant dans la même structure à condition qu'ils pratiquent dans deux secteurs distincts
Critère de sélection des vétérinaires	- utilisation de l'identification bactérienne et de l'antibiogramme, au moins une fois dans leur carrière - volonté de participer

1.2.2 Collecte des données

Nous avons réalisé des entretiens semi-directifs car ils sont appropriés pour étudier les attitudes, les représentations, les croyances, les expériences, les savoirs, valeurs et normes difficilement observables directement [198,199]. L'entretien semi-directif constitue un moyen pertinent d'obtenir des informations et de collecter des données qualitatives à travers des questions ouvertes. Afin de maximiser à la fois la quantité et la qualité des données collectées, un guide d'entretien a été rédigé pour chaque type de production animale afin d'adapter le vocabulaire à la spécificité de chaque secteur. Les guides ont été confrontés à l'avis d'experts, puis pré-testés à travers deux entretiens exploratoires.

Les entretiens ont été menés sur le lieu choisi par les participants, le plus souvent dans leur structure d'exercice : *(i)* individuellement et sans témoin pour faciliter l'expression d'opinions personnelles et/ou controversées, et *(ii)* en face à face par la même personne afin d'assurer la comparabilité des informations recueillies [199]. Avant l'entretien, les participants ont été invités à se renseigner auprès de leurs collègues travaillant dans la même structure pour recueillir leurs pratiques d'utilisation des antibiogrammes et leurs avis sur la nouvelle réglementation. Les sujets présentés dans le Tableau 8 ci-après ont été abordés au cours de tous les entretiens, mais les questions posées par l'enquêteur ont été à chaque fois adaptées pour approfondir les réponses individuelles des participants. Les entretiens ont été enregistrés afin de faciliter les interactions et le dialogue d'une part et de permettre une retranscription minutieuse des propos recueillis dans un second temps. Les entretiens ont été conduits au moins jusqu'à saturation thématique pour chaque secteur de production. La saturation correspond au point au-delà duquel collecter plus de données ne conduit pas à recueillir de nouvelles informations relatives aux questions de recherche [200].

1.2.3 Analyse des données

Les entretiens ont été retranscrits manuellement à partir des enregistrements audio et des notes de terrain. Les transcrits ont ensuite fait l'objet d'une analyse thématique du contenu latent et manifeste [201], selon la méthodologie décrite par Beaud et Weber [199]. Cette méthode fournit un cadre solide pour le codage des données qualitatives et pour ensuite utiliser cette catégorisation pour identifier les différentes unités sémantiques [202]. Les éléments de langage ont été regroupés en catégories (unité de signification) partageant des caractéristiques communes et les catégories ont ensuite été regroupées autour de thèmes afin de relier les différents éléments entre catégories [203,204]. L'analyse a été conduite de manière circulaire selon une démarche comparative constante [202] : répétitions d'aller-retour entre le matériel brut (les transcrits), les regroupements d'éléments, le codage et l'introduction d'inférence [200]. Avant toute inférence, la thèse contraire a

été recherchée et les incohérences et absences de discours ont été investiguées dans les transcrits. Les principes de triangulation (sources d'informations plurielles pour valider chaque inférence) et d'itération (recherche de répétitions et de synergies dans les transcrits) ont été strictement appliqués pour toute inférence [205]. Conformément à la méthodologie conventionnelle, les résultats de l'enquête ont d'abord été soumis à tous les enquêtés. Les différentes étapes d'analyse suivies répondaient aux attentes de fiabilité et de rigueur des résultats en science sociale [206,207]. Afin de préserver la confidentialité des participants et de protéger leur identité, l'âge et le sexe des enquêtés ne sont pas détaillés dans ce document.

Tableau 8 : Sujets de discussion au cours des entretiens

Sujet	Sujet sous-jacent
Question d'ouverture	Dans quelles circonstances avez-vous été amené à utiliser l'antibiogramme ?
Décision d'utiliser l'antibiogramme	Facteurs impliqués dans le recours à l'antibiogramme Présentation du processus de décision Parties-prenantes impliquées / personnes influençant la décision Evolution du processus et pratiques
Perception et opinion sur l'antibiogramme	Connaissance sur l'antibiogramme Capacité à décrire le test Informations reçues : pertinence, quantité, qualité Opinions sur le test et son utilité Visées de l'antibiogramme L'antibiogramme comme moyen de lutte contre l'antibiorésistance Evolution de cette perception Différences avec les opinions et perceptions de leurs collègues
Impact de la nouvelle réglementation d'usage des antibiotiques d'importance critique	Connaissance relative au décret Changements de pratique Raisons de satisfaction / mécontentement Intérêt personnel Opinions sur le décret Evolution de ce point de vue
Question de clôture	Différences avec les pratiques et opinions de leurs collègues Impression générale sur la lutte contre l'antibiorésistance en France Eléments supplémentaires

1.3 Résultats

Soixante-six entretiens semi-directifs ont été conduits d'octobre à décembre 2016 (Tableau 9). Ils ont duré de 36 à 112 minutes. L'analyse thématique a mis en lumière sept thèmes majeurs rattachés aux trois objectifs de recherche ; ils sont repris par la suite pour présenter les résultats.

Tableau 9 : Nombre d'entretiens par secteur et zone géographique

Zone géographique	Equin	Porcin	Avicole	Bovin	*Total*
Bretagne	0	8	5	4	*17*
Normandie	8	0	0	7	*15*
Pays-de-la-Loire	4	4	2	0	*10*
Bourgogne-Franche-Comté	2	1	1	4	*8*
Auvergne-Rhône-Alpes	5	3	3	5	*16*
Total	*19*	*16*	*11*	*20*	*66*

1.3.1 Investigation de la perception des vétérinaires sur l'antibiogramme

- *L'antibiogramme en tant qu'examen complémentaire*
  - Paradigmes: médecine de troupeau *versus* médecine individuelle

Les enquêtés soulignent l'existence de deux approches en médecine vétérinaire : la médecine de troupeau et la médecine individuelle. Les examens complémentaires n'ont pas le même rôle ni la même importance suivant ces deux approches. En médecine de troupeau, le coût de l'examen complémentaire, qui nécessite généralement le sacrifice d'animaux pour autopsie, est mis en perspective avec le bénéfice attendu d'investiguer la cause pour sauver le reste du troupeau ou de la bande.

« Tacitement, en tout cas en porcs, ils savent que ça va coûter moins cher de confirmer, de faire du diagnostic que de mettre un traitement à l'aveugle, surtout si c'est une pathologie récurrente » n° 16

Au contraire, en médecine individuelle, le coût de l'examen complémentaire est relativement élevé car il n'est envisagé que pour un seul animal. Dès lors, la valeur de l'animal, sa carrière sportive et/ou son potentiel génétique sont des éléments déterminants du recours aux analyses. Ces deux approches de la médecine peuvent néanmoins être entrelacées en pratique vétérinaire, en particulier en filières bovine et équine.

- La place des examens complémentaires et de l'antibiogramme dans le diagnostic

Tous les enquêtés considéraient les examens complémentaires comme un moyen de peaufiner leur diagnostic. Ils utilisaient le champ sémantique de la « complétude ». Lorsqu'il leur était demandé de décrire une visite standard en contexte pathologique, les vétérinaires en filières avicole et porcine mentionnaient les examens complémentaires, contrairement à leurs confrères en filières bovine et équine.

« Sur de la médecine individuelle l'analyse elle n'est pas systématique, sur de la médecine de population l'analyse elle est obligatoire quoi ! » n° 34

En filières équine et bovine, l'utilisation de l'antibiogramme et, plus généralement, le recours aux examens complémentaires dépendait du type de vétérinaire, de leur clientèle et de leurs infrastructures. Les antibiogrammes étaient principalement utilisés pour des maladies de troupeau comme les mammites ou les diarrhées néonatales chez les bovins, et pour les troubles de la reproduction, les arthrites ou les infections respiratoires chroniques chez les chevaux.

« *Pour des raisons financières ces examens complémentaires-là ils vont être plus utilisés sur des chevaux de course ou les chevaux de valeur, donc les chevaux de sport, etc. Que les chevaux de loisir, les gens qui n'ont pas beaucoup d'argent, bah on va essayer de se limiter dans les frais* » n° 14

Quelle que soit la filière considérée, les vétérinaires n'opposaient pas examen complémentaire et diagnostic empirique. Ils expliquaient que si les compétences cliniques pouvaient suffire pour établir un diagnostic, un examen complémentaire ne pouvait en revanche pas dispenser les vétérinaires d'utiliser leur sens clinique.

- <u>*Visées de l'antibiogramme en médecine vétérinaire*</u>
    - L'antibiogramme pour guider les pratiques

Les vétérinaires considéraient l'association identification bactérienne et antibiogramme comme un outil diagnostique, pronostique, thérapeutique et épidémiologique. L'antibiogramme leur permettait de consolider leur connaissance et de confirmer la validité de leur sens clinique dans le cadre de leur obligation de moyen vis-à-vis de leurs clients.

- Rôle de l'antibiogramme dans la relation avec le client

L'antibiogramme était utilisé par les 66 vétérinaires comme un support pédagogique grâce auquel ils pouvaient expliquer leur approche clinique à leur client (éleveur ou propriétaire). C'était aussi un moyen d'attirer leur attention sur la problématique de l'antibiorésistance et de les convaincre d'adopter des mesures préventives. D'après les enquêtés, le résultat d'antibiogramme était utile pour faire évoluer les avis de leurs clients car il constituait une source impartiale et extérieure d'information, indépendante du vétérinaire. En filière équine, recourir à l'antibiogramme était aussi un moyen de s'assurer vis-à-vis d'un client insatisfait en cas de litige.

« *Dans sa tête* [l'éleveur] *c'était l'antibiotique qui ne fonctionnait pas bien, qui n'était pas adapté. Donc là, il avait un réel intérêt pédagogique l'antibiogramme, ça lui a montré que tout était sensible et que du coup le problème se situait ailleurs* » n° 25

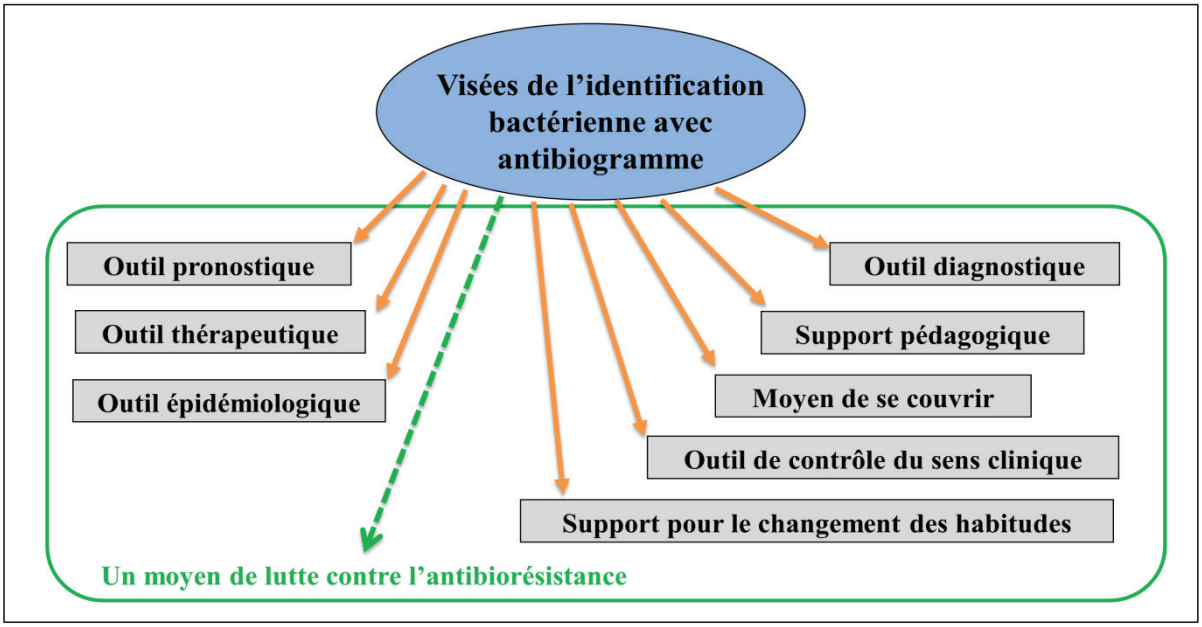
- L'antibiogramme comme moyen de lutte contre l'antibiorésistance

L'antibiogramme était considéré utile par les vétérinaires à plusieurs titres lors de leurs visites en élevage : pour encourager l'utilisation d'antibiotiques de premières générations, pour promouvoir les bonnes pratiques zootechniques, pour orienter la prescription, pour diversifier la prescription si possible et pour surveiller les tendances des résistances.

« *Je pense que ça [l'antibiogramme], clairement c'est le meilleur moyen d'évaluation de l'antibiorésistance, enfin à ma connaissance, et de son évolution* » n° 14

Les visées attribuées à l'antibiogramme par les enquêtés étaient communes à tous les secteurs investigués, excepté le fait de se couvrir vis-à-vis d'un client insatisfait mentionné seulement en filière équine (Figure 10).

Figure 10 : Visées de l'antibiogramme en médecine vétérinaire



➢ *Recours à l'antibiogramme dans la pratique quotidienne*

- Antibiogramme et traitement

En filières avicole et porcine, le recours à l'antibiogramme n'impliquait pas systématiquement l'utilisation d'un antibiotique par la suite. Au contraire, en filières bovine et équine, l'antibiogramme était plutôt utilisé pour guider la prescription pour un traitement en seconde intention et, de fait, sous-entendait l'utilisation d'un antibiotique.

« *Après, nous, on a un schéma aussi, c'est qu'on va lancer l'antibiogramme, enfin lancer les prélèvements, l'antibiogramme, mais si la mortalité n'augmente pas, ou diminue, on ne va pas lancer de traitement. Le traitement, c'est vraiment le dernier recours, on essaie avant de travailler sur les conditions d'élevage, on administre des antioxydants et puis si ça ne suffit pas alors on*

passe à. Mais c'est une troisième étape. Voilà, donc on a toujours lancé l'analyse » n° 56 (vétérinaire aviaire)

- L'association identification bactérienne et antibiogramme

En filières avicole, porcine et équine, les vétérinaires associaient systématiquement l'identification bactérienne et l'antibiogramme. C'était également le cas en filière bovine, à l'exception des traitements de mammites, pour lesquels la majorité des vétérinaires laitiers n'associaient pas ces deux analyses car ils réalisaient une indentification bactérienne simplifiée pour éviter d'envoyer des prélèvements au laboratoire.

« On s'était dit on va d'abord commencer par faire uniquement la bactério parce que ça demandait peu d'investissement en matériel et en connaissance. Et bah on s'est aperçu que de toute façon à partir du type de germe on mettait des traitements un peu plus ciblés, on avait quand même une réponse. Donc honnêtement on s'est basé sur la réponse terrain et on s'est affranchi de l'antibiogramme » n° 24

1.3.2 Investigation des facteurs influençant la demande d'un antibiogramme

- *Raisons et limites : facteurs expliquant le recours à l'antibiogramme*

Parmi les raisons qui supportent ou au contraire limitent le recours à l'antibiogramme, notre étude a identifié 46 facteurs regroupés en 11 catégories (Tableaux 10 et 11). La Figure 11 ci-après illustre les liens entre les différents facteurs, suivant les informations fournies par les enquêtés. Le schéma a été construit pour représenter l'articulation entre les facteurs et/ou entre catégories et illustrer la diversité de leurs interactions. Les différents facteurs représentés pouvaient intervenir comme facteur incitatif ou au contraire comme frein. Certains d'entre eux étaient communs aux différentes filières comme les services proposés par le laboratoire (zone de dépôt des prélèvements, participation aux autopsies, envoi du rapport d'analyses par mail), sa proximité ou les habitudes du vétérinaire, tandis que d'autres étaient spécifiques d'une filière. Par exemple, la saisonnalité n'a été mentionnée qu'en filière bovine : au début de la période des vêlages, les vétérinaires sont plus enclins à réaliser des antibiogrammes qu'à la fin de la période, car le test est jugé utile pour les veaux à venir.

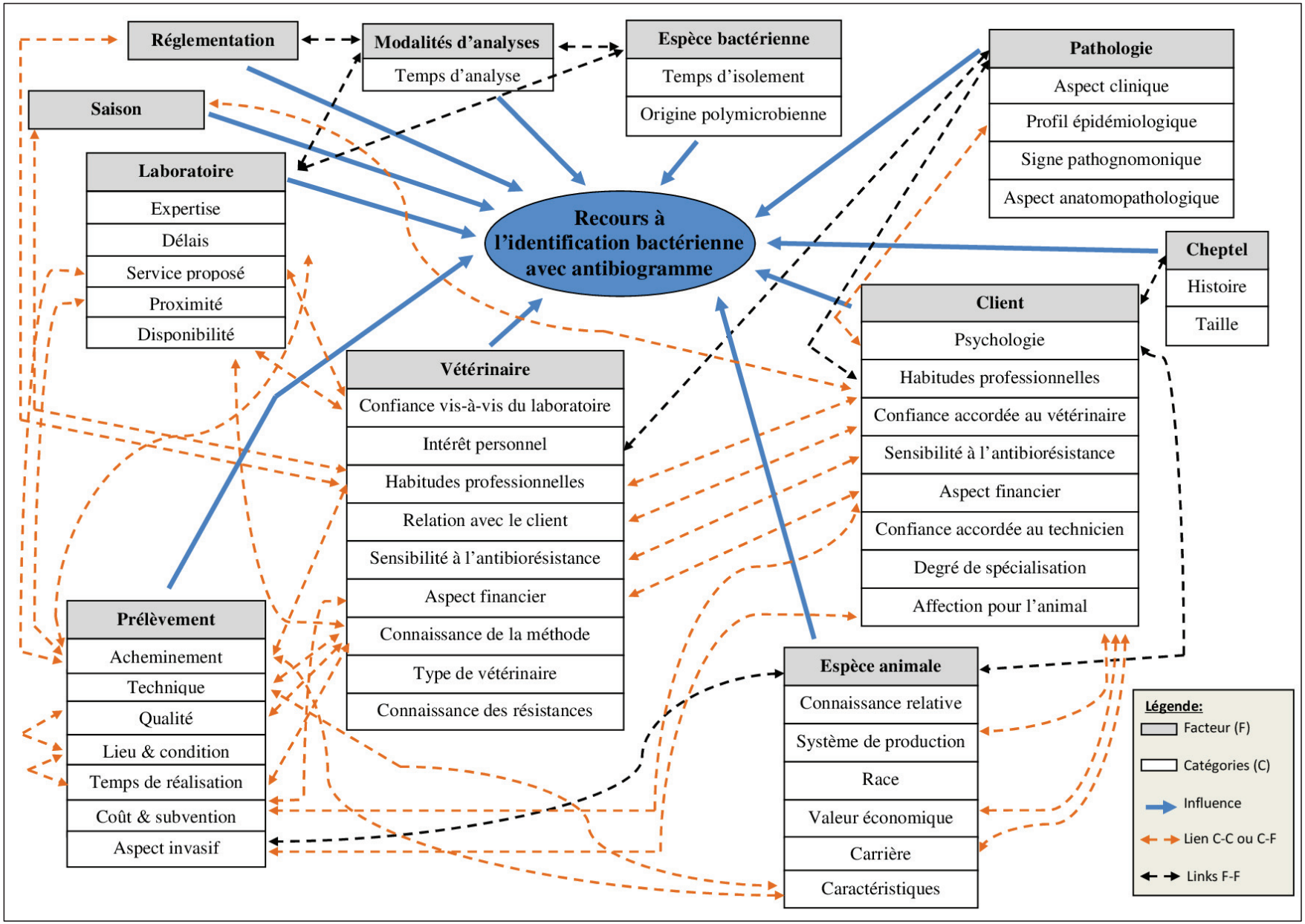
Tableau 10 : Déterminants du recours à l'antibiogramme mentionnés par les enquêtés par filière (partie 1)

Catégorie	Facteur	Filière				
		Toutes filières	Avicole	Porcine	Bovine	Equine
Laboratoire	Service proposé (autopsie, photographie, etc.)	X	X	X	X	X
	Expertise	X	X	X	X	X
	Proximité	X	X	X	X	X
	Disponibilité (heures d'ouverture, facilité de contact par mail, réponse téléphonique, etc.)		X	X	X	
	Temps pour transmettre un résultat			X	X	X
Client (éleveur, fermier, propriétaire, gardien)	Aspect financier	X	X	X	X	X
	Psychologie	X	X	X	X	X
	Habitudes de travail	X	X	X	X	X
	Degré de spécialisation ou de technicité		X		X	
	Confiance vis-à-vis du vétérinaire		X		X	
	Confiance vis-à-vis du technicien		X			
	Sensibilisation à l'antibiorésistance	X	X	X	X	X
	Affection pour l'animal					X
Cheptel	Historique			X	X	
	Taille			X	X	X
Vétérinaire	Habitudes de travail (expériences, pratiques)	X	X	X	X	X
	Aspect financier			X	X	X
	Relation avec le client	X	X	X	X	X
	Curiosité personnelle ou intérêt		X	X	X	
	Connaissance des méthodes de prélèvement	X	X	X	X	X
	Sensibilisation à l'antibiorésistance	X	X	X	X	X
	Connaissance des résistances	X	X	X	X	X
	Confiance vis-à-vis du laboratoire	X	X	X	X	X
	Type de vétérinaire (clinicien, référé, vétérinaire consultant, etc.)					X

Tableau 11 : Déterminants du recours à l'antibiogramme mentionnés par les enquêtés par filière (partie 2)

Catégorie	Facteur	Filière				
		Toutes filières	Avicole	Porcine	Bovine	Equine
Modalités d'analyse	Temps d'analyse	X	X	X	X	X
Espèce animale	Connaissances zootechniques disponibles pour l'espèce animale ou le type de production		X			
	Système de production		X			
	Caractéristiques de l'animal (taille, poids, âge)			X		X
	Valeur économique					X
	Carrière					X
	Race					X
Pathologie	Aspect clinique	X	X	X	X	X
	Profil épidémiologique	X	X	X	X	X
	Signe pathognomonique	X	X	X	X	X
	Profil anatomopathologique	X	X	X	X	
Prélèvement	Technique de prélèvement	X	X	X	X	X
	Acheminement des prélèvements	X	X	X	X	X
	Qualité du prélèvement			X	X	X
	Coût et/ou financement			X	X	X
	Aspect invasif			X	X	X
	Lieu et condition de prélèvement				X	X
	Temps nécessaire pour faire le prélèvement				X	X
Espèce bactérienne	Temps d'isolement		X	X		X
	Origine polymicrobienne			X		X
Saison	Période de l'année				X	
Réglementation	Réglementation relative à l'usage de l'antibiogramme			X	X	X

Figure 11 : Schéma illustrant les liens entre facteurs et catégories de facteurs de recours à l'antibiogramme, d'après les propos des enquêtés



- Modalités de prélèvement et d'analyse

À l'exception de la filière avicole, le temps nécessaire à la réalisation de l'antibiogramme était considéré par la grande majorité des répondants (47 sur 55) comme l'obstacle principal à la réalisation d'un antibiogramme. Presque tous les vétérinaires avicoles (10 sur 11) disposaient d'un laboratoire adjacent à leur clinique. Dans les autres filières, les vétérinaires qui n'avaient pas de laboratoires de proximité ont témoigné avoir des difficultés à travailler avec le laboratoire en raison de coûts d'analyses plus élevés et de délais plus importants pour obtenir un résultat d'antibiogramme. Reflet de la densité du réseau de laboratoires en filières porcine et avicole, la distance avec le laboratoire ne limitait pas le recours à l'antibiogramme dans le Grand-Ouest de la France, contrairement aux autres régions investiguées. En filières bovine et équine, la réalisation de prélèvement sur le terrain (au pré par exemple) constituait une contrainte majeure ; les vétérinaires exerçant en clinique ou en hôpital rapportaient *a contrario* des facilités à réaliser les prélèvements, disposant des infrastructures nécessaires pour la contention, l'hygiène, et la sécurité.

« *C'est compliqué quand tu es dans le fond d'un champ avec un cheval qui se met debout et que le propriétaire ne peut pas tenir et que tu te dis « Ha je lui ferai bien une aspiration transtrachéale ». Tu te dis que c'est dommage, et tu lui fais une petite piqûre et tu t'en vas* » n° 65

En filières bovine, porcine et équine, l'aspect financier (lié au prélèvement ou à l'analyse) était l'un des principaux freins au recours à l'antibiogramme, tandis qu'en filière avicole, le coût n'a été mentionné que par 2 enquêtés sur 11. Par ailleurs, en filières bovine et équine, des vétérinaires ont exprimé de la frustration liée aux limites financières de leurs clients.

« *Beaucoup de clients nous disent « le diagnostic on s'en fiche complètement, on veut un traitement ! » Mais c'est très très fréquent ! C'est compliqué, c'est pénible, c'est l'expérience… Le client il a souvent un panier moyen dans lequel il peut dépenser une certaine somme. Donc plus vous faites de frais sur la partie diagnostic, plus vous êtes satisfait, plus vous êtes précis, meilleur sera votre traitement, mais moins il vous reste de disponibilités financières pour le traitement !* » n° 15 (vétérinaire équin).

- Facteurs imputables au client

En sus de l'aspect financier, trois autres facteurs attribuables aux clients étaient communs aux filières d'étude : la psychologie du client, les habitudes de travail et la sensibilisation à l'antibiorésistance. De nombreux enquêtés (52 sur 66) expliquaient que les éleveurs étaient plus enclins à payer pour un antibiogramme s'ils en comprenaient l'utilité pour la gestion de l'élevage, ou s'ils étaient conscients des problématiques liées à l'antibiorésistance. En filière bovine, 15

vétérinaires sur 20 ont rapporté que les pratiques d'automédication par les éleveurs compromettaient la réalisation d'antibiogramme.

- Facteurs imputables au vétérinaire

Quel que soit le secteur d'activité, l'âge du vétérinaire était soulevé par les enquêtés comme un facteur influençant le recours à l'antibiogramme. Pourtant, à l'analyse des entretiens, aucune différence manifeste de pratique n'apparaissait suivant l'âge des vétérinaires ou leurs années d'exercice. Le facteur supposé par les enquêtés a donc été exprimé par deux autres facteurs : les habitudes du vétérinaire et sa sensibilisation à la problématique de l'antibiorésistance.

➢ *Jeux d'influence entre acteurs*

- Relation avec le client

La décision du recours à l'identification bactérienne et à l'antibiogramme était basée sur un jeu d'acteur bipartite (vétérinaire-éleveur) en filières équine, bovine et porcine, mais tripartite (vétérinaire-éleveur-technicien) en filière avicole. Lorsqu'une infection bactérienne était suspectée en filière avicole, le recours systématique aux examens complémentaires limitait le rôle des vétérinaires dans le processus de décision, car les éleveurs et les techniciens étaient particulièrement favorables au recours aux analyses de laboratoire.

Au cours de beaucoup d'entretiens en filières avicole (9 sur 11) et porcine (13 sur 16), les vétérinaires décrivaient le processus de décision de la façon suivante : le vétérinaire propose, le technicien conseille et l'éleveur paie. En filières équine et bovine, le processus était plus direct : le vétérinaire propose et l'éleveur (le client) accepte et paie. À l'analyse des entretiens il est apparu clairement que les vétérinaires ne proposaient pas seulement l'antibiogramme, au sens simple d'une suggestion. En réalité, les vétérinaires décrivaient comment ils encourageaient leurs clients à accepter le test. Les arguments du vétérinaire étaient cruciaux voire décisifs dans la décision finale du client en filières porcine et avicole.

« *C'est nous qui décidons mais on valide auprès du propriétaire ou du détenteur. On lui explique pourquoi on a envie de le faire, en général si il faut on est assez persuasif* [rire] *il n'a pas trop le choix de dire non !* [Rire] *Bah après c'est une prise de responsabilité quand on explique, les gens ils nous font confiance, ils savent que quand on pense que ça nécessite un examen complémentaire, c'est qui il y a une bonne raison, en général ils adhèrent assez rapidement* » n° 10.

La notion de « confiance » était très souvent utilisée pour justifier le processus de décision du recours à l'antibiogramme. De plus, d'après les enquêtés, l'antibiogramme pouvait soutenir cette confiance car il constituait un moyen pour le vétérinaire de répondre de manière efficace aux

besoins de l'éleveur. En filières équine et bovine (contrairement aux autres), le client pouvait reprocher au vétérinaire de proposer des examens complémentaires, qu'ils soient justifiés ou non. Le vétérinaire pouvait interpréter ce reproche comme une menace pour la relation de confiance établie avec le client. C'est pourquoi certains vétérinaires préféraient ne pas proposer le test.

« *J'étais le jeune vétérinaire qui arrivait de l'université, ou d'une structure comparable à l'université, qui arrivait et il n'était pas capable de faire un diagnostic et de mettre en place un traitement, sans réaliser des prélèvements. Donc, au départ, j'avais baissé* [mon recours aux analyses]*, je proposais presque rien, j'essayais de tout faire avec mes mains et avec mes petits moyens. Maintenant les clients ils me connaissent, ils savent que je ne propose pas tout et n'importe quoi, ils savent que, voilà. Et maintenant je propose plus et ils acceptent, ils acceptent !* » n° 53

- Relation avec le laboratoire

Bien que le laboratoire ne soit pas directement impliqué dans la décision du recours à l'antibiogramme, il jouait un rôle indirect mais déterminant. Les vétérinaires travaillaient généralement avec un seul laboratoire, sélectionné en raison de son expertise et de sa disponibilité. En filières avicole et porcine, après l'autopsie, les employés du laboratoire instruisaient les vétérinaires sur l'identification bactérienne en fonction du profil anatomopathologique. Si une bactérie était isolée, l'antibiogramme était réalisé *de facto*. Dans tous les secteurs, les enquêtés ont mentionné l'importance de la communication avec le laboratoire pour discuter des cas et choisir la stratégie de gestion la plus adaptée. En filières bovine et équine (plus rarement en filière porcine), les enquêtés ont rapporté des difficultés à échanger avec le laboratoire avant et après l'antibiogramme. La disponibilité et les services proposés par le laboratoire (comme l'envoi de rapport complet et clair) étaient des éléments clés du recours à l'antibiogramme.

- Relation entre vétérinaires

Presque tous les vétérinaires interrogés (61 sur 66) ont précisé avoir des pratiques similaires et un recours à l'antibiogramme analogue à leurs confrères partageant la même structure et exerçant dans la même filière de production. Nous avons remarqué que les jeunes vétérinaires adaptaient leurs pratiques à celles de leurs collègues plus expérimentés. Paradoxalement, même si les jeunes générations étaient davantage sensibilisées à l'utilisation de l'antibiogramme, notre étude a mis en évidence qu'ils tentaient de limiter leur recours de manière à s'ajuster aux pratiques de leurs collègues. Ainsi, l'homogénéité entre les pratiques des vétérinaires résultait d'une relation de subordination, des habitudes des vétérinaires et de leur sensibilisation à l'antibiorésistance.

« *Au début mes anciens associés n'en faisaient pas, donc j'étais resté dans leur moule. Après j'ai pris mon autonomie, j'ai pris mes propres décisions. Être patron c'est plus facile* [rire jaune]! » n° 1

1.3.3 Investigation de l'impact du décret relatif à la prescription des AIC et position des vétérinaires

Selon les enquêtés, à quelques exceptions près, le décret n'a pas conduit à une augmentation nette de l'utilisation de l'antibiogramme dans les filières étudiées, mais il a conduit à un changement de pratiques en raison des contraintes de terrain et du temps nécessaire à la réalisation du test. En filière avicole, le décret n'a eu quasiment pas de répercussion car les vétérinaires utilisaient déjà l'antibiogramme pour justifier leur traitement. Les vétérinaires porcins ont revu leur prescription pour les infections urinaires des truies (florfénicol au lieu des fluoroquinolones), pour les diarrhées en post-sevrage et en fin d'engraissement, et quelques-uns ont mentionné faire davantage d'antibiogrammes depuis la publication du décret. En filières bovine et équine, l'analyse a permis de distinguer les vétérinaires qui utilisaient rarement les AIC, de ceux qui les prescrivaient dans plus de 50 % des cas avant le décret. Ces derniers ont drastiquement changé leurs pratiques. Enfin, quelle que soit la filière d'activité, en cas d'urgence, aucun vétérinaire n'aurait attendu le résultat d'antibiogramme avant de prescrire un AIC (une modalité admise par le décret).

1.4 Discussion

Si les tendances principales ont pu être décrites, nous ne pouvons cependant pas quantifier les opinions, ni affirmer que l'ensemble des points de vue existants en France aient été collectés par notre étude. Néanmoins, l'utilisation d'une méthode qualitative, en particulier la réalisation d'entretiens semi-directifs, répond de façon pertinente aux objectifs de l'étude permettant d'investiguer la diversité et la profondeur des opinions des enquêtés [208] et de mieux comprendre comment s'articulent les circonstances, contextes, relations et motivations dans les divers comportements humains. La fiabilité et la validité de nos résultats sont assurées par une approche méthodologique standardisée, une procédure de recrutement rigoureuse, la réalisation d'entretiens individuels, l'établissement de guides d'entretiens testés en amont, et le strict respect des règles d'analyse et d'échantillonnage (triangulation, itération, saturation) [200,207,209]. De fait, nous pouvons extrapoler nos résultats au niveau national pour les filières considérées.

Le processus décisionnel de recours à l'identification bactérienne et à l'antibiogramme est influencé par un panel de facteurs complexes en médecine vétérinaire. De façon logique, certains déterminants sont liés à des facteurs associés à la prescription d'antibiotiques, comme

l'épidémiologie de la maladie, la pression des clients, la sensibilisation à l'antibiorésistance, les habitudes de travail ou les aspects économiques [210–212]. L'importance des jeux d'influence entre parties prenantes dans le processus de décision est indéniable. L'influence s'exerce à trois niveaux : *(i)* individuel (satisfaction personnelle du vétérinaire à utiliser ce test), *(ii)* interpersonnel (entre vétérinaires, entre le vétérinaire et son client ou avec le laboratoire), et *(iii)* organisationnel par le changement des pratiques et l'implémentation de nouvelles règlementations.

1.4.1 Le rôle clé du laboratoire

Par rapport à la densité de laboratoires d'analyses, les zones géographiques et les secteurs d'activité investigués n'étaient pas égaux, les enquêtés travaillant dans l'est de la France rapportant des difficultés à avoir recours à des analyses par manque de laboratoire de proximité. En filière avicole et dans une moindre mesure en filière porcine, le lien historique entre laboratoire d'analyse et cabinet vétérinaire [213] contribue à faciliter le recours aux antibiogrammes, particulièrement dans les zones de forte production comme le Grand-Ouest.

Il était peut-être prévisible que le choix du laboratoire par les vétérinaires serait lié à sa proximité, sa disponibilité [214,215], sa réactivité [216] et le service proposé comme une zone de dépôt ou la participation à l'autopsie. Mais l'analyse a mis en évidence un autre facteur particulièrement pertinent aux yeux des vétérinaires : l'expertise du laboratoire. Ils évaluaient cette expertise au travers des publications du laboratoire, sa communication, les offres proposées et les réponses données aux praticiens en cas de questions sur un cas. Disposer d'un laboratoire avec une expertise constituait pour certains praticiens une condition nécessaire au recours à l'antibiogramme. Afin de faciliter le recours aux analyses de proximité, il apparaît donc judicieux que les laboratoires communiquent activement sur leur panel d'offres et sur leurs compétences techniques auprès des vétérinaires. Mais ce dernier point suscite le débat car le gestionnaire du risque ne s'est pas encore prononcé sur les démarches de qualité, comme des essais interlaboratoires, attestant de la bonne réalisation des antibiogrammes.

Par ailleurs, l'analyse a permis d'identifier des points d'amélioration pour renforcer les liens entre les vétérinaires ruraux et les laboratoires. Au cours des entretiens, les enquêtés ont demandé plus de communication des laboratoires concernant la technique d'antibiogramme, les méthodes de prélèvement et le rapport des résultats. Nous pouvons supposer que les vétérinaires ayant un dialogue facilité avec leur laboratoire sont mieux à même d'expliquer l'antibiogramme aux éleveurs et éventuellement de défendre ses avantages. Echanger avec le laboratoire est également un moyen pour les vétérinaires de compléter un rapport d'analyse qui peut sembler trop concis ou incomplet [216]. Cette étude a montré que les vétérinaires n'étaient pas toujours satisfaits des rapports

d'analyse transmis par les laboratoires car les conclusions quant au choix du traitement n'étaient pas suffisamment claires ou explicites sur les préconisations à tirer en termes de prescription.

1.4.2 Leviers pour faciliter le recours à l'antibiogramme : entre requêtes et réalités de terrain

Quel que soit le secteur investigué, l'augmentation de l'utilisation de l'antibiogramme était souhaitée par les vétérinaires, mais ils sont limités par des contraintes pratiques et financières, qui peuvent expliquer le sentiment de frustration exprimé par certains enquêtés. Après le délai d'analyse, l'aspect financier est un obstacle majeur à l'utilisation de l'antibiogramme en filières équine et bovine. Il ressort clairement de l'analyse que les subventions des laboratoires pharmaceutiques soutiennent financièrement l'utilisation d'antibiogrammes en filières porcine et bovine. Dans ce contexte, de nombreux vétérinaires s'inquiétaient que l'autorité administrative empêche les laboratoires de subventionner une partie des antibiogrammes réalisés. Pour limiter les coûts d'analyse, d'autres alternatives sont envisageables telles que l'assurance en santé animale, les subventions des conseils locaux ou des groupements d'éleveurs, soulignant la possibilité de développer d'autres partenariats.

Cette enquête a souligné l'importance de la sensibilisation des clients à l'utilité des antibiogrammes dans la lutte contre l'antibiorésistance. Les campagnes de communication apparaissent dès lors essentielles pour favoriser leur utilisation. Au cours des dix dernières années, de nombreuses recommandations sur l'usage responsable des antibiotiques et l'utilisation de l'antibiogramme pour une prescription judicieuse et raisonnée ont été produites par des organismes nationaux [217], européens [218,219] et internationaux [220,221]. Notre étude a permis de mettre en évidence que lorsque le recours à l'antibiogramme était fortement conseillé dans les guides de bonnes pratiques des filières (en filière avicole notamment) le recours à ce test était amélioré.

Nos résultats ont mis en exergue le besoin de disposer de techniques plus rapides pour la détermination des profils de résistances en médecine vétérinaire, qui soient reconnues et approuvées par le gestionnaire. L'antibiogramme demeure à l'heure actuelle le seul test d'identification des résistances bactériennes reconnu en santé animale en France. Sur le terrain, le délai d'obtention des résultats, soit 48 heures ou plus [195], limite son usage, en particulier en filières bovine et équine. Ces résultats font écho à des études antérieures réalisées aux Royaume-Uni [210] et aux Pays-Bas [211]. Pour limiter le phénomène de résistance plusieurs auteurs avancent que l'usage de tests rapides des résistances constituerait une solution [222,223]. Différents tests rapides existent d'ores et déjà, mais leurs performances varient et le gain de temps doit être évalué par rapport au risque de sous-estimer la résistance [30].

Après avoir identifié les déterminants du recours à l'antibiogramme qui permettent de mieux comprendre comment ces examens complémentaires s'inscrivent dans la pratique des vétérinaires, la caractérisation du dispositif de surveillance a consisté en l'étude de sa représentativité qui inclue l'évaluation de la couverture du dispositif de surveillance.

2. Représentativité et couverture du Résapath

2.1 Objectifs spécifiques

À sa création en 1982, le réseau d'épidémiosurveillance de l'antibiorésistance des bactéries pathogènes animales était uniquement dédié au suivi des résistances chez les bovins et portait à cette époque le nom de Resabo, pour réseau bovin [224]. En 2001, le réseau a étendu son périmètre de surveillance aux volailles (poulet, dinde, canard principalement) et aux porcs et a pris alors le nom de Résapath. Six ans plus tard, en 2007, le Résapath s'est déployé encore davantage en incluant la surveillance des résistances chez l'ensemble des espèces animales (ovins, caprins, carnivores domestiques, équins, lapins, poissons, animaux de parcs zoologiques, etc.)

Bien qu'étant le seul dispositif de surveillance de l'antibiorésistance en santé animale en France, le Résapath ne regroupe pas tous les laboratoires français réalisant des antibiogrammes à partir de prélèvements d'animaux (Figure 9). Depuis sa création, le nombre de laboratoires adhérents et par conséquent le nombre d'antibiogrammes collectés par le Résapath a constamment augmenté. En 2007, le Résapath comptait 51 laboratoires adhérents transmettant près de 13 000 antibiogrammes. En 2015, ce dispositif incluait 74 laboratoires ayant transmis au cours de l'année plus de 40 000 antibiogrammes.

Face à cette montée en puissance du dispositif, il semble important de s'interroger sur la représentativité de la surveillance exercée par le réseau, par espèce et sur le plan géographique [225–227]. Afin de répondre à ses objectifs de caractérisation de la dynamique d'évolution de l'antibiorésistance, le Résapath devrait couvrir une proportion suffisante et représentative des antibiogrammes réalisés en France en médecine vétérinaire [227,228]. La représentativité indique si un système de surveillance décrit avec justesse la survenue d'événements sous surveillance au fil du temps ou à l'échelle spatiale [229]. En sus, la couverture, qui indique la proportion de la population incluse dans le système de surveillance, permet d'en évaluer l'efficience et la précision [228,230,231]. Le but de l'étude était double : estimer par filière le rapport entre le nombre d'antibiogrammes réalisés par les laboratoires du Résapath et le nombre total d'antibiogrammes

réalisés en médecine vétérinaire en France, d'une part, et évaluer la couverture géographique du Résapath par rapport aux effectifs d'animaux d'autre part.

2.2 Matériel et méthode : analyse populationnelle

Le nombre d'antibiogrammes réalisés en laboratoires d'analyses par filière animale en France a été estimé par questionnement de l'ensemble des laboratoires susceptibles de réaliser des antibiogrammes en santé animale. La période d'étude retenue était l'année 2015 (1er janvier au 31 décembre 2015), les données de l'année 2016 n'étant pas encore transférées au Résapath par tous les laboratoires adhérents au moment de l'enquête.

La première étape de recherche a consisté à faire l'inventaire des laboratoires d'analyses vétérinaires français en 2015. Les laboratoires ont été recherchés sur plusieurs moteurs de recherche (Yahoo®, Google®) sur internet (mots recherchés : « laboratoire », « analyses », « vétérinaire », « antibiogramme », « santé animale » ou « animaux », en faisant varier les espèces animales et les départements français), dans l'Annuaire Roy (http://www.lepointveterinaire.fr/ roy/consulter.html), par des discussions avec des professionnels de laboratoires, ainsi que des investigations auprès de vétérinaires praticiens. Les laboratoires non-adhérents au Résapath ont ensuite été contactés individuellement par mail et/ou par téléphone pour savoir s'ils réalisaient ou non des antibiogrammes. Pour les laboratoires d'analyses vétérinaires adhérents au réseau, le nombre d'antibiogrammes réalisés en 2015 pour chaque espèce animale a été calculé à partir des données collectées en routine par le réseau (conformément à la charte d'adhésion au Résapath, les laboratoires d'analyses membres transmettent l'intégralité des résultats des antibiogrammes qu'ils réalisent en contexte pathologique). Parallèlement, les laboratoires d'analyses vétérinaires réalisant des antibiogrammes et non-adhérents au Résapath ont été sollicités pour transmettre ces mêmes informations. L'ensemble des antibiogrammes réalisés par les laboratoires ont été considérés, indépendamment de la méthode d'évaluation de la résistance utilisée.

In fine, pour chaque filière animale pour l'année 2015, le rapport entre le nombre d'antibiogrammes recensés par le Résapath et le nombre total estimé d'antibiogrammes réalisés en France métropolitaine a été calculé.

La représentativité s'approche en étudiant la couverture de la population cible par le dispositif de surveillance. La population cible, lorsque l'on s'intéresse à la proportion de souches résistantes, est constituée par la population d'animaux malades présentant une infection bactérienne. Cette population n'étant pas connue, l'hypothèse est faite que les fractions d'animaux malades et d'animaux malades faisant l'objet d'un prélèvement pour antibiogramme sont homogènes par espèce animale sur le territoire national. Sous cette hypothèse, la distribution géographique des

animaux par filière a été confrontée à la répartition des lieux des prélèvements ayant fait l'objet des antibiogrammes collectés par le Résapath (ou de la localisation du laboratoire d'analyse par imputation quand le lieu de prélèvement n'était pas disponible). Les données relatives aux populations animales ont été recherchées dans des bases de données publiques et parapubliques (Agreste, Base de Données Nationale d'Identification (BDNI), Institut français du cheval et de l'équitation, France AgriMer) et privées (Chambre syndicale des fabricants d'aliments préparés pour animaux familiers), Comité interprofessionnel du canard à rôtir). Les données disponibles les plus récentes ont été utilisées. L'échelle spatiale disponible la plus petite a été retenue pour cartographier ces effectifs. Le nombre d'antibiogrammes collectés par espèce animale par le Résapath a été calculé pour l'année 2015 à une échelle en concordance avec celle des effectifs populationnels. Les données ont été traitées à l'aide des logiciels Toad for MySQL et Excel. Les cartes ont été construites à l'aide du logiciel R (R Core Team 2016).

2.3 Résultats

Au total, 125 laboratoires d'analyses vétérinaires réalisant potentiellement des antibiogrammes ont été identifiés en France métropolitaine pour l'année 2015. Parmi ces laboratoires, 74 étaient adhérents au Résapath et 51 ne l'étaient pas. Au sein des 74 laboratoires adhérents, deux laboratoires n'ont pas transmis de résultats d'antibiogrammes pour l'année 2015. Parmi les 51 laboratoires non-adhérents, 38 réalisaient des antibiogrammes en médecine vétérinaire. Parmi ces 38 laboratoires, 37 ont accepté de communiquer le nombre d'antibiogrammes réalisés par espèce animale en 2015 (Tableau 12). En définitive, nous disposions des statistiques de 109 laboratoires sur les 112 réalisant des antibiogrammes en France en 2015.

Tableau 12 : Nombre d'antibiogrammes réalisés par les 72 laboratoires adhérents au Résapath et par les 37 laboratoires vétérinaires non-adhérents ayant fourni leurs nombres d'antibiogrammes réalisés en 2015

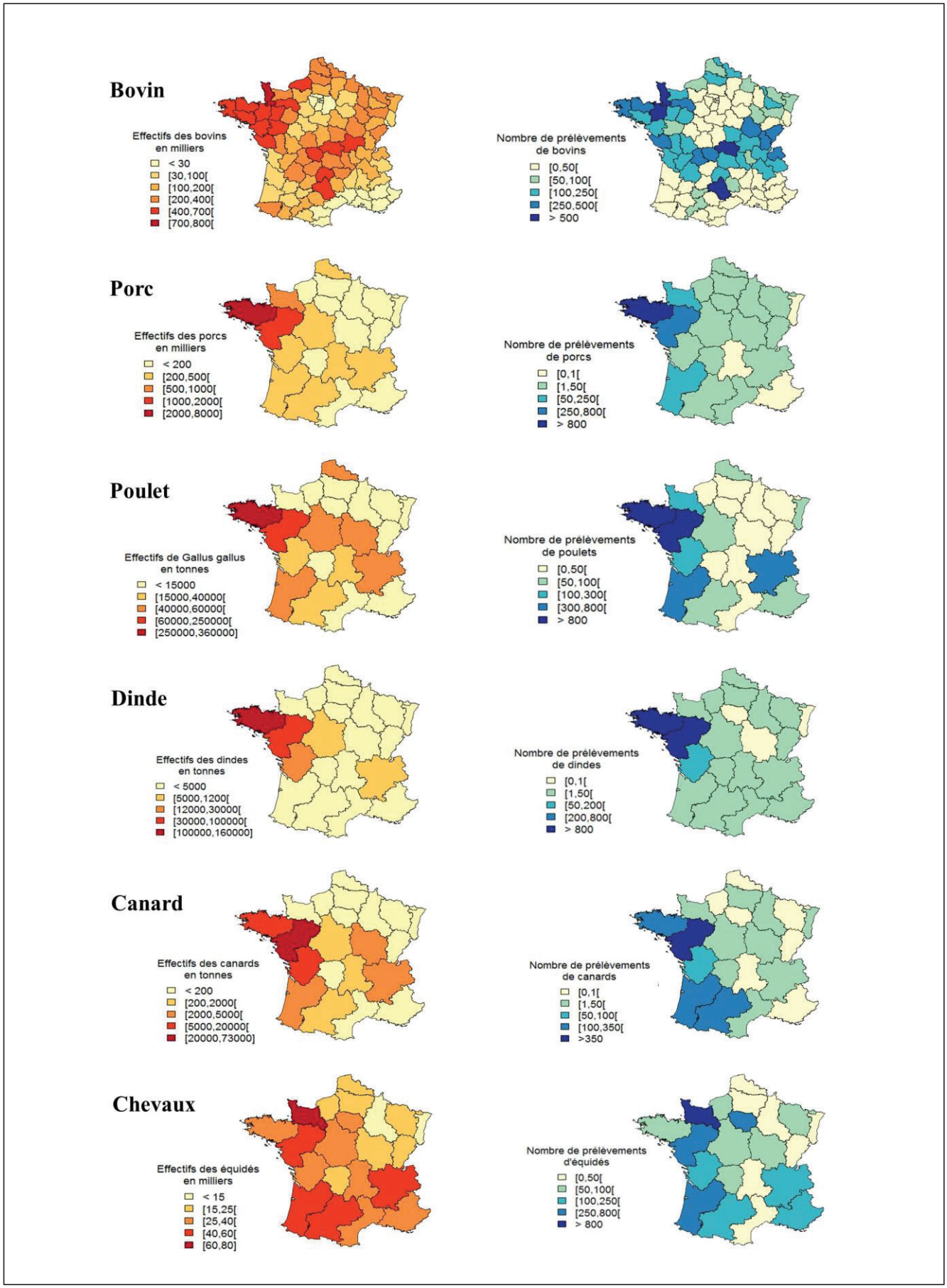
Antibiogramme	Nombre d'antibiogrammes réalisés (proportion par rapport au total, en %)							
	Total	Bovin	Porcin	Avicole	Equin	Chien-Chat	Ovin-Caprin	NAC[1]
Soumis au Résapath	43 972 (62)	10 402 (70)	3 309 (90)	13 210 (62)	3 480 (60)	9 733 (50)	1 407 (70)	2 431 (67)
Non soumis au Résapath	26 593 (38)	4 534 (30)	361 (10)	8 072 (38)	2 291 (40)	9 557 (50)	588 (30)	1 190 (33)
Total	*70 565*	*14 936*	*3 670*	*21 282*	*5 771*	*19 290*	*1 995*	*3 621*

[1] Nouveaux animaux de compagnie

Au total en 2015, la proportion estimée d'antibiogrammes réalisés en médecine vétérinaire et collectés par le Résapath était très élevée en filière porcine (90 %) et plus faible en filières équine (60 %) et avicole (62 %). La proportion calculée la plus faible concernait les animaux de compagnie, chiens et chats : 50 % des antibiogrammes réalisés en France étaient collectés par le Résapath en 2015.

La couverture géographique du Résapath a été mise en regard des effectifs de la population animale pour évaluer sa représentativité (Figure 12). L'imputation des données manquantes concernant les lieux de prélèvements des antibiogrammes a concerné majoritairement les filières porcine (imputation nécessaire pour 50 % des données disponibles) et bovine (imputation pour 14 % des données). La couverture géographique du Résapath était très bonne chez les bovins et les porcs. Chez les chevaux, la couverture était satisfaisante, malgré une sous-représentation dans le Nord, en Auvergne et en Languedoc-Roussillon. Concernant la couverture géographique pour les volailles, elle était bonne avec néanmoins une sous-représentation pour le Centre et la Bourgogne chez l'espèce *Gallus gallus* et une surreprésentation du Sud-Ouest pour les canards. Pour les chiens et les chats (cartes non fournies pour des raisons de confidentialité), la représentativité était également bonne, en dépit d'une surreprésentation en Provence-Alpes-Côte-d'Azur et en région parisienne.

Figure 12 : Effectifs d'animaux (à gauche) et nombre d'antibiogrammes collectés par le Résapath (à droite) en 2015, par filière animale et par département ou région (découpage administratif avant 2015)



2.4 Limites de l'étude

Cette étude réalisée pour l'année 2015 a montré que le Résapath recueille, pour toutes les filières considérées, au moins la moitié des antibiogrammes réalisés en France, avec des variations de 50 à 90 % selon les différentes filières et espèces animales. La précision de ces résultats doit néanmoins être nuancée. La comptabilisation du nombre d'antibiogrammes réalisés par les laboratoires adhérents au Résapath est faite à l'antibiogramme près grâce au système d'information du réseau. En revanche, les résultats transmis par les laboratoires non-adhérents étaient d'une précision variable, certains transmettant des données à l'antibiogramme près, d'autres fournissant un chiffre approximatif à la dizaine ou à la centaine près. De fait, une incertitude existe autour du nombre d'antibiogrammes réalisés par les laboratoires non-adhérents. Malgré un biais imputable à la précision, l'incertitude sur la couverture du réseau reste vraisemblablement limitée.

Cette étude s'est intéressée au nombre d'antibiogrammes réalisés par des laboratoires d'analyses vétérinaires, identifiés comme tels. Mais il existe éventuellement d'autres structures réalisant des antibiogrammes en santé animale : les laboratoires de biologie médicale même s'ils ne sont légalement plus habilités à réaliser des analyses sur des prélèvements d'origine animale depuis 2013, certains cabinets et cliniques vétérinaires. Toutefois, le nombre d'antibiogrammes réalisés par ces différentes structures est vraisemblablement marginal voire anecdotique pour la plupart des espèces.

La mise en perspective de la couverture géographique du Résapath avec la distribution estimée des populations animales a permis d'approcher la représentativité du Résapath, qui peut être considérée globalement bonne en 2015. Notons toutefois que pour certains laboratoires adhérents au Résapath les lieux de prélèvements des antibiogrammes réalisés n'étaient pas connus et ont dû être imputés à la localisation du laboratoire d'analyse. Bien que très vraisemblable en raison des pratiques d'analyse généralement locales et de l'échelle d'étude large choisie, cette hypothèse constitue néanmoins une source d'incertitude sur la répartition des antibiogrammes recueillis par le réseau. En sus, pour certaines filières, les données d'effectifs et de répartition des populations animales ont une fiabilité relative pouvant être à l'origine de biais dans l'estimation de la représentativité. La population d'équidés, par exemple, est vraisemblablement surestimée dans les régions à effectifs élevés où toutes les mortalités ne sont pas comptabilisées. De plus, leurs localisations géographiques restent incertaines car approximées à partir de la localisation du détenteur. En production de volailles, la distribution des animaux est basée sur des estimations d'effectifs en fonction de la capacité des bâtiments et pour les animaux de compagnie la répartition régionale est approchée par sondage.

Il est également vraisemblable que le recours à l'antibiogramme soit hétérogène par filière selon les régions en raison de pratiques vétérinaires ou de spécificités de clientèles ou d'élevage, biaisant potentiellement l'indicateur de représentativité utilisé, le rapport entre le nombre d'antibiogrammes et la taille estimée de la population. Par ailleurs, pour les équidés, les chiens et les chats, le lieu de prélèvement pour l'antibiogramme ne correspond pas forcément au lieu de vie de l'animal, les clients se déplaçant potentiellement pour rencontrer des spécialistes. Cet élément pourrait par exemple expliquer la surreprésentation de la région parisienne pour les chiens et les chats. En outre, la présence d'élevages de volailles de valeur à fort potentiel pourrait influer sur le recours aux analyses dans les zones géographiques où ils se situent. Il est également envisageable que dans les zones de forte densité animale, en Bretagne pour le porc par exemple, le recours à l'antibiogramme soit plus fréquent en raison d'une densité plus élevée de laboratoires d'analyses.

Dans la littérature, la proportion adéquate de couverture d'un dispositif de surveillance événementielle n'est pas documentée par un seuil fixe et précis, surtout qu'elle est relative à la prévalence de l'événement surveillé. Néanmoins, un taux de couverture proche de 75 % est généralement considéré comme satisfaisant [228,232]. Aussi pour certaines filières, la couverture du Résapath pourrait-elle être encore étendue.

2.5 Perspectives

Menée pour l'année 2015, cette étude mériterait d'être réitérée de façon régulière pour suivre la couverture du Résapath dans un contexte règlementaire et sociétal changeant, pouvant favoriser le développement de nouveaux laboratoires ou bien amener les laboratoires existants à se spécialiser ou à se regrouper. Idéalement, la couverture d'un dispositif de surveillance événementielle devrait être la plus constante possible pour permettre de caractériser les évolutions, détecter les émergences ou les spécificités régionales, et stable au fil du temps pour permettre une interprétation des séries chronologiques [228,230].

Depuis 2016, le Résapath n'a pas intégré de nouveaux laboratoires en raison de limites matérielles, financières et de personnels. Cette étude met en évidence le potentiel de développement du Résapath et permet d'envisager l'évolution du réseau pour couvrir de manière plus homogène les différentes filières et les différentes régions. Parmi les laboratoires non-adhérents identifiés réalisant des antibiogrammes, plus de la moitié sont sur liste d'attente pour intégrer le réseau. Ainsi, l'expansion du Résapath doit nécessairement être raisonnée en fonction des objectifs propres du réseau et des aides qui pourront être allouées pour soutenir son développement.

BILAN

L'enquête sociologique et l'analyse populationnelle ont apporté des informations indispensables pour caractériser le dispositif de surveillance et évaluer sa représentativité. En conclusion, puisque la représentativité et la couverture du Résapath sont satisfaisantes, les données collectées pourront être utilisées dans nos recherches pour caractériser le phénomène d'antibiorésistance en santé animale. L'enquête sociologique a objectivé l'existence de biais de sélection imputables aux différents facteurs de recours à l'antibiogramme. En filière avicole, comme le recours à l'antibiogramme est quasi-systématique, les résultats obtenus à partir des données de surveillance reflètent les niveaux de résistance des pathogènes rencontrés. En filières équine et bovine, les analyses complémentaires ne sont pas systématiques et l'antibiogramme est davantage réalisé dans des contextes pathologiques ou épidémiologiques particuliers. En filière équine, les antibiogrammes sont principalement réalisés lors d'infections récidivantes ou chroniques. Ce biais existe également en filière bovine, l'antibiogramme étant davantage réalisé lors d'infections récidivantes, pour les vaches laitières par exemple, ou lorsque plusieurs animaux sont atteints comme lors de diarrhées chez des veaux. Ces éléments nous permettent d'orienter nos recherches en pointant l'importance de stratifier les données de surveillance par espèces animales et types de production, voire, si possible, par pathologies, pour associer entre elles des données de même nature et en tirer des conclusions correctes d'un point de vue biologique. C'est à l'aune de ces premiers résultats que la caractérisation de l'antibiorésistance à partir des données du Résapath est envisageable.

Chapitre II - Caractérisation de l'antibiorésistance à partir des données du Résapath : possibilités et limites

Ce chapitre s'attache dans un premier temps à décrire les données colligées par le Résapath, avant de les utiliser pour caractériser l'antibiorésistance en santé animale.

A- Questions de recherche et objectifs

Pour la caractérisation de l'antibiorésistance en santé animale, les données collectées par le Résapath apparaissent comme un matériel de recherche de choix. Toutefois, le recours à l'antibiogramme étant entaché de différents biais, des stratifications de données sont nécessaires lors des analyses pour pouvoir tirer des conclusions correctes d'un point de vue biologique. Mais les résultats d'antibiogrammes collectés permettent-ils de caractériser les résistances pour toutes les espèces animales ? Pour quelles principales bactéries pathogènes les données de surveillance pourront-elles être utilisées pour caractériser les résistances aux antibiotiques ? Quels indicateurs de la résistance est-il possible de surveiller à partir des données du Résapath et à quelle échelle géographique ?

L'objectif consiste ici à faire une brève description des données de surveillance collectées par le Résapath, pour ensuite caractériser l'antibiorésistance en santé animale à partir des résultats d'antibiogrammes collectés et enfin établir les potentiels et limites des données de surveillance pour répondre à la problématique de recherche.

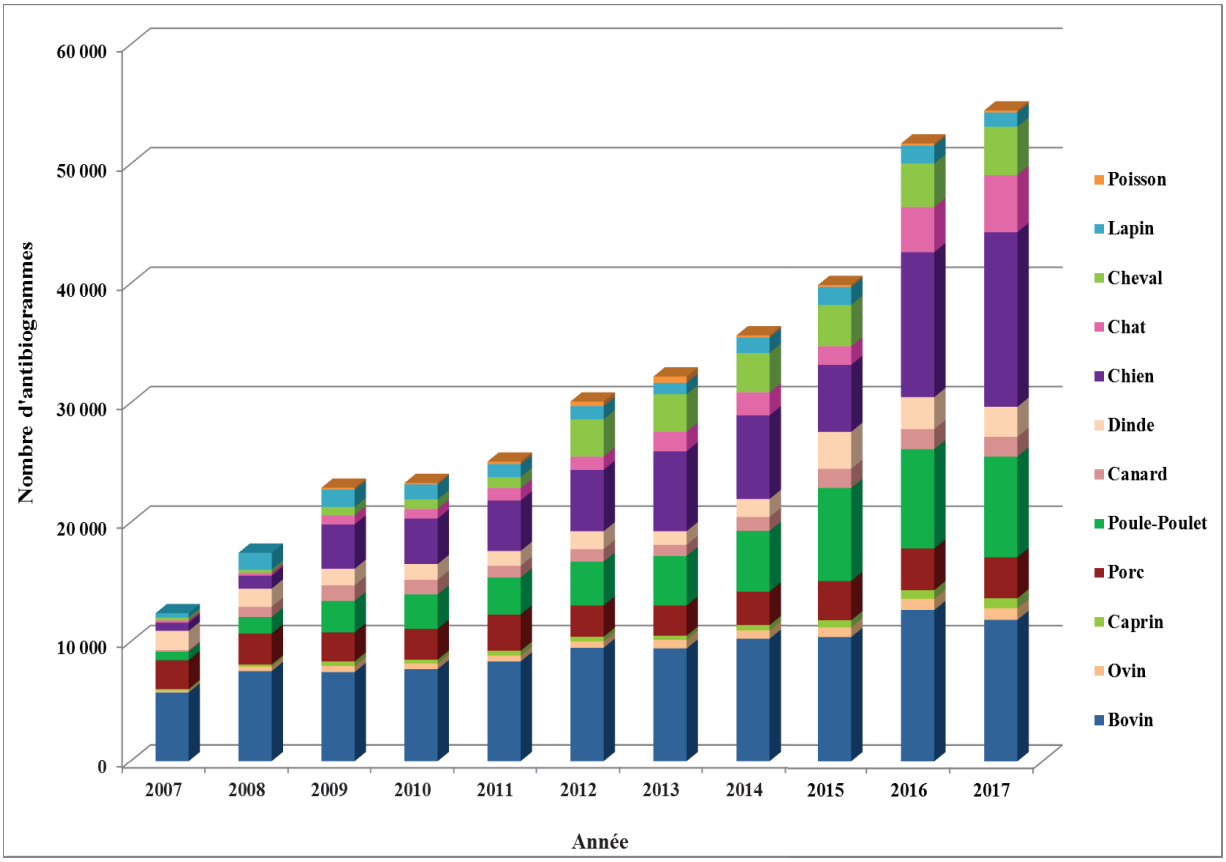
B- Les données collectées par le Résapath

Le nombre d'antibiogrammes collectés par le réseau a fortement progressé au cours du temps comme l'illustre la Figure 13 ci-après : un peu plus de 10 000 antibiogrammes en 2007, contre plus de 55 000 en 2017.

Pour chaque antibiogramme, les informations connexes collectées comprennent : la bactérie isolée (genre bactérien et/ou espèce bactérienne), les diamètres d'inhibition mesurés vis-à-vis des différents antibiotiques testés en millimètres, l'espèce animale à l'origine du prélèvement, le type de production pour les filières industrielles, la classe d'âge de l'animal, la nature du prélèvement (par exemple lait ou liquide de lavage broncho-alvéolaire), la pathologie suspectée par le vétérinaire, le département du lieu de prélèvement, la date du prélèvement au jour ou au mois suivant les filières.

Parmi ces variables, certaines sont systématiquement renseignées par les laboratoires (bactérie isolée, diamètres d'inhibition vis-à-vis des principaux antibiotiques testés, espèce animale à l'origine du prélèvement, date du prélèvement), tandis que d'autres le sont de façon moins systématique (en particulier le lieu géographique du prélèvement).

Figure 13 : Evolution du nombre d'antibiogrammes collectés par le Résapath par espèce animale de 2007 à 2017



E. coli est la bactérie pathogène la plus fréquemment isolée en santé animale d'après les données du Résapath (Tableau 13). Toutefois, des différences existent entre espèces animales et les contextes pathologiques sous-jacents peuvent être pluriels et dépendre de la classe d'âge de l'animal, par exemple colibacilloses digestives pour les veaux *versus* mammites colibacillaires pour les vaches laitières. Chez le cheval et le chien, espèce animales prises en exemple par la suite dans ce chapitre, *E. coli* n'est que le deuxième pathogène le plus fréquemment isolé.

Tableau 13 : Bactéries ou genres bactériens les plus fréquemment isolés en contexte pathologique par espèce animale d'après les résultats d'antibiogrammes collectés par le Résapath en 2017

Espèce animale	Bactérie la plus fréquente (nombre d'antibiogrammes)	Seconde bactérie la plus fréquente (nombre d'antibiogrammes)
Bovin	*E. coli* (6 464)	*Streptococcus uberis* (1 321)
Ovin	*E. coli* (403)	*Pasteurella* (350)
Caprin	*E. coli* (283)	*Pasteurella* (190)
Chien	*Staphylococcus* à coagulase positive (4 079)	*E. coli* (2 738)
Chat	*E. coli* (1 357)	*Staphylococcus* à coagulase négative (614)
Cheval	*Streptococcus* (1 376)	*E. coli* (694)
Dinde	*E. coli* (1 640)	*Ornithobacterium rhinotracheale* (613)
Canard	*E. coli* (1 184)	*Riemerella anatipestifer* (180)
Poule	*E. coli* (7 017)	*Enterococcus cecorum* (448)
Porc	*E. coli* (1 874)	*Streptococcus suis* (518)
Lapin	*Pasteurella multocida* (325)	*E. coli* (300)

C- Caractérisation de la résistance à partir des données de surveillance : exemples en filières équine et canine

La résistance d'une bactérie peut être objectivée vis-à-vis de chaque antibiotique pris séparément, on parle alors de monorésistance, ou vis-à-vis de plusieurs antibiotiques de façon simultanée, on parle alors d'associations de résistances ou de multi-résistance.

1. Caractérisation des monorésistances chez les bactéries isolées de chevaux

L'objectif était d'estimer la résistance des bactéries isolées de chevaux sur la période 2012-2016 dans différents contextes pathologiques.

1.1 Traitement et analyse des données

Les résultats d'antibiogrammes collectés de janvier 2012 à décembre 2016 en filière équine ont été extraits de la base du Résapath. L'analyse s'est focalisée sur les cinq principales souches bactériennes collectées sur la période. Pour chaque bactérie (ou genre bactérien si l'espèce n'était pas disponible), la résistance a été estimée vis-à-vis d'antibiotiques d'intérêt commun en médecines vétérinaire et humaine.

Conformément aux seuils recommandés par la section vétérinaire du CA-SFM [233], nous avons classé les isolats comme sensibles (S), intermédiaires (I) ou résistants (R) à partir de la mesure de leur diamètre d'inhibition. D'un point de vue épidémiologique, l'événement d'intérêt est la non-sensibilité de l'agent pathogène à l'antibiotique testé : la bactérie isolée n'est plus une souche sauvage. Par conséquent, les isolats intermédiaires ont été regroupés avec les isolats résistants. Dans la suite du manuscrit, toutes les analyses décrites ont suivi ce même traitement des données. L'indicateur de la résistance a été défini, pour chaque combinaison bactérie-antibiotique, comme la proportion de souches résistantes vis-à-vis d'un antibiotique ; cette proportion est calculée selon la formule suivante pour un instant *t* :

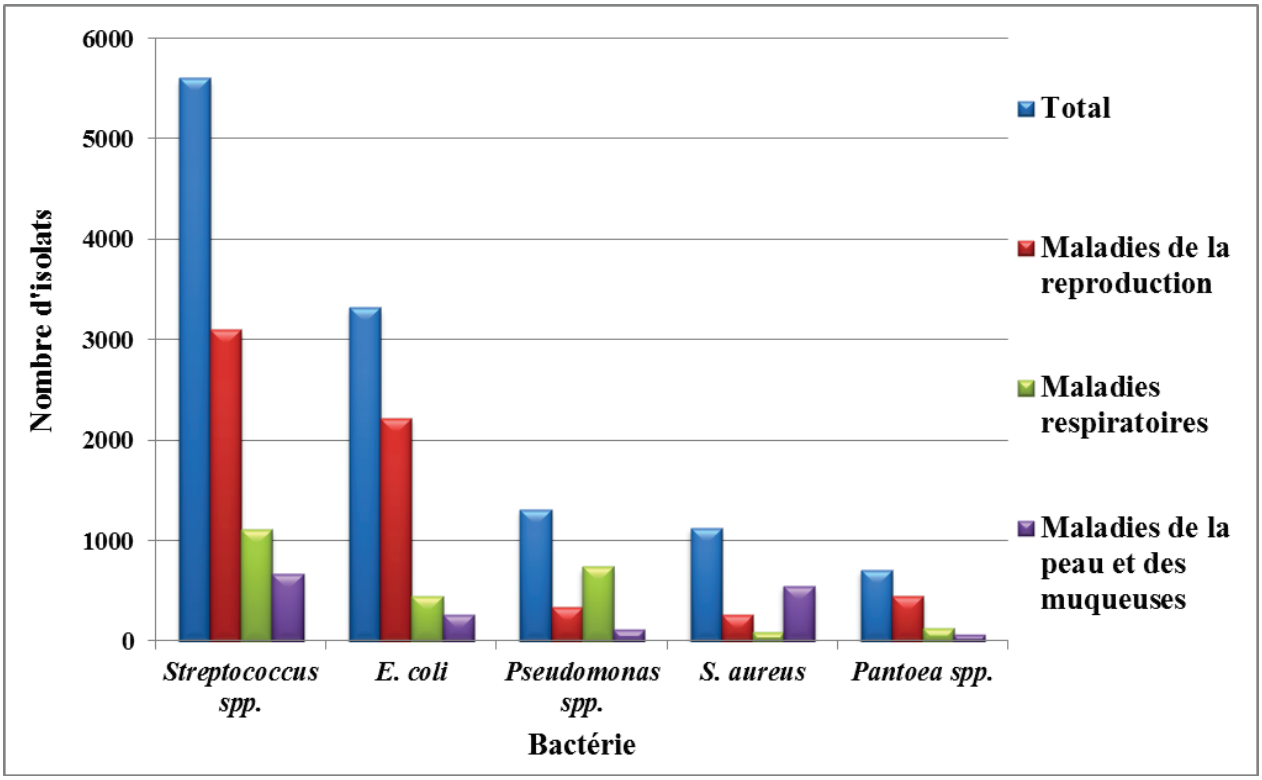
$$\frac{\text{nombre de souches résistantes}}{\text{nombre total de souches collectées}}$$

Pour chaque espèce bactérienne, considérant que les pratiques de recours à l'antibiogramme diffèrent en fonction de la pathologie en cause, les proportions de souches résistantes ont été calculées pour chaque pathologie, puis comparées en utilisant le test exact de Fisher. Une valeur de $p \leq 0,05$ a été considérée comme statistiquement significative.

1.2 Résultats

Au total, 12 076 résultats d'antibiogrammes ont été analysés sur la période 2012-2016. Les cinq bactéries les plus fréquemment isolées de chevaux malades étaient : *Streptococcus spp.* (46,4 % des données), *E. coli* (27,5 %), *Pseudomonas spp.* (10,9 %), *Staphylococcus aureus* (9,3 %) et *Pantoea spp.* (5,9 %, genre bactérien de la famille des *Enterobacteriaceae*, séparé du genre *Enterobacter*). Les isolats provenaient de trois principaux contextes pathologiques : maladies de la reproduction, maladies respiratoires et maladies de la peau et des muqueuses (Figure 14).

Figure 14 : Nombre d'isolats collectés pour les cinq bactéries les plus fréquemment isolées de chevaux sur la période 2012-2016 en France d'après les données du Résapath



Chez *Streptococcus spp.*, les proportions de résistance les plus élevées étaient identifiées pour les maladies de la reproduction, à l'exception de la résistance aux sulfamides-triméthoprime et à l'oxacilline (Tableau 14). De façon similaire pour *S. aureus,* les proportions estimées pour les maladies de la reproduction étaient généralement les plus élevées. Au contraire, pour *E. coli* et *Klebsiella spp.*, les proportions de résistance estimées en contexte de maladies de la reproduction étaient les plus faibles. Pour *Pantoea spp.* les proportions de résistances étaient nulles ou quasi-nulles, quel que soit le contexte pathologique considéré.

Tableau 14 : Proportion de résistance (en %) des souches isolées de chevaux sur la période 2012-2016 par pathologie et comparaisons entre proportions

Bactérie	Antibiotique	Proportion de résistance par maladie (%)			p-value pour chaque combinaison binaire		
		Reproduction	Respiratoire	Peau et muqueuses	Reproduction *versus* Respiratoire	Reproduction *versus* peau et muqueuses	Respiratoire *versus* peau et muqueuses
Streptococcus spp.	Oxacilline	1,2	1,6	1,2	0,7	0,9	0,5
	Erythromycine	10,7	3,6	6,2	<0,001	<0,001	0,01
	Gentamicine	1,4	0,5	0,8	0,02	0,3	0,5
	Enrofloxacine	70,3	65,7	69,7	0,005	0,7	0,08
	Tetracycline	64,6	54,8	61,4	<0,001	0,1	0,007
	SXT*	7,8	10,5	6,2	0,01	0,2	0,003
E. coli	Amoxicilline	37,5	52,0	48,7	<0,001	<0,001	0,4
	Ceftiofur	4,5	10,3	15,4	<0,001	<0,001	0,05
	Gentamicine	5,3	11,2	22,1	<0,001	<0,001	<0,001
	Enrofloxacine	1,7	5,1	14,8	<0,001	<0,001	<0,001
	Tétracycline	18,4	23,2	35,6	0,03	<0,001	<0,001
	SXT*	21,0	28,6	45,0	0,002	<0,001	<0,001
S. aureus	Penicilline G	57,1	42,4	36,5	0,02	<0,001	0,3
	Céfoxitine	29,6	18,1	19,3	0,04	0,002	0,9
	Erythromycine	6,0	5,4	6,1	1	1	1
	Gentamicine	37,6	14,1	16,4	<0,001	<0,001	0,6
	Enrofloxacine	1,5	4,5	2,7	0,1	0,3	0,3
	Tétracycline	45,1	15,1	18,8	<0,001	<0,001	0,5
	SXT*	5,8	4,9	4,8	1	0,6	1
Pseudomonas spp	Gentamicine	12,9	31,3	14,5	<0,001	0,05	<0,001
	Enrofloxacine	50,1	33,6	63,3	<0,001	0,01	<0,001
Pantoea spp	Ceftiofur	0,0	0,4	0,0	1	1	1
	Gentamicine	0,0	0,0	0,0	1	1	1
	Enrofloxacine	0,0	0,0	0,0	1	1	1
	Tétracycline	0,0	0,0	0,0	1	1	1
	SXT*	0,0	0,0	0,0	1	1	1

*sulfamides-triméthoprime

1.3 Discussion

Les différences observées de niveaux de résistance des bactéries suivant le contexte pathologique sont vraisemblablement le reflet de pratiques thérapeutiques sous-jacentes.

Dans la littérature, les études sur l'épidémiologie de la résistance des bactéries pathogènes des chevaux sont rares [234] et se sont principalement focalisées sur les SARM et les *E. coli* productrices de BLSE en raison de leur potentiel zoonotique et des limites thérapeutiques pour ces bactéries [235]. La prévalence du SARM chez les chevaux serait comprise entre 0 et 7 % et les chevaux hospitalisés seraient plus à risque [236,237]. Dans notre étude, en dépit d'investigations génétiques pour confirmer la présence du gène de résistance, la proportion de *S. aureus* phénotypiquement résistants à la méthicilline était élevée, entre 18,1 % [10,5 ; 28,0] et 29,6 % [23,9 ; 35,8] de résistance à la céfoxitine. Même si cette approximation est clairement une surestimation de la proportion réelle de SARM, nos résultats indiquent qu'il n'est pas anecdotique d'isoler des SARM de chevaux infectés en France, ce qui est particulièrement préoccupant. Ces résultats concordent avec une précédente étude française estimant la proportion d'isolats de SARM à 6,1 % [4,9 ; 7,5] dans les infections de chevaux sur la période 2007- 2013 [238].

Les études sur la résistance des souches de *Pseudomonas spp.* en santé animale sont rares et concernent principalement les isolats de chiens et de chats [239,240]. Nos résultats ont démontré que *Peudomonas spp.* était fréquemment isolé de chevaux (10,9 % des souches analysées sur la période 2012-2016, soit 1 313 isolats), soulignant son importance en tant que pathogène équin. Par ailleurs, ils témoignent des difficultés à traiter les infections à *Pseudomonas* : la résistance à la gentamicine était modérée à élevée suivant le contexte pathologique et les fluoroquinolones ne peuvent pas être utilisées en première intention.

Enfin, nos résultats constituent la première exploration de la résistance des souches de *Pantoea spp.* isolées de chevaux. *Pantoea spp* était le troisième pathogène bactérien le plus fréquemment isolé de maladies de la reproduction en France sur la période 2012-2016 et ses niveaux de résistances étaient nuls ou quasi-nuls contrairement aux autres *Enterobacteriaceae* étudiés.

Les résultats d'antibiogrammes collectés chez les chevaux ont permis la caractérisation des monorésistances des bactéries pathogènes équines isolées suite à un antibiogramme. Mais les données de surveillance peuvent également servir à estimer les niveaux de résistance simultanée vis-à-vis de plusieurs antibiotiques.

2. Caractérisation de la multirésistance

2.1 Objectif spécifique

Pour caractériser une résistance et statuer sur son importance, il faut également tenir compte des associations de résistance en particulier de la multirésistance. En 2011, un groupe d'experts internationaux s'est réuni pour formuler une définition standardisée de la multirésistance [241] : elle est définie comme l'acquisition d'une non-susceptibilité à au moins trois antibiotiques de classes différentes.

De fait, l'objectif a consisté à caractériser la multirésistance à partir des résultats d'antibiogrammes collectés chez le chien et à décrire sa distribution spatiale en France. Etant donné qu'en médecine individuelle, l'enquête sociologique a montré que le recours à l'antibiogramme était plus usité pour les infections récidivantes ou chroniques, l'analyse a porté sur la résistance de *Staphylococcus pseudintermedius*, la bactérie la plus fréquemment isolée d'otites canines - infections récidivantes parmi les plus fréquentes du chien [242–244].

2.2 Méthode

Les résultats d'antibiogrammes des souches de *S. pseudintermedius* isolées de chiens avec otites de janvier 2012 à décembre 2016 ont été extraits de la base du Résapath et les isolats ont été catégorisés et traités en utilisant comme précédemment les seuils du CA-SFM. L'analyse de la multirésistance a été réalisée sur six classes d'antibiotiques d'intérêt commun en médecines vétérinaire et humaine (Tableau 15). Pour caractériser la distribution spatiale des niveaux de multirésistance, les proportions de multirésistance ont ensuite été calculées et cartographiées par région. Quand le lieu de prélèvement n'était pas disponible, il a été imputé à la localisation (région) du laboratoire d'analyse ayant fourni le résultat d'antibiogramme. Les intervalles de confiances à 95 % des proportions estimées ont été calculés avec la méthode binomiale exacte. Les analyses et représentations graphiques ont été réalisées à l'aide du logiciel R (R Core Team 2017).

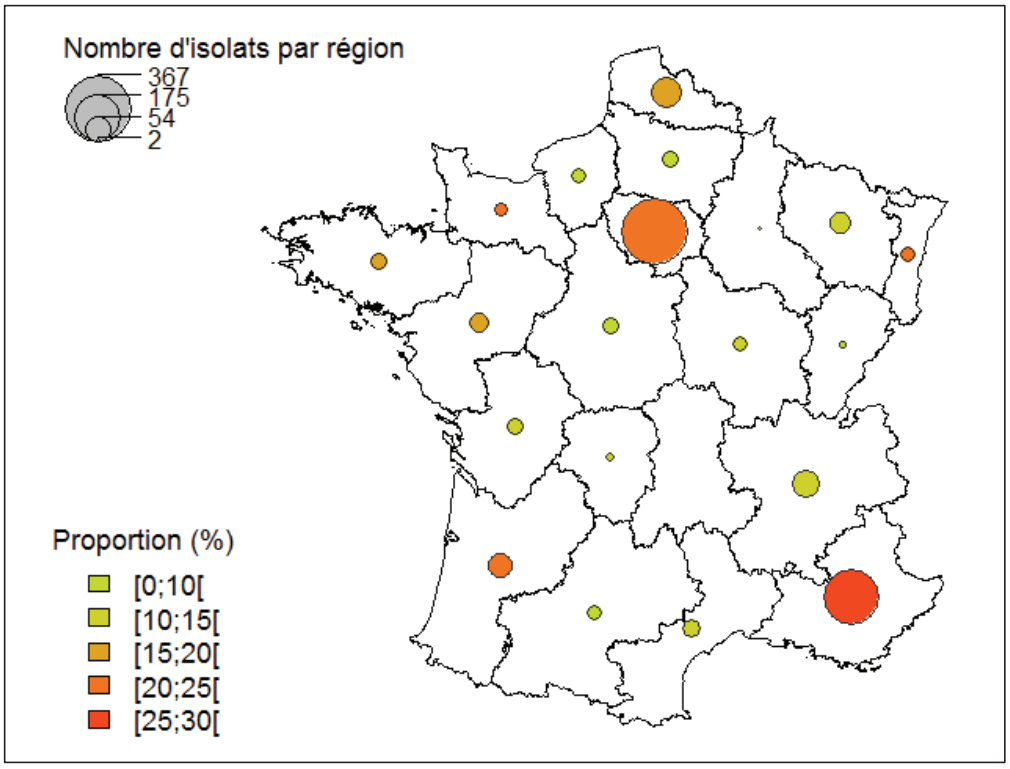
Tableau 15 : Antibiotiques et classes d'antibiotiques associées pour la caractérisation de la multirésistance des souches de *S. pseudintermedius* chez le chien

Antibiotique	Classe d'antibiotiques
Pénicilline G	Pénicillines
Céfovécine	Céphalosporines
Gentamicine	Aminosides
Enrofloxacine	Fluoroquinolones
Sulfamides-triméthoprime	Inhibiteurs de la synthèse des folates
Erythromycine	Macrolides

2.3 Résultats

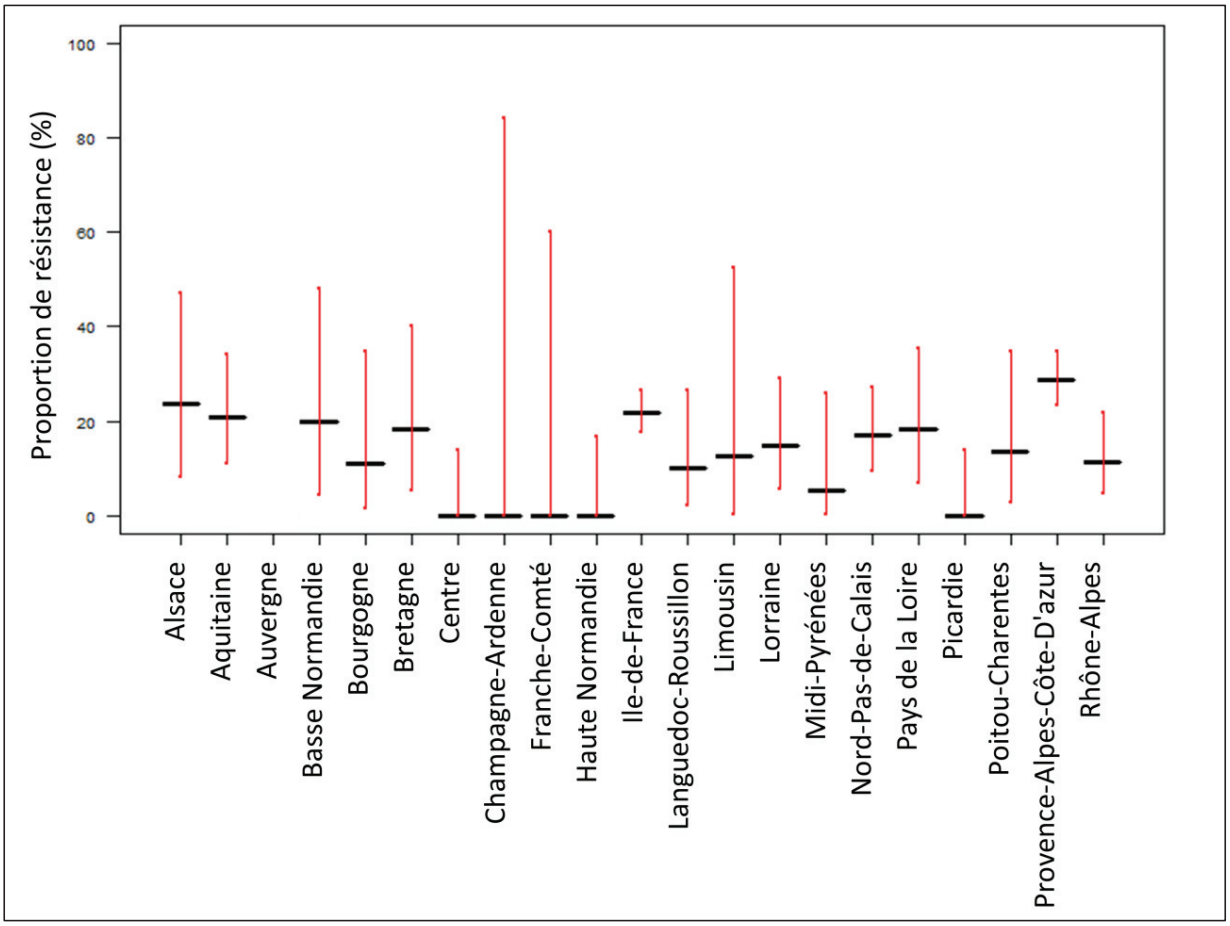
Au total 1 066 souches de *S. pseudintermedius* isolées d'otites canines ont été analysées sur la période 2012-2016. L'imputation des données manquantes pour le lieu de prélèvement a concerné 4 souches. En France sur la période 2012-2016, la proportion de *S. pseudintermius* multirésistants était de 20,7 % [18,3 ; 23,3]. La distribution spatiale de la proportion de souches multirésistantes (couleur des cercles dans la Figure 15) a mis en évidence une forte hétérogénéité spatiale entre régions. Le nombre d'isolats collectés par région, représenté par la taille des cercles dans la Figure 15, était également très variable d'une zone à l'autre.

Figure 15 : Distribution spatiale par région administrative des proportions (en %) de multirésistance des souches de *S. pseudintermedius* isolées d'otites canines de 2012 à 2016



Les isolats de *S. pseudintermedius* provenaient principalement de deux régions françaises, Ile-de-France et Provence-Alpes-Côte-d'Azur, pour lesquelles les proportions de multirésistance figuraient parmi les plus élevés (Figure 16), respectivement 21,8 % [17,7 ; 26,4] et 28,9 % [23,3 ; 34,9]. Toutefois, tenant compte de l'incertitude sur les proportions par région (Figure 16), les différences observées au niveau des proportions n'étaient pas significatives.

Figure 16 : Proportions de multirésistance des souches de *S. pseudintermedius* isolées d'otites canines de 2012 à 2016, estimées par région administrative avec représentation des intervalles de confiance à 95 % en rouge



2.4 Discussion

La multirésistance de *S. pseudintermedius* est élevée en France chez les souches isolées d'otites canines pour réalisation d'un antibiogramme. Ces résultats indiquent que les chiens avec otites canines constituent des réservoirs de bactéries résistantes et multirésistantes. *S. pseudintermedius* est un agent pathogène beaucoup plus répandu chez les chiens (y compris en cas d'otite) que *S. aureus*, ce qui suggère que *S. pseudintermedius* est plus adapté à la colonisation de la peau canine. *S. pseudintermedius* reste un agent pathogène rare chez l'Homme et les personnes en contact avec les chiens sont plus à risque [135,245,246].

Jusqu'alors, peu d'études ont été consacrées à la résistance de souches pathogènes isolées d'otites canines et elles concernent principalement *S. pseudintermedius*. Cependant, dans ces études le nombre d'isolats pris en compte est limité [244,247–251] et/ou les auteurs regroupent des souches de diverses origines (peau, oreille, tissu mou [252,253]) ou des souches de chiens malades et en bonne santé [254] pour augmenter la taille de l'échantillon. Ces différences de méthode de collecte

des souches, de la population bactérienne étudiée (commensale *versus* pathogène) et le site anatomique de prélèvement rendent la comparaison des données difficile et peu pertinente.

L'existence de données de surveillance riches grâce au Résapath est une véritable force pour l'étude de la résistance de ce type de germes. Toutefois, la caractérisation des niveaux de résistance des bactéries isolées chez les chevaux dans différents contextes pathologiques et chez les *S. pseudintermedius* isolés d'otites canines mettent en évidence à la fois les potentiels du Résapath mais également ses limites.

3. Potentiels et limites d'utilisation des données de surveillance pour la caractérisation des résistances

3.1 Synthèse sur les potentiels du Résapath

S'appuyant sur l'activité de demande d'analyse de routine des vétérinaires, le Résapath collige un nombre conséquent de résultats d'antibiogrammes (Figure 13) pour un coût limité (réalisation de l'antibiogramme à la charge du propriétaire de l'animal). De fait, le Résapath est un dispositif de surveillance pragmatique en comparaison aux moyens financiers, matériels et humains nécessaires pour acquérir des quantités de données similaires avec une qualité épidémiologique réellement supérieure. De par son fonctionnement, le Résapath permet la caractérisation des niveaux de résistance des bactéries pathogènes non seulement chez les animaux de production, mais également chez les animaux de compagnie (chien et chat) et il se positionne donc de façon complémentaire à la surveillance programmée par l'UE sur les bactéries commensales des animaux de production à l'abattoir.

Comme illustré en filières équine et canine, le Résapath permet de caractériser les niveaux de monorésistance et de multirésistance en appliquant les stratifications (par espèce animale et par pathologie) nécessaires à l'interprétation biologique des données. Par la collecte systématique des résultats d'antibiogrammes, quel que soit le germe isolé, les données du Résapath permettent également : *(i)* de caractériser la résistance chez des germes pathogènes moins fréquents que les *E. coli* en médecine vétérinaire mais présentant un intérêt majeur en termes de santé publique, comme *P. aeruginosa,* ou un intérêt particulier en médecine vétérinaire comme *S. pseudintermedius*, et *(ii)* de caractériser la résistance chez des bactéries encore non-étudiées, comme celle de *Pantoea* en filière équine. Enfin, la collecte systématique des dates de prélèvements liées à aux antibiogrammes rend possible l'analyse temporelle des niveaux de résistance, *a minima* par regroupement d'années ou par année.

3.2 Les limites du dispositif

En dépit des potentiels irréfutables du Résapath pour la caractérisation des résistances en santé animale et de son utilité dans le cadre actuel de la surveillance de l'antibiorésistance en France, certaines limites du dispositif demeurent.

En raison d'un nombre limité de laboratoires participants dans les années 90, les données de surveillance ne sont utilisables qu'à partir des années 2000 en filière bovine. Pour les filières porcine et avicole, les résultats d'antibiogrammes peuvent être analysés dès 2001. Pour les animaux de compagnie il faut attendre 2009, date de l'intégration au réseau d'un laboratoire d'analyse vétérinaire réalisant à lui seul près d'un tiers des antibiogrammes collectés par le Résapath dans cette filière. De façon similaire en filière équine, les données de surveillance peuvent être utilisées de manière pertinente à partir de 2012, suite à l'entrée dans le Résapath de laboratoires spécialisés en équine et drainant tout le territoire national. Pour les filières cunicole, ovine et caprine, les données sont utilisables à partir de 2009, année à partir de laquelle l'ensemble des laboratoires membres transmettent l'intégralité des résultats d'antibiogrammes pour ces filières. Pour les autres animaux tels que les poissons, oiseaux, reptiles, gibiers d'élevage et animaux de parc zoologiques, les effectifs collectés sont trop faibles pour permettre des analyses épidémiologiques pertinentes. Plus précisément, moins d'une cinquantaine d'isolats sont collectés chaque année pour chacune de ces espèces.

La caractérisation de l'antibiorésistance à partir des données de surveillance du Résapath ne peut être faite qu'à l'échelle phénotypique comme les laboratoires d'analyses vétérinaires membres ne réalisent pas d'analyses moléculaires de routine. Par ailleurs, ils ne confirment pas par la détection PCR des gènes de résistance certains phénotypes, comme la résistance à la méthicilline chez les staphylocoques coagulase positive par exemple. De fait, les résultats d'antibiogrammes collectés peuvent conduire dans ces cas précis à une surestimation des niveaux de résistance.

Si les variables connexes collectées par le Résapath sont multiples, elles ne sont pas pour autant toutes renseignées. Certains laboratoires mentionnent le genre bactérien tandis que d'autres précisent à la fois le genre et l'espèce bactérienne. Cette variabilité dans la précision limite la finesse d'analyse par la suite, comme l'a illustrée la caractérisation des résistances chez les chevaux.

Mais les données manquantes concernent principalement l'origine géographique des prélèvements. L'antibiorésistance étant un phénomène complexe, lié à la pression de sélection, aux pratiques d'élevage plurielles et variables (Tableaux 5 et 6), certaines régions sont

vraisemblablement plus impactées que d'autres, avec une distribution hétérogène de l'antibiorésistance sur le territoire. Sous cette hypothèse, la première étape de recherche a consisté à décrire et représenter la proportion de résistance par zone géographique. D'après la littérature [255], un nombre suffisant d'isolats doit être considéré par zone, même si aucun seuil n'est précisé. L'analyse par département mettant en évidence un nombre conséquent de zones sans isolats collectés, la représentation à l'échelle de la région est apparue plus pertinente pour décrire la distribution des niveaux de résistance. Lors de la réalisation de la cartographie descriptive des résistances plusieurs limites ont finalement restreint notre champ d'investigation : l'échelle spatiale d'analyse (région le plus souvent), les fluctuations du nombre d'isolats collectés par le Résapath par zone et pour une même zone d'une année à l'autre, et les potentiels biais de représentativité pour certaines zones géographiques comme le lieu de prélèvement pour l'antibiogramme ne correspond pas forcément au lieu de vie de l'animal. Pour ces raisons, l'exploration n'a pas été poursuivie avec des méthodes de modélisation spatiale. Les données de surveillance du Résapath ne nous permettent pas actuellement d'étudier de manière satisfaisante la dynamique de la distribution géographique des résistances.

Par ailleurs, il n'existe pas d'harmonisation de la liste des antibiotiques testés entre laboratoires et le nombre et la nature des antibiotiques peuvent varier entre antibiogrammes, pour une même bactérie isolée chez une même espèce animale. Cet élément apparaît problématique en particulier pour l'analyse de la multirésistance. En cas d'otites canines à *S. pseudintermedius*, il est possible d'utiliser pour le traitement de l'acide fusidique ou des phénicolés. Cependant, comme ces molécules ne sont pas testées en routine par tous les laboratoires d'analyses vétérinaires membres du Résapath, elles n'ont pas pu être prises en compte lors de l'estimation de la multirésistance.

En outre, pour certaines filières animales comme la filière cunicole, ou pour certaines espèces bactériennes comme *P. aerugionosa*, le nombre d'antibiotiques testés par les laboratoires est très limité. Les classes d'antibiotiques testées par les laboratoires adhérents sont majoritairement celles utilisées dans les secteurs vétérinaires d'exercice correspondant. Par exemple, le chloramphénicol, interdit chez les animaux de rente, n'est pas testé pour ces espèces tandis qu'il est généralement testé chez les animaux de compagnie pour lesquels la possibilité d'usage existe. Pour *P. aeruginosa*, seulement deux antibiotiques, la gentamicine et l'enrofloxacine, sont testés en routine en France par les laboratoires vétérinaires car très peu d'antibiotiques, principalement des aminosides, des fluoroquinolones et des polymyxines, disposent d'une AMM en médecine vétérinaire pour traiter cette bactérie. Toutefois, pour des raisons techniques d'identification de certaines résistances, certains antibiotiques sont aussi testés en dépit d'un non-usage vétérinaire.

C'est le cas de la céfoxitine qui est testée pour mettre en évidence la résistance à la méticilline chez les *S. aureus*.

D'autre part, certaines molécules testées par les laboratoires ne sont pas les meilleurs marqueurs d'antibiorésistance disponibles. Pour les *Pseudomonas* par exemple, la ciprofloxacine est considérée comme un meilleur marqueur de la résistance aux fluoroquinolones que l'enrofloxacine qui tend à surestimer le niveau de résistance. Mais la ciprofloxacine n'est pas autorisée en santé animale, et les laboratoires d'analyses vétérinaires ne la testent donc pas en routine en France. De fait, les données du Résapath conduisent vraisemblablement à surestimer la proportion de souches de *Pseudomonas* résistantes aux fluoroquinolones. Toutefois, comme les fluoroquinolones sont des antibiotiques de dernier recours pour le traitement d'infections sévères chez l'Homme, il reste essentiel de disposer d'information sur la résistance vis-à-vis de cette classe, même si l'information est imparfaite.

Enfin, les données du Résapath ne permettent pas de caractériser les niveaux de résistances vis-à-vis d'antibiotiques pour lesquels la technique d'antibiogramme de référence n'est pas le milieu gélosé. Par exemple, pour traiter les otites canines, la polymyxine B est un antibiotique de choix, mais il n'a pas été possible de l'inclure dans les analyses. En effet, l'antibiogramme par diffusion en milieu gélosé réalisé par les laboratoires ne permet pas de discriminer de façon satisfaisante les isolats sensibles et résistants pour la polymyxine B en raison d'une faible diffusion des polypeptides dans l'agar [256].

BILAN

Ayant exploré dans quelles mesures les données de surveillance du Résapath peuvent servir à répondre à la problématique de recherche, nous avons caractérisé la monorésistance et la multirésistance chez les bactéries pathogènes animales. Les résultats d'antibiogrammes colligés par le Résapath permettent d'estimer la résistance phénotypique des bactéries isolées chez les animaux de compagnie et chez les principales espèces de production en France dans des contextes pathologiques variés. Si les informations collectées autour du résultat d'antibiogramme sont riches et utiles pour une analyse pertinente des niveaux de résistance, notamment au travers de la stratification, les données de la surveillance ne permettent pas d'étudier de manière satisfaisante la dynamique de la distribution géographique des résistances. Toutefois, les informations relatives aux dates de prélèvement étant systématiquement renseignées par les laboratoires, la caractérisation temporelle des résistances en santé animale est possible.

Chapitre III - Evolution temporelle des résistances pour l'évaluation des mesures de maîtrise

Dans ce chapitre, la modélisation de séries temporelles est utilisée pour caractériser l'évolution des niveaux de résistance. Cette démarche permet de décrire la dynamique de l'antibiorésistance en France et de mettre en regard l'évolution des tendances et les mesures de maîtrise dans une perspective d'évaluation et d'orientation des stratégies de lutte.

A- Questions de recherche et objectif

Les résultats d'antibiogrammes collectés par le Résapath permettent d'ores et déjà à l'Anses d'estimer les niveaux de résistance annuels des bactéries pathogènes par espèce animale [257]. Etant donné que depuis 2004 la date de prélèvement associée au résultat d'antibiogramme est indiquée au jour près ou au mois près par les laboratoires adhérents, il est possible d'envisager une description plus fine de l'évolution des niveaux de résistance. Mais comment caractériser l'évolution temporelle de l'antibiorésistance ? Quelle méthode et quel pas de temps choisir ? Comment évolue la résistance ? Présente-t-elle des cycles saisonniers ? Peut-on réaliser des modèles prédictifs qui permettront d'évaluer l'impact des mesures de gestion mises en œuvre par les filières ou les pouvoirs publics ?

Pour répondre à ces questions, l'objectif de recherche était double : *(i)* mettre au point des outils utilisables dans le cadre de la surveillance générique de l'antibiorésistance pour décrire l'évolution temporelle des résistances, et *(ii)* décrire les niveaux de résistance en santé animale. À partir de la description des dynamiques temporelles des résistances, il est alors possible d'examiner l'impact des mesures de gestion de l'antibiorésistance sur l'évolution des résistances.

B- La méthode de modélisation : les modèles additifs généralisés

1. Analyse de séries temporelles : généralités et contexte

1.1 Définitions

Les séries temporelles occupent une place importante dans tous les domaines de l'observation ou de la collection de données, notamment dans le cadre de la surveillance

épidémiologique. Le terme « *série* » est employé pour évoquer des objets enregistrés classés dans un certain ordre : cet ordre utilisant une mesure du temps [258], d'où le nom de série « *temporelle* ».

Classiquement, une série temporelle ou chronique est considérée comme une suite d'observations d'un phénomène au cours du temps. Elle associe deux variables : une variable « temps » et une variable quantitative dont les données sont dépendantes, indexées par le temps. Mais il est également possible de considérer une série temporelle comme la réalisation d'une suite de variables aléatoires, on parle alors de processus stochastique. Elle se définit alors comme une suite d'observations d'une variable notée $\{Xt : t \in T\}$ où T est un ensemble ordonné de façon chronologique. En d'autres termes, une série temporelle est la réalisation x_t d'un processus aléatoire indicé par le temps. Cette dichotomie de considération de la chronique est à l'origine de la distinction faite dans la littérature entre les méthodes d'analyse de type lissage exponentiel et l'approche stochastique.

L'analyse de séries temporelles correspond à la décomposition d'un signal brut en éléments simples. D'après la littérature, on distingue quatre composantes principales d'une série temporelle [259,260] :

- **la tendance** : elle rend compte de l'évolution à long terme de la grandeur observée, donc de son comportement ;
- **la saisonnalité** : les mouvements saisonniers traduisent des fluctuations périodiques, c'est-à-dire le comportement répétitif de la série à des intervalles de temps égaux avec une forme à peu près constante autour de la tendance à long terme ;
- **la cyclicité** : la composante cyclique rapporte les oscillations autour de la tendance observée sur le long terme, mais avec une périodicité inconnue et changeante ;
- **le bruit** : les fluctuations résiduelles, aussi appelées mouvements résiduels ou bruit, constituent la composante d'erreur qui regroupe tout ce qui n'est pas pris en compte par les composantes précédentes et résulte des fluctuations accidentelles ou irrégulières de nature imprévisible et aléatoire dues à des facteurs perturbateurs non-permanents ; c'est la composante stochastique de manière générale.

Classiquement, seulement trois éléments sont utilisés dans les analyses : la tendance, la saisonnalité et le bruit. La cyclicité apparaît difficile à identifier et son effet n'est observable que sur une très longue période de temps [259]. De fait, dans notre recherche, le recul choisi ne sera *a priori* pas assez important pour pouvoir définir cette composante ; c'est pourquoi elle est omise par la suite.

1.2 Importance de la représentation graphique préliminaire et illustration

Toutes les méthodes d'analyse de séries temporelles se basent avant tout sur une observation graphique de la série chronologique brute. Le chronogramme est généralement le premier graphique choisi pour l'examen. Il s'agit d'une représentation graphique de l'évolution des observations en fonction du temps : il constitue le profil temporel de la chronique. Il donne une vue d'ensemble de la série, et permet d'éclairer sur certaines particularités de la structure comme sa saisonnalité, les changements de dynamique, les ruptures, les valeurs atypiques, ou le bruit [261] et de guider la modélisation, notamment pour le choix du pas de temps. Enfin, de manière plus approfondie, l'analyse du corrélogramme (diagramme des coefficients d'autocorrélation) des fonctions d'autocorrélation et d'autocorrélation partielle de la série brute permet de se faire une idée de la stationnarité et de la saisonnalité.

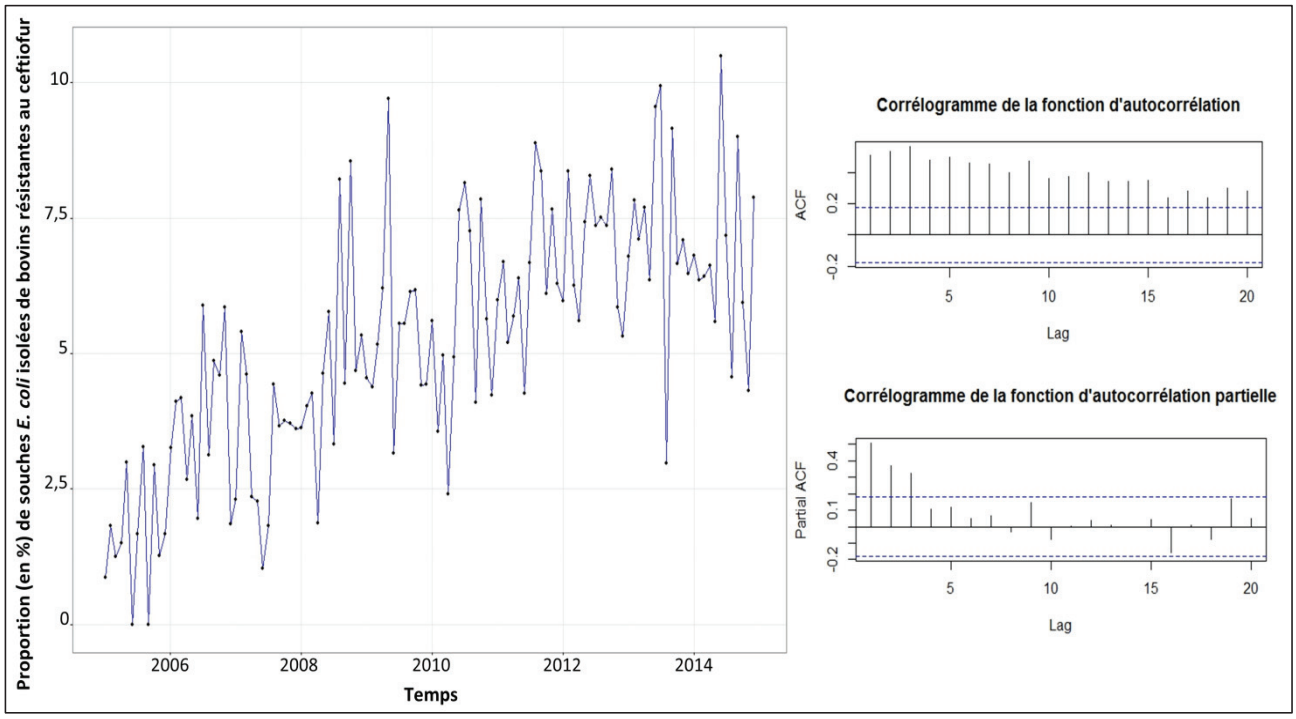
Le chronogramme de la proportion mensuelle de souches *E. coli* isolées de bovins résistantes au ceftiofur de 2005 à 2014 et les corrélogrammes des fonctions d'autocorrélation et d'autocorrélation partielle de la série brute (Figure 17) apportent des éléments essentiels à la modélisation temporelle future :

- la tendance est globalement croissante de 2005 à 2014 ;
- les termes de la série brute sont autocorrélés : la décroissance lente des autocorrélations simples indique la présence d'une non stationnarité et confirme l'existence d'une tendance ;
- aucune variation saisonnière n'est décelable par l'étude graphique des fonctions d'autocorrélation ;
- le bruit résiduel présente des variations d'amplitude élevée (même ordre de grandeur que la variation de tendance), un pas d'analyse plus fin serait donc à proscrire car il risquerait d'amplifier le bruit déjà fort.

Dans le cadre de ces travaux de recherche, la représentation graphique des chronogrammes a mis en évidence deux points majeurs de la modélisation des phénomènes d'antibiorésistance en santé animale à partir des résultats d'antibiogrammes collectés par le Résapath : les séries temporelles sont particulièrement bruitées et le pas de temps d'étude à une échelle plus fine que le mois ne semble pas judicieux. En effet, réduire le pas de temps accentue l'amplitude du bruit qui perturbe la chronique. En sus, d'un point de vue biologique, il est peu probable qu'une précision à la semaine se justifie : l'antibiorésistance est un phénomène d'évolution lente, comme le laissent supposer les mécanismes moléculaires sous-jacents impliqués ou les études sur la reconversion de souches résistantes à l'état de sensibilité [8,262]. En définitive, bien qu'une analyse à une unité

temporelle plus réduite soit envisageable pour certaines espèces animales, l'analyse au pas de temps mensuel apparaît finalement plus judicieuse, alliant avantage méthodologique et pertinence biologique.

Figure 17 : Chronogramme de la proportion mensuelle de souches *E. coli* résistantes au ceftiofur en filière bovine de 2005 à 2014 et corrélogrammes des fonctions d'autocorrélation et d'autocorrélation partielle associées à la série brute



2. Méthode retenue : les modèles additifs généralisés

2.1 Choix de la méthode de modélisation

De nombreuses techniques de décomposition des séries temporelles existent, parmi lesquelles il convient de choisir en fonction du phénomène à étudier et de la nature des données disponibles [258]. Cependant, on constate que les distinctions faites entre les méthodes ne nourrissent pas un choix catégorique de la technique à employer : bien souvent plusieurs méthodes différentes sont implémentés et se justifient [263–267].

Une précédente étude [268] a comparé trois approches distinctes de modélisation temporelle des données du Résapath : les modèles additifs généralisés (GAM, *Generalised Additive Model*) [263], les modèles Box-Jenkins du type ARMA (*Auto Regressive Moving Average*) [132] et le lissage exponentiel [269]. Ces méthodes ont été comparées entre elles *via* des indicateurs, en termes de prédiction, mais aussi et surtout de réponse aux objectifs fixés de modélisation et du sens

biologique. Puisqu'il n'était pas envisageable d'adapter la surveillance de l'antibiorésistance au cas par cas en fonction de la filière de production ou de l'antibiotique testé, il fallait que la méthode choisie soit généralisable et utilisable par les opérateurs de la surveillance. Ces premiers travaux ont établi que l'approche par GAM s'avère être la technique la plus performante pour la caractérisation de routine des tendances des phénomènes d'antibiorésistance en santé animale à partir des données de surveillance du Résapath.

2.2 Structure générale des modèles additifs généralisés

Historiquement les GAM ont été développés pour l'usage de données temporelles ou spatiales [270,271]. Le GAM demeure l'une des méthodes les plus employées pour les études de séries temporelles en biologie [263], principalement parce qu'il permet un ajustement non paramétrique : le prédicteur est additif [272], il n'est pas forcément linéaire contrairement aux modèles linéaires généralisés (GLM). Il s'agit donc d'une approche plus flexible que les approches paramétriques [273,274], qui apparaît pertinente sans connaissance *a priori* de la forme des relations à décrire. Comme le GLM, la fonction de distribution Y_i de la variable à expliquer par le GAM appartient à la famille exponentielle, et la fonction *g* de lien est monotone et différenciable. Le modèle GAM s'écrit :

$$Y_i \sim L_{exp} \quad \text{et} \quad \mu_i = E(Y_i)$$
$$\eta_i = g(\mu_i) = \alpha + \sum_{j=1}^{p} f_j(x_{ij})$$

où les fonctions *fj* sont des fonctions quelconques d'une ou de plusieurs variables. Elles peuvent être paramétriques (polynomiales, trigonométriques, avec spline de régression) ou non paramétriques comme les fonctions splines non paramétriques (splines de lissage) ou les fonctions de régression locale pondérée (*locally-weighted running-line smoother* ou fonctions *loess).* À l'instar du GLM, les erreurs ε_i du GAM sont des variables aléatoires indépendantes des x_{ij} et respectant les propriétés suivantes pour tout *i* : $E(\varepsilon_i) = 0$ et $var(\varepsilon_i) = \sigma_i^2$. Par extension, les modèles additifs généralisés à effets mixtes (GAMM, *Generalised Additive Mixed model*) prennent en compte la dépendance entre les données observées qui se répercute en une dépendance dans les erreurs (aussi appelée structure de corrélation).

2.3 Les GAM en pratique pour la description de l'évolution de l'antibiorésistance

Les modèles additifs généralisés avec ou sans effet mixte (GAM ou GAMM) ont été implémentés dans les travaux décrits par la suite pour capturer la tendance et la saisonnalité des séries temporelles. Les modèles ont été implémentés avec une ou deux fonctions splines cubiques,

chaque fonction permettant la prise en compte respectivement de la tendance et de la saisonnalité. La preuve de la composante saisonnière a été recherchée à l'aide d'analyses graphiques, *via* les fonctions d'autocorrélation et d'autocorrélation partielle. Un pas de temps mensuel ou bimensuel a été utilisé pour les analyses afin d'assurer un effectif minimum de 25 antibiogrammes à chaque pas de temps [255]. Plus spécifiquement, pour un antibiotique donné, nous avons défini : y_t la proportion bimensuelle de souches résistantes, x_{1t} la série temporelle bimensuelle permettant de prendre en compte la tendance et x_{2t} le numéro du mois de l'année pour prendre en compte la saisonnalité. Le modèle le plus complexe implémenté s'exprimait de la façon suivante :

$$y_t \sim \text{Binomial}\ (n_t, \mu_t)$$

$$\text{logit}\ (\mu_t) = \log\left(\frac{\mu_t}{1-\mu_t}\right) = \alpha + s_1(x_{1t}, \lambda_1) + s_2\,(x_{2t}, \lambda_2) + a_t$$

avec α l'intercept à l'origine, $s_1(x_{1t}, \lambda_1)$ et $s_2\,(x_{2t}, \lambda_2)$ deux fonctions de lissage ayant des degrés de liberté λ_1 et λ_2 modélisées comme un spline cubique pénalisé et un spline cyclique pénalisé respectivement, et a_t la composante résiduelle, qui incluait potentiellement des termes d'autocorrélation pris en compte dans la matrice de covariance (modèle à effet mixte [275]). Les coefficients ont été estimés par maximisation de la vraisemblance pénalisée suivant le schéma P-IRLS (*penalized iteratively re-weighted least squares*) reposant sur l'algorithme rétrograde itératif (*backfitting*) pondéré et les termes de lissage ont été sélectionnés par validation croisée généralisée [273,276]. L'adéquation des modèles a été vérifiée à l'aide d'un test de blancheur (test de Box-Ljung) évaluant l'indépendance des résidus. Une valeur de $p \leq 0{,}05$ a été considérée comme statistiquement significative. Si les variations de tendance n'étaient pas significatives, la tendance était considérée comme stationnaire.

C- Modélisation de l'évolution temporelle de l'antibiorésistance

La résistance des souches de *Streptococcus uberis* isolées de lait de vache laitières avec mammites est ici présentée à titre d'illustration de la démarche générale de modélisation.

1. Objectif

Les mammites, inflammations de la glande mammaire, sont les infections bactériennes les plus fréquentes chez les vaches laitières et les antibiotiques sont une composante importante de leur traitement et de leur contrôle. En France [277,278], comme dans d'autres pays européens, américains ou africains, *Streptococcus uberis*, *E. coli* et les staphylocoques à coagulase positive (CoPS) sont les agents pathogènes responsables de mammites cliniques les plus fréquents [279–

282]. Ces bactéries peuvent constituer un réservoir de gènes de résistance et jouer un rôle dans leur propagation vers d'autres bactéries pathogènes ou commensales en élevage [283]. Considérant que l'usage des antibiotiques est un facteur favorisant le développement des résistances, ces résistances doivent être surveillées au cours du temps pour guider l'usage raisonné des antibiotiques [284]. Or la résistance chez les bactéries responsables de mammites bovines, en particulier chez *S. uberis*, n'a jamais été étudiée en Europe à une large échelle et sur une longue période (au moins quatre années consécutives). Pourtant, l'estimation des tendances est essentielle pour détecter les émergences, guider la prescription prudente des antibiotiques et ainsi préserver l'efficacité de l'arsenal thérapeutique. L'objectif de ces travaux était de décrire l'évolution des résistances des souches de *S. uberis* isolées de lait de mammites de vaches laitières en France à partir des résultats d'antibiogrammes collectés par le Résapath de 2006 à 2016.

2. Méthodologie

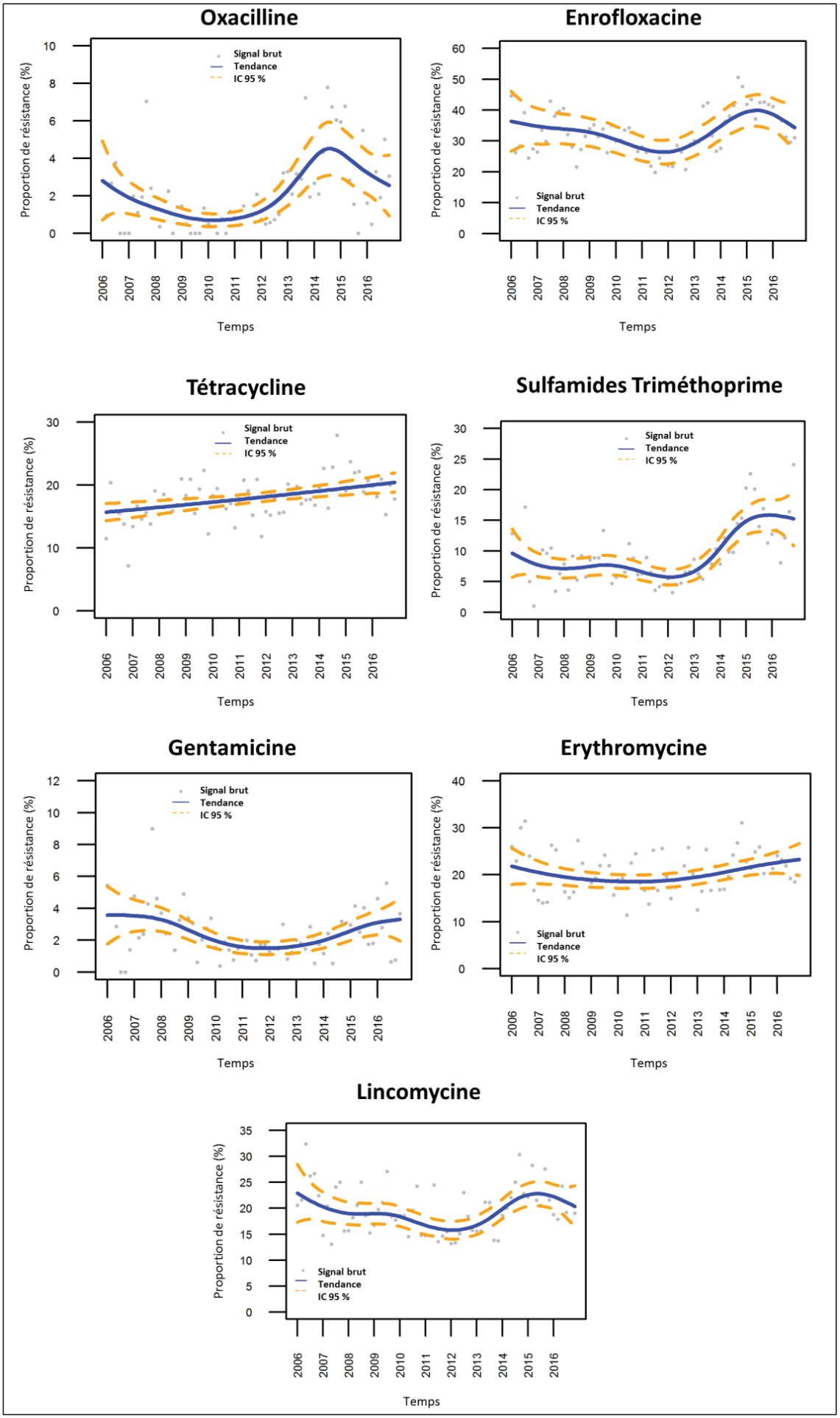
L'évolution de la résistance des souches *S. uberis* a été étudiée pour sept classes d'antibiotiques utilisées pour le traitement des mammites : les pénicillines, les aminosides, les tétracyclines, les inhibiteurs de la synthèse du folate, les macrolides, les lincosamides et les fluoroquinolones. Pour l'analyse des séries temporelles, des GAM ont été implémentés pour décrire les tendances des résistances au pas de temps bimensuel comme détaillé précédent. Le logiciel R (R Core Team, 2017) version 3.4.0. (2017-04-21) a été utilisé pour toutes les analyses statistiques (package gamm4) et les illustrations graphiques.

3. Résultats

Au total, 13 862 antibiogrammes collectés entre le 1er janvier 2006 et le 31 décembre 2016 ont été analysés. Sur l'ensemble de la période, les proportions de résistance les plus faibles ont été observées vis-à-vis de l'oxacilline et de la gentamicine, et, à l'exception de l'enrofloxacine, les proportions de résistances étaient inférieures à 30 %.

L'analyse temporelle des résistances a montré que toutes les tendances présentaient des variations significatives de 2006 à 2016 (Figure 18). Toutefois, aucun cycle saisonnier n'a été observé à l'analyse graphique des corrélogrammes et la composante saisonnière des modèles n'était jamais significative.

Figure 18 : Tendances de la résistance des souches *S. uberis* isolées de mammites bovines en France de 2006 à 2016



Tous les niveaux de résistance étaient en augmentation au cours de la seconde moitié de la période d'étude. La résistance à la tétracycline a augmenté linéairement passant de 15,7 % [14,2 ; 17,2] en janvier 2006 à 20,4 % [18,7 ; 22,1] en décembre 2016. En revanche, les tendances étaient non linéaires pour les autres antibiotiques testés. La proportion de résistance à l'oxacilline était inférieure à 5 % sur toute la période : elle a diminué de 2006 à 2010 puis a augmenté rapidement, passant de 0,7 % [0,4 ; 1,0] en mai 2010 à 4,5 % [3,1 ; 5,9] en juillet 2014 avant de diminuer en 2015 et 2016. La proportion de résistance à la gentamicine est également restée faible sur la période. La proportion de résistance aux sulfamides-triméthoprime a fluctué autour de 6 % entre 2006 et 2012, puis a augmenté en janvier 2012 pour atteindre 16 % [11,0 ; 21,0] en décembre 2016. La proportion de résistance à l'érythromycine a peu varié au cours de la période. Enfin, la résistance à l'enrofloxacine a légèrement diminué au cours de la première moitié de la période d'étude, puis a fortement augmenté pour atteindre 41,8 % [36,4 ; 47,2] en juillet 2015, avant de diminuer à nouveau.

4. Discussion

Par l'étude des séries chronologiques, nous avons pu caractériser les tendances des résistances des souches de *S. uberis* responsables de mammites bovines en France de 2006 à 2016. Cependant, nos résultats méritent d'être nuancés. Comme l'isolement bactérien et l'antibiogramme ne sont pas des analyses systématiques en médecine vétérinaire (Chapitre 1), il peut exister des biais de sélection dans les données collectées par le Résapath qui pourraient conduire à fournir un reflet imparfait de la situation épidémiologique. Cependant, considérant ces biais constants dans le temps dans le cadre du Résapath, les tendances de la résistance peuvent être interprétées.

Dans notre étude, les niveaux de résistance de *S. uberis* vis-à-vis de l'enrofloxacine étaient plus élevés que ceux précédemment rapportés dans la littérature [279,285]. Cependant, nous avons très probablement surestimé ces niveaux car nous avons regroupé les isolats intermédiaires et résistants. En raison de leur résistance intrinsèque aux quinolones, les streptocoques peuvent apparaître phénotypiquement intermédiaires par la méthode de diffusion en milieu gélosé, malgré l'absence de résistance acquise. Récemment, une étude européenne réalisée sur 282 isolats de *S. uberis* provenant de bovins laitiers atteints de mammite clinique a révélé des résultats similaires aux nôtres pour la résistance à l'érythromycine (20 %), mais une résistance supérieure à la tétracycline (28,7 %) [284], ces différences résultant vraisemblablement de pratiques d'usage variables entre pays.

D'après les déclarations de ventes d'antibiotiques, les pénicillines, les céphalosporines (première et deuxième générations), les aminosides, les polymyxines et les tétracyclines sont les

classes d'antibiotiques les plus utilisées en France pour les injections intra-mammaires (Anses-ANMV, 2016). Parmi les 29 spécialités d'antibiotiques disponibles en France en 2017 pour les administrations intra-mammaires chez les bovins, 11 combinaient deux antibiotiques de classes différentes, quinze contenaient des pénicillines, huit des aminosides, six des céphalosporines de premières générations et trois des céphalosporines de dernières générations (céfopérazone et cefquinome). Nous avons caractérisé les tendances des résistances pour toutes les classes d'antibiotiques présentes dans ces spécialités, exceptées pour les ansamycines (une spécialité disponible), car cette classe n'est pas systématiquement testée par les laboratoires vétérinaires, et pour les polymixines (deux spécialités avec colistine) car la diffusion en milieu gélosé est utilisée par les laboratoires (Chapitre 2). Notons que les ventes de céphalosporines de dernières générations pour administration intra-mammaire ont augmenté de 20,3 % entre 2007 et 2011 puis ont diminué de 79,5 % entre 2013 et 2016, en raison de nouvelles réglementations limitant leur utilisation en médecine vétérinaire et d'une sensibilisation accrue des professionnels sur la nécessité d'un usage raisonné de ces molécules (Anses-ANMV, 2017).

Ces résultats peuvent guider les vétérinaires dans le choix du traitement empirique initial le plus approprié. En sus, ils peuvent également permettre de compléter les guides de bonnes pratiques [286] qui orientent la stratégie thérapeutique dans un contexte clinique et épidémiologique donné. Ces travaux illustrent également l'utilité des dispositifs de surveillance tels que le Résapath pour guider les pratiques thérapeutiques, suivre les niveaux de résistance et détecter des émergences. Enfin, de tels résultats sont essentiels pour l'évaluation des mesures mises en place et la conception de stratégies de lutte pour limiter l'antibiorésistance.

D- Utilisation de la modélisation temporelle pour l'évaluation des mesures de maîtrise

La résistance aux céphalosporines de troisième génération des souches *E. coli* isolées de différentes productions animales est ici mise en parallèle des mesures de lutte pour évaluer l'efficacité de ces dernières.

1. Contexte et objectif spécifique

Les céphalosporines de dernières générations (céphalosporines de troisième génération (C3G) et de quatrième génération (C4G)) constituent l'une des dernières alternatives thérapeutiques pour lutter contre les maladies infectieuses graves chez l'Homme [287]. Considérées comme des AIC [288], ces antibiotiques ont été classés comme prioritaires pour la médecine humaine. En

France, les céphalosporines de dernières générations sont utilisées en médecine vétérinaire principalement pour lutter contre les infections causées par *E. coli* et quatre antibiotiques (céfovécine, céfopérazone, céfquinome et ceftiofur) disposent d'une autorisation de mise sur le marché (AMM). Ils sont approuvés pour un usage par voie parentérale chez les veaux, les bovins de boucherie, les porcs, les chats, les chiens et les chevaux, et pour un usage parentéral et intramammaire chez les vaches laitières. Ces antibiotiques ne disposent pas d'AMM pour les volailles [6] mais des injections *in ovo* de C3G ont été rapportées avant 2014 [289].

La résistance aux C3G et aux C4G est une préoccupation majeure de santé publique. L'attention se concentre principalement sur les animaux d'élevage en raison de leur rôle potentiel dans le transfert de déterminants de résistance à l'Homme *via* la chaîne alimentaire ou par contamination de l'environnement [290–292]. Ces dernières années en France des mesures de luttes contre l'antibiorésistance, lancées tant par les pouvoirs publics que par les professionnels eux-mêmes, ont été mises en place (Partie I), en particulier pour préserver l'efficacité des AIC. Mais ces mesures ont-elles eu un impact sur l'évolution des résistances ?

L'objectif a consisté ici à caractériser les tendances des résistances aux C3G chez les souches *E. coli* isolées d'animaux de production dans des contextes pathologiques spécifiques de 2006 à 2016 en France. La comparaison de la temporalité de l'évolution des résistances avec la mise en place des mesures réglementaires ou des initiatives professionnelles visant à limiter l'antibiorésistance au cours de la période a été l'occasion d'examiner l'impact potentiel des changements de pratiques.

2. Méthode

Les résultats d'antibiogrammes des souches *E. coli* isolées de 2006 à 2016 ont été extraits de la base du Résapath pour cinq types de production pour lesquels *E. coli* est la bactérie la plus fréquemment isolée, à savoir les poulets de chair, les poules pondeuses, les porcelets, les truies et les veaux. Pour chaque type de production, considérant le recours à l'antibiogramme variable suivant le contexte pathologique, la maladie principale causée par *E. coli* a été sélectionnée pour les analyses : septicémie chez les volailles, troubles digestifs chez les porcelets et les veaux, infections génito-urinaires chez les truies. Ainsi, les variables extraites comprenaient l'espèce animale, le type de production, la pathologie, la date de prélèvement et le diamètre de la zone d'inhibition du ceftiofur. En effet, en santé animale, le ceftiofur est utilisé comme marqueur de la résistance aux C3G. Les isolats ont été catégorisés et traités en utilisant les seuils du CA-SFM comme précédemment décrit. Pour l'analyse des séries temporelles, des GAM au pas de temps mensuel ont été implémentés pour capturer la tendance et la saisonnalité.

Pour examiner le parallèle entre l'évolution de la résistance des souches *E. coli* aux C3G et les modifications potentielles de l'utilisation des antibiotiques au cours de la période d'étude, nous avons répertorié les événements connus - soit les mesures réglementaires, les plans d'action de lutte contre l'antibiorésistance et les initiatives des professionnels - potentiellement liés au contrôle de l'usage des antibiotiques, à la lutte contre l'antibiorésistance ou pouvant entrainer des changements de pratiques en élevage en France de 2006 à 2016. Les indicateurs de niveau d'exposition des animaux aux antibiotiques (ALEA pour *Animal Level of Exposure to Antimicrobials*) ont également été recueillis auprès de l'Agence nationale du médicament vétérinaire (ANMV) de l'Anses. Ces indicateurs représentent les niveaux d'exposition, ici aux C3G, par voie orale et parentérale, calculés en divisant le poids des animaux traités par le poids de la population potentiellement utilisatrice d'antibiotiques [293]. Ces indicateurs se basent sur les données de ventes des antibiotiques transmises par les industriels. Comme les usages hors AMM ne sont pas enregistrés dans les données de ventes, l'absence d'ALEA calculé pour une espèce animale ne signifie pas une absence d'usage des antibiotiques correspondants.

3. Résultats

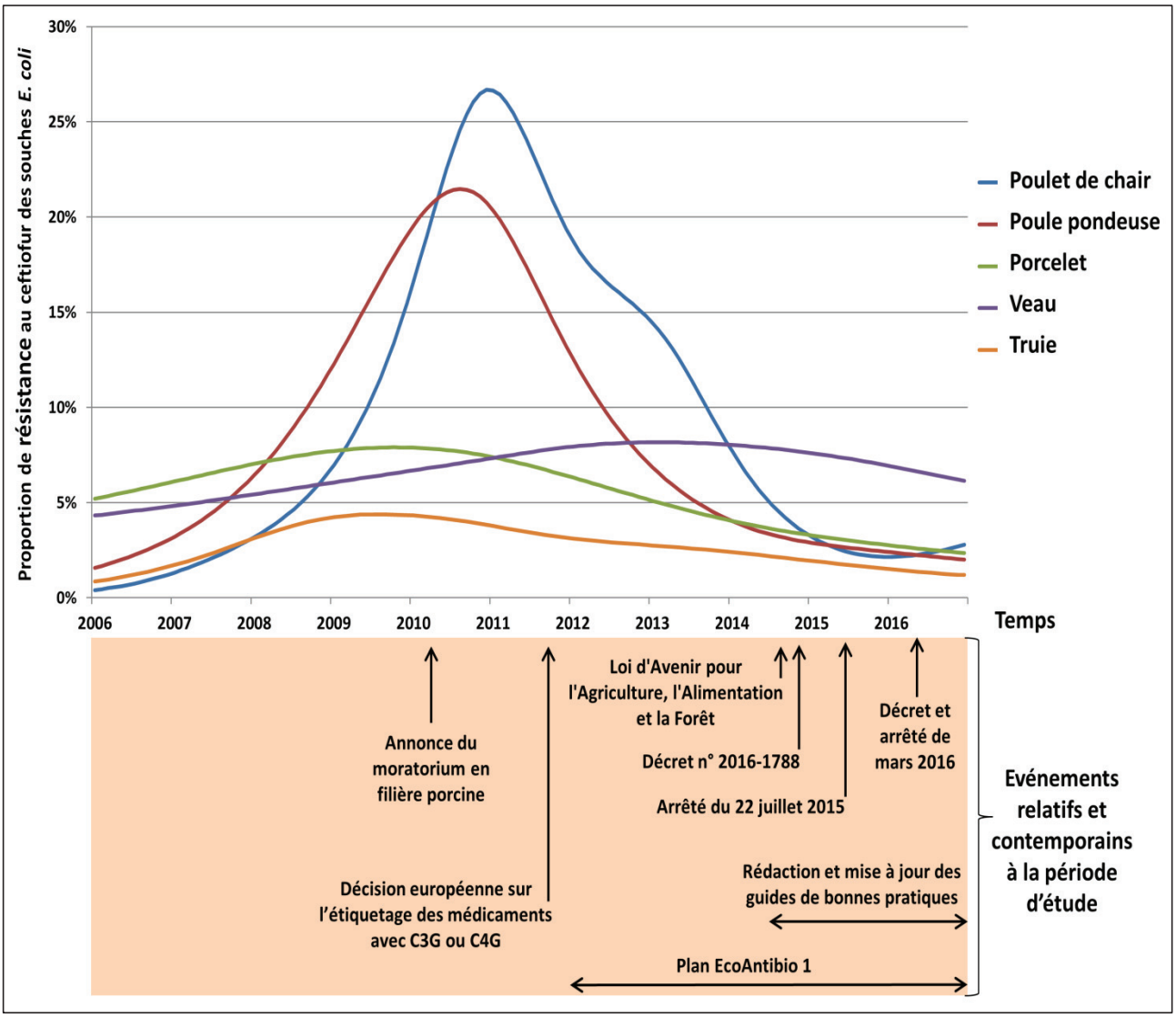
Au total 58 964 résultats d'antibiogrammes collectés par le Résapath entre le 1er janvier 2006 et le 31 décembre 2016 ont été analysés. Les analyses temporelles ont montré que les dynamiques des proportions de souches de *E. coli* résistantes aux C3G au cours de la période étaient variables entre les cinq types de production étudiés (Figure 19). Aucun cycle saisonnier n'a été identifié dans les séries, quel que soit le type de production considéré.

Les tendances de la résistance au ceftiofur étaient assez similaires en amplitude et variation pour les poules pondeuses et les poulets de chair. Pour les volailles, la résistance augmentait fortement de 2006 à 2010, atteignant un maximum à 21,5 % [18,5 ; 24,4] en août 2010 pour les poules pondeuses et à 26,7 % [22,9 ; 30,4] en décembre 2010 pour les poulets de chair. Par la suite, les proportions de résistance diminuaient fortement avant de se stabiliser entre 2 et 3 % en 2015 et 2016.

Pour les veaux avec troubles digestifs, la résistance augmentait également en début de période, passant de 4,3 % [3,0 ; 5,7] en janvier 2006, à 8,2 % [7,3 ; 9,0] en février 2013. Par la suite, la résistance se stabilisait avant de diminuer légèrement, atteignant 6,2 % [5,1 ; 7,2] en décembre 2016. En comparaison, pour les porcelets avec troubles digestifs, la période d'augmentation de la résistance était plus courte : la proportion de résistance a augmenté jusqu'à 8,0 % [6,5 ; 9,3] en novembre 2009, puis a diminué, jusqu'à atteindre 2,4 % [1,2 ; 3,5] en décembre 2016.

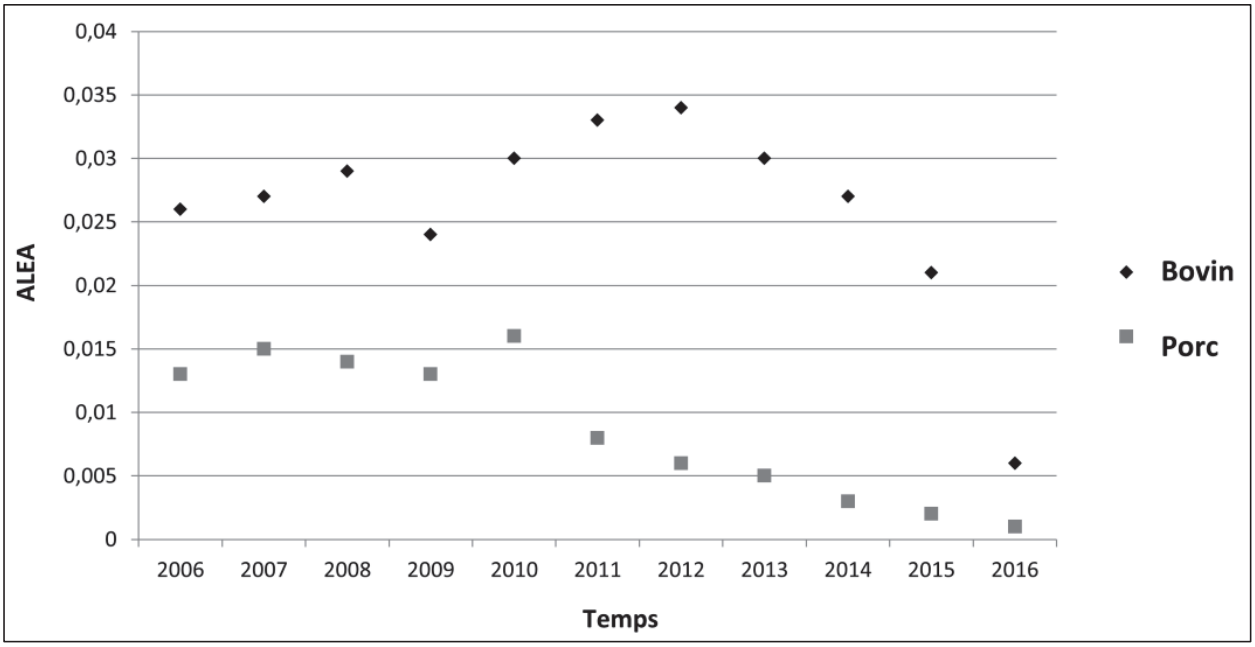
Pour les truies atteintes d'infections génito-urinaires, la résistance au ceftiofur a augmenté au cours de la période, passant d'une résistance presque nulle à 0,8 % [0,0 ; 1,6] en janvier 2006, jusqu'à un maximum à 4,4 % [3,1 ; 5,7] en juillet 2009, avant de diminuer légèrement en 2015 et 2016. Les tendances de la résistance au ceftiofur évoluaient en parallèle pour les porcelets et les truies.

Figure 19 : Tendances de la résistance au ceftiofur des souches *E. coli* isolées de poulets de chair, de poules pondeuses, de veaux, de porcelets et de truies de 2006 à 2016 et identification temporelle des principaux événements relatifs en antibiorésistance



Comme les usages hors AMM ne sont pas enregistrés dans les données de ventes, les ALEA annuels n'étaient disponibles que chez les bovins et les porcs, tous types de production considérés. Chez les bovins, l'indicateur annuel a évolué de 0,026 en 2006 à 0,034 en 2012 et a diminué par la suite (Figure 20). Dans le secteur porcin, l'ALEA avoisinait les 0,015 en début de période avant de diminuer de 2011 à 2016.

Figure 20 : Evolution de l'indicateur de niveau d'exposition des animaux aux antibiotiques (ALEA) chez les bovins et les porcs, tous types de production confondus, sur la période 2006-2016 en France [293]



Toutes les mesures et initiatives françaises relatives au contrôle de l'antibiorésistance et plus particulièrement à la résistance aux C3G ont été recherchées et listées au cours de la période 2006-2016 (Tableau 16). La plupart des mesures et initiatives répertoriées ont eu lieu au cours de la seconde moitié de la période d'étude, entre 2011 et 2016.

Tableau 16 : Liste des mesures et des initiatives relatives à la lutte contre l'antibiorésistance en santé animale entre 2006 et 2016 en France

Mesures et initiatives	Filière concernée	Période / Date	Courte description
Moratorium en filière porcine	Porcine	Annoncé en 2010 et officiellement mis en œuvre depuis mai 2011	Initiative de professionnels du secteur porcin pour limiter volontairement l'utilisation des céphalosporines de troisième et de quatrième générations (C3G et C4G) dans l'ensemble des exploitations du territoire.
Plan ÉcoAntibio	Toutes	Lancé en novembre 2011 après deux ans de préparations et d'échanges entre parties prenantes ; le plan est considéré effectif de janvier 2012 à décembre 2016	Plan d'action national de lutte contre l'antibiorésistance en santé animale, destiné à promouvoir l'utilisation prudente des antibiotiques. Il fixait un objectif quantitatif (réduction de 25 % de l'utilisation des antibiotiques en médecine vétérinaire en 5 ans) et qualitatif (réduction de l'utilisation des antibiotiques d'importance critique (AIC)). Il comprenait deux campagnes de sensibilisation: la première en septembre 2014 et la seconde en septembre 2016.
Décision Européenne du 13 janvier 2012	Toutes	Avis de l'Agence européenne des médicaments (EMA) sur l'étiquetage des médicaments vétérinaires contenant des C3G ou des C4G, adopté en octobre 2011, et traduit en décision le 13 janvier 2012.	Décision de la Commission européenne basée sur l'avis de l'EMA concernant tous les médicaments vétérinaires contenant des C3G ou C4G administrés par voie systémique (parentérale et orale) destinés à être utilisés chez des espèces productrices de denrées alimentaires (Article 35 de la Directive 2001/82/CE). Cette décision recommande de modifier l'étiquetage des médicaments : de supprimer toutes les indications relatives aux volailles et d'ajouter : « *Ne pas utiliser chez les volailles (y compris les œufs) en raison du risque de propagation de la résistance aux antibiotiques chez l'Homme* ».
Guides de bonnes pratiques d'usage des antibiotiques	Bovine, porcine et avicole	Annoncés par le plan ÉcoAntibio, publiés en juin 2014 puis révisés annuellement	Guides établis par le groupement technique vétérinaire chargé de la formation continue des membres.
Loi d'Avenir pour l'Agriculture, l'Alimentation et la Forêt (LAAF)	Toutes	Annoncée en novembre 2012 et officiellement publiée en octobre 2014	Cette loi réglemente la commercialisation des antibiotiques, met fin aux rabais, remises et ristournes sur les antibiotiques (article 48) et vise à réduire la consommation d'AIC de 25 % d'ici la fin de 2016.
Décret n° 2016-1788 du 19 décembre 2014	Toutes	Annoncé par le plan ÉcoAntibio, publié en décembre 2014	Ce décret publie la liste des médicaments vétérinaires autorisés pour les groupes d'éleveurs agréés (les antibiotiques ont été retirés de cette liste).
Arrêté ministériel du 22 juillet 2015	Toutes	Annoncé par le plan ÉcoAntibio, publié en juillet 2015	Cet arrêté mentionne les bonnes pratiques relatives à l'utilisation de médicaments vétérinaires contenant un ou plusieurs antibiotiques (C3G et C4G incluses).
Guide de bonnes pratiques d'usage des antibiotiques	Veaux	Annoncé par le plan ÉcoAntibio, publié en septembre 2015	Guide établi par le groupement technique vétérinaire chargé de la formation continue des membres.
Décret n° 2016-317 et arrêté ministériel du 16 et 18 mars 2016	Toutes	Annoncé par le plan ÉcoAntibio, publié en mars 2016 et officiellement en vigueur depuis le 1er avril 2016	Le décret répertorie les AIC disponibles en médecine vétérinaire (C3G, C4G et fluoroquinolones, sur la base des listes établies par l'OMS). L'arrêté restreint l'utilisation des AIC en médecine vétérinaire à la réalisation préalable d'une identification bactérienne et de tests de sensibilité.

4. Mise en perspective des résultats

Ces résultats montrent que la résistance aux C3G peut augmenter fortement en seulement quelques années, mais que l'inversion de la tendance de la résistance est également possible. De fait, ils soulignent l'utilité de collecter en continu des données sur l'antibiorésistance pour statuer sur l'importance du phénomène et ses évolutions. Chaque année, dans le cadre du plan européen de surveillance et de contrôle des résistances, les États membres communiquent à l'Europe les niveaux de résistances aux C3G des souches *E. coli* commensales isolées au niveau national. Nos résultats concordent avec les niveaux de résistance observés chez les *E. coli* commensaux isolés de poulets de chair (5,1 %) en Europe en 2014 [58]. Cependant, nos résultats ont montré que la résistance aux C3G chez les *E. coli* isolés de veaux avec troubles digestifs était supérieure à 5 % depuis 2007, alors qu'en Europe, depuis 2009, la résistance aux C3G des souches *E. coli* commensales isolées de caecaux de veaux est rapportée nulle ou détectée à des niveaux faibles (1,5 % en France en 2015) [58]. Cette différence met en évidence la nécessité de surveiller l'antibiorésistance à la fois dans les isolats commensaux et les souches pathogènes pour obtenir une image complète de la résistance.

En plus de la surveillance européenne, quelques publications ont à ce jour étudié les tendances de résistance aux C3G ou C4G de souches de *E. coli* en production animale dans d'autres pays : une aux États-Unis concernant les isolats cliniques de *E. coli* isolés de bovins, de poulets et de porcs [136], deux en Chine (l'une sur des souches *E. coli* de poulets malades [294], l'autre sur les souches *E. coli* commensales de poulets et de porcs [295]) et une en Belgique se concentrant sur les souches *E. coli* commensales isolées de veaux de boucherie, de poulets de chair et de porcs [296]. Cependant, ces études utilisaient généralement des tests sur les proportions annuelles pour détecter les tendances linéaires (test de Cochran-Armitage) et n'étaient donc pas en mesure de détecter les variations non linéaires dans la série. Les auteurs ont signalé une résistance aux C3G inférieure à 20 %, à l'exception de Zhang et al. (2017) qui ont décrit des niveaux de résistance élevés en Chine (entre 36 et 61 %). Nous supposons que l'utilisation de ceftiofur chez des poussins d'un jour en Chine explique en partie cette différence. Ce résultat souligne de nouveau l'importance de surveiller la résistance aux C3G et de mettre en place des politiques appropriées dans les pays où l'utilisation de ces antibiotiques n'est pas limitée [297].

5. Parallèle entre résistance, usage et mesures de lutte

Aucune donnée adéquate n'est disponible pour établir une comparaison directe entre l'utilisation des antibiotiques et les tendances de la résistance aux C3G en France en santé animale et en particulier pour intégrer les données d'usage dans les modèles. En effet, l'usage des antibiotiques est approximé par les ventes annuelles d'antibiotiques, mais une différence existe

entre vente et usage, et ces données de ventes ne distinguent pas les types de production (par exemple les poulets de chair par rapport aux poules pondeuses), les affections traitées (tous pathogènes confondus) et les utilisations hors AMM [293]. En dépit de ces limites, les ALEA annuels fournissent néanmoins des indices sur l'exposition des bovins et des porcs aux C3G sur la période 2006-2016 en France. Il a été démontré que l'injection de ceftiofur chez les veaux sélectionne la résistance [298], mais les C3G sont rarement utilisées pour traiter les veaux malades en France [299]. L'ingestion par les veaux de lait de vaches traitées est également un facteur de sélection de la résistance [298,300] : cette pratique pourrait avoir contribué à la sélection de germes résistants chez les veaux [174,298,300] et pourrait expliquer l'augmentation de la résistance entre 2006 et 2012. En France, les C3G et les C4G sont interdites chez les poules pondeuses et les poulets de chair, mais des injections de C3G *in ovo* ont été rapportées au cours de la première partie de la période d'étude (Anses, 2014). Cette pratique est connue pour sélectionner la résistance [301] et elle peut expliquer la dynamique de résistance des C3G considérant la dissémination verticale de la résistance, des couvoirs aux parquets de production en aval [148]. L'inversion de la tendance de la résistance aux C3G observée chez les poulets de chair et les poules pondeuses coïncide avec les changements de pratiques des couvoirs. En filière porcine, plusieurs études ont démontré que l'utilisation des C3G contribuait à la sélection de souches résistantes dans le tube digestif des porcs [302,303]. Le moratorium visant à limiter l'usage des C3G et des C4G en filière porcine (Tableau 16) a entraîné une diminution de l'usage des C3G avec la diminution de l'ALEA de 2011 à 2016 (Figure 20). Cette mesure a très vraisemblablement contribué à la diminution de la résistance observée après 2010 chez les truies et les porcelets.

La stabilisation et la diminution des proportions de résistance aux C3G en filières avicole et porcine ont commencé avant la mise en œuvre du plan ÉcoAntibio. En revanche, la stabilisation et la diminution des résistances chez les veaux coïncident avec la période de mise en œuvre du plan, des arrêtés ministériels correspondants et de la production de guides de bonnes pratiques. À l'exemption des résistances chez les veaux, la baisse de la résistance aux C3G chez les souches *E. coli* a débuté avant la publication des lois, ordonnances et décrets relatifs à l'usage d'antibiotiques en médecine vétérinaire, en particulier le décret n° 2016-317 (mars 2016) qui limite l'utilisation des céphalosporines des dernières générations en santé animale. En raison de l'incertitude persistante sur la période effective des mesures de contrôle et un certain décalage (variable entre les types de production considérés) entre la mise en œuvre des mesures et leur effet potentiel sur la résistance aux antibiotiques, il demeure difficile d'attribuer un point de rupture dans l'évolution des résistances à un événement précis de la chronologie de la lutte contre l'antibiorésistance. Néanmoins, nous supposons qu'après 2010, le débat public grandissant sur la problématique de l'antibiorésistance et l'anticipation des nouvelles réglementations ont contribué à un usage plus

prudent et raisonné des antibiotiques, influant par voie de conséquence sur les tendances des résistances des souches *E. coli* aux céphalosporines des dernières générations.

Même s'il n'est pas possible de démontrer directement la causalité à partir du parallèle entre les tendances de résistance et les changements de pratiques, les comparaisons chronologiques sont un élément de preuve essentiel en faveur d'une inférence causale entre la dynamique de la résistance, l'utilisation des antibiotiques, les mesures de luttes et les changements de pratiques.

BILAN

Dans ce chapitre, nous avons pu mettre en évidence deux points majeurs de la modélisation des phénomènes d'antibiorésistance en santé animale à partir des résultats d'antibiogrammes collectés par le Résapath : *(i)* il s'agit de séries temporelles particulièrement bruitées, l'amplitude du bruit étant plus élevée ou du même ordre de grandeur que l'amplitude de la tendance, *(ii)* le pas de temps d'étude à une échelle plus fine que le mois ne semble pas judicieux pour traiter ce type de série et en décrire la tendance comme il accentuerait l'amplitude du bruit. L'implémentation des modèles GAM pour différentes combinaisons espèce bactérienne / espèce animale / antibiotique a mis en évidence l'absence de saisonnalité dans les séries. Les décompositions de séries temporelles stratifiées par espèce animale, type de production et pathologie en cause ont été rendues possibles grâce à l'exhaustivité et la richesse des données collectées en routine auprès des laboratoires adhérents par le Résapath. Ils témoignent de fait que le Résapath constitue un outil puissant pour la surveillance de l'antibiorésistance en santé animale. S'il est difficile d'évaluer précisément l'impact des mesures de maîtrise de l'antibiorésistance, en raison de l'incertitude relative à la période d'effectivité réelle de ces mesures, le parallèle entre les tendances des résistances et la chronologie des événements apporte des éléments essentiels pour décrire leur impact potentiel et contribue à leur évaluation. À l'heure actuelle en France, les données sur les usages des antibiotiques sont encore trop limitées pour permettre une analyse directe avec les données de résistance. Dans une perspective d'analyse de risque, il est essentiel dans un futur proche de mesurer l'utilisation des antibiotiques par espèce animale, voire mieux par type de productions animales, afin d'évaluer de manière quantitative l'impact de l'utilisation des antibiotiques sur la résistance. Enfin, l'épidémiologie comparative de l'évolution des résistances aux C3G a mis en évidence des différences de dynamique d'évolution entre types de production pour une même espèce bactérienne donnée. Ces différences, qui résultent vraisemblablement de différences notables dans les pratiques d'élevage et d'usage d'antibiotiques, laissent supposer que les dynamiques de résistances peuvent également être différentes dans d'autres espèces, en particulier chez l'Homme.

Chapitre IV - Mise en perspective des niveaux de résistance et des tendances dans un contexte *One Health*

Dans ce chapitre, la modélisation de séries temporelles est utilisée pour caractériser l'évolution des niveaux de résistance en santé humaine comme en santé animale. Le rapprochement entre épidémiologie de l'antibiorésistance humaine et épidémiologie de l'antibiorésistance animale permet alors de documenter l'hypothèse classiquement émise de similitudes et d'interactions entre les deux phénomènes.

A- Questions de recherche et objectifs

Le lien supposé entre les résistances des bactéries isolées chez l'Homme et chez l'animal implique des analogies dans la dynamique de la résistance. Cette hypothèse repose sur le partage des communautés bactériennes et sur la mise en évidence de transferts ponctuels de déterminants de résistance entre bactéries véhiculées par l'Homme et les animaux [100]. Mais les évolutions de la résistance aux antibiotiques chez les bactéries humaines et animales vont-elles de pair ? La dynamique des phénomènes est-elle similaire ? Les niveaux de résistance chez l'Homme sont-ils plus analogues aux niveaux de résistance observés chez les animaux domestiques ou chez les animaux de production ? Les évolutions des résistances observées en santé animale se répercutent-elles sur les évolutions dans le secteur humain et *vice versa* ?

À ce jour, en France comme dans d'autres pays d'Europe, les dynamiques de l'antibiorésistance chez l'Homme et chez l'animal n'ont jamais été analysées ensemble ni directement comparées. Cependant, compte tenu du défi mondial que pose le développement de la résistance, une telle comparaison semble essentielle pour orienter les stratégies de contrôle. Elle s'inscrit en sus dans la démarche intégrative prônée par l'alliance tripartite OIE-FAO-OMS visant à lutter contre l'antibiorésistance de manière globale et transversale, conformément au concept *One Health* [68–70]. La comparaison des niveaux de résistance décrits dans différentes études chez l'Homme et l'animal reste difficile en raison de disparités dans la collecte des souches, les populations bactériennes considérées - pathogènes ou commensales - la temporalité, l'aire géographique d'étude et les analyses effectuées. Pour établir un parallèle pertinent, il apparaît indispensable d'utiliser une procédure de collecte de données similaire chez l'Homme et les animaux et de les analyser suivant une méthodologie semblable.

E. coli est l'espèce bactérienne la plus fréquemment isolée en médecine communautaire chez l'Homme et en contexte pathologique chez les animaux, elle constitue un bon candidat pour comparer les niveaux de résistance dans les deux secteurs. En outre, la plupart des classes d'antibiotiques utilisées pour le traitement de la colibacillose sont communes à la médecine humaine communautaire et à la médecine vétérinaire, qu'il s'agisse d'antibiotiques de premières générations comme les pénicillines ou d'AIC [288]. Afin de documenter la relation présumée entre la dynamique de l'antibiorésistance en santé humaine et animale, l'objectif visait ici à caractériser et à comparer les niveaux de résistance et les tendances observés chez les souches *E. coli* isolées chez l'Homme, les animaux de production et les animaux de compagnie.

B- Matériels et méthode

Afin de dresser un parallèle Homme-animal pertinent, il était nécessaire de colliger des données de natures similaires en santé humaine et animale.

1. Présentation du réseau MedQual

Créé en 2003, MedQual est un centre de ressource en antibiologie qui comprend un réseau de 610 laboratoires de biologie médicale recouvrant 11 régions françaises en 2017 [304]. Ce réseau a pour objectif d'assurer une veille épidémiologique des résistances en milieu communautaire, c'est-à-dire en ville par opposition au milieu hospitalier, principalement chez les souches *E. coli* et *S. aureus* [305]. À l'instar du Résapath, MedQual est un réseau de surveillance événementiel qui collecte tous les résultats d'antibiogrammes des souches isolées en routine dans les prélèvements à visée diagnostique analysés par les laboratoires de biologie médicale de ville. Les laboratoires participant à MedQual réalisent des analyses à la demande des médecins et se conforment aux recommandations européennes pour les tests de sensibilité aux antibiotiques (CA-SFM/EUCAST) [306], réalisant les antibiogrammes par diffusion en milieu gélosé ou par dilution avec des automates, le Vitek 2 de bioMérieux® et le Phoenix de Becton Dickinson®. Tous les laboratoires membres transmettent mensuellement leurs résultats d'antibiogrammes à MedQual qui les compile dans une base de données.

2. Sources de données

Ces travaux ont été réalisés à partir des résultats d'antibiogrammes des souches *E. coli* collectées entre janvier 2014 et décembre 2017 par les réseaux MedQual et Résapath. De la base de données MedQual, les variables extraites comprenaient les catégories de sensibilité des souches vis-à-vis de chaque antibiotique testé, la date de prélèvement et la pathologie considérée. Les catégories

de sensibilité avaient été déterminées en amont par les laboratoires de biologie médicale en utilisant les seuils reconnus par le CA-SFM/EUCAST [306]. De façon similaire, les variables extraites de la base de données du Résapath comprenaient le diamètre de la zone d'inhibition de chaque antibiotique testé, l'espèce animale, la date de prélèvement et la pathologie en cause. Conformément aux seuils approuvés par la section vétérinaire du CA-SFM 2017 [307], les isolats ont été catégorisés en sensibles, intermédiaires ou résistants vis-à-vis de chaque antibiotique.

Considérant les pratiques de prescription d'antibiotiques variables selon la pathologie en cause, les analyses ont porté sur les principales infections engendrées par *E. coli* par espèces, à savoir : les infections du tractus urinaire chez l'Homme en milieu communautaire, les chiens et les chats, les septicémies chez les volailles et les troubles digestifs chez les veaux et les porcelets.

Cinq antibiotiques ont été sélectionnés pour l'analyse en fonction de leur spectre d'activité, de leur utilisation pour le traitement de la colibacillose en santé humaine et animale et de leur intérêt en santé publique. Pour une même classe d'antibiotiques donnée, les antibiotiques testés par les laboratoires pouvaient être différents en médecine humaine et vétérinaire (Tableau 17).

Tableau 17 : Antibiotiques sélectionnés et classes d'antibiotiques correspondantes

Classe d'antibiotiques	Antibiotique chez l'Homme	Antibiotique chez l'animal
Pénicillines	Amoxicilline	Amoxicilline
Inhibiteur de la synthèse de folate	Sulfamides -triméthoprime	Sulfamides -triméthoprime
Aminosides	Gentamicine	Gentamicine
C3G	Céfotaxime or ceftriaxone	Ceftiofur
Fluoroquinolones	Ciprofloxacine	Enrofloxacine ou marbofloxacine ou danofloxacine

3. Analyses des données

Les résultats d'antibiogrammes ont été traités, analysés et modélisés suivant une méthodologie strictement identique qu'il s'agisse de souches isolées chez l'Homme ou chez l'animal. Dans un premier temps, les proportions de résistance aux différentes classes d'antibiotiques sur l'ensemble de la période 2014-2017 ont été calculées pour chaque espèce. Puis, pour l'analyse des séries temporelles, des GAM au pas de temps mensuel (ou bimensuel pour les chats) ont été implémentés pour décrire les tendances des résistances.

C- Résultats

1. Niveaux de résistance sur 2014-2017

Plus de 790 000 antibiogrammes ont été analysés sur la période 2014-2017, dont 93,9 % provenaient du secteur humain. Les niveaux de résistance des souches *E. coli* isolées chez l'Homme étaient du même ordre de grandeur que les niveaux de résistance des souches isolées d'animaux (Tableau 18). En outre, les souches humaines présentaient des niveaux de résistance médians par rapport à l'étendue des niveaux de résistance observés en santé animale. Comme chez les animaux, la résistance à l'amoxicilline était la plus élevée chez l'Homme atteignant 42,5 % [42,4 ; 42,6]. Par rapport aux souches isolées d'animaux de production, les souches isolées chez l'Homme et les animaux de compagnie présentaient globalement des niveaux plus bas de résistance aux antibiotiques de première génération, mais des niveaux de résistance plus élevés vis-à-vis des AIC.

2. Tendances des résistances aux antibiotiques de première génération

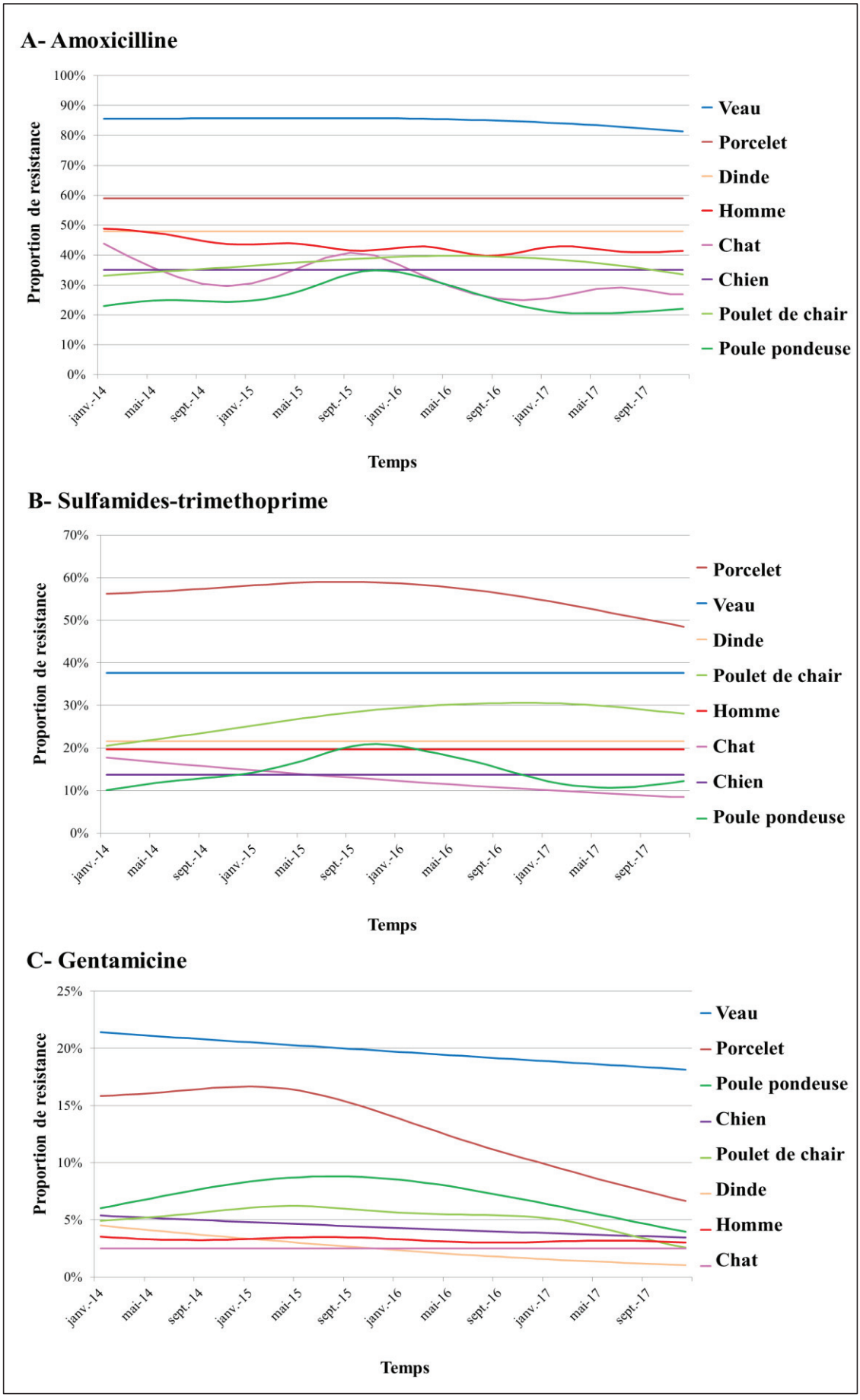
Sur la base d'analyses graphiques, aucun cycle saisonnier n'a été observé dans l'évolution des résistances, quel que soit le secteur considéré. Les tendances de résistance à l'amoxicilline étaient stationnaires ou en diminution au cours de la période d'étude pour la majorité des espèces considérées (Figure 21). Chez l'Homme, la proportion de résistance à l'amoxicilline a diminué, passant de 48,9 % [47,1 ; 50,7] en janvier 2014 à 41,5 % [40,5 ; 42,5] en décembre 2017. Tout au long de la période, les proportions de résistance à l'amoxicilline chez les isolats de veaux étaient bien supérieures à celles observées chez l'Homme et les autres espèces animales, malgré une diminution de la résistance, de 85,5 % [83,3 ; 87,7] en janvier 2014 à 81,4 % [79,3 ; 83,4] en décembre 2017 (Figure 21-A).

De 2014 à 2017, les proportions de résistance aux sulfamides-triméthoprime étaient stables chez l'Homme comme chez les veaux, les dindes et les chiens (Figure 21-B). Les souches *E. coli* isolées de porcelets présentaient des niveaux de résistance aux sulfamides-triméthoprime plus élevés que ceux identifiés chez l'Homme et les autres espèces animales, malgré une diminution de la résistance à la fin de la période, de 59,0 % [55,4 ; 62,7] en août 2015 à 48,5 % [42,3 ; 54,7] en décembre 2017. *A contrario* des autres espèces, la résistance aux sulfamides-triméthoprime chez les souches *E. coli* isolées de chats a diminué de façon continue au cours de la période, passant de 17,8 % [13,6 ; 21,9] en janvier 2014 à 8,6 % [10,3 ; 6,8] en décembre 2017.

Tableau 18 : Résistance (en pourcentage avec intervalle de confiance à 95 %) des souches *E. coli* isolées en France sur la période 2014-2017 chez l'Homme et chez les animaux

Espèce ou type de production (pathologie)	Amoxicilline		Sulfamide -triméthoprime		Gentamicine		Fluoroquinolones		C3G	
	Nombre d'isolats	Niveau de résistance	Nombre d'isolats	Niveau de résistance	Nombre d'isolats	Niveau de résistance	Nombre d'isolats	Niveau de résistance	Nombre d'isolats	Niveau de résistance
Homme (infection du tractus urinaire)	741 275	42,5 % [42,4 ; 42,6]	708 729	19,7 % [19,6 ; 19,8]	736 401	3,2 % [3,16 ; 3,25]	735 149	9,3 % [9,2 ; 9,4]	743 483	3,70 % [3,66 ; 3,75]
Chien (infection du tractus urinaire)	3 774	35,1 % [33,5 ; 36,6]	3 920	13,7 % [12,6 ; 14,8]	3 897	4,2 % [3,6 ; 4,8]	3 935	10,6 % [9,7 ; 11,6]	3 844	6,4 % [5,6 ; 7,2]
Chat (infection du tractus urinaire)	2 165	29,7 % [27,8 ; 31,7]	2 232	11,4 % [10,1 ; 12,8]	2 228	2,5 % [1,9 ; 3,3]	2 240	7,3 % [6,3 ; 8,5]	2 204	6,1 % [5,1 ; 7,2]
Veau (troubles digestifs)	12 370	84,7 % [84,1 ; 85,4]	13 614	37,7 % [36,9 ; 38,5]	13 695	19,6 % [18,9 ; 20,3]	13 641	18,1 % [14,4 ; 18,7]	13 653	6,2 % [5,8 ; 6,6]
Poulet de chair (septicémie)	12 041	37,5 % [36,7 ; 38,4]	12 054	28,3 % [27,5 ; 29,1]	9 989	5,0 % [4,6 ; 5,5]	11 071	5,3 % [4,9 ; 5,7]	10 704	2,5 % [2,2 ; 2,8]
Poule pondeuse (septicémie)	8 016	26,2 % [25,2 ; 27,1]	8 015	14,9 % [14,1 ; 15,7]	6 961	7,1 % [6,5 ; 7,7]	7 352	2,9 % [2,5 ; 3,3]	7 805	2,3 % [2,0 ; 2,7]
Dinde (septicémie)	6 179	48,0 % [46,7 ; 49,2]	6 185	21,6 % [20,5 ; 22,6]	4 286	2,1 % [1,8 ; 2,7]	5 961	3,4 % [3,0 ; 3,9]	5 856	0,8 % [0,6 ; 1,1]
Porcelet (troubles digestifs)	2 471	58,9 % [57,0 ; 60,9]	2 469	55,8 % [53,8 ; 57,7]	2 484	12,7 % [11,4 ; 14,1]	2 457	8,5 % [7,5 ; 9,7]	2 527	2,4 % [1,9 ; 3,1]

Figure 21 : Tendances des résistances à l'amoxicilline (A), aux sulfamides-triméthoprime (B) et à la gentamicine (C) chez les souches *E. coli* isolées chez l'Homme, les chiens, les chats, les porcelets, les poulets de chair, les poules pondeuses, les dindes et les veaux, entre 2014 et 2017



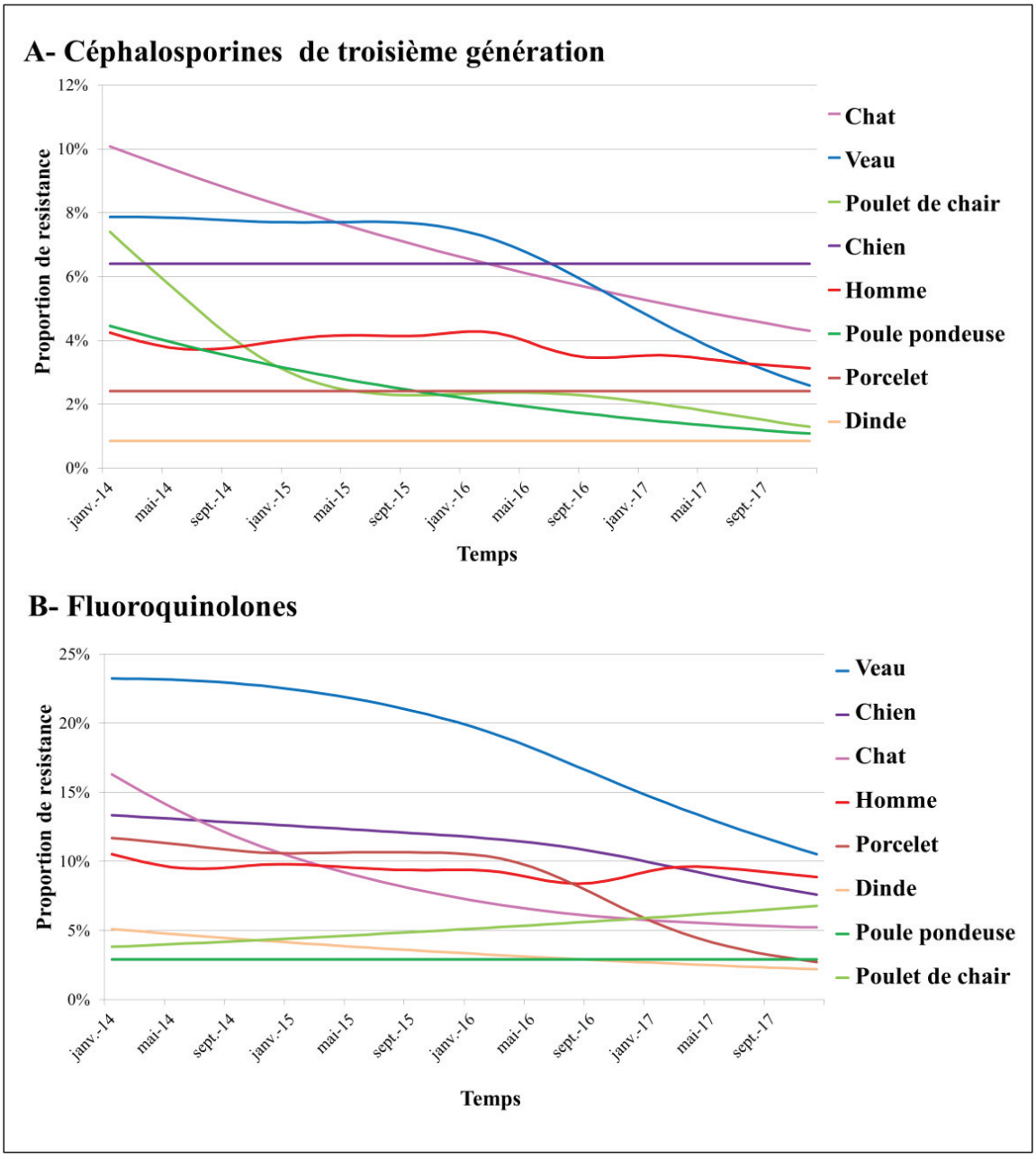
La tendance de la résistance à la gentamicine était globalement stable chez l'Homme, oscillant de 3,5 % [3,2 ; 3,8] en janvier 2014 à 3,0 % [2,9 ; 3,2] en décembre 2017 (Figure 21-C). En santé animale, en revanche, les tendances des résistances ont diminué depuis 2015 chez toutes les espèces étudiées, excepté les chats. En décembre 2017, les proportions les plus élevées de résistance à la gentamicine étaient respectivement de 18,1 % [16,9 ; 19,4] pour les veaux et 6,7 % [4,0 ; 9,3] pour les porcelets, alors que pour toutes les autres espèces les résistances étaient inférieures à 5 %

3. Tendances des résistances aux antibiotiques d'importance critique

Alors que la plupart des isolats d'espèces animales présentaient une forte diminution de la résistance aux C3G, les proportions de résistance des souches humaines n'ont que légèrement diminué sur la période d'étude, passant de 4,2 % [3,8 ; 4,7] en janvier 2014 à 3,1 % [2,9 ; 3,4] en décembre 2017 (Figure 22). En décembre 2017, le niveau de résistance aux C3G chez l'Homme était médian entre les niveaux de résistance observés chez les animaux de compagnie et chez les animaux de production. Les isolats de chiens et de chats présentaient les niveaux de résistance aux C3G les plus élevés, 6,4 % [5,6 ; 7,2] et 4,3 % [3,2 ; 5,6] respectivement, tandis que les souches isolées de volailles présentaient les niveaux de résistance les plus faibles, inférieurs à 2 %.

De façon similaire, la plupart des souches *E. coli* isolées d'animaux présentait une nette diminution de la résistance aux fluoroquinolones entre 2014 et 2017, alors que la résistance des souches isolées chez l'Homme variait de 10,5 % [10,0 ; 11,1] en janvier 2014 à 8,9 % [8,6 ; 9,2] en décembre 2017. Seule la tendance de la résistance chez les poulets de chair était en augmentation. En décembre 2017, les isolats humains présentaient, après les isolats de veaux, les proportions les plus élevées de résistance aux fluoroquinolones (Figure 22-B).

Figure 22 : Tendances des résistances aux céphalosporines de troisième génération (A) et aux fluoroquinolones (B) chez les souches *E. coli* isolées chez l'Homme, les chiens, les chats, les porcelets, les poulets de chair, les poules pondeuses, les dindes et les veaux, entre 2014 et 2017



D- Discussion

1. Approche *One Health* : enjeux et obstacles

Suivant le concept *One Health* [69], il est essentiel de confronter l'évolution des résistances chez l'Homme et les animaux pour orienter les stratégies de contrôle et de lutte. Cependant, cette approche intégrative et globale ne consiste pas seulement à rassembler des données et à les interpréter conjointement. La première étape consiste à déterminer quelles données peuvent être utilisées de manière pertinente pour le parallèle envisagé et comment effectuer une analyse afin de

fournir des comparaisons ayant un sens. Dans le cadre de ces travaux, le parallèle réalisé entre la résistance des souches *E. coli* isolées chez l'Homme en ville et chez les animaux reposait : *(i)* sur une collecte de données similaire *via* des systèmes de surveillance des bactéries pathogènes à l'échelle nationale et *(ii)* sur une méthodologie strictement similaire par l'implémentation de modèles GAM permettant d'analyser statistiquement l'évolution des résistances.

La période d'étude a été choisie pour assurer une comparabilité des données recueillies au cours du temps en santé humaine. En effet, les standards de catégorisation des isolats en sensible, intermédiaire et résistant ayant été modifiés en 2013 en médecine humaine, la période d'étude a été calibrée en conséquence. Compte tenu des pratiques, de l'utilisation des antibiotiques et du recours à l'antibiogramme variables en fonction de chaque type de production et du contexte pathologique sous-jacent, des sous-populations ont été sélectionnées pour les analyses. Par conséquent, le contexte pathologique pouvait varier entre les espèces considérées. De fait, les souches *E. coli* pourraient ne pas être strictement comparables d'une espèce à une autre dans cette étude. Cependant, d'un point de vue biologique, cette analyse fine apparaît largement préférable à celle qui aurait consisté à rassembler des souches provenant de différents types de production, de veaux et de vaches laitières par exemple, ou de différents contextes pathologiques, en cas de troubles digestifs et de mammites par exemple, alors que ces différents contextes sont connus pour présenter des niveaux de résistance différents [308,309].

2. Parallèle Homme-Animal : similitudes ou différences ?

Si les données traitées dans cette étude sont de même nature, les volumes traités en médecine humaine et en médecine animale sont quant à eux très différents puisque plus de 90 % des données analysées provenaient du réseau MedQual. Les différences de volumes observées résultent principalement : *(i)* de différences de paradigmes de soin entre secteurs, la médecine humaine de ville étant une médecine individuelle et non-populationnelle, et *(ii)* des facilités d'accès aux examens complémentaires en santé humaine, notamment au travers du système d'assurance maladie qui prend en charge une partie du coût de l'antibiogramme.

Comparant les niveaux et les tendances de résistance chez l'Homme et les animaux entre 2014 et 2017, ces travaux révèlent que les niveaux de résistance des souches *E. coli* d'origine humaine étaient médians par rapport à l'étendue des niveaux de résistances observés en santé animale. Cependant, aucune dynamique commune entre les tendances des résistances chez l'Homme, les animaux de production et les animaux de compagnie n'a été identifiée. Les tendances ont évolué de manière spécifique à chaque espèce et semblent refléter différentes dynamiques infectieuses et différentes pratiques d'utilisation des antibiotiques. De plus, même si des contacts

directs et étroits entre l'Homme et les animaux de compagnie pouvaient suggérer des échanges de déterminants de résistance entre ces espèces et donc une dynamique de résistance proche, ces résultats démontrent que les niveaux et les tendances de résistance différaient entre les souches isolées chez l'Homme, les chiens et les chats. Si les animaux de production sont largement considérés comme des réservoirs de résistance [310], ces travaux soulignent que les animaux de compagnie constituent également une source de déterminant de résistance pour l'Homme, en particulier vis-à-vis des AIC. Il est donc tout aussi essentiel de surveiller l'évolution des résistances chez les animaux de compagnie, compte tenu du contact étroit entre l'Homme et ces derniers.

Par ailleurs, contrairement aux diminutions importantes des résistances aux AIC observées chez les animaux d'élevage et les animaux de compagnie, ces résistances chez l'Homme n'ont que légèrement diminué. Pourtant au cours de la période 2014-2017, plusieurs campagnes de communication en médecine humaine ont été menées auprès des médecins et du grand public. En particulier, pour le traitement de la cystite simple (sans risque de complications), des recommandations ont été publiées depuis 2014 par la Société de Pathologie Infectieuse de Langue Française : l'association fosfomycine-trométamol est recommandée en traitement de première intention et le pivmécillinam en deuxième intention [311]. Les fluoroquinolones peuvent être utilisées dans les cas de cystites compliquées, mais uniquement en traitement de troisième intention ou sur la base des résultats d'antibiogrammes. L'utilisation des fluoroquinolones en médecine de ville a diminué entre 2014 et 2016, passant de 1,74 à 1,51 consommation quotidienne / 1 000 habitants / jour [312]. Toutefois cette variation ne se reflète pas sur la tendance de la résistance aux fluoroquinolones chez l'Homme qui demeure assez stable sur la période. L'utilisation des C3G en ville est quant à elle restée stable sur la période 2014-2016. En définitive, les résultats de ces travaux ne corroborent pas les hypothèses classiquement émises de répercussion d'effet des pratiques du secteur animal sur la santé humaine.

BILAN

Dans une démarche intégrative, la finalité des travaux de recherche a consisté à mener une analyse comparée de la situation épidémiologique de l'antibiorésistance en santé animale et en santé humaine en médecine de ville, hors milieu hospitalier. Ce rapprochement documente l'hypothèse classiquement émise du parallèle et d'interactions entre les deux phénomènes. En analysant les tendances des résistances des souches *E. coli* isolées chez l'Homme et les animaux par une méthodologie commune, cette étude a montré que, quel que soit l'antibiotique considéré, les proportions de résistance des isolats d'origine humaine étaient du même ordre de grandeur que les proportions de résistance des isolats d'animaux, qu'il s'agisse d'animaux de production ou d'animaux de compagnie. Les résistances ont évolué moins fortement et rapidement chez l'Homme que chez certaines espèces animales, notamment les veaux et les porcelets. Aucune dynamique de résistance commune à l'Homme, aux animaux de production et aux animaux de compagnie n'a été observée : les tendances ont évolué de manière spécifique à chaque espèce. Ces résultats justifient que l'effort de réduction de l'utilisation des antibiotiques soit porté dans tous les secteurs et pour toutes les espèces, en médecines humaine et vétérinaire. Au cours de ces dernières années, les mesures réglementaires en médecine vétérinaire ont eu un impact important sur l'utilisation des AIC en santé animale en France, contribuant à la diminution des résistances chez les animaux de production comme chez les animaux de compagnie. Néanmoins, les variations de résistance dans le secteur vétérinaire n'ont pas eu un impact visible et clair sur les tendances des résistances en médecine humaine. Les phénomènes d'antibiorésistance sont donc vraisemblablement plus sectoriels qu'on ne pouvait l'imager.

Chapitre V - Discussion générale

Dans ce dernier chapitre, nous discutons de la portée de ces travaux de recherche dans le cadre général de la surveillance de l'antibiorésistance chez les bactéries pathogènes en santé animale en France et de ses perspectives, en particulier pour l'évolution du réseau.

A- Surveillance temporelle des résistances : quelles pistes pour une alerte précoce en santé animale ?

Les modèles implémentés ont permis de décrire l'évolution des niveaux de résistance et de détecter des variations significatives *a posteriori*. Mais serait-il possible de faire de l'alerte précoce en antibiorésistance ? Les modèles développés permettraient-ils cette avancée ? Les données dont nous disposons aujourd'hui peuvent-elles servir à assurer une surveillance précoce et pour quelles finalités ?

1. L'alerte : généralités et application à l'antibiorésistance

L'alerte précoce repose sur la détection d'anomalies dans les chroniques temporelles. Une anomalie ou alarme est un écart par rapport à une valeur attendue, c'est-à-dire une valeur théorique standard ou une prévision statistique. La détection d'anomalies consiste à évaluer si la différence entre l'attendu et l'observé est statistiquement significative, auquel cas une alarme statistique est déclenchée. Appliquée à l'antibiorésistance, la définition de l'anomalie semble plurielle. Il pourrait s'agir : *(i)* d'une augmentation inhabituelle de la proportion de souches résistantes vis-à-vis d'un antibiotique ou de plusieurs antibiotiques de façon conjointe, *(ii)* de l'apparition d'une résistance nouvelle pour un taxon donné, par exemple la résistance au ceftiofur chez *P. multocida* [313], ou *(iii)* de l'apparition d'un nouveau mécanisme de résistance. Les deux dernières anomalies reposent nécessairement sur des investigations à la fois phénotypiques et moléculaires, témoignant de la relation entre ces différentes définitions. À partir des données dont nous disposons *via* le Résapath, l'augmentation inhabituelle de la proportion de souches résistantes vis-à-vis d'un ou de plusieurs antibiotiques pourrait être étudiée dans une perspective d'alerte précoce. Suite à une alerte sur le profil phénotypique de la résistance, des investigations moléculaires pourraient être effectuées, aboutissant par exemple à la détection de nouveaux mécanismes de résistance.

2. Méthodologie de détection d'anomalies et application aux données de surveillance

La détection précoce des anomalies ou alarmes est un vaste champ de recherche en surveillance et en épidémiologie et il existe de nombreux algorithmes de détection. Ils impliquent tous une mesure de l'espérance des données et une fonction statistique permettant de comparer la valeur attendue pour une ou plusieurs unité(s) temporelle(s) à l'observation. La mesure de l'espérance peut être calculée en utilisant deux approches distinctes reposant sur deux types d'algorithmes de détection: *(i)* les méthodes inspirées par la maîtrise statistique des procédés, également appelées cartes de contrôle, utilisent la moyenne sur une période de référence sélectionnée comme mesure de l'attendu et *(ii)* les techniques de régression et les méthodologies de séries chronologiques qui basent la mesure de l'attendu sur la prédiction de l'échantillon [314–318]. Quelles que soient les méthodes choisies, la détection d'anomalies pour des phénomènes infectieux se fait classiquement à partir du signal brut.

Dans la littérature, la détection précoce de l'antibiorésistance a été discutée et explorée à ce jour par Righi *et al.* en 2017 dans un contexte particulier. Les auteurs ont recherché l'augmentation de l'incidence de certaines bactéries résistantes (SARM et BLSE) à l'hôpital en utilisant des cartes de contrôle Cumulative Sums (CUSUM). Le niveau acceptable d'incidence de la résistance était déterminé par la moyenne du taux d'incidence mensuel de la résistance bactérienne pour 1000 patients par jour. Une augmentation d'un écart-type était considérée comme inacceptable et fixait le seuil limite de détection d'une anomalie. Ces cartes ont permis la détection précoce d'augmentation des niveaux de résistance à l'échelle de l'hôpital à partir du signal brut observé.

L'approche utilisée en médecine hospitalière semble difficilement transposable au contexte de la santé animale et pour analyser les données dont nous disposons. Nos travaux ont mis en évidence que les séries temporelles des résistances en santé animale étaient des signaux particulièrement bruités. De fait, si le signal brut est utilisé, le seuil d'alarme sera très difficile à choisir pour minimiser les fausses alarmes mais néanmoins détecter des anomalies. Dans ce contexte, seules des alarmes portant sur l'évolution de la tendance des résistances et non sur le signal brut semblent réalisables et pertinentes. Les modèles GAM développés à un pas de temps infra-annuel pourraient être utilisés pour établir des prédictions à un horizon temporel déterminé en tenant compte de la structure passée de la chronique. Il serait donc possible de les utiliser en routine pour la détection d'anomalies en recherchant des augmentations de tendance des résistances. Dans la littérature, les seuils d'alarme sont généralement définis à un multiple près de l'écart type de la moyenne de l'échantillon [317,318]. Ici, le seuil d'alarme pourrait être fixé par rapport à

l'enveloppe de confiance à 95% des prévisions. D'après nos travaux, cette approche aurait par exemple permis la détection de l'augmentation de la résistance des souches *E. coli* aux C3G chez les volailles dans les années 2010. D'autres recherches sont nécessaires pour préciser la sensibilité au changement de cette approche.

3. Pistes pour un gain de réactivité

Si les modèles GAM développés pouvaient être utilisés pour produire des alarmes en antibiorésistance, la précocité de cette alarme resterait fonction du délai entre l'infection d'un animal par une bactérie pathogène porteuse de résistances et l'analyse du résultat d'antibiogramme par le Résapath. À condition que le signal soit d'ampleur suffisante pour être détecté, plus les délais sont courts, plus l'alarme est précoce. Ce délai prend en compte différentes étapes du recours à l'antibiogramme et de l'intégration des données à la base du Résapath, évoquées Figure 9. Au cours de ces travaux de recherche, nous n'avons pu décrire les tendances des résistances qu'avec un retard de douze mois par rapport à l'année en cours en raison d'un délai de transmission des résultats d'antibiogrammes par les laboratoires. Pour la mise en place d'un dispositif d'alerte précoce, il faudrait raccourcir ce délai. Une transmission plus régulière des données par les laboratoires, par exemple tous les trimestres, serait possible et est envisagée comme une amélioration du dispositif de surveillance dans les années à venir. En parallèle, le développement de logiciels d'échange de données informatisé entre les laboratoires adhérents et le Résapath apparaît comme une solution à mettre en œuvre pour faciliter et donc accélérer la collecte. Des réflexions sont actuellement en cours pour le déploiement de ces logiciels.

4. Alerte précoce, quelle finalité ?

Sous l'hypothèse que les données du Résapath permettraient de détecter des anomalies précoces dans l'évolution de l'antibiorésistance en santé animale en France, quel sens pourrait-on donner à ces signaux anormaux et quelles suites envisager ? La dernière étape critique pour un tel dispositif de surveillance serait l'interprétation des alarmes produites qui devraient être confrontées à l'expertise de personnes en charge de leur interprétation et validation. C'est le passage de l'alarme à l'alerte. Cette étape doit précéder toute investigation ou toute mise en place de mesures de lutte dans un souci de limitation de mobilisation de moyens humains, financiers ou matériels pour de fausses alertes.

Appliquée plus précisément aux données de surveillance du Résapath, l'alerte précoce interroge la pertinence et la fiabilité des alarmes potentiellement produites. Si les résistances phénotypiques peuvent être un bon indicateur des résistances moléculaires sous-jacentes, elles n'en

restent pas moins une approximation qui peut être mise à mal dans certains cas. Pour exemple, la résistance des streptocoques aux fluoroquinolones est largement surestimée par l'analyse phénotypique en milieu gélosé. Ainsi, si une alarme est formulée à partir des données du Résapath, sa fiabilité et sa pertinence dépendront du germe en cause et de l'antibiotique testé.

La finalité ultime de la surveillance n'est pas tant la détection que l'action. Quelles suites pourrait-on donner à ces alertes ? Les récipiendaires d'une telle alerte sont le gestionnaire du risque, représenté par les administrations vétérinaires locales et centrales, et les vétérinaires praticiens. Les suites données dépendront *a fortiori* : de la combinaison espèce bactérienne / antibiotique / espèce animale en cause, de l'aspect zoonotique de cette résistance, des marges de manœuvre du décideur et des moyens disponibles, réglementaires ou financiers. Elles pourraient conduire à l'arrêt ou à la restriction d'usage de certains antibiotiques, mais également au renforcement de la biosécurité et de la prévention, comme la vaccination des cheptels bovins contre certaines affections respiratoires. Pour le gestionnaire ces alertes précoces trouvent leur utilité dans le cas de menaces sanitaires graves, pour l'Homme, le cheptel ou l'économie. Au vu de nos travaux, la résistance peut évoluer fortement sur une courte période comme un trimestre, justifiant en partie une évolution vers un dispositif d'alerte précoce. Toutefois, peu de combinaisons de résistances d'ores et déjà surveillées par le Résapath sont actuellement considérées comme des indicateurs de menaces graves. La précocité est également à définir en fonction des besoins des gestionnaires du risque et des professionnels pour mettre en place des mesures correctives. Même avec un retard annuel, les résultats de nos travaux de recherche permettent déjà d'orienter les acteurs du sanitaire, nuançant l'intérêt d'un dispositif d'alerte plus précoce.

B- Une surveillance spatiale des résistances en santé animale : quelles perspectives ?

1. Intérêts et limites d'une caractérisation spatiale des résistances et principaux freins rencontrés

La surveillance spatiale des résistances en santé animale permettrait, grâce au développement de méthodes appropriées, *(i)* de décrire l'hétérogénéité des niveaux de résistances entre zones géographiques, *(ii)* de quantifier et d'étudier la dynamique d'évolution spatiale du phénomène d'antibiorésistance, *(iii)* de révéler la présence de facteurs de risque et *(iv)* d'orienter des investigations sanitaires [121]. Si les informations collectées autour du résultat d'antibiogramme sont riches, nos travaux ont illustré que les données du Résapath ne permettaient

pas à l'heure actuelle d'étudier de manière satisfaisante la dynamique de la distribution géographique des résistances. Cette limite résulte principalement du fait que les volumes collectés par unité géographique sont faibles et que l'origine géographique du lieu de prélèvement pour la réalisation de l'antibiogramme n'est pas renseignée de façon systématique par les laboratoires. Deux solutions sont donc envisageables : améliorer la complétude des données du Résapath et augmenter le volume de données collectées par le réseau.

2. Renforcer la complétude des données de surveillance

Le renseignement de l'indication géographique s'intègre plus globalement dans la problématique de complétude des commémoratifs liés à l'antibiogramme. Les données manquantes peuvent provenir de deux origines : soit le vétérinaire n'a pas transmis les commémoratifs au laboratoire d'analyse, soit le laboratoire n'a pas transmis au réseau les commémoratifs reçus. Nos travaux de recherche ont suscité la réalisation d'une enquête nationale auprès des vétérinaires pour déterminer - dans le contexte de réalisation d'un antibiogramme - quelles informations ils transmettaient en commémoratifs aux laboratoires, à quelle fréquence, par quels moyens et pour quelles raisons. Cette enquête en cours permettra de poser les premiers jalons pour communiquer auprès des vétérinaires sur l'utilité de ces commémoratifs dans le cadre de la surveillance et ainsi les encourager à transmettre de façon systématique un panel d'informations connexes. Cette enquête pourra également initier la mise au point, en partenariat avec les laboratoires et les vétérinaires, d'une feuille de commémoratifs standardisée pour les prélèvements pour antibiogramme. La rédaction d'une telle fiche basée sur une approche participative trouverait tout son sens pour motiver les acteurs et les sensibiliser à la problématique. En effet, il est clairement nécessaire d'intégrer à la fois les vétérinaires et les laboratoires aux premières étapes de la réalisation de cette fiche afin d'identifier les obstacles potentiels ainsi que les moyens de les surmonter [319–321]. L'approche participative permettrait d'améliorer la compréhension du fonctionnement du Résapath par les vétérinaires et les laboratoires adhérents et de les sensibiliser à l'importance de la transmission de commémoratifs complets pour assurer une bonne surveillance des résistances [322,323]. Une telle approche a été utilisée pour le développement d'une politique de gestion des antibiotiques au Royaume-Uni, impliquant une collaboration et un dialogue intensifs entre les producteurs laitiers, les vétérinaires, les scientifiques et les partenaires de l'industrie [324]. Le succès de ces approches est lié à la participation des acteurs à la fois dans la conception, la mise en œuvre et l'évaluation de l'outil ou de la mesure mise en place [325].

À l'heure actuelle le Résapath ne dispose pas d'indicateur relatif à la complétude ou à la qualité des données transmises par les laboratoires. En premier lieu, dans une perspective

d'amélioration de la surveillance, il serait donc judicieux de définir de tels indicateurs. Appliqué à la surveillance spatiale des résistances, il pourrait s'agir du nombre de résultats d'antibiogrammes transmis comprenant le renseignement de l'indication géographique. Une évaluation du Résapath par la méthode OASIS [226] en 2018 est parvenue à des conclusions similaires pour l'amélioration du dispositif de surveillance. Enfin, au-delà de l'aspect géographique, la complétude des commémoratifs, notamment sur les types de production et l'âge des animaux, permettrait au Résapath de mieux remplir ses missions de surveillance. En effet, l'enquête sociologique a mis en évidence l'importance de la stratification des données pour analyser ensemble les résistances.

Si la complétude des données est nécessaire pour faire de l'analyse spatiale, le premier facteur limitant reste la quantité de données collectées par le réseau de surveillance.

3. Accroître le périmètre de la surveillance chez les bactéries pathogènes en France

La problématique se pose de savoir comment collecter davantage de résultats d'antibiogrammes en santé animale. Deux pistes sont discutées ici : favoriser le recours à l'antibiogramme et augmenter la couverture de la surveillance.

3.1 Favoriser le recours à l'antibiogramme

L'enquête sociologique réalisée au cours de cette thèse a été l'occasion d'identifier les leviers d'action pour favoriser et soutenir l'usage de l'antibiogramme en France. Si l'aspect financier et la durée de l'analyse demeurent les principaux freins à un usage plus fréquent de ce test en filières bovine, porcine et équine, d'autres contraintes existent comme le manque de laboratoires disponibles le week-end pour la réalisation des analyses, ou encore le manque de connaissance sur l'utilité de ce test. Des pistes existent donc comme un renforcement de la communication entre vétérinaires et agents de laboratoires ou la sensibilisation des acteurs de terrain sur l'utilité de l'antibiogramme. Des solutions pouvant avoir un impact notable sur les pratiques seraient par exemple la possibilité de faire subventionner ces analyses en routine par les régions.

Si favoriser le recours à l'antibiogramme présente différents intérêts, une augmentation brutale du recours à l'antibiogramme par changements des pratiques présenterait concomitamment un inconvénient majeur pour la surveillance de l'antibiorésistance. Les travaux d'analyses temporelles de cette thèse sont basés sur l'hypothèse sous-jacente et nécessaire de biais constants dans la collecte des données. Une modification soudaine des pratiques de recours à l'antibiogramme mettrait à mal cette hypothèse. Notons que l'augmentation importante de données collectées par le

réseau de surveillance ces dernières années (+ 211 % sur la période 2008-2017) peut déjà mettre à mal l'hypothèse formulée de biais constant et donc relativiser la fiabilité des résultats produits à partir des données de surveillance.

3.2 Augmentation de la couverture de la surveillance

Nos recherches ont montré que la couverture du dispositif de surveillance était variable selon les filières animales, s'échelonnant de 90% des antibiogrammes réalisés en filière porcine, à 50% en filière animaux de compagnie. Il existe donc une marge de progrès pour intégrer davantage de laboratoires dans le réseau et collecter, de fait, plus d'antibiogrammes. La solution idéale pour couvrir l'ensemble du territoire dans toutes les filières consisterait à intégrer l'ensemble des laboratoires d'analyses français, ou, de façon plus réaliste, à fixer des critères pour l'intégration de ces laboratoires.

Mais plusieurs limites se posent à l'intégration de nouveaux laboratoires aux Résapath. La principale est le manque de moyens des unités de l'Anses pour intégrer de nouveaux laboratoires ; elles n'ont pas de budget spécifique dédié aux activités du Résapath, mais utilisent leur budget propre qui est en diminution constante. Aucun nouveau laboratoire n'a pu être intégré au Résapath depuis 2016 car l'Anses n'est pas en mesure avec les moyens actuellement disponibles (outils informatiques, personnels) d'absorber le surcroît d'activité qui serait associé à l'adhésion de nouveaux laboratoires. De plus, tous les laboratoires d'analyses vétérinaires ne réalisent pas l'antibiogramme selon la même méthode : les résultats d'antibiogrammes ne seraient donc pas analysables ensemble directement. Une solution serait de disposer de nouvelles ressources : *(i)* financières pour permettre en particulier la réalisation d'essais inter-laboratoires d'aptitude à tous les laboratoires adhérents au réseau, *(ii)* humaines pour le traitement et l'intégration des données et *(iii)* matérielles avec le développement d'un logiciel d'échange de données informatisé pour faciliter et accélérer l'échange des résultats d'antibiogrammes. Dans le cadre du plan EcoAntibio, le Résapath a reçu des subventions pour l'implémentation d'un tel logiciel. Il est donc raisonnable d'espérer un renforcement du dispositif avec l'intégration de nouveaux laboratoires dans les années à venir. Il demeurera toutefois le choix crucial des critères d'intégration. Considérant que le nombre d'antibiogrammes réalisés par un laboratoire peut être le reflet de la maîtrise de la technique et de son expertise, une possibilité serait d'intégrer tous les laboratoires réalisant *a minima* 200 antibiogrammes par an par la méthode en milieu gélosé et transmettant tous les mois leurs données sous le format requis par le réseau. Ces critères éviteraient les étapes de reformatage et de relance particulièrement chronophages. Notons néanmoins que l'exhaustivité n'est pas une finalité de la surveillance. Toutefois, dans un contexte où l'organisation des laboratoires d'analyses sur le

territoire est sujette à remaniement, le Résapath devrait être à même d'intégrer davantage de laboratoires dans les années à venir.

4. Disposer de plus de données : une réelle solution pour l'analyse spatiale ?

La régionalisation des résistances est déjà réalisée en médecine humaine à partir des données de surveillance collectées par le réseau MedQual, et les décisionnaires sont particulièrement demandeurs de cette information qui leur permet de cibler les efforts à accomplir. Mais la distribution des populations animales sur le territoire est très hétérogène. En particulier les animaux de production sont concentrés dans des régions bien spécifiques (Figure 12). De fait, même si le Résapath étend sa couverture et collecte davantage d'antibiogrammes, peu d'antibiogrammes seront collectés dans certaines régions à faibles effectifs animaux. Le Résapath ne sera donc pas en mesure de mettre en évidence une différence significative des niveaux de résistance dans de telles régions en raison d'un intervalle de confiance trop large. Du point de vue de la communication, se poserait également la problématique du message transmis. Seules les résistances des régions françaises correspondant aux zones où les animaux sont les plus présents seraient cartographiées, pouvant laisser supposer, possiblement à tort, l'absence de résistance dans les autres régions à faibles effectifs. Il serait utile de déterminer pour chaque combinaison espèce bactérienne / espèce animale / antibiotique le nombre d'antibiogrammes nécessaires pour faire de la cartographie par région, en fonction de la prévalence supposée et de la précision souhaitée. De façon plus réaliste, ces analyses pourraient être menées pour les combinaisons présentant un intérêt de santé publique. Elles permettraient de déterminer si l'objectif de cartographie des résistances à une échelle infranationale serait atteignable dans quelques années.

Si l'accroissement du périmètre de la surveillance est une évolution possible du Résapath, d'autres évolutions ou réorientation sont envisageables.

C- Autres pistes d'évolution pour la surveillance des résistances chez les bactéries pathogènes en santé animale

1. Evaluer le coût de la surveillance : une étape essentielle

Pour demander des aides financières dans une perspective d'évolution de la surveillance et surtout justifier leur montant, il est nécessaire d'estimer au préalable les coûts de fonctionnement du système. Or, à l'heure actuelle, aucune évaluation économique du fonctionnement du Résapath n'a

été faite. Face à un panel d'évolutions possibles, la première étape serait donc d'évaluer le coût de fonctionnement du Résapath et la répartition par activité des budgets. Ensuite seulement, l'estimation des coûts des évolutions envisagées serait possible.

2. Vers une surveillance ciblée des résistances : intérêts et écueils

Comme les ressources humaines et financières disponibles sont limitées, intuitivement, une solution pour réorienter la surveillance serait de surveiller en priorité les combinaisons espèce bactérienne / espèce animale / antibiotique qui présentent le plus de risque en termes de santé publique. Appliquée à la surveillance de l'antibiorésistance en santé animale, cette démarche conduirait à surveiller en priorité certaines résistances d'intérêt comme les résistances aux AIC, particulièrement étudiées dans le cadre de cette thèse. Pour faire le parallèle avec les données en médecine humaine et répondre aux attentes des pouvoirs publics, la résistance aux carbapénèmes chez les entérobactéries ou bien la résistance à la vancomycine chez les entérocoques pourraient également être surveillées.

Cependant, comme nous l'avons vu au travers de nos recherches, seules les résistances aux antibiotiques testés par les laboratoires d'analyses vétérinaires peuvent être explorées à partir des données de surveillance du Résapath. Les laboratoires ne testent pas en routine les carbapénèmes ou la vancomycine car ces molécules ne sont pas autorisées en médecine vétérinaire. De plus, le laboratoire ne doit pas rendre d'avis sur leurs résistances aux vétérinaires. Pour permettre la surveillance de ces molécules, il faudrait donc faire évoluer les pratiques des laboratoires. Mais ce changement introduirait un surcoût pour l'activité des laboratoires en raison de la fourniture en disques imprégnés en antibiotiques et l'achat de plaques d'antibiogramme supplémentaires. Dans ce contexte, seule une incitation par les pouvoirs publics serait à même de modifier les pratiques : il pourrait s'agir de subventions, de compensations financières ou de mesures réglementaires, qui, dans l'intérêt commun de lutte contre l'antibiorésistance, inciteraient ou obligeraient les laboratoires à tester systématiquement ces molécules. Une surveillance ciblée présenterait toutefois un inconvénient majeur : seules les résistances connues seraient surveillées, les résistances nouvelles, préoccupantes *de facto* car non connues, ne seraient pas décelables par un tel système. Au-delà de la surveillance ciblée, une surveillance basée sur le risque, c'est à dire ciblant les populations bactériennes ou animales à surveiller en fonction du risque qu'elles présentent ou seraient susceptibles de présenter, pourrait également être une option d'évolution. La surveillance basée sur le risque garantit un rapport bénéfice-coût plus élevé [326], affectant les ressources de manière plus efficace. Elle vise non seulement à prioriser les dangers à surveiller (surveillance ciblée), mais également à assurer la détection précoce de phénomènes émergents qui pourraient menacer la santé

publique. L'identification et la sélection des dangers à prendre en compte en fonction des risques, liées aux pratiques notamment, sont des étapes clés dans la conception de ces systèmes de surveillance. Appliquées à l'antibiorésistance en santé animale, la principale problématique serait d'après Stärk *et al.* (2006) une liste de dangers particulièrement longue pouvant compromettre le gain d'efficacité réel d'une telle surveillance [326].

Quelle que soit la stratégie choisie, il est indispensable de garder à l'esprit que c'est à la fois la motivation professionnelle des vétérinaires à réaliser l'antibiogramme et la motivation sanitaire, personnelle ou professionnelle du propriétaire de l'animal qui soutiennent actuellement la surveillance de l'antibiorésistance chez les bactéries pathogènes en santé animale. Le principal coût de la surveillance, qui est le coût de production des données, est directement endossé par les éleveurs ou propriétaires qui paient pour l'antibiogramme. Comme l'investissement des vétérinaires et de leurs clients est mu par une finalité clinique de médecine vétérinaire - soigner les animaux malades - une réorientation de la surveillance vers une autre finalité, par exemple de santé publique, pourrait faire surgir des tensions et incompréhensions délétères à la surveillance [327]. Ce sont les possibilités thérapeutiques qui intéressent au premier chef les vétérinaires praticiens lors de la réalisation d'un antibiogramme. Il faudra donc veiller, quelle que soit l'évolution envisagée pour la surveillance, à préserver la motivation des vétérinaires à réaliser ces antibiogrammes. En ce sens, il est important de ne pas faire porter aux vétérinaires ou aux propriétaires d'animaux le surcoût engendré par une évolution du dispositif de surveillance. Dans le cas contraire, le recours à l'antibiogramme risquerait de s'amenuiser, remettant en cause les capacités du dispositif de surveillance à remplir ses missions initiales.

Au lieu de réorienter le champ de la surveillance, une autre évolution possible pourrait être de caractériser plus finement les résistances phénotypiques déjà surveillées à l'aide de techniques de biologie moléculaire.

3. Vers une surveillance moléculaire des résistances : un objectif réaliste ?

À l'heure actuelle, le Résapath n'est pas un dispositif de surveillance moléculaire des résistances en santé animale. Nous entendons ici par surveillance moléculaire l'identification précise de la bactérie (espèce et genre) et de son sérogroupe, ainsi que la mise en évidence de déterminants de résistance, principalement par analyse PCR. Les souches collectées pour analyse moléculaire par le réseau ne sont qu'une petite sous-partie non-représentative des résultats

d'antibiogrammes collectés en routine ; en 2017 seulement 3% des données ont permis des analyses microbiologiques menées par l'Anses (1 634/56 290).

Pourtant la mise en place d'une surveillance moléculaire des résistances présenterait différents intérêts notables en termes de santé publique : *(i)* préciser l'origine ou les origines de l'augmentation de la résistance, comme les émergences de résistance ou de fortes variations des niveaux de résistance sur une courte période de temps peuvent résulter de la dissémination de déterminants de résistance ou de la prolifération d'un clone bactérien en particulier ; (*ii)* connaître les mécanisme de résistance sous-jacents et identifier s'ils sont nouveaux ou communs avec ceux identifiés en santé humaine et *(iii)* faire le parallèle avec les données de surveillance moléculaire disponibles en santé humaine. À l'heure actuelle les principaux freins sont d'ordres financier et humain ; l'Anses ne dispose pas des ressources suffisantes pour mener en routine des analyses de biologie moléculaire sur un panel conséquent de souches. D'autres considérations techniques sont à prendre en compte : les laboratoires adhérents ne sont pas tous capables de conserver et de transmettre leurs souches à l'Anses.

À l'aune de ces éléments, une évolution vers une surveillance moléculaire ne pourrait être endossée que par l'Anses qui dispose déjà des moyens techniques pour réaliser les analyses de biologie moléculaire et de l'expertise interne pour l'interprétation. À première vue, le coût de développement d'une surveillance moléculaire serait considérable car il doit tenir compte : de la transmission du matériel biologique, de son stockage, de sa conservation et de son analyse. S'il n'est pas imaginable de déployer une surveillance moléculaire des résistances de façon systématique en raison du volume élevé de souches potentiellement reçues (plus de 56 000), une solution réaliste serait de cibler la surveillance moléculaire sur une combinaison bactérie / espèce animale / antibiotique à définir en fonction des priorités de santé publique. On pourrait par exemple envisager, à l'instar de ce qui est en partie effectué par le Résapath, de réaliser une surveillance moléculaire de toutes les entérobactéries présentant une résistance phénotypique aux C3G (profil BLSE) chez les espèces animales où ces résistances sont les plus élevées, ou bien une surveillance moléculaire de tous les *Staphylococcus aureus* présentant une résistance phénotypique à l'oxacilline (profils SARM).

Quoi qu'il en soit, pour que la surveillance moléculaire de l'antibiorésistance se mette en place en santé animale en France, il faudrait qu'elle soit soutenue par l'autorité administrative : *(i)* soit d'un point de vue réglementaire, par exemple *via* l'obligation d'investigations moléculaires sur certains profils de résistance phénotypique, *(ii)* soit d'un point de vue financier par l'octroi de subventions pour le développement du Résapath, *(iii)* soit les deux. La mise en œuvre d'une surveillance moléculaire des résistances en santé animale doit être décidée en fonction des objectifs

des décideurs et au vu des ressources humaines, matérielles, financières allouées et du temps disponible. Quoi qu'il en soit, la surveillance phénotypique demeure dans tous les cas un préalable indispensable à la surveillance moléculaire.

Pour préparer les évolutions évoquées du Résapath, il serait donc nécessaire d'estimer les coûts et bénéfices : *(i)* de l'intégration de nouveaux laboratoires dans le réseau ; *(ii)* de réalisation d'une surveillance des résistances phénotypiques pour des antibiotiques utiles en santé humaine comme les carbapénèmes ou la vancomycine ; et *(iii)* de mise en place d'une surveillance moléculaire. Au-delà des évolutions précédemment envisagées qui nécessitent *a fortirori* de disposer de moyens supplémentaires pour être mises en œuvre, nous pouvons imaginer une autre évolution qui serait, elle, liée à l'approche méthodologique.

4. Une surveillance des résistances sans *a priori*

Une autre évolution possible du Résapath consisterait à revisiter l'approche d'analyse des associations de résistance. Dans le cadre de nos travaux, nous nous sommes intéressés à la caractérisation de la multirésistance définie comme l'acquisition d'une non-susceptibilité à au moins trois antibiotiques de classes différentes, seuil arbitraire commun à toutes les bactéries. Or, un phénotype de résistance à plus de trois antibiotiques peut être davantage préoccupant en termes de choix thérapeutiques, d'impacts en santé publique pour certains germes que pour d'autres. En sus, cette définition ne prend pas en considération la nature des associations ou combinaisons de résistances : or certaines sont évidentes comme la résistance au ceftiofur impliquant une résistance à l'amoxicilline, tandis que d'autres ne relèvent pas d'une association logique ou connue. De plus, la résistance conjointe vis-à-vis de deux antibiotiques peut être plus préoccupante pour une espèce bactérienne qu'une résistance conjointe vis-à-vis de trois antibiotiques. Enfin, l'utilisation unique de la définition de la multirésistance pour caractériser les associations de résistance réduit à une vision scotomateuse le champ de surveillance.

Existe-t-il d'autres associations de résistance qu'il serait judicieux de surveiller en routine ? Quelles sont les associations de résistances les plus fréquentes ou au contraire les plus rares chez les souches isolées en santé animale et existe-t-il des différences entre espèces animales ? Pour y répondre, une exploration sans *a priori* des associations de résistance à partir des résultats d'antibiogrammes collectés par le Résapath semble pertinente [328]. Il serait possible d'appliquer : *(i)* des méthodes d'analyses de données multiples pour la détection d'associations fréquentes comme par exemple l'analyse des correspondances multiples, suivie d'une classification ascendante hiérarchique, et *(ii)* des méthodes de détection d'événements rares telles que celles basées sur les réseaux de neurones.

Ces travaux permettraient d'identifier des associations de résistances fréquentes et rares, qui pourraient ensuite être suivies dans le temps et surveillées en routine en fonction de leur intérêt en termes de santé publique. De plus, les regroupements identifiés seraient confrontés aux connaissances biologiques des mécanismes de résistance ; par exemple chez *E. coli* un seul plasmide peut réguler la sensibilité aux céphalosporines, pénicillines, chloramphénicol, tétracyclines et fluoroquinolones [8,329]. Ils pourront en plus susciter des investigations de recherche moléculaire, on peut imaginer l'identification de mécanisme de résistance nouveau. *In fine* de telles recherches augmenteraient les chances de détecter de nouvelles résistances et de nouveaux mécanismes de résistances, qui, inconnus jusqu'alors, ne sont pas surveillés ou recherchés.

D- Quels enjeux d'avenir pour la surveillance de l'antibiorésistance en santé animale ?

1. De la nécessité d'ancrer l'importance d'une surveillance des résistances chez les bactéries pathogènes

L'importance de la surveillance des bactéries isolées en contexte clinique chez les animaux ne fait pas encore consensus en France et à travers le monde. À cet égard, cette thèse illustre et démontre la pertinence d'une telle surveillance non seulement pour suivre les résistances en santé animale dans le temps et sur un panel diversifié de bactéries, mais également pour faire le parallèle avec la surveillance clinique en santé humaine. Pour asseoir l'utilité de la surveillance, il est également important d'illustrer ses capacités. Nos travaux ont montré comment les données de surveillance servaient à évaluer l'impact des mesures de contrôle et les initiatives des professionnels sur l'évolution des résistances. De telles informations sont nécessaires aux gestionnaires du risque comme mentionné dans le Plan EcoAntibio2. De plus, l'évolution de l'antibiorésistance chez les bactéries pathogènes est un bon indicateur à analyser en parallèle de l'évolution de la consommation en antibiotiques. Les modèles développés dans cette thèse permettront d'intégrer cette variable dans les années à venir lorsqu'elle sera disponible.

Au niveau national, l'importance de cette surveillance est aussi liée à son utilisation par les récipiendaires de ces résultats, à savoir ici principalement l'État et les vétérinaires. Si les pouvoirs publics s'appuient sur les données de la surveillance pour orienter leurs mesures de contrôle et communiquer sur le risque, nous ne savons pas à l'heure actuelle dans quelle mesure les vétérinaires utilisent les données de surveillance produites. Un projet de recherche a été construit pour répondre

à cette question, visant à évaluer la connaissance des vétérinaires sur le Résapath et leurs attentes potentielles envers ce dispositif de surveillance. En parallèle, l'Anses développe une interface R-Shiny, site interactif en ligne permettant la visualisation des résultats de la surveillance. Les vétérinaires seraient évidemment de potentiels utilisateurs de cet outil. Les résultats de l'enquête auprès des vétérinaires permettront de moduler la présentation de l'interface en fonction des besoins de terrain identifiés.

2. Renforcer les collaborations et synergies de surveillance

Le projet de recherche mené avec le réseau MedQual a déclenché une dynamique de coopération et de collaboration qui, nous l'espérons, sera pérenne. Elle a été l'occasion d'échanger sur le fonctionnement des deux dispositifs, les problématiques rencontrées et les solutions mises en œuvre, mais également de créer un partage de compétences en statistiques et de réfléchir aux données dont il faudrait disposer pour la mise en parallèle Homme-animal. Les coordinateurs des réseaux avaient déjà eu l'occasion d'échanger dans le cadre de l'ONERBA, mais nos travaux ont permis aux équipes opérationnelles de véritablement travailler ensemble. Nos travaux illustrent la plus-value scientifique d'une telle collaboration pour la surveillance en termes de connaissances et d'amélioration de la surveillance.

Sous l'impulsion lancée par l'OMS, l'OIE et la FAO qui promeuvent le concept *One Health* [70], un nombre croissant de dispositifs intégrant surveillance animale et humaine voient le jour ces dernières années avec des différences entre pays [70,330–332]. Dans la plupart des cas, il s'agit essentiellement de mises en commun de données issues de différents secteurs mais sans articulation des modalités de surveillance et des analyses [333–336]. Dans le rapport de l'ONERBA [304], comme dans la plaquette annuelle de Santé Publique France qui diffuse des résultats sur la résistance à la fois chez l'Homme, l'animal et l'environnement, les données de surveillance de l'antibiorésistance sont présentées dans le même document, mais sans analyse conjointe. Nos travaux de recherche participent à la mise en œuvre d'une réflexion sur l'approche *One Health* et son application au travers de la méthodologie d'analyses conjointes des données de surveillance. Supposant que de telles collaborations se pérennisent, quels indicateurs souhaiterions-nous surveiller en santé animale pour faire le parallèle avec la santé humaine ? Nous pourrions renforcer ou étendre la surveillance vis-à-vis des principales résistances d'intérêt en santé humaine : la résistance à la colistine, aux bétalactamines et aux carbapénèmes chez les entérobactéries, la résistance chez *Pseudomonas aeruginosa*, la résistance chez *Acinetobacter baumanii*, la résistance chez les *Staphylococcus aureus* et *pseudintermedius*, la résistance à la vancomycine des entérocoques. Pour prioriser et faire le parallèle avec la médecine communautaire de ville, où sont

principalement surveillées *E. coli*, *Klebsiella* et *S. aureus*, nous nous focaliserions principalement sur les entérobactéries avec la résistance à la colistine, aux carbapénèmes et aux C3G et sur les SARM et SPRM. Toutefois, la surveillance de certains de ces indicateurs nécessite des modifications dans le fonctionnement actuel des dispositifs de surveillance, en particulier du Résapath : ajout d'antibiotiques à tester en routine par les laboratoires, investigations moléculaires pour certaines résistances, modification de la méthode d'antibiogramme. Quels que soient les objectifs fixés à l'avenir, ils devront tenir compte des capacités de chaque réseau et des moyens mobilisables pour y parvenir. À court terme, la problématique des référentiels devra nécessairement être abordée par le Résapath.

3. Antibiogramme : vers une harmonisation des méthodes et des référentiels

Le Résapath appuie sa surveillance sur la méthode de l'antibiogramme en milieu gélosé suivant le référentiel du CA-SFM vétérinaire, car il s'agit de la méthode la plus utilisée par les laboratoires d'analyses vétérinaires en France. Mais il existe également d'autres méthodes reconnues par le décisionnaire comme les microdilutions déterminant la CMI en milieu liquide. Comme nous l'avons évoqué, la méthode en milieu gélosé ne convient pas pour la détection de toutes les résistances phénotypiques, en particulier pour les polypeptides. De plus cette technique peut fournir un résultat imparfait, surestimant par exemple la résistance aux fluoroquinolones chez les streptocoques. Si les CMI en milieu liquide sont encore peu utilisées en santé animale, il serait imaginable qu'elles deviennent un jour la technique de choix car elles sont facilement automatisables et permettent le suivi de résistances d'importance critique comme la résistance à la colistine. Dans une perspective d'intégration de nouveaux laboratoires, le Résapath pourrait un jour également accepter les antibiogrammes provenant de différentes méthodes : CMI en milieu liquide et antibiogrammes en milieu gélosé. Se posera alors la question du référentiel suivi pour ces méthodes, afin d'assurer une interprétation fiable des données collectées.

En 2013, les laboratoires de biologie médicale de santé humaine se sont alignés sur le référentiel européen, passant du CA-SFM, référentiel spécifiquement français, à un référentiel CA-SFM/EUCAST. Le référentiel EUCAST se différencie du CA-SFM par une température d'incubation inférieure (35°C contre 37), une charge d'inoculum différente (pure *versus* dilution au dixième) et des charges d'antibiotiques pouvant être différentes. Si les seuils et les antibiotiques à tester du référentiel européen restent adaptés à la santé humaine, une version propre à la médecine vétérinaire, avec des breakpoints vétérinaires, est en cours d'élaboration et pourrait aboutir à la création d'un référentiel européen VETCAST [337]. Toutefois, cette initiative n'étant pas financée

et demandant un travail très conséquent, comprenant à la fois des études épidémiologiques, microbiologiques et des analyses de pharmacocinétique et pharmacodynamie, il semble peu vraisemblable qu'elle aboutisse à l'établissement d'un référentiel avant une décennie. Dans ce contexte, l'option la plus plausible resterait une migration du Résapath vers le référentiel EUCAST avec une reprise des seuils de l'EUCAST appliqués aux antibiotiques testés en médecine vétérinaire par classes d'antibiotiques. Le principal frein serait matériel : tous les laboratoires devraient disposer d'étuves spécifiques pour les antibiogrammes à 35°C. Si le changement de référentiel peut apparaître comme une nécessité, les modifications qu'il impliquera ne sont pas forcément anodines. Pour exemple, la migration du réseau MedQual du référentiel CA-SFM vers le CA-SFM/EUCAST a provoqué une rupture dans les chroniques, les rendant inexploitables. Il est donc vraisemblable que le changement de référentiel conduise à perdre la continuité d'analyse avec les années antérieures. Quoi qu'il en soit, les outils développés dans le cadre de ces travaux de recherche resteront parfaitement applicables à un changement de référentiel.

Mais pourquoi le Résapath ne continuerait-il pas à suivre le référentiel de la section vétérinaire du CA-SFM ? La problématique liée au CA-SFM est relative à la disponibilité des disques d'antibiotique chargés suivant les standards de la section vétérinaire du CA-SFM. À l'heure actuelle, ces disques ne sont plus produits que par un seul laboratoire. Une harmonisation des référentiels semble en sus indispensable dans une perspective de renforcement des synergies de surveillance en santés humaine et animale et pour le déploiement d'une surveillance européenne des résistances chez les bactéries pathogènes animales, pour conjuguer les résultats de différents systèmes.

4. Surveillance dans le contexte international

À l'heure actuelle, seule la surveillance de la résistance des bactéries commensales des animaux est organisée à une échelle supranationale, en particulier en Europe par la directive 2003/99/CE. Comme évoqué dans la première partie de cette thèse, le Résapath est un dispositif unique en Europe, même si d'autres dispositifs de surveillance des résistances des bactéries pathogènes existent, avec des périmètres de surveillance plus étroits, une collecte de données beaucoup plus faible ou fonctionnant à une échelle locale [338,339]. Plusieurs initiatives portées par les industries pharmaceutiques vétérinaires assurent depuis quelques années une surveillance harmonisée des résistances des bactéries pathogènes dans plusieurs pays européens pour les animaux producteurs d'aliments (programmes VetPath et MycoPath) et des animaux de compagnie (ComPath) [340–346]. Cependant, ces initiatives répondent initialement à un besoin des industriels face aux exigences réglementaires des procédures d'autorisation de mise sur le marché d'un

antibiotique. La surveillance établie reste du domaine privé, n'englobe pas tous les Etats Membres et ne peut remplacer un système de surveillance européen produisant des données publiques.

Dans une perspective européenne de lutte contre l'antibiorésistance, il serait judicieux de promouvoir l'instauration de dispositifs de surveillance des résistances des bactéries pathogènes des animaux dans d'autres pays communautaires avec une coordination européenne, par exemple par l'EFSA, permettant de produire des données et comparaisons à l'échelle européenne. C'est précisément l'un des enjeux de l'action conjointe EU-JAMRAI lancée en septembre 2017. Le workpackage 7.4.2 de cette action est centré sur le secteur vétérinaire. Il vise principalement *(i)* à évaluer les possibilités de combiner les systèmes de surveillance nationaux dans un réseau européen pilote pour la surveillance des résistances des bactéries isolées en contexte clinique en santé animale et *(ii)* à fournir des recommandations globales et spécifiques à l'UE pour la construction d'un réseau européen de surveillance des résistances chez les bactéries pathogènes des animaux. L'Anses, partie prenante de ce projet, promeut ici l'importance d'une surveillance de l'antibiorésistance chez les bactéries pathogènes animales, notamment pour faire le parallèle avec la santé humaine, comme l'ont illustré nos travaux.

À l'issue de cette action conjointe, l'Europe pourrait se prononcer en faveur de l'instauration d'une surveillance de certaines résistances chez les bactéries pathogènes en santé animale. Nous pourrions imaginer la mise en place d'un dispositif similaire à EARS-Net en médecine vétérinaire. Dans le cadre de la conceptualisation de ce dispositif, les réflexions évoquées précédemment pour la France se poseront à l'échelle communautaire. Les pistes sur le choix des résistances à surveiller en priorité, les techniques d'antibiogramme retenues, le ou les référentiels choisis discutés ci-avant prendront une autre envergure. Une harmonisation inadéquate des définitions épidémiologiques, des données collectées, des méthodes de réalisation d'antibiogrammes et des politiques de partage des données sont des obstacles potentiels à une surveillance collaborative fiable et informative [347]. À l'instar du dispositif EARS-Net en médecine humaine, il est à prévoir qu'il faille s'accommoder, au moins pendant quelques années, des spécificités locales des pays.

La mise en place et l'homogénéisation de systèmes de surveillance chez les bactéries pathogènes en santé animale en Europe pour la mise en parallèle avec les données de surveillance en santé humaine ne constitueraient en réalité qu'une étape supplémentaire d'une approche plus articulée de l'amélioration de la qualité et de la couverture de la surveillance mondiale des bactéries résistantes aux antibiotiques. Dans un contexte de mondialisation accrue, d'intensification du commerce, des échanges et des flux humains, une surveillance mondiale des résistances, à la fois chez l'Homme, l'animal et dans l'environnement est cruciale. En ce sens, l'alliance tripartite OIE-FAO-OMS appelle à la création de systèmes de surveillance actifs et fiables au niveau mondial et à

une intensification des efforts pour améliorer ou implémenter des systèmes de surveillance, en particulier dans les pays à faibles revenus qui présentent des niveaux particulièrement élevés de résistance [347–349]. C'est précisément dans ces pays que nombre d'industriels pharmaceutiques se sont installés, bénéficiant d'une main-d'œuvre bon marché et d'une réglementation environnementale moins contraignante qu'en Europe. La problématique dans ces pays est principalement liée au manque d'encadrement et de contrôle des émissions de produits pharmaceutiques rejetés par les industries au cours de la fabrication des médicaments, en particulier des antibiotiques [350–353]. Les cours d'eau où sont rejetés les antibiotiques créent des conditions favorables à l'émergence de bactéries multirésistantes, notamment vis-à-vis des fluoroquinolones, des céphalosporines de dernières générations et des carbapénèmes [350]. Plus inquiétant encore, les déterminants de multirésistance générés sont capables de se propager rapidement à d'autres pays. Une étude de 2010 a révélé que le gène NDM-1, porteur de la résistance aux carbapénèmes, avait déjà largement diffusé en Inde, au Pakistan, mais aussi au Royaume-Uni, depuis sa première identification en 2008 [354–357]. En 2017, le ministère indien de la Santé a lancé le premier plan du pays visant à réduire l'antibiorésistance (2017-2021). La surveillance sera partie intégrante de ce plan de lutte pour préserver la santé publique à la fois en Inde et dans d'autres pays [358,359]. Mais, les efforts de diminution d'usage des antibiotiques en médecines humaine et animale pourraient bien être vains, si la pollution de l'environnement durant le processus même de fabrication des antibiotiques ne diminue. Dans l'idéal, l'Inde, comme d'autres pays d'Asie, pourrait développer une stratégie de lutte contre la pollution de l'eau, à l'instar de ce qui a été lancé en Europe avec la Directive n° 2013/39/UE relative à la pollution de l'eau par les substances pharmaceutiques. Mais bien sûr une telle lutte est très onéreuse. C'est là tout l'enjeu de la lutte actuelle : déployer une surveillance intégrée, globale et mondiale en tenant compte les moyens existants ou mobilisables.

Conclusion

La surveillance de l'antibiorésistance se positionne comme un élément essentiel de la lutte contre le phénomène : elle permet d'approcher la dynamique d'évolution de la résistance, d'évaluer les stratégies de maîtrise et d'orienter les mesures de gestion. L'objectif général de ces travaux était de fournir au gestionnaire une aide à la décision pour la mise en œuvre et l'évaluation des mesures de lutte contre l'antibiorésistance en santé animale au travers de la caractérisation des résistances. Ces travaux ont montré que les résultats d'antibiogrammes des bactéries pathogènes animales collectés par le Résapath constituent un matériel de choix pour l'étude de la résistance chez des germes *(i)* présentant un intérêt majeur en termes de santé publique, comme *E. coli* ou *P. aeruginosa, (ii)* présentant un intérêt particulier en médecine vétérinaire comme *S. pseudintermedius*, ou *(iii)* pour lesquels peu de connaissances existent, à l'instar de *Pantoea* en filière équine. Le développement de modèles additifs généralisés a montré que les tendances des résistances sont propres à chaque espèce animale, reflétant des pratiques et des usages d'antibiotiques variables. La réversion de la résistance est possible et peut même se produire sur une courte période de temps, témoin de l'importance d'un suivi continu et pérenne des résistances en santé animale. Au cours de ces dernières années, les mesures réglementaires en médecine vétérinaire ont eu un impact important sur l'utilisation des AIC en santé animale en France, contribuant à la diminution des résistances chez les animaux de production comme chez les animaux de compagnie. Mais les variations de résistance dans le secteur vétérinaire n'ont pas eu un impact visible et clair sur les tendances des résistances en médecine humaine, d'après la mise en parallèle avec les données de surveillance du centre MedQual en médecine de ville. Il est donc indispensable que l'effort de réduction de l'utilisation des antibiotiques soit porté dans tous les secteurs et pour toutes les espèces, en médecines humaine et vétérinaire.

En définitive, par la caractérisation des résistances des bactéries pathogènes chez les animaux, ces recherches répondent bien à l'objectif général qui leur était assigné. Dans une perspective d'amélioration de la surveillance, elles mettent en lumière les marges de progrès du dispositif en place. Au-delà, elles témoignent que le Résapath constitue un outil puissant pour la connaissance de l'évolution des résistances en santé animale, ouvrant la voie au développement de dispositifs similaires dans d'autres pays. Dans le paradigme actuel de la lutte contre l'antibiorésistance, les évolutions à apporter au Résapath, et plus largement au déploiement de systèmes de surveillance des résistances en santé animale, devront s'inscrire, quelles qu'elles soient, dans une réflexion globale à conduire avec les décideurs politiques, prenant en compte des considérations financières, techniques, méthodologiques, logistiques et scientifiques, le tout dans une perspective *One Health*.

Références

1. Waksman SA. What is an antibiotic or an antibiotic substance? Mycologia. 1947;39: 565–569.
2. Sengupta S, Chattopadhyay MK, Grossart H-P. The multifaceted roles of antibiotics and antibiotic resistance in nature. Front Microbiol. 2013;4: 47.
3. Cohen Y, Jacquot C. Pharmacologie. Elsevier Masson; 2008 p. 516.
4. de Lima Procópio RE, da Silva IR, Martins MK, de Azevedo JL, de Araújo JM. Antibiotics produced by *Streptomyces*. Braz J Infect Dis. 2012;16: 466–471.
5. Martin R, Chabbert Y, Sureau B. Combinations of antibiotics ; their bacteriostatic and bactericide potency; clinical applications. Presse Med. 1953;61: 168–171.
6. Anses-ANMV. Index des Médicaments vétérinaires autorisés en France. In: Index des RCP 2017. Available: http://www.ircp.anmv.anses.fr/
7. Hooper DC. Fluoroquinolone resistance among Gram-positive cocci. Lancet Infect Dis. 2002;2: 530–538.
8. Blair JMA, Webber MA, Baylay AJ, Ogbolu DO, Piddock LJV. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. Nat Rev Microbiol. 2015;13: 42–51.
9. Khameneh B, Diab R, Ghazvini K, Fazly Bazzaz BS. Breakthroughs in bacterial resistance mechanisms and the potential ways to combat them. Microb Pathog. 2016;95: 32–42.
10. Tenover FC. Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. Am J Infect Control. 2006;34: S3-10; discussion S64-73. doi:10.1016/j.ajic.2006.05.219
11. Roberts MC. Tetracycline resistance determinants: mechanisms of action, regulation of expression, genetic mobility, and distribution. FEMS Microbiol Rev. 1996;19: 1–24.
12. Correia S, Poeta P, Hébraud M, Capelo JL, Igrejas G. Mechanisms of quinolone action and resistance: where do we stand? J Med Microbiol. 2017;66: 551–559.
13. Waksman SA. Streptomycin and neomycin. Br Med J. 1950;2: 595–600.
14. Chellat MF, Raguž L, Riedl R. Targeting antibiotic resistance. Angew Chem Int Ed Engl. 2016;55: 6600–6626. doi:10.1002/anie.201506818
15. Cochetti I, Tili E, Mingoia M, Varaldo PE, Montanari MP. erm(B)-carrying elements in tetracycline-resistant *pneumococci* and correspondence between Tn1545 and Tn6003. Antimicrob Agents Chemother. 2008;52: 1285–1290. doi:10.1128/AAC.01457-07
16. Montanari MP, Cochetti I, Mingoia M, Varaldo PE. Phenotypic and molecular characterization of tetracycline- and erythromycin-resistant strains of *Streptococcus pneumoniae*. Antimicrob Agents Chemother. 2003;47: 2236–2241.
17. D'Costa VM, King CE, Kalan L, Morar M, Sung WWL, Schwarz C, et al. Antibiotic resistance is ancient. Nature. 2011;477: 457–461. doi:10.1038/nature10388
18. Spellberg B, Guidos R, Gilbert D, Bradley J, Boucher HW, Scheld WM, et al. The epidemic of antibiotic-resistant infections: a call to action for the medical community from the Infectious Diseases Society of America. Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am. 2008;46: 155–164. doi:10.1086/524891
19. Ventola CL. The antibiotic resistance crisis. Pharm Ther. 2015;40: 277–283.
20. Lobanovska M, Pilla G. Penicillin's discovery and antibiotic resistance: lessons for the future? Yale J Biol Med. 2017;90: 135–145.

21. Norrby SR, Nord CE, Finch R, European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. Lack of development of new antimicrobial drugs: a potential serious threat to public health. Lancet Infect Dis. 2005;5: 115–119. doi:10.1016/S1473-3099(05)01283-1

22. Guerin E, Cambray G, Sanchez-Alberola N, Campoy S, Erill I, Da Re S, et al. The SOS response controls integron recombination. Science. 2009;324: 1034.

23. Llosa M, Gomis-Rüth FX, Coll M, de la Cruz Fd F. Bacterial conjugation: a two-step mechanism for DNA transport. Mol Microbiol. 2002;45: 1–8.

24. Walk ST, Mladonicky JM, Middleton JA, Heidt AJ, Cunningham JR, Bartlett P, et al. Influence of antibiotic selection on genetic composition of *Escherichia coli* populations from conventional and organic dairy farms. Appl Environ Microbiol. 2007;73: 5982–5989.

25. Singhal N, Kumar M, Kanaujia PK, Virdi JS. MALDI-TOF mass spectrometry: an emerging technology for microbial identification and diagnosis. Front Microbiol. 2015;6: 1–16.

26. Ericsson HM, Sherris JC. Antibiotic sensitivity testing. Report of an international collaborative study. Acta Pathol Microbiol Scand [B] Microbiol Immunol. 1971;217: Suppl 217:1+.

27. Jorgensen JH, Ferraro MJ. Antimicrobial susceptibility testing: a review of general principles and contemporary practices. Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am. 2009;49: 1749–1755. doi:10.1086/647952

28. Reller LB, Weinstein M, Jorgensen JH, Ferraro MJ. Antimicrobial susceptibility testing: a review of general principles and contemporary practices. Clin Infect Dis. 2009;49: 1749–1755. doi:10.1086/647952

29. Fehlberg LCC, Nicoletti AG, Ramos AC, Rodrigues-Costa F, de Matos AP, Girardello R, et al. In vitro susceptibility of *Burkholderia cepacia* complex isolates: comparison of disk diffusion, Etest®, agar dilution, and broth microdilution methods. Diagn Microbiol Infect Dis. 2016;86: 422–427. doi:10.1016/j.diagmicrobio.2016.08.015

30. van Belkum A, Dunne WM. Next-generation antimicrobial susceptibility testing. J Clin Microbiol. 2013;51: 2018–2024. doi:10.1128/JCM.00313-13

31. Wiegand I, Hilpert K, Hancock REW. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. Nat Protoc. 2008;3: 163–175. doi:10.1038/nprot.2007.521

32. OIE. Méthodes de laboratoire utilisées pour les essais d'antibiorésistance. Manuel terrestre de l'OIE 2008. 2008. pp. 61–71.

33. CASFM. Recommandations 2013 du Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie. 2013 p. 60.

34. Brown DF, Brown L. Evaluation of the E test, a novel method of quantifying antimicrobial activity. J Antimicrob Chemother. 1991;27: 185–190.

35. Citron DM, Ostovari MI, Karlsson A, Goldstein EJ. Evaluation of the E test for susceptibility testing of anaerobic bacteria. J Clin Microbiol. 1991;29: 2197–2203.

36. Huang MB, Baker CN, Banerjee S, Tenover FC. Accuracy of the E test for determining antimicrobial susceptibilities of *staphylococci*, *enterococci*, *Campylobacter jejuni*, and gram-negative bacteria resistant to antimicrobial agents. J Clin Microbiol. 1992;30: 3243–3248.

37. Schwarz S, Silley P, Simjee S, Woodford N, van Duijkeren E, Johnson AP, et al. Assessing the antimicrobial susceptibility of bacteria obtained from animals. Vet Microbiol. 2010;141: 1–4. doi:10.1016/j.vetmic.2009.12.013

38. Cai HY, Archambault M, Gyles CL, Prescott JF. Molecular genetic methods in the veterinary clinical bacteriology laboratory: current usage and future applications. Anim Health Res Rev. 2003;4: 73–93.

39. Harisberger M, Gobeli S, Hoop R, Dewulf J, Perreten V, Regula G. Antimicrobial resistance in Swiss laying hens, prevalence and risk factors. Zoonoses Public Health. 2011;58: 377–387. doi:10.1111/j.1863-2378.2010.01376.x

40. von Ah U, Wirz D, Daniels AU. Isothermal microcalorimetry, a new method for MIC determinations: results for 12 antibiotics and reference strains of *E. coli* and *S. aureus*. BMC Microbiol. 2009;9: 106. doi:10.1186/1471-2180-9-106

41. Bonkat G, Braissant O, Widmer AF, Frei R, Rieken M, Wyler S, et al. Rapid detection of urinary tract pathogens using microcalorimetry: principle, technique and first results. BJU Int. 2012;110: 892–897. doi:10.1111/j.1464-410X.2011.10902.x

42. Howell M, Wirz D, Daniels AU, Braissant O. Application of a microcalorimetric method for determining drug susceptibility in mycobacterium species. J Clin Microbiol. 2012;50: 16–20. doi:10.1128/JCM.05556-11

43. Wilson SM, al-Suwaidi Z, McNerney R, Porter J, Drobniewski F. Evaluation of a new rapid bacteriophage-based method for the drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*. Nat Med. 1997;3: 465–468.

44. Banaiee N, Bobadilla-Del-Valle M, Bardarov S, Riska PF, Small PM, Ponce-De-Leon A, et al. Luciferase reporter mycobacteriophages for detection, identification, and antibiotic susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* in Mexico. J Clin Microbiol. 2001;39: 3883–3888. doi:10.1128/JCM.39.11.3883-3888.2001

45. Bauer AW, Kirby WM, Sherris JC, Turck M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. Am J Clin Pathol. 1966;45: 493–496.

46. Haenni M, Jouy E, Morignat E, Madec J-Y. Amélioration du référentiel vétérinaire français (CA-SFM vétérinaire) pour la validation des antibiogrammes par diffusion en milieu gélosé. Cah Réf. 2011; 10–12.

47. Ge B, Bodeis S, Walker RD, White DG, Zhao S, McDermott PF, et al. Comparison of the E test and agar dilution for in vitro antimicrobial susceptibility testing of *Campylobacter*. J Antimicrob Chemother. 2002;50: 487–494.

48. CASFM. Antibiogramme vétérinaire du Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie. 2016 p. 13.

49. Kahlmeter G, Brown DFJ, Goldstein FW, MacGowan AP, Mouton JW, Osterlund A, et al. European harmonization of MIC breakpoints for antimicrobial susceptibility testing of bacteria. J Antimicrob Chemother. 2003;52: 145–148. doi:10.1093/jac/dkg312

50. Toma B, Dufour, Bénet, Sanaa, Shaw, Moutou. Epidémiologie appliquée à la lutte collective contre les maladies animales transmissibles majeures. 3rd Ed. AEEMA; 2010 p. 600.

51. Dufour B, Hendrikx P. Surveillance épidemiologique en santé animale. Quae; 2011 p. 342.

52. WHO. Antimicrobial resistance : global report on surveillance. Geneva, Switzerland: World Health Organisation; 2014 p. 256.

53. Diggle P. Statistical analysis of spatial and spatio-temporal point pattern. 3rd Ed. CRC Press; 2014 p. 263.

54. Fenton SE, Clough HE, Diggle PJ, Evans SJ, Davison HC, Vink WD, et al. Spatial and spatio-temporal analysis of *Salmonella* infection in dairy herds in England and Wales. Epidemiol Infect. 2009;137: 847–857. doi:10.1017/S0950268808001349

55. ECDC, EFSA, EMA. ECDC/EFSA/EMA first joint report on the integrated analysis of the consumption of antimicrobial agents and occurrence of antimicrobial resistance in bacteria from humans and food-producing animals. 2015 p. 144.

56. EFSA. The European Union Summary Report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2010. Parme; 2012 p. 233.

57. WHO. Surveillance for the prevention and control of health hazards due to antibiotic-resistant enterobacteria : report of a WHO meeting. 1978 p. 54.

58. EFSA, ECDC. The European Union summary report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2014. 2016 p. 207.

59. ONERBA. Rapport d'activité. 2016 p. 131.

60. Arpin C, Quentin C, Grobost F, Cambau E, Robert J, Dubois V, et al. Nationwide survey of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in the French community setting. J Antimicrob Chemother. 2009;63: 1205–1214. doi:10.1093/jac/dkp108

61. Anses. FARM 2007-2008, Programme français de surveillance de l'antibiorésistance des bactéries d'origine animale. 2010 p. 104. Available: https://www.anses.fr/fr/system/files/SANT-Ra-FARM2008.pdf

62. Anses. Spécial antibiotiques et antibiorésistances. Bull Épidémiologique Santé Anim Aliment. 2012;53. Available: https://be.anses.fr/sites/default/files/BEP-mg-BE53.pdf

63. Anses. Résapath Réseau d'épidémiosurveillance de l'antibiorésistance des bactéries pathogènes animales - Bilan 2015. 2016 p. 158. Available: https://www.anses.fr/fr/system/files/LABO-Ra-Resapath2015.pdf

64. Johnsen PJ, Østerhus JI, Sletvold H, Sørum M, Kruse H, Nielsen K, et al. Persistence of animal and human glycopeptide-resistant *Enterococci* on two norwegian poultry farms formerly exposed to avoparcin is associated with a widespread plasmid-mediated vanA element within a polyclonal *Enterococcus faecium* population. Appl Environ Microbiol. 2005;71: 159–168. doi:10.1128/AEM.71.1.159-168.2005

65. WHO. The medical impact of antimicrobial use in food animals. Report of a WHO Meeting. Berlin; 1997 p. 21. Available: https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/64439/WHO_EMC_ZOO_97.4.pdf

66. WHO. Use of quinolones in food animals and potential impact on human health. 1998 p. 256. Available: https://apps.who.int/iris/handle/10665/66401

67. Gyles C. The growing problem of antimicrobial resistance. Can Vet J. 2011;52: 817–820.

68. Jeggo M, Mackenzie JS. Defining the future of One Health. Microbiol Spectr. 2014;2: OH-0007-2012. doi:10.1128/microbiolspec.OH-0007-2012

69. Zinsstag J, Schelling E, Waltner-Toews D, Tanner M. From "one medicine" to "one health" and systemic approaches to health and well-being. Prev Vet Med. 2011;101: 148–156.

70. Johnson I, Hansen A, Bi P. The challenges of implementing an integrated One Health surveillance system in Australia. Zoonoses Public Health. 2018;65: e229–e236.

71. Li J, Xie S, Ahmed S, Wang F, Gu Y, Zhang C, et al. Antimicrobial activity and resistance: influencing factors. Front Pharmacol. 2017;8: 364. doi:10.3389/fphar.2017.00364

72. OIE. Combattre la résistance aux agents antimicrobiens dans le cadre d'une approche « Une seule santé » : les actions à mener et la stratégie de l'OIE. Paris; 2016 p. 3. Available: http://www.oie.int/fileadmin/Home/fr/Our_scientific_expertise/docs/pdf/AMR/F_RESO_AMR_2016.pdf

73. WHO. Global action plan on antimicrobial resistance. Geneva,Switzerland; 2015 p. 28. Available: www.wpro.who.int/entity/drug_resistance/resources/global_action_plan_eng.pdf

74. Davies J, Davies D. Origins and evolution of antibiotic resistance. Microbiol Mol Biol Rev MMBR. 2010;74: 417–433. doi:10.1128/MMBR.00016-10

75. ANSM. L'évolution des consommations d'antibiotiques en France entre 2000 et 2015. ANSM; 2017 p. 44. Available: https://ansm.sante.fr/var/ansm_site/storage/original/application/188a6b5cf9cde90848ae9e3419bc3d3f.pdf

76. FAO. Plan d'action de la FAO contre la résistance aux antimicrobiens 2016-2020. Rome; 2016 p. 28. Available: http://www.fao.org/3/b-i5996f.pdf

77. Neely AN, Holder IA. Antimicrobial resistance. Burns J Int Soc Burn Inj. 1999;25: 17–24.

78. Laxminarayan R. Antibiotic effectiveness: balancing conservation against innovation. Science. 2014;345: 1299–1301. doi:10.1126/science.1254163

79. Helms M, Vastrup P, Gerner-Smidt P, Mølbak K. Excess mortality associated with antimicrobial drug-resistant *Salmonella typhimurium*. Emerg Infect Dis. 2002;8: 490–495.

80. Depuydt PO, Vandijck DM, Bekaert MA, Decruyenaere JM, Blot SI, Vogelaers DP, et al. Determinants and impact of multidrug antibiotic resistance in pathogens causing ventilator-associated-pneumonia. Crit Care Lond Engl. 2008;12: R142. doi:10.1186/cc7119

81. European Centre for Disease Prevention and Control. Annual epidemiological report Reporting on 2011 surveillance data and 2012 epidemic intelligence data. ECDC, Stockholm; 2013 p. 260.

82. O'Neill J. Tackling Drug-resistant infections globally: final report and recommendations. The review on antimicrobial resistance. London, 2016. Available: https://amr-review.org/sites/default/files/160518_Final%20paper_with%20cover.pdf

83. Argudín MA, Deplano A, Meghraoui A, Dodémont M, Heinrichs A, Denis O, et al. Bacteria from animals as a pool of antimicrobial resistance genes. Antibiotics. 2017;6.

84. Hampton T. Report reveals scope of US antibiotic resistance threat. JAMA. 2013;310: 1661–1663. doi:10.1001/jama.2013.280695

85. Cosgrove SE. The relationship between antimicrobial resistance and patient outcomes: mortality, length of hospital stay, and health care costs. Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am. 2006;42 Suppl 2: S82-89. doi:10.1086/499406

86. Sipahi OR. Economics of antibiotic resistance. Expert Rev Anti Infect Ther. 2008;6: 523–539. doi:10.1586/14787210.6.4.523

87. Roberts RR, Hota B, Ahmad I, Scott RD, Foster SD, Abbasi F, et al. Hospital and societal costs of antimicrobial-resistant infections in a Chicago teaching hospital: implications for antibiotic stewardship. Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am. 2009;49: 1175–1184. doi:10.1086/605630

88. Nicolas-Chanoine M-H, Blanco J, Leflon-Guibout V, Demarty R, Alonso MP, Caniça MM, et al. Intercontinental emergence of *Escherichia coli* clone O25:H4-ST131 producing CTX-M-15. J Antimicrob Chemother. 2008;61: 273–281. doi:10.1093/jac/dkm464

89. Johnson JR, Johnston B, Clabots C, Kuskowski MA, Castanheira M. *Escherichia coli* sequence type ST131 as the major cause of serious multidrug-resistant *E. coli* infections in the United States. Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am. 2010;51: 286–294.

90. Nicolas-Chanoine M-H, Bertrand X, Madec J-Y. *Escherichia coli* ST131, an intriguing clonal group. Clin Microbiol Rev. 2014;27: 543–574. doi:10.1128/CMR.00125-13

91. Cornaglia G, Giamarellou H, Rossolini GM. Metallo-β-lactamases: a last frontier for β-lactams? Lancet Infect Dis. 2011;11: 381–393. doi:10.1016/S1473-3099(11)70056-1

92. Huijbers PMC, Blaak H, de Jong MCM, Graat EAM, Vandenbroucke-Grauls CMJE, de Roda Husman AM. Role of the environment in the transmission of antimicrobial resistance to humans: a review. Environ Sci Technol. 2015;49: 11993–12004.

93. Marshall BM, Ochieng DJ, Levy SB. Commensals: underappreciated reservoir of antibiotic resistance. Microbe Mag. 2009;4: 231–238. doi:10.1128/microbe.4.231.1

94. Sanders P. L'antibiorésistance en médecine vétérinaire: enjeux de santé publique et de santé animale. B Acad Vet Fr. 2005;158: 139–143.

95. Linton AH. Antibiotic resistance: the present situation reviewed. Vet Rec. 1977;100: 354–360.

96. Doyle MP. Antimicrobial resistance: implications for the food system. Compr Rev Food Sci Food Saf. 2006;5: 71–137. doi:10.1111/j.1541-4337.2006.00004.x

97. Hummel R, Tschäpe H, Witte W. Spread of plasmid-mediated nourseothricin resistance due to antibiotic use in animal husbandry. J Basic Microbiol. 1986;26: 461–466.

98. Aarestrup FM, Seyfarth AM, Emborg HD, Pedersen K, Hendriksen RS, Bager F. Effect of abolishment of the use of antimicrobial agents for growth promotion on occurrence of antimicrobial resistance in fecal *enterococci* from food animals in Denmark. Antimicrob Agents Chemother. 2001;45: 2054–2059. doi:10.1128/AAC.45.7.2054-2059.2001

99. Chang Q, Wang W, Regev-Yochay G, Lipsitch M, Hanage WP. Antibiotics in agriculture and the risk to human health: how worried should we be? Evol Appl. 2015;8: 240–247.

100. van der Mee-Marquet NL, Corvaglia A, Haenni M, Bertrand X, Franck J-B, Kluytmans J, et al. Emergence of a novel subpopulation of CC398 *Staphylococcus aureus* infecting animals is a serious hazard for humans. Front Microbiol. 2014;5: 652. doi:10.3389/fmicb.2014.00652

101. Paul NC, Moodley A, Ghibaudo G, Guardabassi L. Carriage of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* in small animal veterinarians: indirect evidence of zoonotic transmission. Zoonoses Public Health. 2011;58: 533–539.

102. Fey PD, Safranek TJ, Rupp ME, Dunne EF, Ribot E, Iwen PC, et al. Ceftriaxone-resistant *Salmonella* infection acquired by a child from cattle. N Engl J Med. 2000;342: 1242–1249.

103. Guardabassi L, Schwarz S, Lloyd DH. Pet animals as reservoirs of antimicrobial-resistant bacteria. J Antimicrob Chemother. 2004;54: 321–332. doi:10.1093/jac/dkh332

104. Winokur PL, Vonstein DL, Hoffman LJ, Uhlenhopp EK, Doern GV. Evidence for transfer of CMY-2 AmpC β-lactamase plasmids between *Escherichia coli* and *Salmonella* isolates from food animals and humans. Antimicrob Agents Chemother. 2001;45: 2716–2722.

105. Yazdankhah SP, Sørum H, Oppegaard H. Comparison of genes involved in penicillin resistance in *staphylococci* of bovine origin. Microb Drug Resist Larchmt N. 2000;6: 29–36.

106. Novick RP, Murphy E, Gryczan TJ, Baron E, Edelman I. Penicillinase plasmids of *Staphylococcus aureus*: restriction-deletion maps. Plasmid. 1979;2: 109–129.

107. Aarestrup FM, Jensen LB. Trends in antimicrobial susceptibility in relation to antimicrobial usage and presence of resistance genes in *Staphylococcus hyicus* isolated from exudative epidermitis in pigs. Vet Microbiol. 2002;89: 83–94.

108. AFSSA. Usages vétérinaires des antibiotiques, résistance bactérienne et conséquences pour la santé humaine. 2006 p. 214. Available: www.anses.fr/fr/system/files/SANT-Ra-ABR.pdf

109. Haenni M, Galofaro L, Ponsin C, Bes M, Laurent F, Madec J-Y. Staphylococcal bovine mastitis in France: enterotoxins, resistance and the human Geraldine methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clone. J Antimicrob Chemother. 2011;66: 216–218.

110. Madec J-Y, Gay E. Antibiorésistance : le passage animal - Homme, mythe ou réalité ? Bull Épidémiologique Santé Anim Aliment. 2012; 50–52.

111. Lehner G, Linek M, Bond R, Lloyd DH, Prenger-Berninghoff E, Thom N, et al. Case-control risk factor study of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* (MRSP) infection in dogs and cats in Germany. Vet Microbiol. 2014;168: 154–160.

112. Youn J-H, Yoon JW, Koo HC, Lim S-K, Park YH. Prevalence and antimicrogram of *Staphylococcus intermedius* group isolates from veterinary staff, companion animals, and the environment in veterinary hospitals in Korea. J Vet Diagn Investig Off Publ Am Assoc Vet Lab Diagn Inc. 2011;23: 268–274. doi:10.1177/104063871102300211

113. Haenni M, Saras E, Châtre P, Médaille C, Bes M, Madec J-Y, et al. A USA300 variant and other human-related methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains infecting cats and dogs in France. J Antimicrob Chemother. 2012;67: 326–329. doi:10.1093/jac/dkr499

114. Pomba C, Rantala M, Greko C, Baptiste KE, Catry B, van Duijkeren E, et al. Public health risk of antimicrobial resistance transfer from companion animals. J Antimicrob Chemother. 2017;72: 957–968. doi:10.1093/jac/dkw481

115. Ewers C, Grobbel M, Stamm I, Kopp PA, Diehl I, Semmler T, et al. Emergence of human pandemic O25:H4-ST131 CTX-M-15 extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Escherichia coli* among companion animals. J Antimicrob Chemother. 2010;65: 651–660.

116. Platell JL, Cobbold RN, Johnson JR, Heisig A, Heisig P, Clabots C, et al. Commonality among fluoroquinolone-resistant sequence type ST131 extraintestinal *Escherichia coli* isolates from humans and companion animals in Australia. Antimicrob Agents Chemother. 2011;55: 3782–3787. doi:10.1128/AAC.00306-11

117. Lew W, Pai M, Oxlade O, Martin D, Menzies D. Initial drug resistance and tuberculosis treatment outcomes: systematic review. Ann Intern Med. 2008;149: 123–134.

118. Woodford N, Livermore DM. Infections caused by Gram-positive bacteria: a review of the global challenge. J Infect. 2009;59 Suppl 1: S4-16. doi:10.1016/S0163-4453(09)60003-7

119. Liu B, Pop M. ARDB-Antibiotic Resistance genes database. Nucleic Acids Res. 2009;37: D443-447. doi:10.1093/nar/gkn656

120. Acar JF, Moulin G. Integrating animal health surveillance and food safety: the issue of antimicrobial resistance. Rev Sci Tech Int Off Epizoot. 2013;32: 383–392.

121. Cox R, Su T, Clough H, Woodward MJ, Sherlock C. Spatial and temporal patterns in antimicrobial resistance of *Salmonella Typhimurium* in cattle in England and Wales. Epidemiol Infect. 2012;140: 2062–2073. doi:10.1017/S0950268811002755

122. Aliyu AB, Saleha AA, Jalila A, Zunita Z. Risk factors and spatial distribution of extended spectrum β-lactamase-producing- *Escherichia coli* at retail poultry meat markets in Malaysia: a cross-sectional study. BMC Public Health. 2016;16. doi:10.1186/s12889-016-3377-2

123. Plaza-Rodríguez C, Appel B, Kaesbohrer A, Filter M. Discussing state-of-the-art spatial visualization techniques applicable for the epidemiological surveillance data on the example of *Campylobacter spp.* in raw chicken meat. Zoonoses Public Health. 2016;63: 358–369.

124. Galvin S, Bergin N, Hennessy R, Hanahoe B, Murphy AW, Cormican M, et al. Exploratory spatial mapping of the occurrence of antimicrobial resistance in *E. coli* in the community. Antibiotics. 2013;2: 328–338. doi:10.3390/antibiotics2030328

125. McCormick AW, Whitney CG, Farley MM, Lynfield R, Harrison LH, Bennett NM, et al. Geographic diversity and temporal trends of antimicrobial resistance in *Streptococcus pneumoniae* in the United States. Nat Med. 2003;9: 424–430. doi:10.1038/nm839

126. Sannes MR, Kuskowski MA, Johnson JR. Geographical distribution of antimicrobial resistance among *Escherichia coli* causing acute uncomplicated pyelonephritis in the United States. FEMS Immunol Med Microbiol. 2004;42: 213–218.

127. Wieczorek K, Osek J. A five-year study on prevalence and antimicrobial resistance of *Campylobacter* from poultry carcasses in Poland. Food Microbiol. 2015;49: 161–165.

128. Williams NJ, Sherlock C, Jones TR, Clough HE, Telfer SE, Begon M, et al. The prevalence of antimicrobial-resistant *Escherichia coli* in sympatric wild rodents varies by season and host. J Appl Microbiol. 2011;110: 962–970. doi:10.1111/j.1365-2672.2011.04952.x

129. Cummings KJ, Aprea VA, Altier C. Antimicrobial resistance trends among canine *Escherichia coli* isolates obtained from clinical samples in the northeastern USA, 2004-2011. Can Vet J Rev Vét Can. 2015;56: 393–398.

130. Normand EH, Gibson NR, Reid SW, Carmichael S, Taylor DJ. Antimicrobial-resistance trends in bacterial isolates from companion-animal community practice in the UK. Prev Vet Med. 2000;46: 267–278.

131. Chen K, Huang Y, Song Q, Wu C, Chen X, Zeng L. Drug-resistance dynamics of *Staphylococcus aureus* between 2008 and 2014 at a tertiary teaching hospital, Jiangxi Province, China. BMC Infect Dis. 2017;17: 97. doi:10.1186/s12879-016-2172-0

132. López-Lozano JM, Monnet DL, Yagüe A, Burgos A, Gonzalo N, Campillos P, et al. Modelling and forecasting antimicrobial resistance and its dynamic relationship to antimicrobial use: a time series analysis. Int J Antimicrob Agents. 2000;14: 21–31.

133. Lawes T, Lopez-Lozano J-M, Nebot CA, Macartney G, Subbarao-Sharma R, Dare CR, et al. Effects of national antibiotic stewardship and infection control strategies on hospital-associated and community-associated meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections across a region of Scotland: a non-linear time-series study. Lancet Infect Dis. 2015;15: 1438–1449. doi:10.1016/S1473-3099(15)00315-1

134. Doernberg SB, Dudas V, Trivedi KK. Implementation of an antimicrobial stewardship program targeting residents with urinary tract infections in three community long-term care facilities: a quasi-experimental study using time-series analysis. Antimicrob Resist Infect Control. 2015;4. doi:10.1186/s13756-015-0095-y

135. Guardabassi L, Loeber ME, Jacobson A. Transmission of multiple antimicrobial-resistant *Staphylococcus intermedius* between dogs affected by deep pyoderma and their owners. Vet Microbiol. 2004;98: 23–27.

136. Tadesse DA, Zhao S, Tong E, Ayers S, Singh A, Bartholomew MJ, et al. Antimicrobial drug resistance in *Escherichia coli* from humans and food animals, United States, 1950-2002. Emerg Infect Dis. 2012;18: 741–749. doi:10.3201/eid1805.111153

137. Wu G, Day MJ, Mafura MT, Nunez-Garcia J, Fenner JJ, Sharma M, et al. Comparative analysis of ESBL-positive *Escherichia coli* isolates from animals and humans from the UK, The Netherlands and Germany. PloS One. 2013;8: e75392.

138. Johnson JR, Sannes MR, Croy C, Johnston B, Clabots C, Kuskowski MA, et al. Antimicrobial drug–resistant *Escherichia coli* from humans and poultry products, Minnesota and Wisconsin, 2002–2004. Emerg Infect Dis. 2007;13: 838–846.

139. Bartoloni A, Bartalesi F, Mantella A, Dell'Amico E, Roselli M, Strohmeyer M, et al. High prevalence of acquired antimicrobial resistance unrelated to heavy antimicrobial consumption. J Infect Dis. 2004;189: 1291–1294. doi:10.1086/382191

140. Bartoloni A, Pallecchi L, Rodríguez H, Fernandez C, Mantella A, Bartalesi F, et al. Antibiotic resistance in a very remote Amazonas community. Int J Antimicrob Agents. 2009;33: 125–129. doi:10.1016/j.ijantimicag.2008.07.029

141. Pallecchi L, Bartoloni A, Paradisi F, Rossolini GM. Antibiotic resistance in the absence of antimicrobial use: mechanisms and implications. Expert Rev Anti Infect Ther. 2008;6: 725–732. doi:10.1586/14787210.6.5.725

142. Garber L, Smeltzer M, Fedorka-Cray P, Ladely S, Ferris K. *Salmonella enterica* serotype enteritidis in table egg layer house environments and in mice in U.S. layer houses and associated risk factors. Avian Dis. 2003;47: 134–142.

143. Namata H, Méroc E, Aerts M, Faes C, Abrahantes JC, Imberechts H, et al. *Salmonella* in Belgian laying hens: an identification of risk factors. Prev Vet Med. 2008;83: 323–336.

144. Featherstone CA, Reichel R, Snow LC, Davies RH, Christiansen KH, Carrique-Mas JJ, et al. Investigation of risk factors for *Salmonella* on fattening-turkey farms. Epidemiol Infect. 2010;138: 1427–1438. doi:10.1017/S0950268810000312

145. Snow LC, Davies RH, Christiansen KH, Carrique-Mas JJ, Cook AJC, Evans SJ. Investigation of risk factors for *Salmonella* on commercial egg-laying farms in Great Britain, 2004-2005. Vet Rec. 2010;166: 579–586. doi:10.1136/vr.b4801

146. Em J, Lc S, Jj C-M, Rj G, C C, Rh D. Risk factors for antimicrobial resistance in *Escherichia coli* found in GB turkey flocks. Vet Rec. 2013;173: 422–422. doi:10.1136/vr.101759

147. Persoons D, Haesebrouck F, Smet A, Herman L, Heyndrickx M, Martel A, et al. Risk factors for ceftiofur resistance in *Escherichia coli* from Belgian broilers. Epidemiol Infect. 2011;139: 765–771. doi:10.1017/S0950268810001524

148. Dutil L, Irwin R, Finley R, Ng LK, Avery B, Boerlin P, et al. Ceftiofur resistance in *Salmonella enterica* serovar Heidelberg from chicken meat and humans, Canada. Emerg Infect Dis. 2010;16: 48–54. doi:10.3201/eid1601.090729

149. Schwaiger K, Schmied E-MV, Bauer J. Comparative analysis on antibiotic resistance characteristics of *Listeria spp.* and *Enterococcus spp.* isolated from laying hens and eggs in conventional and organic keeping systems in Bavaria, Germany. Zoonoses Public Health. 2010;57: 171–180. doi:10.1111/j.1863-2378.2008.01229.x

150. Dewulf J, Catry B, Timmerman T, Opsomer G, de Kruif A, Maes D. Tetracycline-resistance in lactose-positive enteric coliforms originating from Belgian fattening pigs: degree of resistance, multiple resistance and risk factors. Prev Vet Med. 2007;78: 339–351.

151. Akwar HT, Poppe C, Wilson J, Reid-Smith RJ, Dyck M, Waddington J, et al. Associations of antimicrobial uses with antimicrobial resistance of fecal *Escherichia coli* from pigs on 47 farrow-to-finish farms in Ontario and British Columbia. Can J Vet Res Rev Can Rech Veterinaire. 2008;72: 202–210.

152. Langlois BE, Cromwell GL, Stahly TS, Dawson KA, Hays VW. Antibiotic resistance of fecal coliforms after long-term withdrawal of therapeutic and subtherapeutic antibiotic use in a swine herd. Appl Environ Microbiol. 1983;46: 1433–1434.

153. Lee C, Langlois BE, Dawson KA. Detection of tetracycline resistance determinants in pig isolates from three herds with different histories of antimicrobial agent exposure. Appl Environ Microbiol. 1993;59: 1467–1472.

154. Berge ACB, Epperson WB, Pritchard RH. Assessing the effect of a single dose florfenicol treatment in feedlot cattle on the antimicrobial resistance patterns in faecal *Escherichia coli*. Vet Res. 2005;36: 723–734. doi:10.1051/vetres:2005027

155. Funk JA, Lejeune JT, Wittum TE, Rajala-Schultz PJ. The effect of subtherapeutic chlortetracycline on antimicrobial resistance in the fecal flora of swine. Microb Drug Resist. 2006;12: 210–218. doi:10.1089/mdr.2006.12.210

156. Alt K, Fetsch A, Schroeter A, Guerra B, Hammerl JA, Hertwig S, et al. Factors associated with the occurrence of MRSA CC398 in herds of fattening pigs in Germany. BMC Vet Res. 2011;7: 69. doi:10.1186/1746-6148-7-69

157. Moro MH, Beran GW, Griffith RW, Hoffman LJ. Effects of heat stress on the antimicrobial drug resistance of *Escherichia coli* of the intestinal flora of swine. J Appl Microbiol. 2000;88: 836–844.

158. Moro MH, Beran GW, Hoffman LJ, Griffith RW. Effects of cold stress on the antimicrobial drug resistance of *Escherichia coli* of the intestinal flora of swine. Lett Appl Microbiol. 1998;27: 251–254.

159. Stanton TB, Humphrey SB, Stoffregen WC. Chlortetracycline-resistant intestinal bacteria in organically raised and feral swine. Appl Environ Microbiol. 2011;77: 7167–7170.

160. Jindal A, Kocherginskaya S, Mehboob A, Robert M, Mackie RI, Raskin L, et al. Antimicrobial use and resistance in swine waste treatment systems. Appl Environ Microbiol. 2006;72: 7813–7820. doi:10.1128/AEM.01087-06

161. Scott L, Menzies P, Reid-Smith RJ, Avery BP, McEwen SA, Moon CS, et al. Antimicrobial resistance in fecal generic *Escherichia coli* and *Salmonella spp.* obtained from Ontario sheep flocks and associations between antimicrobial use and resistance. Can J Vet Res. 2012;76: 109–119.

162. Weese JS, Lefebvre SL. Risk factors for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* colonization in horses admitted to a veterinary teaching hospital. Can Vet J. 2007;48: 921–926.

163. Bryan J, Leonard N, Fanning S, Katz L, Duggan V. Antimicrobial resistance in commensal faecal *Escherichia coli* of hospitalised horses. Ir Vet J. 2010;63: 373–379.

164. Tikofsky LL, Barlow JW, Santisteban C, Schukken YH. A comparison of antimicrobial susceptibility patterns for *Staphylococcus aureus* in organic and conventional dairy herds. Microb Drug Resist Larchmt N. 2003;9 Suppl 1: S39-45. doi:10.1089/107662903322541883

165. Sato K, Bennedsgaard TW, Bartlett PC, Erskine RJ, Kaneene JB. Comparison of antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolated from bulk tank milk in organic and conventional dairy herds in the midwestern United States and Denmark. J Food Prot. 2004;67: 1104–1110.

166. Hille K, Ruddat I, Schmid A, Hering J, Hartmann M, von Münchhausen C, et al. Cefotaxime-resistant *E. coli* in dairy and beef cattle farms-Joint analyses of two cross-sectional investigations in Germany. Prev Vet Med. 2017;142: 39–45.

167. Di Labio E, Regula G, Steiner A, Miserez R, Thomann A, Ledergerber U. Antimicrobial resistance in bacteria from Swiss veal calves at slaughter. Zoonoses Public Health. 2007;54: 344–352. doi:10.1111/j.1863-2378.2007.01071.x

168. Duse A, Waller KP, Emanuelson U, Unnerstad HE, Persson Y, Bengtsson B. Risk factors for antimicrobial resistance in fecal *Escherichia coli* from preweaned dairy calves. J Dairy Sci. 2015;98: 500–516. doi:10.3168/jds.2014-8432

169. Snow LC, Warner RG, Cheney T, Wearing H, Stokes M, Harris K, et al. Risk factors associated with extended spectrum beta-lactamase *Escherichia coli* (CTX-M) on dairy farms in North West England and North Wales. Prev Vet Med. 2012;106: 225–234.

170. Duse A, Waller KP, Emanuelson U, Unnerstad HE, Persson Y, Bengtsson B. Risk factors for quinolone-resistant *Escherichia coli* in feces from preweaned dairy calves and postpartum dairy cows. J Dairy Sci. 2015;98: 6387–6398. doi:10.3168/jds.2015-9453

171. Graveland H, Wagenaar JA, Heesterbeek H, Mevius D, Duijkeren E van, Heederik D. Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* ST398 in Veal Calf Farming: Human MRSA Carriage Related with Animal Antimicrobial Usage and Farm Hygiene. PLOS ONE. 2010;5: e10990. doi:10.1371/journal.pone.0010990

172. Usui M, Iwasa T, Fukuda A, Sato T, Okubo T, Tamura Y. The role of flies in spreading the extended-spectrum β-lactamase gene from cattle. Microb Drug Resist Larchmt N. 2013;19: 415–420. doi:10.1089/mdr.2012.0251

173. Reist M, Geser N, Hächler H, Schärrer S, Stephan R. ESBL-producing *Enterobacteriaceae*: occurrence, risk factors for fecal carriage and strain traits in the Swiss slaughter cattle population younger than 2 years sampled at abattoir level. PloS One. 2013;8: e71725.

174. Berge ACB, Moore DA, Sischo WM. Field trial evaluating the influence of prophylactic and therapeutic antimicrobial administration on antimicrobial resistance of fecal *Escherichia coli* in Dairy Calves. Appl Environ Microbiol. 2006;72: 3872–3878. doi:10.1128/AEM.02239-05

175. Berge ACB, Atwill ER, Sischo WM. Animal and farm influences on the dynamics of antibiotic resistance in faecal *Escherichia coli* in young dairy calves. Prev Vet Med. 2005;69: 25–38. doi:10.1016/j.prevetmed.2005.01.013

176. Hoyle DV, Knight HI, Shaw DJ, Hillman K, Pearce MC, Low JC, et al. Acquisition and epidemiology of antibiotic-resistant *Escherichia coli* in a cohort of newborn calves. J Antimicrob Chemother. 2004;53: 867–871. doi:10.1093/jac/dkh177

177. Khachatryan AR, Hancock DD, Besser TE, Call DR. Role of calf-adapted *Escherichia coli* in maintenance of antimicrobial drug resistance in dairy calves. Appl Environ Microbiol. 2004;70: 752–757. doi:10.1128/AEM.70.2.752-757.2004

178. Schmid A, Hörmansdorfer S, Messelhäusser U, Käsbohrer A, Sauter-Louis C, Mansfeld R. Prevalence of extended-spectrum β-lactamase-producing *Escherichia coli* on Bavarian dairy and beef cattle farms. Appl Environ Microbiol. 2013;79: 3027–3032.

179. Schouten JM, Bouwknegt M, van de Giessen AW, Frankena K, De Jong MCM, Graat E a. M. Prevalence estimation and risk factors for *Escherichia coli* O157 on Dutch dairy farms. Prev Vet Med. 2004;64: 49–61. doi:10.1016/j.prevetmed.2004.03.004

180. Duse A, Persson Waller K, Emanuelson U, Ericsson Unnerstad H, Persson Y, Bengtsson B. Occurrence and spread of quinolone-resistant *Escherichia coli* on dairy farms. Appl Environ Microbiol. 2016;82: 3765–3773. doi:10.1128/AEM.03061-15

181. Catry B, Dewulf J, Maes D, Pardon B, Callens B, Vanrobaeys M, et al. Effect of antimicrobial consumption and production type on antibacterial resistance in the bovine respiratory and digestive Tract. PloS One. 2016;11: e0146488.

182. Checkley SL, Campbell JR, Chirino-Trejo M, Janzen ED, Waldner CL. Associations between antimicrobial use and the prevalence of antimicrobial resistance in fecal *Escherichia coli* from feedlot cattle in western Canada. Can Vet J. 2010;51: 853–861.

183. Inglis GD, McAllister TA, Busz HW, Yanke LJ, Morck DW, Olson ME, et al. Effects of subtherapeutic administration of antimicrobial agents to beef cattle on the prevalence of antimicrobial resistance in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter hyointestinalis*. Appl Environ Microbiol. 2005;71: 3872–3881. doi:10.1128/AEM.71.7.3872-3881.2005

184. O'Connor AM, Poppe C, McEwen SA. Changes in the prevalence of resistant *Escherichia coli* in cattle receiving subcutaneously injectable oxytetracycline in addition to in-feed

chlortetracycline compared with cattle receiving only in-feed chlortetracycline. Can J Vet Res Rev Can Rech Veterinaire. 2002;66: 145–150.

185. Stabler SL, Fagerberg DJ, Quarles CL. Effects of oral and injectable tetracyclines on bacterial drug resistance in feedlot cattle. Am J Vet Res. 1982;43: 1763–1766.

186. Pol M, Ruegg PL. Relationship between antimicrobial drug usage and antimicrobial susceptibility of gram-positive mastitis pathogens. J Dairy Sci. 2007;90: 262–273.

187. Zhang L, Huang Y, Zhou Y, Buckley T, Wang HH. Antibiotic Administration routes significantly influence the levels of antibiotic resistance in gut microbiota. Antimicrob Agents Chemother. 2013;57: 3659–3666. doi:10.1128/AAC.00670-13

188. Wedley AL, Dawson S, Maddox TW, Coyne KP, Pinchbeck GL, Clegg P, et al. Carriage of antimicrobial resistant *Escherichia coli* in dogs: Prevalence, associated risk factors and molecular characteristics. Vet Microbiol. 2017;199: 23–30. doi:10.1016/j.vetmic.2016.11.017

189. Martín Jaramago J, Armero Ibáñez R, Camarena Miñana JJ, Morales Suárez-Varela M. Resistance profiles and risk factors of resistant microorganisms in bacteraemia of abdominal origin. Rev Esp Anestesiol Reanim. 2017; doi:10.1016/j.redar.2017.03.007

190. Saputra S, Jordan D, Worthing KA, Norris JM, Wong HS, Abraham R, et al. Antimicrobial resistance in coagulase-positive *staphylococci* isolated from companion animals in Australia: A one year study. PloS One. 2017;12: e0176379. doi:10.1371/journal.pone.0176379

191. Zur G, Gurevich B, Elad D. Prior antimicrobial use as a risk factor for resistance in selected *Staphylococcus pseudintermedius* isolates from the skin and ears of dogs. Vet Dermatol. 2016;27: 468-e125. doi:10.1111/vde.12382

192. Soares Magalhães RJ, Loeffler A, Lindsay J, Rich M, Roberts L, Smith H, et al. Risk factors for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) infection in dogs and cats: a case-control study. Vet Res. 2010;41. doi:10.1051/vetres/2010028

193. Gandolfi-Decristophoris P, Regula G, Petrini O, Zinsstag J, Schelling E. Prevalence and risk factors for carriage of multi-drug resistant *Staphylococci* in healthy cats and dogs. J Vet Sci. 2013;14: 449–456.

194. Bourbonnais R, Terraza M. Analyse des séries temporelles. 3e édition. Paris: Dunod; 2010.

195. Okeke IN, Peeling RW, Goossens H, Auckenthaler R, Olmsted SS, de Lavison J-F, et al. Diagnostics as essential tools for containing antibacterial resistance. Drug Resist Updat Rev Comment Antimicrob Anticancer Chemother. 2011;14: 95–106.

196. De Briyne N, Atkinson J, Pokludová L, Borriello SP, Price S. Factors influencing antibiotic prescribing habits and use of sensitivity testing amongst veterinarians in Europe. Vet Rec. 2013;173: 475. doi:10.1136/vr.101454

197. Kaufmann J-C. L'entretien compréhensif - L'enquête et ses méthodes. 3e édition. Armand Colin; 2011 p. 128.

198. Given L. Qualitative research in evidence-based practice: a valuable partnership. Libr Hi Tech. 2006;24: 376–386.

199. Beaud S, Weber F. Guide de l'enquête de terrain : Produire et analyser des données ethnographiques. Nouv. éd. La Découverte; 2003 p. 336.

200. Mukamurera J, Lacourse F, Couturier Y. Des avancées en analyse qualitative : pour une transparence et une systématisation des pratiques. Rech Qual. 2006;26: 110–138.

201. Graneheim UH, Lundman B. Qualitative content analysis in nursing research: concepts, procedures and measures to achieve trustworthiness. Nurse Educ Today. 2004;24: 105–112.

202. Braun V, Clarke V. What can “thematic analysis” offer health and wellbeing researchers? Int J Qual Stud Health Well-Being. 2014;9. doi:10.3402/qhw.v9.26152

203. Paillé P, Mucchielli A. L’analyse qualitative en sciences humaines et sociales. Armand Colin; 2012 p. 424.

204. Bardin L. L’analyse de contenu. 2ème édition. Presses Universitaires de France; 2013 p. 320.

205. Olivier De Sardan J-PO. La rigueur du qualitatif : Les contraintes empiriques de l’interprétation socio-anthropologique. Editions Academia; 2008 p. 365.

206. Guest G, Bunce A, Johnson L. How many interviews are enough? An experiment with data saturation and variability. Field Methods. 2006;18: 59–82. doi:10.1177/1525822X05279903

207. Tracy SJ. Qualitative quality: Eight a"big-tent" criteria for excellent qualitative research. Qual Inq. 2010;16: 837–851. doi:10.1177/1077800410383121

208. Yardley L. Demonstrating validity in qualitative psychology. Qual Psychol Pract Guide Res Methods. 2008;2: 235–251.

209. Collingridge DS, Gantt EE. The quality of qualitative research. Am J Med Qual Off J Am Coll Med Qual. 2008;23: 389–395. doi:10.1177/1062860608320646

210. Coyne LA, Latham SM, Williams NJ, Dawson S, Donald IJ, Pearson RB, et al. Understanding the culture of antimicrobial prescribing in agriculture: a qualitative study of UK pig veterinary surgeons. J Antimicrob Chemother. 2016;71: 3300–3312.

211. Speksnijder DC, Jaarsma ADC, van der Gugten AC, Verheij TJM, Wagenaar JA. Determinants associated with veterinary antimicrobial prescribing in farm animals in the Netherlands: a qualitative study. Zoonoses Public Health. 2015;62 Suppl 1: 39–51.

212. Gibbons JF, Boland F, Buckley JF, Butler F, Egan J, Fanning S, et al. Influences on antimicrobial prescribing behaviour of veterinary practitioners in cattle practice in Ireland. Vet Rec. 2013;172: 14. doi:10.1136/vr.100782

213. Conseil général vétérinaire. Histoire des services vétérinaires français. Conseil général vétérinaire, Broché; 2006 p. 477.

214. Mendez D, Judd J, Speare R. Testing for Hendra virus: difficulties experienced by veterinarians in Queensland prior to 2011. Aust Vet J. 2013;91: 323–327.

215. Robinson PA, Epperson WB, Huston CL, Pace LW, Wills RW, Cosby AG. Factors influencing diagnostic sample submission by food animal veterinarians in Mississippi. Vet Ital. 2012;48: 31–39.

216. Robinson PA, Epperson WB. Farm animal practitioners’ views on their use and expectations of veterinary diagnostic laboratories. Vet Rec. 2013;172: 503. doi:10.1136/vr.101366

217. Anonymous. Le Plan Ecoantibio 2012-2016 : réduire l’utilisation des antibiotiques vétérinaires. 2011. Available: http://agriculture.gouv.fr/plan-antibioresistance-ecoantibio-les-40-mesures-ecoantibio-2012-2017

218. EPRUMA. Best-practice framework for the use of antimicrobials in food-producing animals in the EU. 2008. Available: http://www.epruma.eu

219. FVE. Veterinarians care for animals and people: how to use antimicrobials responsibly: advice for veterinarians. 2012. Available: http://www.fve.org

220. WHO, FAO, OIE. Antimicrobial resistance: a manual for developing national action plans. 2016 p. 32. Available: https://apps.who.int/iris/handle/10665/204470

221. EMA, EFSA. EMA and EFSA Joint Scientific Opinion on measures to reduce the need to use antimicrobial agents in animal husbandry in the European Union, and the resulting impacts on food safety. EFSA Journal 2017. 2017: 245.

222. Dunne Jr. WM, van Belkum A. More timely antimicrobial susceptibility testing as a tool in combatting antimicrobial resistance in clinically relevant microorganisms: is there more than one way to skin a cat? Clin Microbiol Newsl. 2014;36: 149–153.

223. Peterson LR, Dalhoff A. Towards targeted prescribing: will the cure for antimicrobial resistance be specific, directed therapy through improved diagnostic testing? J Antimicrob Chemother. 2004;53: 902–905. doi:10.1093/jac/dkh187

224. Botrel M-A, Chazel M, Meunier D, Jouy E, Kobisch M, Madec J-Y, et al. Le Résapath : analyse critique et propositions d'amélioration. Epidémiologie Santé Anim. 2006;50: 157–168.

225. German RR, Lee LM, Horan JM, Milstein RL, Pertowski CA, Waller MN, et al. Updated guidelines for evaluating public health surveillance systems: recommendations from the Guidelines Working Group. MMWR Recomm Rep Morb Mortal Wkly Rep Recomm Rep. 2001;50: 1–35.

226. Hendrikx P, Gay E, Chazel M, Moutou F, Danan C, Richomme C, et al. OASIS: an assessment tool of epidemiological surveillance systems in animal health and food safety. Epidemiol Infect. 2011;139: 1486–1496. doi:10.1017/S0950268811000161

227. Hoinville LJ, Alban L, Drewe JA, Gibbens JC, Gustafson L, Häsler B, et al. Proposed terms and concepts for describing and evaluating animal-health surveillance systems. Prev Vet Med. 2013;112: 1–12. doi:10.1016/j.prevetmed.2013.06.006

228. Berger N, Muyldermans G, Dupont Y, Quoilin S. Assessing the sensitivity and representativeness of the Belgian Sentinel Network of Laboratories using test reimbursement data. Arch Public Health. 2016;74. doi:10.1186/s13690-016-0145-9

229. Keusch GT, Pappaioanou M, Gonzalez MC, Scott KA, Tsai P. Achieving an effective zoonotic disease surveillance system. National Academies Press (US); 2009. pp. 115–164. Available: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK215315/

230. Chen H, Hailey D, Wang N, Yu P. A review of data quality assessment methods for public health information systems. Int J Environ Res Public Health. 2014;11: 5170–5207.

231. Ely ER, Nicholson RE, Snow LC, Strugnell BW, Williamson SM, Milnes AS, et al. Evaluation of methods for measuring coverage and representativeness of an early-warning disease surveillance system. Vet Rec. 2012;171: 423–423. doi:10.1136/vr.100854

232. Lowndes CM, Fenton KA. Surveillance systems for STIs in the European Union: facing a changing epidemiology. Sex Transm Infect. 2004;80: 264–271. doi:10.1136/sti.2004.010389

233. CA-SFM. Recommandations 2017 du comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie, Groupe de Travail Antibiogramme Vétérinaire. 2017 pp. 1–16.

234. Chipangura JK, Chetty T, Kgoete M, Naidoo V. Prevalence of antimicrobial resistance from bacterial culture and susceptibility records from horse samples in South Africa. Prev Vet Med. 2017;148: 37–43. doi:10.1016/j.prevetmed.2017.10.004

235. Maddox TW, Clegg PD, Williams NJ, Pinchbeck GL. Antimicrobial resistance in bacteria from horses: epidemiology of antimicrobial resistance. Equine Vet J. 2015;47: 756–765.

236. Maddox TW, Pinchbeck GL, Clegg PD, Wedley AL, Dawson S, Williams NJ. Cross-sectional study of antimicrobial-resistant bacteria in horses. Part 2: Risk factors for faecal carriage of antimicrobial-resistant *Escherichia coli* in horses. Equine Vet J. 2012;44: 297–303. doi:10.1111/j.2042-3306.2011.00440.x

237. Tirosh-Levy S, Steinman A, Carmeli Y, Klement E, Navon-Venezia S. Prevalence and risk factors for colonization with methicillin resistant *Staphylococcus aureus* and other

Staphylococci species in hospitalized and farm horses in Israel. Prev Vet Med. 2015;122: 135–144. doi:10.1016/j.prevetmed.2015.09.007

238. Guérin F, Fines-Guyon M, Meignen P, Delente G, Fondrinier C, Bourdon N, et al. Nationwide molecular epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* responsible for horse infections in France. BMC Microbiol. 2017;17.

239. Hariharan H, Coles M, Poole D, Lund L, Page R. Update on antimicrobial susceptibilities of bacterial isolates from canine and feline otitis externa. Can Vet J Rev Veterinaire Can. 2006;47: 253–255.

240. Mekić S, Matanović K, Šeol B. Antimicrobial susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from dogs with otitis externa. Vet Rec. 2011;169: 125. doi:10.1136/vr.d2393

241. Magiorakos A-P, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG, et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. Clin Microbiol Infect. 2012;18: 268–281. doi:10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x

242. Pietschmann S, Meyer M, Voget M, Cieslicki M. The joint in vitro action of polymyxin B and miconazole against pathogens associated with canine otitis externa from three European countries. Vet Dermatol. 2013;24: 439–445, e96-97. doi:10.1111/vde.12037

243. Cole LK, Kwochka KW, Kowalski JJ, Hillier A. Microbial flora and antimicrobial susceptibility patterns of isolated pathogens from the horizontal ear canal and middle ear in dogs with otitis media. J Am Vet Med Assoc. 1998;212: 534–538.

244. Oliveira LC, Leite CAL, Brilhante RSN, Carvalho CBM. Comparative study of the microbial profile from bilateral canine otitis externa. Can Vet J Rev Veterinaire Can. 2008;49: 785–788.

245. Gómez-Sanz E, Torres C, Ceballos S, Lozano C, Zarazaga M. Clonal dynamics of nasal *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus pseudintermedius* in dog-owning household members. Detection of MSSA ST398. PLOS ONE. 2013;8: e69337.

246. van Duijkeren E, Kamphuis M, van der Mije IC, Laarhoven LM, Duim B, Wagenaar JA, et al. Transmission of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* between infected dogs and cats and contact pets, humans and the environment in households and veterinary clinics. Vet Microbiol. 2011;150: 338–343. doi:10.1016/j.vetmic.2011.02.012

247. Dégi J, Imre K, Catana N, Morar A, Sala C, Herman V. Frequency of isolation and antibiotic resistance of staphylococcal flora from external otitis of dogs. Vet Rec. 2013;173: 42.

248. Dziva F, Wint C, Auguste T, Heeraman C, Dacon C, Yu P, et al. First identification of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* strains among coagulase-positive staphylococci isolated from dogs with otitis externa in Trinidad, West Indies. Infect Ecol Epidemiol. 2015;5: 29170.

249. Graham-Mize CA, Rosser EJ. Comparison of microbial isolates and susceptibility patterns from the external ear canal of dogs with otitis externa. J Am Anim Hosp Assoc. 2004;40: 102–108. doi:10.5326/0400102

250. Penna B, Varges R, Medeiros L, Martins GM, Martins RR, Lilenbaum W. Species distribution and antimicrobial susceptibility of staphylococci isolated from canine otitis externa. Vet Dermatol. 2010;21: 292–296. doi:10.1111/j.1365-3164.2009.00842.x

251. Zamankhan Malayeri H, Jamshidi S, Zahraei Salehi T. Identification and antimicrobial susceptibility patterns of bacteria causing otitis externa in dogs. Vet Res Commun. 2010;34: 435–444. doi:10.1007/s11259-010-9417-y

252. Lin D, Foley SL, Qi Y, Han J, Ji C, Li R, et al. Characterization of antimicrobial resistance of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from canine infections. J Appl Microbiol. 2012;113: 16–23. doi:10.1111/j.1365-2672.2012.05304.x

253. Kawakami T, Shibata S, Murayama N, Nagata M, Nishifuji K, Iwasaki T, et al. Antimicrobial susceptibility and methicillin resistance in *Staphylococcus pseudintermedius* and *Staphylococcus schleiferi subsp. coagulans* isolated from dogs with pyoderma in Japan. J Vet Med Sci. 2010;72: 1615–1619.

254. Lyskova P, Vydrzalova M, Mazurova J. Identification and antimicrobial susceptibility of bacteria and yeasts isolated from healthy dogs and dogs with otitis externa. J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med. 2007;54: 559–563. doi:10.1111/j.1439-0442.2007.00996.x

255. Barlow J. Mastitis therapy and antimicrobial susceptibility: a multispecies review with a focus on antibiotic treatment of mastitis in dairy cattle. J Mammary Gland Biol Neoplasia. 2011;16: 383–407. doi:10.1007/s10911-011-9235-z

256. Humphries RM. Susceptibility testing of the polymyxins: where are we now? Pharmacotherapy. 2015;35: 22–27. doi:10.1002/phar.1505

257. Anses. Résapath, Réseau d'épidémiosurveillance de l'antibiorésistance des bactéries pathogènes animales - Bilan 2017. 2018 p. 155. Available: https://www.anses.fr/fr/system/files/LABO-Ra-Resapath2017.pdf

258. Bhaskaran K, Gasparrini A, Hajat S, Smeeth L, Armstrong B. Time series regression studies in environmental epidemiology. Int J Epidemiol. 2013;42: 1187–1195.

259. Wonnacott T-H, Wonnacott R-J. Statistique : Economie - Gestion - Sciences - Médecine. 4e ed. Paris: Economica; 1999 p. 910.

260. Adjengue L. Méthodes statistiques - concepts, applications et exercices. Presses Internationales Polytechnique. 2014 p. 530. Available: http://www.lavoisier.fr/livre/mathematiques/methodes-statistiques/adjengue/descriptif-9782553016738

261. Aragon Y. Séries temporelles avec R : Méthodes et cas. Reprint. Springer. 2011 p. 265.

262. Baym M, Stone LK, Kishony R. Multidrug evolutionary strategies to reverse antibiotic resistance. Science. 2016;351: aad3292. doi:10.1126/science.aad3292

263. Dominici F, McDermott A, Zeger SL, Samet JM. On the use of generalized additive models in time-series studies of air pollution and health. Am J Epidemiol. 2002;156: 193–203.

264. Hu W, Mengersen K, Bi P, Tong S. Time-series analysis of the risk factors for haemorrhagic fever with renal syndrome: comparison of statistical models. Epidemiol Infect. 2007;135: 245–252. doi:10.1017/S0950268806006649

265. Wu W, Guo J, An S, Guan P, Ren Y, Xia L, et al. Comparison of two hybrid models for forecasting the incidence of hemorrhagic fever with renal syndrome in Jiangsu Province, China. PloS One. 2015;10: e0135492. doi:10.1371/journal.pone.0135492

266. Weisent J, Seaver W, Odoi A, Rohrbach B. Comparison of three time-series models for predicting campylobacteriosis risk. Epidemiol Infect. 2010;138: 898–906.

267. Ye Y, Kerr WC. Alcohol and liver cirrhosis mortality in the United States: comparison of methods for the analyses of time-series panel data models. Alcohol Clin Exp Res. 2011;35: 108–115. doi:10.1111/j.1530-0277.2010.01327.x

268. Boireau C, Morignat É, Cazeau G, Jarrige N, Jouy É, Haenni M, et al. Antimicrobial resistance trends in *Escherichia coli* isolated from diseased food-producing animals in France: A 14-year period time-series study. Zoonoses Public Health. 2018;65: 86–94.

269. Zhang X, Zhang T, Young AA, Li X. Applications and comparisons of four time series models in epidemiological surveillance data. PloS One. 2014;9: e88075.

270. Aragon Y. Séries temporelles avec R : Méthodes et cas. Paris: Springer-Verlag; 2011 p. 260.

271. Hyndman R, Koehler AB, Keith Ord J, Snyder RD. Forecasting with Exponential Smoothing. Springer; 2008 p. 362.

272. Hastie T, Tibshirani R. Generalized additive models. Chapman and Hall/CRC; 1990 p. 352.

273. Wood SN. Generalized Additive Models: an Introduction with R. Chapman and Hall; 2006 p. 410.

274. Wood SN. Modelling and smoothing parameter estimation with multiple quadratic penalties. J R Stat Soc Ser B Stat Methodol. 2000;62: 413–428.

275. Pinheiro JC, Bates DM. Mixed-Effects Models in S and S-PLUS (Statistics and Computing). 1st ed. Springer-Verlag New York Inc.; 2000 p. 548.

276. Wood SN. Fast stable direct fitting and smoothness selection for generalized additive models. J R Stat Soc Ser B Stat Methodol. 2008;70: 495–518. doi:10.1111/j.1467-9868.2007.00646.x

277. Guérin-Faublée V, Carret G, Houffschmitt P. In vitro activity of 10 antimicrobial agents against bacteria isolated from cows with clinical mastitis. Vet Rec. 2003;152: 466–471.

278. Botrel M-A, Haenni M, Morignat E, Sulpice P, Madec J-Y, Calavas D. Distribution and antimicrobial resistance of clinical and subclinical mastitis pathogens in dairy cows in Rhône-Alpes, France. Foodborne Pathog Dis. 2010;7: 479–487. doi:10.1089/fpd.2009.0425

279. Tenhagen B-A, Köster G, Wallmann J, Heuwieser W. Prevalence of mastitis pathogens and their resistance against antimicrobial agents in dairy cows in Brandenburg, Germany. J Dairy Sci. 2006;89: 2542–2551. doi:10.3168/jds.S0022-0302(06)72330-X

280. Bradley AJ, Leach KA, Breen JE, Green LE, Green MJ. Survey of the incidence and aetiology of mastitis on dairy farms in England and Wales. Vet Rec. 2007;160: 253–257.

281. Ericsson Unnerstad H, Lindberg A, Persson Waller K, Ekman T, Artursson K, Nilsson-Ost M, et al. Microbial aetiology of acute clinical mastitis and agent-specific risk factors. Vet Microbiol. 2009;137: 90–97. doi:10.1016/j.vetmic.2008.12.005

282. Kateete DP, Kabugo U, Baluku H, Nyakarahuka L, Kyobe S, Okee M, et al. Prevalence and antimicrobial susceptibility patterns of bacteria from milkmen and cows with clinical mastitis in and around Kampala, Uganda. PloS One. 2013;8: e63413.

283. Aarestrup FM. The livestock reservoir for antimicrobial resistance: a personal view on changing patterns of risks, effects of interventions and the way forward. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 2015;370: 20140085. doi:10.1098/rstb.2014.0085

284. Thomas V, de Jong A, Moyaert H, Simjee S, El Garch F, Morrissey I, et al. Antimicrobial susceptibility monitoring of mastitis pathogens isolated from acute cases of clinical mastitis in dairy cows across Europe: VetPath results. Int J Antimicrob Agents. 2015;46: 13–20.

285. Persson Y, Nyman A-KJ, Grönlund-Andersson U. Etiology and antimicrobial susceptibility of udder pathogens from cases of subclinical mastitis in dairy cows in Sweden. Acta Vet Scand. 2011;53: 36. doi:10.1186/1751-0147-53-36

286. SNGTV. Recommandations de bonnes pratiques d'utilisation des antibiotiques en filière bovine. 2014 p. 45. Available: https://www.sngtv.org/4DACTION/NS2013_SM_ACTION/6695

287. WHO. Critically important antimicrobials for human medicine 5th revison. 2017 p. 41. Available: https://www.who.int/foodsafety/publications/antimicrobials-fifth/en/

288. Collignon P, Powers JH, Chiller TM, Aidara-Kane A, Aarestrup FM. World Health Organization ranking of antimicrobials according to their importance in human medicine: a critical step for developing risk management strategies for the use of antimicrobials in food production animals. Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am. 2009;49: 132–141.

289. Anses. Évaluation des risques d'émergence d'antibiorésistances liées aux modes d'utilisation des antibiotiques dans le domaine de la santé animale. 2014 p. 240. Available: https://www.anses.fr/fr/system/files/SANT2011sa0071Ra.pdf

290. Hale CR, Scallan E, Cronquist AB, Dunn J, Smith K, Robinson T, et al. Estimates of enteric illness attributable to contact with animals and their environments in the United States. Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am. 2012;54 Suppl 5: S472-479. doi:10.1093/cid/cis051

291. Geenen PL, Graat E a. M, Haenen A, Hengeveld PD, Van Hoek AH a. M, Huijsdens XW, et al. Prevalence of livestock-associated MRSA on Dutch broiler farms and in people living and/or working on these farms. Epidemiol Infect. 2013;141: 1099–1108.

292. Woolhouse M, Ward M, van Bunnik B, Farrar J. Antimicrobial resistance in humans, livestock and the wider environment. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 2015;370: 20140083. doi:10.1098/rstb.2014.0083

293. Anses-ANMV. Suivi des ventes de médicaments vétérinaires contenant des antibiotiques en France en 2016. Anses; 2017 p. 108. Available: https://www.anses.fr/fr/system/files/ANMV-Ra-Antibiotiques2016.pdf

294. Chen X, Zhang W, Yin J, Zhang N, Geng S, Zhou X, et al. *Escherichia coli* isolates from sick chickens in China: changes in antimicrobial resistance between 1993 and 2013. Vet J Lond Engl 1997. 2014;202: 112–115. doi:10.1016/j.tvjl.2014.06.016

295. Zhang P, Shen Z, Zhang C, Song L, Wang B, Shang J, et al. Surveillance of antimicrobial resistance among *Escherichia coli* from chicken and swine, China, 2008-2015. Vet Microbiol. 2017;203: 49–55. doi:10.1016/j.vetmic.2017.02.008

296. Hanon J-B, Jaspers S, Butaye P, Wattiau P, Méroc E, Aerts M, et al. A trend analysis of antimicrobial resistance in commensal *Escherichia coli* from several livestock species in Belgium (2011-2014). Prev Vet Med. 2015; doi:10.1016/j.prevetmed.2015.09.001

297. Viale P, Giannella M, Bartoletti M, Tedeschi S, Lewis R. Considerations about antimicrobial stewardship in settings with epidemic extended-spectrum β-lactamase-producing or carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*. Infect Dis Ther. 2015;4: 65–83.

298. Pereira RVV, Siler JD, Bicalho RC, Warnick LD. In vivo selection of resistant *E. coli* after ingestion of milk with added drug residues. PloS One. 2014;9: e115223.

299. Jarrige N, Cazeau G, Morignat E, Chanteperdrix M, Gay E. Quantitative and qualitative analysis of antimicrobial usage in white veal calves in France. Prev Vet Med. 2017;144: 158–166. doi:10.1016/j.prevetmed.2017.05.018

300. Maynou G, Bach A, Terré M. Feeding of waste milk to Holstein calves affects antimicrobial resistance of *Escherichia coli* and *Pasteurella multocida* isolated from fecal and nasal swabs. J Dairy Sci. 2017;100: 2682–2694. doi:10.3168/jds.2016-11891

301. Baron S, Jouy E, Larvor E, Eono F, Bougeard S, Kempf I. Impact of third-generation-cephalosporin administration in hatcheries on fecal *Escherichia coli* antimicrobial resistance in broilers and layers. Antimicrob Agents Chemother. 2014;58: 5428–5434.

302. Fleury MA, Mourand G, Jouy E, Touzain F, Le Devendec L, de Boisseson C, et al. Impact of ceftiofur injection on gut microbiota and *Escherichia coli* resistance in pigs. Antimicrob Agents Chemother. 2015;59: 5171–5180. doi:10.1128/AAC.00177-15

303. Lin D, Chen K, Xie M, Ye L, Chan EW-C, Chen S. Effect of ceftiofur and enrofloxacin on *E. coli* sub-population in pig gastrointestinal tract. J Glob Antimicrob Resist. 2017;10: 126–130. doi:10.1016/j.jgar.2017.05.010

304. ONERBA. Rapport d'activité 2017. 2018 p. 131. Available: http://onerba.org/publications/rapports-onerba/

305. Thibaut S, Caillon J, Grandjean G, Ballereau F. Réseau MedQual : surveillance de l'évolution des résistances des souches d'*Escherichia coli* isolées en ville. Bull Épidémiologique Santé Anim Aliment. 2013; 21–24.

306. CA-SFM, EUCAST. Comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie Recommandations 2018. 2018 p. 134. Available: https://www.sfm-microbiologie.org/wp-content/uploads/2018/12/CASFMV2_SEPTEMBRE2018.pdf

307. CASFM. Antibiogramme vétérinaire du Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie. 2017 p. 16.

308. Bourély C, Chauvin C, Jouy É, Cazeau G, Jarrige N, Leblond A, et al. Comparative epidemiology of *E. coli* resistance to third-generation cephalosporins in diseased food-producing animals. Vet Microbiol. 2018;223: 72–78. doi:10.1016/j.vetmic.2018.07.025

309. Boireau C, Cazeau G, Jarrige N, Calavas D, Madec J-Y, Leblond A, et al. Antimicrobial resistance in bacteria isolated from mastitis in dairy cattle in France, 2006–2016. J Dairy Sci. 2018;101: 9451–9462. doi:10.3168/jds.2018-14835

310. Hu Y, Yang X, Li J, Lv N, Liu F, Wu J, et al. The bacterial mobile resistome transfer network connecting the animal and human microbiomes. Appl Environ Microbiol. 2016;82: 6672–6681. doi:10.1128/AEM.01802-16

311. SPILF. Diagnostic et antibiothérapie des infections urinaires bactériennes communautaires de l'adulte. 2015 p. 43. Available: http://www.infectiologie.com/UserFiles/File/spilf/recos/infections-urinaires-spilf.pdf

312. ANSM. La consommation d'antibiotiques en France en 2016. 2017 p. 20. Available: https://ansm.sante.fr/var/ansm_site/storage/original/application/519a5cd0c5e00867cf73dcc2ff39d519.pdf

313. Schwarz S, Alesík E, Grobbel M, Lübke-Becker A, Werckenthin C, Wieler LH, et al. Antimicrobial susceptibility of *Pasteurella multocida* and *Bordetella bronchiseptica* from dogs and cats as determined in the BfT-GermVet monitoring program 2004-2006. Berl Munch Tierarztl Wochenschr. 2007;120: 423–430.

314. Faverjon C, Berezowski J. Choosing the best algorithm for event detection based on the intended application: A conceptual framework for syndromic surveillance. J Biomed Inform. 2018;85: 126–135. doi:10.1016/j.jbi.2018.08.001

315. Unkel S, Farrington CP, Garthwaite PH, Robertson C, Andrews N. Statistical methods for the prospective detection of infectious disease outbreaks: a review. J R Stat Soc Ser A Stat Soc. 2012;175: 49–82. doi:10.1111/j.1467-985X.2011.00714.x

316. Fricker RD. Introduction to statistical methods for biosurveillance: with an emphasis on syndromic surveillance. Cambridge University Press; 2013 p.418.

317. Carpenter TE. Methods to investigate spatial and temporal clustering in veterinary epidemiology. Prev Vet Med. 2001;48: 303–320.

318. Hutwagner LC, Thompson WW, Seeman GM, Treadwell T. A simulation model for assessing aberration detection methods used in public health surveillance for systems with limited baselines. Stat Med. 2005;24: 543–550. doi:10.1002/sim.2034

319. Bernoux P. Le changement dans les organisations. Entre structures et interactions. Relat Ind Ind Relat. 2002; 77–99.

320. Dent EB, Goldberg SG. Challenging "Resistance to Change." J Appl Behav Sci. 1999;35: 25–41. doi:10.1177/0021886399351003

321. Lawrence PR. How to deal with resistance to change. Harv Bus Rev. 1969;47: 4–6.

322. Catley A. Use of participatory epidemiology to compare the clinical veterinary knowledge of pastoralists and veterinarians in East Africa. Trop Anim Health Prod. 2006;38: 171–184.

323. Catley A, Alders RG, Wood JLN. Participatory epidemiology: approaches, methods, experiences. Vet J Lond Engl 1997. 2012;191: 151–160. doi:10.1016/j.tvjl.2011.03.010

324. van Dijk L, Hayton A, Main DCJ, Booth A, King A, Barrett DC, et al. Participatory policy making by dairy producers to reduce anti-microbial use on farms. Zoonoses Public Health. 2016; doi:10.1111/zph.12329

325. Pretty JN. Participatory learning for sustainable agriculture. World Dev. 1995;23: 1247–1263. doi:10.1016/0305-750X(95)00046-F

326. Stärk KDC, Regula G, Hernandez J, Knopf L, Fuchs K, Morris RS, et al. Concepts for risk-based surveillance in the field of veterinary medicine and veterinary public health: review of current approaches. BMC Health Serv Res. 2006;6: 20. doi:10.1186/1472-6963-6-20

327. Fortané N. La surveillance comme dispositif-frontière. Rev Anthropol Connaiss. 2015;9: 265–290.

328. Botrel M-A, Morignat E, Meunier D, Madec J-Y, Calavas D. Identifying antimicrobial multiresistance patterns of *Escherichia coli* sampled from diarrhoeic calves by cluster analysis techniques: a way to guide research on multiresistance mechanisms. Zoonoses Public Health. 2010;57: 204–210. doi:10.1111/j.1863-2378.2009.01262.x

329. Ruppé É, Woerther P-L, Barbier F. Mechanisms of antimicrobial resistance in Gram-negative bacilli. Ann Intensive Care. 2015;5. doi:10.1186/s13613-015-0061-0

330. Napoli C, Iannetti S, Rizzo C, Bella A, Di Sabatino D, Bruno R, et al. Vector borne infections in Italy: results of the integrated surveillance system for West Nile disease in 2013. BioMed Res Int. 2015;2015: 643439. doi:10.1155/2015/643439

331. Wendt A, Kreienbrock L, Campe A. Zoonotic disease surveillance--inventory of systems integrating human and animal disease information. Zoonoses Public Health. 2015;62: 61–74.

332. Hattendorf J, Bardosh KL, Zinsstag J. One Health and its practical implications for surveillance of endemic zoonotic diseases in resource limited settings. Acta Trop. 2017;165: 268–273. doi:10.1016/j.actatropica.2016.10.009

333. Wahl TG, Burdakov AV, Oukharov AO, Zhilokov AK. Electronic integrated disease surveillance system and pathogen asset control system. Onderstepoort J Vet Res. 2012;79: 455. doi:10.4102/ojvr.v79i2.455

334. Burdakov A, Wahl T, Oukharov A, Bekshin Z, Kazakov S, Grigorev U. Strengthening national One Health disease surveillance with open-source EIDSS. Int J Infect Dis. 2014;21: 274. doi:10.1016/j.ijid.2014.03.989

335. Perez A, Alkhamis M, Carlsson U, Brito B, Carrasco-Medanic R, Whedbee Z, et al. Global animal disease surveillance. Spat Spatio-Temporal Epidemiol. 2011;2: 135–145.

336. Keller M, Blench M, Tolentino H, Freifeld CC, Mandl KD, Mawudeku A, et al. Use of unstructured event-based reports for global infectious disease surveillance. Emerg Infect Dis. 2009;15: 689–695. doi:10.3201/eid1505.081114

337. Toutain P-L, Bousquet-Mélou A, Damborg P, Ferran AA, Mevius D, Pelligand L, et al. En route towards European clinical breakpoints for veterinary antimicrobial susceptibility testing: a position paper explaining the VetCAST approach. Front Microbiol. 2017;8.

338. Silley P, de Jong A, Simjee S, Thomas V. Harmonisation of resistance monitoring programmes in veterinary medicine: an urgent need in the EU? Int J Antimicrob Agents. 2011;37: 504–512. doi:10.1016/j.ijantimicag.2010.12.002

339. Schrijver R, Stijntjes M, Rodríguez-Baño J, Tacconelli E, Babu Rajendran N, Voss A. Review of antimicrobial resistance surveillance programmes in livestock and meat in EU with focus on humans. Clin Microbiol Infect. 2017; doi:10.1016/j.cmi.2017.09.013

340. de Jong A, Garch FE, Simjee S, Moyaert H, Rose M, Youala M, et al. Monitoring of antimicrobial susceptibility of udder pathogens recovered from cases of clinical mastitis in dairy cows across Europe: VetPath results. Vet Microbiol. 2018;213: 73–81.

341. de Jong A, Thomas V, Simjee S, Moyaert H, El Garch F, Maher K, et al. Antimicrobial susceptibility monitoring of respiratory tract pathogens isolated from diseased cattle and pigs across Europe: The VetPath study. Vet Microbiol. 2014;172: 202–215.

342. Thomas V, de Jong A, Moyaert H, Simjee S, El Garch F, Morrissey I, et al. Antimicrobial susceptibility monitoring of mastitis pathogens isolated from acute cases of clinical mastitis in dairy cows across Europe: VetPath results. Int J Antimicrob Agents. 2015;46: 13–20.

343. Morrissey I, Moyaert H, de Jong A, El Garch F, Klein U, Ludwig C, et al. Antimicrobial susceptibility monitoring of bacterial pathogens isolated from respiratory tract infections in dogs and cats across Europe: ComPath results. Vet Microbiol. 2016;191: 44–51.

344. Moyaert H, Morrissey I, de Jong A, El Garch F, Klein U, Ludwig C, et al. Antimicrobial susceptibility monitoring of bacterial pathogens isolated from urinary tract infections in dogs and cats across Europe: ComPath results. Microb Drug Resist Larchmt N. 2017;23: 391–403.

345. Ludwig C, Jong A de, Moyaert H, Garch FE, Janes R, Klein U, et al. Antimicrobial susceptibility monitoring of dermatological bacterial pathogens isolated from diseased dogs and cats across Europe (ComPath results). J Appl Microbiol. 2016;121: 1254–1267.

346. de Jong A, Thomas V, Klein U, Marion H, Moyaert H, Simjee S, et al. Pan-European resistance monitoring programmes encompassing food-borne bacteria and target pathogens of food-producing and companion animals. Int J Antimicrob Agents. 2013;41: 403–409.

347. Tacconelli E, Sifakis F, Harbarth S, Schrijver R, van Mourik M, Voss A, et al. Surveillance for control of antimicrobial resistance. Lancet Infect Dis. 2017; doi:10.1016/S1473-3099(17)30485-1

348. Group IN for S of AR (INSAR). Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in India: Prevalence & susceptibility pattern. Indian J Med Res. 2013;137: 363.

349. Wattal C, Goel N, Oberoi JK, Raveendran R, Datta S, Prasad KJ. Surveillance of multidrug resistant organisms in tertiary care hospital in Delhi, India. J Assoc Physicians India. 2010;58 Suppl: 32–36.

350. Lübbert C, Baars C, Dayakar A, Lippmann N, Rodloff AC, Kinzig M, et al. Environmental pollution with antimicrobial agents from bulk drug manufacturing industries in Hyderabad, South India, is associated with dissemination of extended-spectrum beta-lactamase and carbapenemase-producing pathogens. Infection. 2017;45: 479–491.

351. Marathe NP, Pal C, Gaikwad SS, Jonsson V, Kristiansson E, Larsson DGJ. Untreated urban waste contaminates Indian river sediments with resistance genes to last resort antibiotics. Water Res. 2017;124: 388–397. doi:10.1016/j.watres.2017.07.060

352. Diwan V, Purohit M, Chandran S, Parashar V, Shah H, Mahadik VK, et al. A three-year follow-up study of antibiotic and metal residues, antibiotic resistance and resistance genes, focusing on Kshipra-A river associated with holy religious mass-bathing in India: protocol paper. Int J Environ Res Public Health. 2017;14. doi:10.3390/ijerph14060574

353. Reddy B, Dubey SK. River Ganges water as reservoir of microbes with antibiotic and metal ion resistance genes: High throughput metagenomic approach. Environ Pollut Barking Essex 1987. 2019;246: 443–451. doi:10.1016/j.envpol.2018.12.022

354. Hawkey PM. The origins and molecular basis of antibiotic resistance. BMJ. 1998;317: 657–660.

355. Poirel L, Hombrouck-Alet C, Freneaux C, Bernabeu S, Nordmann P. Global spread of New Delhi metallo-β-lactamase 1. Lancet Infect Dis. 2010;10: 832.

356. Yong D, Toleman MA, Giske CG, Cho HS, Sundman K, Lee K, et al. Characterization of a new metallo-beta-lactamase gene, bla(NDM-1), and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India. Antimicrob Agents Chemother. 2009;53: 5046–5054. doi:10.1128/AAC.00774-09

357. Castanheira M, Deshpande LM, Mathai D, Bell JM, Jones RN, Mendes RE. Early dissemination of NDM-1- and OXA-181-producing *Enterobacteriaceae* in Indian hospitals: report from the SENTRY antimicrobial surveillance program, 2006-2007. Antimicrob Agents Chemother. 2011;55: 1274–1278. doi:10.1128/AAC.01497-10

358. Dutta SS. India launches strategy to curb antimicrobial resistance. BMJ. 2017;357: j2049. doi:10.1136/bmj.j2049

359. Das B, Chaudhuri S, Srivastava R, Nair GB, Ramamurthy T. Fostering research into antimicrobial resistance in India. BMJ. 2017;358: j3535. doi:10.1136/bmj.j3535

Annexes

Annexe 1 : Liste des productions scientifiques dans le cadre de la thèse

Revues internationales à comité de lecture

- Articles publiés

- **Boireau C.,** Morignat E., Cazeau G., Jarrige N., Jouy E., Haenni M., Madec J-Y., Leblond A., Gay E.. 2018. Antimicrobial resistance trends in *Escherichia coli* isolated from diseased food-producing animals in France: A 14-year period time-series study. Zoonoses and Public Health, 65, 1, 86–94, DOI : 10.1111/zph.12412
- **Boireau C.,** Cazeau G., Jarrige N., Calavas D., Madec J-Y., Leblond A., Haenni M., Gay E. 2018. Antimicrobial resistance in bacteria isolated from mastitis in dairy cattle in France, 2006–2016. Journal of Dairy Science. 101, 9451-9462, DOI: 10.3168/jds.2018-14835
- **Bourély C.,** Chauvin C., Jouy E., Cazeau G., Jarrige N., Leblond A., Gay E. 2018. Comparative epidemiology of *E. coli* resistance to third-generation cephalosporins in diseased food-producing animals. Veterinary microbiology, 223, 72-78, DOI : 10.1016/j.vetmic.2018.07.025
- **Bourély C.,** Fortané N., Calavas D., Leblond A., Gay E. 2018. Why do veterinarians ask for antimicrobial susceptibility testing? A qualitative study exploring determinants and evaluating the impact of antibiotic reduction policy. Preventive Veterinary Medicine, 159, 123-134, DOI : 10.1016/j.prevetmed.2018.09.009
- **Bourély C.,** Cazeau G., Jarrige N., Leblond A., Madec J-Y., Haenni M., Gay E. 2019. Antimicrobial resistance patterns of bacteria isolated from dogs with otitis. Epidemiology and Infection. 147, E121. DOI :10.1017/S0950268818003278
- **Bourély C.,** Cazeau G., Jarrige N., Haenni M., Leblond A, Gay E. 2019. Antimicrobial resistance in bacteria isolated from diseased horses in France. Equine veterinary Journal. DOI : 10.1111/evj.13133
- **Bourély C.,** Cazeau G., Jouy E., Haenni M., Madec J-Y., Jarrige N., Leblond A., Gay E. Antimicrobial resistance of *Pasteurella multocida* isolated from diseased food-producing animals and pets. Veterinary microbiology, 235, 280-284

- Articles soumis

- **Bourély C.,** Coeffic T., Caillon J., Thibaut S., Cazeau G., Jouy E., Jarrige N., Chauvin C., Madec J-Y., Haenni M., Leblond A., Gay E.. *Escherichia coli* resistance trends: are humans the black sheep of the animal kingdom? Journal of Antimicrobial Chemotherapy, under review.
- **Bourély C.,** Cazeau G., Jarrige N., Jouy E., Haenni M., Lupo A., Madec J-Y., Leblond A., Gay E. Joint resistance to amoxicillin and tetracycline as an indicator of multidrug resistance in *Escherichia coli* isolates from animals, Frontiers in Microbiology, under review.

Revue nationale à comité de lecture

- **Boireau C.,** Jarrige N., Cazeau G., Jouy E., Haenni M., Philippon C., Calavas D., Madec J-Y., Leblond A., Gay E. 2018. Representativeness and coverage of the RESAPATH, the French surveillance network for antimicrobial resistance in pathogenic bacteria of animal. Bulletin Epidémiologique, santé animale - alimentation, 82(4).
- **Bourély C.,** Fortané N., Calavas D., Leblond A., Gay E. 2018. La restriction d'usage des antibiotiques d'importance critique en France : impact de la nouvelle réglementation en médecine vétérinaire. Epidémiologie et santé animale. 73, 91-105.

- **Bourély C.,** Cazeau G., Jarrige N., Calavas D., Philippon C., Vinard J-L., Madec J-Y., Leblond A., Haenni M., Gay E. 2019. Apport du Résapath pour lacaractérisation phénotypique des résistances des bactéries responsables de mammites chez les vaches laitières en France. Bulletin Epidémiologique, santé animale - alimentation, 87(1).
- **Bourély C.,** Cazeau G., Gay E., Haenni M., Jarrige N., Jouy E., Lupo A., Madec J-Y. 2019. La résistance des bactéries isolées d'animaux malades : faits marquants du rapport annuel du Résapath pour l'année 2017. Bulletin Epidémiologique, santé animale - alimentation, in press

Contribution à la rédaction de rapport

- Anses 2018. Résapath - Réseau d'épidémiosurveillance de l'antibiorésistance des bactéries pathogènes animales, bilan 2017. Lyon et Ploufragan-Plouzané, novembre 2018, rapport, 155p.
- Anses 2019. RESAPATH - French surveillance network for antimicrobial resistance in bacteria from diseased animals. Lyon and Ploufragan-Plouzané, March 2019, Annual report, 107p.
- Anses 2019. Evaluation du réseau d'épidémiosurveillance de l'antibiorésistance des bactéries pathogènes animales en France (Résapath). Lyon, Avril 2019, Rapport d'évaluation, 83p.

Participation à des congrès scientifiques

➢ Communication orale (anglais)

- **Boireau C.,** Chauvin C., Jouy E., Cazeau G., Jarrige N., Leblond A., Gay E. Comparative epidemiology of clinical *E. coli* resistance to thrid-generation cephalosporins in animal health. In: SVEPM, Conference & Annual General meeting of the Society. Tallinn, Estonia, 21-23 March 2018.
- **Boireau C.,** Fortané N., Calavas D., Leblond A., Gay E. How do French veterinarians face the new antimicrobial resistance policy regarding the use of critically important antibiotics? In: ISESSAH, International Society for Economics and Social Sciences of Animal Health. Montpellier, France, 14-15 May 2018.
- **Bourély C.,** Fortané N., Calavas D., Leblond A., Gay E. Understanding the use of antimicrobial susceptibility testing by veterinarians to better interpret antimicrobial resistance surveillance data. In: ISVEE 15, The 15th International Symposium of Veterinary Epidemiology and Economics. Chiang Mai, Thailand, 12-16 November 2018.
- **Bourély C.,** Cazeau G., Jarrige N., Haenni M., Gay E., Leblond A. Dynamic of antimicrobial resistance in diseased horses in France from 2012 to 2016. In: ISVEE 15, The 15th International Symposium of Veterinary Epidemiology and Economics. Chiang Mai, Thailand, 12-16 November 2018.
- **Bourély C.,** Cazeau G., Jouy E., Haenni M., Madec J-Y., Jarrige N., Leblond A., Gay E. What do we know about the antimicrobial resistance of *Pasteurella multocida* isolated from food-producing animals and pets? In: ARAE, The 8th Symposium on Antimicrobial Resistance in Animals and the Environment. Tours, France, 1-3 July 2019.

➢ Communication orale (français)

- **Boireau C.,** Fortané N., Calavas D., Leblond A. and Gay E. Quels sont les déterminants du recours à l'antibiogramme en santé animale en France ? In: Résapath 2017, Journée du Résapath. Maisons-Alfort, France, 5 Décembre 2017.
- **Boireau C.,** Jarrige N., Cazeau G., Jouy E., Haenni M., Philippon C., Calavas D., Madec J-Y., Leblond A., Gay E. Le Résapath en 2015 : un système de surveillance représentatif ? In: Résapath 2017, Journée du Résapath. Maisons-Alfort, France, 5 Décembre 2017.

- **Boireau C.,** Fortané N., Calavas D., Leblond A. and Gay E. La restriction d'usage des antibiotiques d'importance critique en France : impact de la nouvelle réglementation en médecine vétérinaire. In: AEEMA, Association pour l'étude de l'épidémiologie des maladies anaimales. Maisons-Alfort, France , 30 mai - 1 juin 2018.
- **Bourély C.,** Cazeau G., Jarrige N., Calavas D., Madec J-Y., Leblond A., Haenni M., Gay E. Eclairage épidémiologique sur la résistance des bactéries responsables de mammites bovines. In: Résapath 2018, Journée du Résapath. Maisons-Alfort, France, 27 Novembre 2018.
- **Bourély C.,** Chauvin C., Jouy E., Cazeau G., Jarrige N., Leblond A., Gay E. Epidémiologie comparative de la résistance des souches *E. coli* aux céphalosporines de troisième génération chez les animaux de production. In: Journées scientifiques et doctorales, Anses. Maisons-Alfort, France, 5-6 décembre 2018.
- **Bourély C.,** Coeffic T., Caillon J., Thibaut S., Cazeau G., Jouy E., Jarrige N., Leblond A., Gay E. Parallèle Homme-animal des tendances des résistances chez Escherichia coli. In: RICAI, Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-Infectieuse. Paris, France, 17-18 Décembre 2018.

➢ Posters

- **Boireau C.,** Fortané N., Calavas D., Leblond A., Gay E. Understanding the use of antimicrobial susceptibility testing by veterinarians to interpret surveillance data on resistance: a qualitative study exploring determinants and issues in France. In: 11th Annual Meeting EPIZONE. Paris, France, 19-21 September 2017.
- **Boireau C.,** Fortané N., Calavas D., Leblond A., Gay E. Comprendre le recours à l'antibiogramme en médecine vétérinaire pour interpréter les données de surveillance sur l'antibiorésistance : une étude qualitative explorant les déterminants et enjeux en France. In: Journées scientifiques et doctorales, Anses. Maisons-Alfort, France, 25-26 Octobre 2017.
- **Boireau C.**, Morignat E., Cazeau G., Jarrige N., Jouy E., Haenni M., Madec J-Y., Leblond A., Gay E. Temporal dynamics of the resistance of *Escherichia coli* isolated from food-producing animals in France: a 14-year period time-series study. In: Epidemics 6, International Conference on Infectious Disease Dynamics. Sitges, Espagne, 29 November - 1 December 2017.
- **Bourély C.,** Chauvin C., Jouy E., Cazeau G., Jarrige N., Leblond A., Gay E. *E. coli* resistance to third-generation cephalosporins in diseased food-producing animals. In: ECVPH 2018 Conference. Perugia, Italie, 17-19 October 2018.
- **Bourély C.,** Cazeau G., Jarrige N., Leblond A., Haenni M., Gay E. What do we know about the antimicrobial resistance of bacteria isolated from dogs with otitis in France? In: ISVEE 15, The 15th International Symposium of Veterinary Epidemiology and Economics. Chiang Mai, Thailand, 12-16 November 2018.
- **Bourély C.,** Fortané N., Calavas D., Leblond A., Gay E. Utilisation de l'antibiogramme en médecine vétérinaire : comprendre les pratiques pour interpréter les données de surveillance. In: Cycle de conférences Global Health 2018. Marcy L'Etoile, France, 13 Décembre 2018.
- **Bourély C.,** Chauvin C., Jouy E., Cazeau G., Jarrige N., Leblond A., Gay E. Dynamique de la résistance des souches *E. coli* aux céphalosporines de troisième génération chez les animaux de production. In: Cycle de conférences Global Health 2018. Marcy L'Etoile, France, 13 Décembre 2018.

Annexe 2 : Premier article - Antimicrobial resistance trends in Escherichia coli isolated from diseased food-producing animals in France: A 14-year period time-series study

Received: 15 June 2017
DOI: 10.1111/zph.12412

ORIGINAL ARTICLE

WILEY

Antimicrobial resistance trends in *Escherichia coli* isolated from diseased food-producing animals in France: A 14-year period time-series study

C. Boireau[1,2,3] | É. Morignat[2] | G. Cazeau[2] | N. Jarrige[2] | É. Jouy[4] | M. Haenni[5] | J.-Y. Madec[5] | A. Leblond[3] | É. Gay[2]

[1]École Nationale des Services Vétérinaires, ENSV, VetAgroSup, Lyon, France

[2]Laboratoire de Lyon, Unité Épidémiologie, Université de Lyon, ANSES, Lyon, France

[3]Epidémiologie des maladies Animales et zoonotiques, EPIA, INRA, VetAgroSup, University of Lyon, Lyon, France

[4]Laboratoire de Ploufragan-Plouzané, Unité Mycoplasmologie-Bactériologie, ANSES, Université Bretagne Loire, Technopôle Saint-Brieuc Armor, Ploufragan, France

[5]Laboratoire de Lyon, Unité Antibiorésistance et Virulence Bactériennes, ANSES, Université de Lyon, Lyon, France

Correspondence
Émilie Gay, Laboratoire de Lyon, Unité Épidémiologie, Université de Lyon, ANSES, Lyon, France.
Email: emilie.gay@anses.fr

Funding information
This work was partly supported by the French Ministry of Agriculture (http://agriculture.gouv.fr). No additional external funding was received for this study. The funders had no role in study design, data collection, and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Summary

Antimicrobial resistance (AMR) among bacteria isolated from food-producing animals is a growing concern with implications for public health. AMR surveillance is essential to identify resistance trends and help in the design of effective and efficient control strategies. The aim of the study was to describe the antimicrobial susceptibility of pathogenic *Escherichia coli* isolated from three livestock productions in France (cattle, swine and poultry). The trend in resistance to the most commonly prescribed antibiotics in animal health was analysed as follows: amoxicillin (penicillin), spectinomycin or streptomycin (aminoglycoside), tetracycline and trimethoprim-sulfamethoxazole/Enrofloxacin and ceftiofur were also taken into account as members of critically important antimicrobial families in human and veterinary medicine, that is fluoroquinolones and third-generation cephalosporins, respectively. Data collected between 2002 and 2015 by the French national surveillance network of AMR referred to as RESAPATH were analysed. Resistance trends were investigated using non-linear analysis (generalized additive models) applied to time-series stratified by livestock production and antibiotic. Irrespective of the species and the antibiotic considered, resistance signals over time showed no significant annual cycle. Resistance to third-generation cephalosporins emerged during the period of the study, with a peak at 22% [20.5; 24.0] in poultry in 2010, decreasing afterwards, while it remained consistently below 10% for the other species. The proportion of resistance to fluoroquinolones was broadly similar between species and remained under 30%, with a slight decreasing trend after 2009. Resistances to tetracycline and amoxicillin remained high, between 90% and 40% over time in cattle and swine. After 2010, there was a decrease in resistance to these antibiotics for all species, especially to tetracycline for poultry with a drop from 84% in 2009 to 43% in 2015. These results contribute to risk assessment and constitute objective evidence on which to evaluate the efficacy of control measures implemented to limit AMR occurrence.

KEYWORDS
antimicrobial resistance, cattle, poultry, RESAPATH, swine, time-series

1 | INTRODUCTION

Antimicrobial resistance (AMR) in humans and animals has become a major concern with strong implications for public health. In this context, our understanding of this phenomenon strongly relies on efficient surveillance and monitoring systems both in humans and animals. Hence, continuous surveillance of AMR at national and international levels is important to quantify the spread of AMR, to guide

both appropriate policies and antimicrobial stewardship, and to assess the efficacy of measures in place (WHO, 2014).

The selection and spread of AMR has crucial consequences in human medicine, such as increased patient morbidity and mortality, therapeutic failure, limited treatment options and cost of health care. On the other hand, the animal sector undoubtedly plays a role in the global transfer of resistant bacteria and resistance genes to humans although the food chain, by direct contact with animals, or by contamination of the environment (Geenen et al., 2013; Woolhouse, Ward, van Bunnik, & Farrar, 2015). Therefore, a knowledge of temporal variations in AMR, with regular updates, in both humans and animals, is indispensable to estimate the magnitude of the potential threat to public health, to design efficient control strategies and to measure their effectiveness.

Escherichia coli, a member of the *Enterobacteriaceae* family, is a common commensal organism of the mammalian intestinal track. But *E. coli* is also one of the most frequently isolated pathogens in food-producing animals and also a major Gram-negative infectious agent for humans, especially causing urinary tract infections (Karam, Chastre, Wilcox, & Vincent, 2016). AMR in *E. coli* has now become a serious issue, especially with regard to the possibilities for treating infections caused by this bacterium with either first- or last-line antibiotics. *E. coli* is one of the most frequent etiological agents of digestive disorders in cattle and swine (DebRoy & Maddox, 2001) and avian pathogenic *E. coli* cause acute fatal septicaemia and systemic infection of internal organs with a diversity of symptoms (Dho-Moulin & Fairbrother, 1999). In cattle, *E. coli* is also a dominant cause of clinical mastitis (Botrel et al., 2010). Moreover, *E. coli* is considered to be an excellent sentinel of AMR for a wide range of species (Aarestrup, Wegener, & Collignon, 2008; De Graef, Decostere, Devriese, & Haesebrouck, 2004) and it readily acquires resistance in the face of local selection pressure (von Baum & Marre, 2005). *E. coli* is able to select resistance phenotypes through point mutations in the chromosome, but its ability to acquire and disseminate resistance genes through horizontal gene transfer is much more problematic (Tenover, 2006): *E. coli* can potentially confer resistance to other bacteria and this is a key source of dissemination of resistance genes.

The aim of our study was to describe the trends of AMR in pathogenic *E. coli* in food-producing animals in France over a 14-year period. The main antimicrobial classes commonly used in veterinary medicine (Anses-ANMV, 2016) were studied as follows: tetracyclines, aminoglycosides, potentiated sulphonamides, fluoroquinolones and among beta-lactams, penicillins and last-generation cephalosporins.

Impacts

- By applying time-series analysis, we described antimicrobial resistance trends of pathogenic *Escherichia coli* in food-producing animals: the data generated can help in designing efficient control strategies and policies.
- This retrospective study was performed using data collected by an established national surveillance network for antimicrobial resistance in pathogenic bacteria from animals, referred to as RESAPATH. The results highlighted the need to set up national surveillance networks able to monitor antibiotic resistance of pathogens in food-producing animals.
- Resistance to third-generation cephalosporins emerged during the period of the study: this trend is particularly alarming because these antimicrobial agents constitute last resort antibiotics for some human diseases.

2 | MATERIALS AND METHODS

2.1 | Source of data

This retrospective study was performed using data from the French established national surveillance network for AMR in pathogenic bacteria from animals, referred to as RESAPATH, and coordinated by the French Agency for Food, Environmental and Occupational Health and Safety (ANSES). RESAPATH was created in 1982 to monitor AMR in cattle. Since 2000 it has expanded to include swine and poultry and since 2007 all animal species including pets, horses and exotic animals. RESAPATH collects data from antimicrobial susceptibility testing (more than 40,000 in 2015) performed by French veterinary laboratories (74 members in 2015 of almost 100 in the country) that joined the surveillance network voluntarily. Initially, the antibiograms are requested by veterinarians in a pathological context for diagnostic purposes.

Laboratories participating in RESAPATH use standard bacteriological culture and methods for bacterial isolation and identification (Singhal, Kumar, Kanaujia, & Virdi, 2015). Antimicrobial susceptibility testing (antibiograms) are performed by the disc diffusion method, according to the veterinary section of the Antibiogram Committee of the French Society of Microbiology (CA-SFM). Inhibition zone diameters are transmitted to ANSES and compiled in a database. In accordance with the approved breakpoints from the veterinary section of the CA-SFM, isolates are then categorized as susceptible (S), intermediate (I) or resistant (R). The RESAPATH laboratories have participated in annual ring trials since 2006, which contribute to the quality control of the data.

From the RESAPATH database, we extracted data concerning *E. coli* isolates from cattle, swine and poultry from 2002 to 2015. Variables extracted included species, date of the sampling and susceptibility categories (S, I or R) to each tested antimicrobial agent.

We also selected six antibiotics of relevance for *E. coli* in veterinary and human medicine, including the following: amoxicillin as a representative of penicillins, ceftiofur as a representative of third-generation cephalosporins (3GC), enrofloxacin as a representative of fluoroquinolones, spectinomycin or streptomycin (depending on the animal species) as a representative of aminoglycosides, trimethoprim-sulfamethoxazole as a representative of potentiated sulphonamides and tetracycline.

2.2 | Data analysis

From an epidemiological point of view, the event of particular interest is the non-susceptibility of the pathogen to a particular antibiotic, indicating that it is no longer a wild-type strain. Therefore, intermediate isolates were grouped together with resistant isolates in the non-susceptible population, referred to as resistant in this study. The indicator of AMR was defined for each animal species and antibiotic as the ratio between the monthly number of resistant *E. coli* strains and the total monthly number of *E. coli* strains tested. The trend is defined as the long-term variation and is one of the components of a time-series along with seasonality and noise (i.e., the residuals component). The trend reflects the structural dynamic and was used to monitor long-term movement (Bourbonnais & Terraza, 2010). Evidence of seasonality was sought using graphic analyses (autocorrelation function, partial autocorrelation function).

There are several methods available for analysing time-series data and their temporal trends. Before running models on the whole period, we explored three classical methods to identify the one that produced the best fitting of *E. coli* resistance patterns from 2005 to 2013. At first, we fitted temporal behaviour by (i) Box-Jenkins autoregressive integrated moving average (ARIMA) analyses to separate trends, seasonality and stochastic processes (López-Lozano et al., 2000), (ii) exponential weighted moving average models (simple exponential smoothing and Holt models) (Zhang, Zhang, Young, & Li, 2014) and (iii) generalized additive models (GAM) (Dominici, McDermott, Zeger, & Samet, 2002) to capture trends and seasonality. We compared these methods using two quantitative indicators: root mean square error and mean absolute error, as recommended by the literature (Chai & Draxler, 2014; Zhang et al., 2014). According to quantitative indicators, even when models had similar outputs, GAM had the highest accuracy over the predictive period (2005 to 2013) and was the best choice for modelling the resistance (Fig. S1).

GAM extends traditional generalized linear models by replacing the linear predictor with unspecified non-parametric functions, allowing more flexibility than parametric methods. Using count data, the monthly number of resistant *E. coli* strains was modelled with a Poisson regression with an offset equal to the log of the total number of strains submitted monthly. Considering variations in husbandry methods across food-producing animals, AMR trends were modelled for each species and analysed using a separate and independent GAM for each antimicrobial agent. The models presented in this paper included non-parametric smooth functions of calendar time. Susceptibility status to an antibiotic (sensible versus resistant) was used as the dichotomous outcome variable in these models. More specifically, let y_t be the monthly resistant strain count, let x_{1t} be the monthly calendar time and x_{2t} the month of the year. We fitted the following log-linear models:

$$y_t \sim \text{Poisson}(\mu_t)$$

$$\log(\mu_t) = \alpha + s_1(x_{1t}, \lambda_1) + s_2(x_{2t}, \lambda_2) + a_t$$

where $s_1(x_{1t}, \lambda_1)$ and $s_2(x_{2t}, \lambda_2)$ were smooth functions of calendar time designed to control for trend and seasonality, with degrees of freedom λ_1 and λ_2, s_1 was a cubic spline and s_2 a cyclic spline; and a_t denoted the residuals component, which potentially included autocorrelation terms taken into account in the covariance matrix. The coefficients were estimated by penalized likelihood maximization following a penalized iteratively re-weighted least squares method, based on a backfitting algorithm. Smoothing parameters were estimated using cross-validation (Wood, 2008). The adequacy of the models for the series was verified using white noise tests (Box–Ljung test, Skewness–Kurtosis and Shapiro test with $p > .05$) to check whether the residuals were independent and normally distributed.

Significance was defined as $p \leq .05$. Confidence intervals (CI) of the predictions were calculated using the exact binomial method (p-values were two-sided). R (R Core Team, 2016), version 3.2.3 (2015-12-10) was used for all data manipulations and statistical analyses (gamm4 package for GAM implementation).

3 | RESULTS

In total, 92,867 antibiograms collected by the RESAPATH between January 1, 2002, and December 31, 2015 and including at least one of the six selected antibiotics were analysed. Among these, 48% (44,841) were from cattle, 22% (20,072) from swine and 30% (27,954) from poultry. The number of antibiograms available by antimicrobial agent is presented in Table 1. AMR signals were particularly noisy, as illustrated for ceftiofur in *E. coli* isolates from cattle (Figure 1). Based on graphical analyses, no seasonal cycle was observed and the seasonal component in the model was significant for neither cattle, poultry nor swine. Time-series analyses showed that trend curves of resistances were almost linear and decreased for cattle and swine (Figures 2 and 4—in the interest of clarity, CIs are not given in Figure 2–4). For poultry, however, resistance trends were subject to large fluctuations over the period: for almost all antibiotics, we observed a peak of resistance around 2009 and 2010, followed by a sharp decrease (Figure 3), and from 2014 onwards, levels of resistance to the six antibiotics considered were below 50%.

For poultry and swine, tetracycline resistance levels were highest. In addition, regardless of the animal species, resistance declined over the period. For swine (Figure 4), tetracycline resistance steadily declined from 88% [83.4; 92.2] in 2002 to 69% [65.1; 73.0] in 2015. The decrease was considerable for poultry (Figure 3), as resistance proportion dropped down from 84% [80.6; 86.8] at the start of 2009 to 43% [40.6; 45.9] at the end of 2015. For poultry, amoxicillin resistance followed the tetracycline trend at a lower rate, from 59% [55.8; 61.2] in 2009 to 38% [35.5; 40.3] at the end of 2015. For cattle (Figure 2), amoxicillin and tetracycline resistance trends were similar. For swine, the amoxicillin trend was fairly stable, with a slight increase from 2002 to 2009, and a slight decrease afterwards.

Escherichia coli resistance trends to the studied aminoglycosides varied between species. Even though resistance to streptomycin decreased in cattle, the levels of resistance remained high over the period, starting at 82% [82.3; 85.5] in 2002 and ending at 75% [74.7; 77.0] at the end of 2015. However, levels of resistance to streptomycin were lower in other animal species, especially in poultry (around 16%).

TABLE 1 Proportion of resistance of *Escherichia coli* isolated from diseased animals, by species, between 2002 and 2015 (non-susceptible isolates grouping resistant and intermediate isolates)

Antimicrobial class	Antimicrobial agent	Species	Number of non-susceptible isolates (percentage)	Total number of isolates
Penicillins	Amoxicillin	Cattle	27,583 (75.7%)	36,456
		Swine	11,347 (58.3%)	19,470
		Poultry	12,035 (43.2%)	27,831
Cephalosporins	Ceftiofur	Cattle	2,359 (5.3%)	44,841
		Swine	635 (3.2%)	20,072
		Poultry	2,157 (8.5%)	25,350
Aminoglycosides	Streptomycin Spectinomycin	Cattle	22,765 (77.6%)	29,324
		Swine	6,628 (42.6%)	15,569
		Poultry	1,675 (17.2%)	9,713
Fluoroquinolones	Enrofloxacin	Cattle	10,625 (25.0%)	42,493
		Swine	2,289(11.8%)	19,471
		Poultry	2,271 (8.1%)	27,954
Tetracyclines	Tetracycline	Cattle	31,694 (73.2%)	43,292
		Swine	13,277 (80.2%)	16,558
		Poultry	14,631 (62.6%)	23,386
Potentiated sulfonamides	Trimethoprim-sulfamethoxazole	Cattle	15,366 (35.1%)	43,751
		Swine	12,542 (63.0%)	19,893
		Poultry	7,112 (25.5%)	27,943

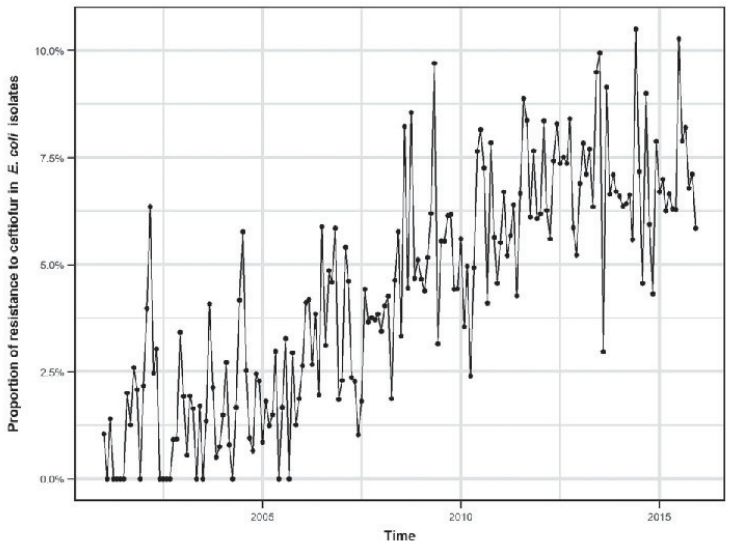


FIGURE 1 Temporal evolution of the raw signal of antimicrobial resistance to ceftiofur in *Escherichia coli* isolates from diseased cattle during the period 2002-2015, on a monthly time step

In contrast to cattle and poultry, *E. coli* resistance to trimethoprim-sulfamethoxazole remained above 50% in swine from 2002 to 2015.

Escherichia coli resistance levels to last-generation antimicrobial agents stayed low over the period. Resistances to fluoroquinolones were systematically higher for cattle than for poultry or swine. Fluoroquinolone resistance decreased after 2010, regardless of the animal species. Resistance of *E. coli* to broad-spectrum cephalosporins emerged in 2004 for swine and in 2006 for poultry. A peak of 22% [20.5; 24.0] of resistance was observed in 2010 for poultry, but the trends dropped rapidly after that.

4 | DISCUSSION

The aim of our study was to investigate the changes in AMR over time for *E. coli* isolated from diseased food-producing animals on farms in the context of the RESAPATH network. Using GAM models, we succeeded in revealing the changes in AMR over a fourteen-year period (2002-2015). The use of time-series analyses at a monthly step enabled us to determine the structure of the phenomenon: the seasonal component was not meaningful but the trend showed significant variations. Overall, the rate of susceptibility to six main antibiotics

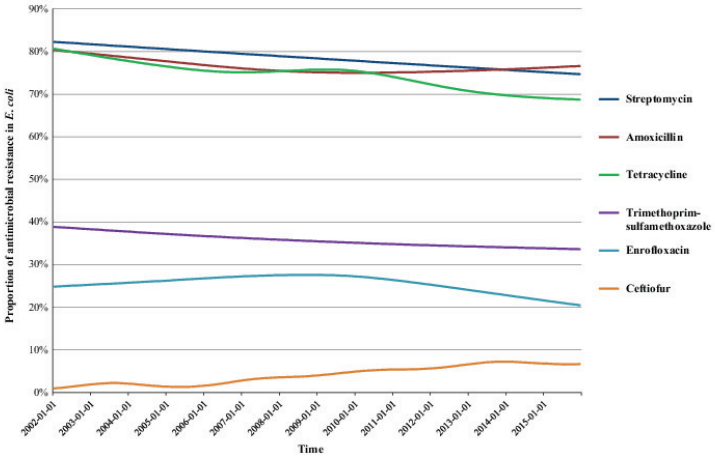


FIGURE 2 Trends of antimicrobial resistance in *Escherichia coli* isolates from diseased cattle during the period 2002-2015, on a monthly time step

showed striking changes over the fourteen years, with notable differences between the three main animal species (cattle, swine and poultry). The analyses revealed that *E. coli* isolated from diseased farm animals presented high resistance to tetracycline and amoxicillin. Regardless of the animal species, the lowest levels of resistance were observed for enrofloxacin and ceftiofur, which is nevertheless concerning because these antibiotics are last-generation antimicrobial agents.

Few studies have so far investigated resistance trends in bacterial isolates from animals, and these mostly in poultry and companion animals (Chen et al., 2014; Cohn, Gary, Fales, & Madsen, 2003; Normand, Gibson, Reid, Carmichael, & Taylor, 2000). These studies mostly used chi-square tests to analyse the data. Econometric methods such as time-series analysis offer one approach for understanding the epidemiology of AMR. With generalized additive models, we were able to more accurately describe the trends and changes. Similar methods have been used in human medicine (Doernberg, Dudas, & Trivedi, 2015; López-Lozano et al., 2000; Mühlemann, Uehlinger, Büchi, Gorgievski, & Aebi, 2006), but our study is the first to analyse such a large number of samples, even for a retrospective study.

A particular strength of our study was the availability of an ongoing nationwide surveillance system for AMR in animal health: the RESAPATH network. However, with respect to the data, this study had several limitations linked to the data set. The main limitation is the potential selection bias, as laboratories join the RESAPATH on a voluntary basis and antibiograms rely on the decision taken by veterinarians during their healthcare activity. Hence, bacterial isolations and antibiograms are not systematically performed; for instance, we assume that a history of clinical disease could prompt sample submission by veterinarians. Moreover, it was not possible to distinguish first and subsequent sample submissions and we simply assumed that multiple sampling from the same animal did not occur frequently. Furthermore, aminoglycoside was not frequently tested for in poultry (spectinomycin), unlike in other species: a selection bias could be suspected because this antibiotic is rarely used therapeutically. Overall, these biases could lead to a lack of representativity if they varied over time. Our data analysis therefore probably gave an imperfect picture of disease-associated *E. coli* resistance trends. However, the use of routinely collected data from laboratories minimized the risks of such information bias. We can also consider RESAPATH to be an effective and pragmatic network enabling large-scale analysis of AMR in animal health, in comparison with the methodological or financial difficulties of obtaining higher-quality data.

We used independent and separate models for each animal species because animal husbandry practices vary considerably across the different food sectors. However, differences also exist for a given animal species, such as, for instance, veterinary usages in sows compared to fattening pigs. Thus, the studied population might very well encompass a great diversity of environmental variables, and comparisons between animal species should be made carefully. The proportions of samples from previously untreated compared to treated animals are also unknown and could potentially impact differently the results of resistance (i.e., through the selective antimicrobial pressure). Nevertheless, this study succeeded in providing an overview of changing resistance trends. To our knowledge, this is also the first paper exploring AMR trends in farm animals over such a long period of time and based on such a large data set, compared with previous findings (Chen et al., 2014; Hanon et al., 2015). Moreover, this study is the first to investigate antibiotic resistance with its temporal component in France.

No seasonal cycle was found in the time-series. In comparison with other studies in animal health on this topic, only Williams et al. described annual variations in rates of ampicillin-resistant *E. coli* in sympatric wild rodents, potentially linked to diets and reproductive cycles (Williams et al., 2011). Trend analysis in farm animals was studied in Belgium through a prospective study from 2011 to 2014 (Hanon et al., 2015), focused on commensal *E. coli* isolated from faecal samples from four livestock categories including veal calves, beef, chicken and pigs.

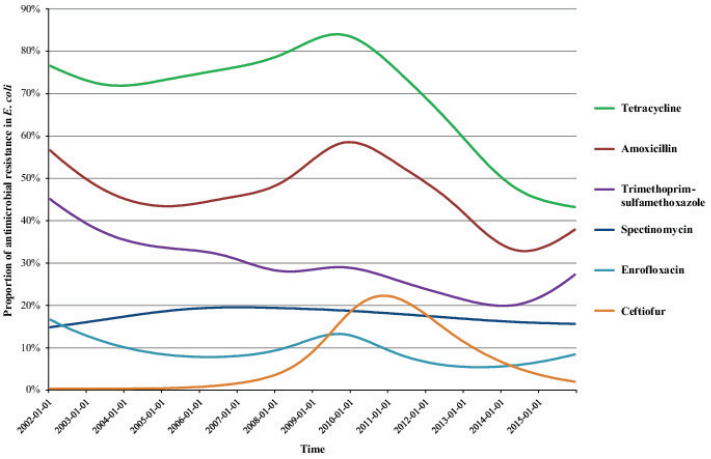


FIGURE 3 Trends of antimicrobial resistance in *Escherichia coli* isolates from diseased poultry during the period 2002-2015, on a monthly time step

Although this latter study showed similar decreasing temporal trends to those presented here, the validity of a cross-study comparison is limited by the differences in the bacterial population studied (commensal versus disease-associated *E. coli*), the number of antibiograms performed and the methodology used.

In this study, regardless of the animal species, high levels of resistance to amoxicillin and tetracycline were detected continuously over the period. Such high proportions of resistance have been observed previously both in pathogenic and non-pathogenic isolates of *E. coli* in the European Union (Garcia-Migura, Hendriksen, Fraile, & Aarestrup, 2014; Hanon et al., 2015) and all over the world (Chen et al., 2014; Cummings, Aprea, & Altier, 2015; Tadesse et al., 2012). In veterinary practice, these antibiotics have been commonly used for decades to treat bacterial infections (EMA and ESVAC, 2016). The long history of their use in animal health could explain their high levels of resistance in comparison with the latest generations of antimicrobial agents. From 2002 to 2015, resistances to aminoglycosides were particularly high in cattle, compared with the levels detected in poultry and swine. These antimicrobial agents are known to be commonly used to treat cattle diseases such as mastitis and to potentiate the activity of penicillins and cephalosporins. But their use to cure swine and poultry infections remains limited(Anses-ANMV, 2016), underpinning the relationship between resistance and antimicrobial consumption.

Fluoroquinolones and 3GC have been classified of highest priority for human medicine. According to the World Health Organization, those molecules were considered as critically important antimicrobial agents (Collignon, Powers, Chiller, Aidara-Kane, & Aarestrup, 2009; WHO, 2017) for two main reasons: (i) they are one of few alternatives for treating serious human diseases and (ii) they are used to

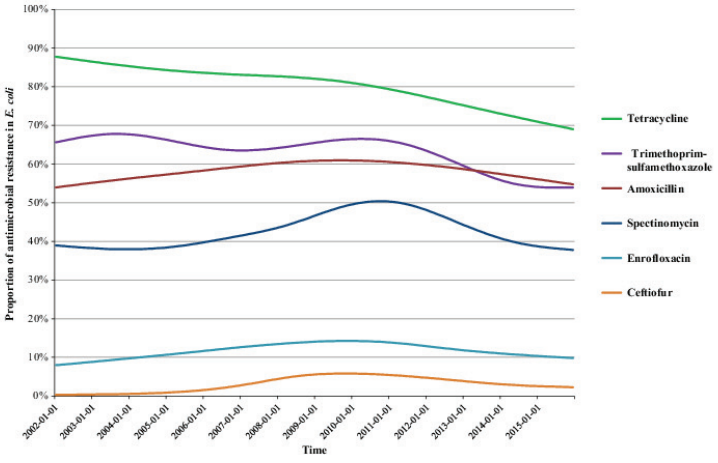


FIGURE 4 Trends of antimicrobial resistance in *Escherichia coli* isolates from diseased swine during the period 2002-2015, on a monthly time step

treat diseases resulting from the transmission of organisms from non-human sources or organisms that may acquire resistance genes from non-human sources (Wendlandt et al., 2015). This study notably showed the emergence of 3GC resistance of *E. coli* in swine in 2004 and in poultry in 2006. Although the levels of resistance to fluoroquinolones and 3CG remained low in comparison with those observed for other generation antimicrobial agents, as reported in other countries (Chen et al., 2014; Hanon et al., 2015; Tadesse et al., 2012), their resistance levels are already particularly concerning because these agents constitute a last resort therapy for several human diseases. This further underscores the importance of monitoring resistance to these antimicrobials (for both pathogenic and commensal bacteria) and setting up appropriate policies in countries where the use of these antimicrobials is not limited (Viale, Giannella, Bartoletti, Tedeschi, & Lewis, 2015).

The main purpose of RESAPATH is to monitor the dynamics of resistances in bacteria isolated from diseased animals, and the pre-existing set-up partially met this objective. Our study contributed to an improvement in the analyses and interpretation of the data collected by RESAPATH, through the identification of time-series methods routinely applicable to this setting. Further work using similar methods might be applied to describe antimicrobial resistance trends for other pathogenic bacteria in food-producing and domestic animals.

Antibiotic resistance determinants had been circulating before the production and use of antibiotics (D'Costa et al., 2011). But as the selective pressure exerted by antimicrobial agents is surely a driving force behind AMR emergence and the spread of drug resistance among pathogenic bacteria, trends in AMR provide indications about the relationship between antimicrobial use and the emergence of resistance (Bell, Schellevis, Stobberingh, Goossens, & Pringle, 2014). It is also possible to compare resistance trends with those in sales of antibiotics (López-Lozano et al., 2000). Indeed, the consumption of antimicrobial agents has declined since 2007 in cattle, swine and poultry (Anses-ANMV, 2016), which may well have contributed to the global decrease in AMR observed in this study over the last few years.

In addition, we could consider resistance trends in parallel with the regulatory frameworks and growing social awareness of AMR. The time frame of this study allowed an assessment of the impacts of national usage policies and antibiotics stewardship strategies (Lawes et al., 2015). Since 2010, efforts have been made in the swine, cattle and poultry sectors to decrease and improve the use of antibiotics. At the same time, recommendations have been provided by French Directorate for Food for farmers and veterinarians to promote the responsible use of antimicrobials, with the objective of achieving a substantial reduction in their consumption by 2016 (−25% compared to 2011). Although the current impact of these elements has not been formally assessed, one can assume it has contributed to the decrease in AMR observed in this study. Further work is required to correlate the observed decreasing trends of AMR with the consumption trends of antimicrobials and control measures implemented over the period.

5 | CONCLUSION

In conclusion, this study adds important new information on AMR trends in farm animals in France and lays the groundwork for understanding the evolution of resistance. Our results emphasize the necessity to conduct further surveillance and monitoring studies to estimate the proportion of AMR in *E. coli* in farm animals. This study has been made possible thanks to the data collected by an established national surveillance network for antimicrobial resistance, the RESAPATH. The results highlighted the importance of setting national surveillance networks able to monitor resistance to a panel of antibiotics in farm animals on a monthly basis to rapidly detect variations over time. A knowledge of AMR trends makes possible the judicious use of antimicrobial agents in animals, which is required to counteract the AMR phenomenon. Ultimately, to estimate the magnitude of the potential public health threat, and also to guide and support the development of antimicrobial usage policies in veterinary medicine, there is a clear need for such widespread monitoring of resistance to antimicrobials.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank all the voluntary laboratories, which collected and transmitted antibiogram' results over several years. The authors are particularly grateful to Christelle Philippon, RESAPATH's secretary, for her meticulous follow-up of laboratories and careful data collection.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no potential conflict of interests with respect to the research, authorship and/or publication of this article.

DATA AVAILABILITY

The data used for this study was obtained from the RESAPATH network. Conditions of approval (respecting the anonymity of farms and laboratories) do not allow us to distribute or make available data directly to other parties.

AUTHORS' CONTRIBUTIONS

All the authors read and approved the final manuscript.

ORCID

É. Gay http://orcid.org/0000-0001-5983-9263

REFERENCES

Aarestrup, F. M., Wegener, H. C., & Collignon, P. (2008). Resistance in bacteria of the food chain: Epidemiology and control strategies. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, *6*(5), 733–750.

Anses-ANMV. (2016). *Sales survey of veterinary medicinal products containing antimicrobials in France in 2015* (Annual report) (p. 105). Anses. Retreived from [https://www.anses.fr/en/system/files/ANMV-Ra-Antibiotiques2015EN.pdf]

von Baum, H., & Marre, R. (2005). Antimicrobial resistance of *Escherichia coli* and therapeutic implications. *International Journal of Medical Microbiology: IJMM*, *295*(6–7), 503–511.

Bell, B. G., Schellevis, F., Stobberingh, E., Goossens, H., & Pringle, M. (2014). A systematic review and meta-analysis of the effects of antibiotic consumption on antibiotic resistance. *BMC Infectious Diseases*, *14*, 13. https://doi.org/10.1186/1471-2334-14-13

Botrel, M.-A., Haenni, M., Morignat, E., Sulpice, P., Madec, J.-Y., & Calavas, D. (2010). Distribution and antimicrobial resistance of clinical and subclinical mastitis pathogens in dairy cows in Rhône-Alpes France. *Foodborne Pathogens and Disease*, *7*(5), 479–487.

Bourbonnais, R., & Terraza, M. (2010). *Analyse des séries temporelles (3e édition)*. Paris: Dunod.

Chai, T., & Draxler, R. R. (2014). Root mean square error (RMSE) or mean absolute error (MAE)? Arguments against avoiding RMSE in the literature Geosci. *Geoscientific Model Development*, *7*, 1247–1250.

Chen, X., Zhang, W., Yin, J., Zhang, N., Geng, S., Zhou, X., … Jiao, X. (2014). *Escherichia coli* isolates from sick chickens in China: Changes in antimicrobial resistance between 1993 and 2013. *Veterinary Journal (London, England: 1997)*, *202*, (1), 112–115.

Cohn, L. A., Gary, A. T., Fales, W. H., & Madsen, R. W. (2003). Trends in fluoroquinolone resistance of bacteria isolated from canine urinary tracts. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation: Official Publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc*, *15*, (4), 338–343.

Collignon, P., Powers, J. H., Chiller, T. M., Aidara-Kane, A., & Aarestrup, F. M. (2009). World Health Organization ranking of antimicrobials according to their importance in human medicine: A critical step for developing risk management strategies for the use of antimicrobials in food production animals. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, *49*(1), 132–141.

Cummings, K. J., Aprea, V. A., & Altier, C.. (2015). Antimicrobial resistance trends among canine *Escherichia coli* isolates obtained from clinical samples in the northeastern USA, 2004-2011. *The Canadian Veterinary Journal. La Revue Vétérinaire Canadienne*, *56*(4), 393-398.

D'Costa, V. M., King, C. E., Kalan, L., Morar, M., Sung, W. W. L., Schwarz, C., … Wright, G. D. (2011). Antibiotic resistance is ancient. *Nature*, *477*(7365), 457–461.

De Graef, E. M., Decostere, A., Devriese, L. A., & Haesebrouck, F. (2004). Antibiotic resistance among fecal indicator bacteria from healthy individually owned and kennel dogs. *Microbial Drug Resistance (Larchmont, N.Y.)*, *10*, (1), 65–69.

DebRoy, C., & Maddox, C. W. (2001). Identification of virulence attributes of gastrointestinal *Escherichia coli* isolates of veterinary significance. *Animal Health Research Reviews*, *2*(2), 129–140.

Dho-Moulin, M., & Fairbrother, J. M. (1999). Avian pathogenic Escherichia coli (APEC). *Veterinary Research*, *30*(2–3), 299–316.

Doernberg, S. B., Dudas, V., & Trivedi, K. K. (2015). Implementation of an antimicrobial stewardship program targeting residents with urinary tract infections in three community long-term care facilities: A quasi-experimental study using time-series analysis. *Antimicrobial Resistance and Infection Control*, *4*, https://doi.org/10.1186/s13756-015-0095-y

Dominici, F., McDermott, A., Zeger, S. L., & Samet, J. M. (2002). On the use of generalized additive models in time-series studies of air pollution and health. *American Journal of Epidemiology*, *156*(3), 193–203.

EMA, & ESVAC. (2016). *Sales of veterinary antimicrobial agents in 29 European countries in 2014. Trends from 2011 to 2014* (Sixth ESVAC Report) (p. 176).

Garcia-Migura, L., Hendriksen, R. S., Fraile, L., & Aarestrup, F. M. (2014). Antimicrobial resistance of zoonotic and commensal bacteria in Europe: The missing link between consumption and resistance in veterinary medicine. *Veterinary Microbiology*, *170*(1–2), 1–9.

Geenen, P. L., Graat, E. A. M., Haenen, A., Hengeveld, P. D., Van Hoek, A. H. A. M., Huijsdens, X. W., … Van De Giessen, A. W. (2013). Prevalence of livestock-associated MRSA on Dutch broiler farms and in people living and/or working on these farms. *Epidemiology and Infection*, *141*(5), 1099-1108.

Hanon, J.-B., Jaspers, S., Butaye, P., Wattiau, P., Méroc, E., Aerts, M., … Van der Stede, Y. (2015). A trend analysis of antimicrobial resistance in commensal *Escherichia coli* from several livestock species in Belgium (2011-2014). *Preventive Veterinary Medicine*, *122*(4), 443–452.

Karam, G., Chastre, J., Wilcox, M. H., & Vincent, J.-L. (2016). Antibiotic strategies in the era of multidrug resistance. *Critical Care (London, England)*, *20*(1), 136.

Lawes, T., López-Lozano, J.-M., Nebot, C., Macartney, G., Subbarao-Sharma, R., Dare, C. R. J., … Gould, I. M. (2015). Turning the tide or riding the waves? Impacts of antibiotic stewardship and infection control on MRSA strain dynamics in a Scottish region over 16 years: Non-linear time series analysis. *British Medical Journal Open*, *5*(3), e006596.

López-Lozano, J. M., Monnet, D. L., Yagüe, A., Burgos, A., Gonzalo, N., Campillos, P., & Saez, M. (2000). Modelling and forecasting antimicrobial resistance and its dynamic relationship to antimicrobial use: A time series analysis. *International Journal of Antimicrobial Agents*, *14*(1), 21–31.

Mühlemann, K., Uehlinger, D. E., Büchi, W., Gorgievski, M., & Aebi, C. (2006). The prevalence of penicillin-non-susceptible *Streptococcus pneumoniae* among children aged < 5 years correlates with the biannual epidemic activity of respiratory syncytial virus. *Clinical Microbiology and Infection: The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, *12*(9), 873–879.

Normand, E. H., Gibson, N. R., Reid, S. W., Carmichael, S., & Taylor, D. J. (2000). Antimicrobial-resistance trends in bacterial isolates from companion-animal community practice in the UK. *Preventive Veterinary Medicine*, *46*(4), 267–278.

R Core Team. (2016). *R: A language and environment for statistical computing*. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing. Retrieved fromhttps://www.R-project.org/.

Singhal, N., Kumar, M., Kanaujia, P. K., & Virdi, J. S. (2015). MALDI-TOF mass spectrometry: An emerging technology for microbial identification and diagnosis. *Frontiers in Microbiology*, *6*, 1–19.

Tadesse, D. A., Zhao, S., Tong, E., Ayers, S., Singh, A., Bartholomew, M. J., & McDermott, P. F. (2012). Antimicrobial drug resistance in *Escherichia coli* from humans and food animals, United States, 1950-2002. *Emerging Infectious Diseases*, *18*(5), 741–749.

Tenover, F. C.. (2006). Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. *American Journal of Infection Control*, *34*(5 Suppl 1), S3–S10. discussion S64-73. https://doi.org/10.1016/j.ajic.2006.05.219

Viale, P., Giannella, M., Bartoletti, M., Tedeschi, S., & Lewis, R. (2015). Considerations About Antimicrobial Stewardship in Settings with Epidemic Extended-Spectrum β-Lactamase-Producing or Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae. *Infectious Diseases and Therapy*, *4*(Suppl 1), 65–83.

Wendlandt, S., Shen, J., Kadlec, K., Wang, Y., Li, B., Zhang, W.-J., … Schwarz, S. (2015). Multidrug resistance genes in staphylococci from animals that confer resistance to critically and highly important antimicrobial agents in human medicine. *Trends in Microbiology*, *23*(1), 44–54.

WHO (2014). *Antimicrobial resistance : Global report on surveillance* (p. 256). Geneva, Switzerland: World Health Organisation.

WHO. (2017). *Critically important antimicrobials for human medicine 5th revison* (p. 41).Geneva: World Health Organization.

Williams, N. J., Sherlock, C., Jones, T. R., Clough, H. E., Telfer, S. E., Begon, M., … Bennett, M. (2011). The prevalence of antimicrobial-resistant *Escherichia coli* in sympatric wild rodents varies by season and host. *Journal of Applied Microbiology*, *110*(4), 962–970.

Wood, S. N. (2008). Fast stable direct fitting and smoothness selection for generalized additive models. *Journal of the Royal Statistical Society: Series B (Statistical Methodology)*, *70*(3), 495–518.

Woolhouse, M., Ward, M., van Bunnik, B., & Farrar, J. (2015). Antimicrobial resistance in humans, livestock and the wider environment. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, *370*(1670), 20140083.

Zhang, X., Zhang, T., Young, A. A., & Li, X. (2014). Applications and comparisons of four time series models in epidemiological surveillance data. *PLoS ONE*, *9*(2), e88075.

SUPPORTING INFORMATION

Additional Supporting Information may be found online in the supporting information tab for this article.

How to cite this article: Boireau C, Morignat É, Cazeau G, et al. Antimicrobial resistance trends in *Escherichia coli* isolated from diseased food-producing animals in France: A 14-year period time-series study. *Zoonoses Public Health*. 2018;65:e86–e94. https://doi.org/10.1111/zph.12412

Annexe 3 : Deuxième article – Antimicrobial resistance in bacteria isolated from mastitis in dairy cattle in France, 2006-2016

Used by permission of the American Dairy Science Association

J. Dairy Sci. 101:9451–9462
https://doi.org/10.3168/jds.2018-14835
© American Dairy Science Association®, 2018.

Antimicrobial resistance in bacteria isolated from mastitis in dairy cattle in France, 2006–2016

Clémence Boireau,*†‡ Géraldine Cazeau,† Nathalie Jarrige,† Didier Calavas,† Jean-Yves Madec,§ Agnès Leblond,‡ Marisa Haenni,§ and Émilie Gay†[1]
*École Nationale des Services Vétérinaires (ENSV), Vetagro Sup, Marcy l'Étoile, 69280, France
†French Agency for Food, Environmental and Occupational Health and Safety (ANSES), Laboratoire de Lyon, Unité Épidémiologie, Université de Lyon, 31 avenue Tony Garnier, 69007 Lyon, France
‡Epidémiologie des maladies animales et zoonotiques, UMR 0346, INRA, Vetagro Sup, University of Lyon, F-69280, Marcy L'Etoile, France
§ANSES, Laboratoire de Lyon, Unité Antibiorésistance et Virulence Bactériennes, Université de Lyon, 31 avenue Tony Garnier, 69007 Lyon, France

ABSTRACT

In dairy cattle, mastitis is the most frequent bacterial disease, and the routine use of antibiotics for treatment and prevention can drive antimicrobial resistance (AMR). The aim of our study was to estimate the levels of AMR of the 3 main bacteria isolated from dairy cattle with mastitis in France (*Streptococcus uberis*, *Escherichia coli*, and coagulase-positive staphylococci) and to investigate their changes over time. Data collected between 2006 and 2016 by the French surveillance network for AMR in pathogenic bacteria of animal origin (called RESAPATH) were analyzed. The proportions of mono- and multidrug resistance were calculated and the trends were investigated using nonlinear analyses applied to time series. Over the whole period, the lowest proportions of resistance in *S. uberis* isolates were observed for oxacillin (2.2%) and gentamicin (2.4%) and most resistance levels were below 20%. The trends in resistance showed some significant variation, mainly for *S. uberis*, but without a common pattern across the various antibiotics examined. For only 2 combinations of bacteria-antibiotic the trend in resistance showed a continuous increase from 2006 to 2016: tetracycline resistance in *S. uberis* isolates and third-generation cephalosporin resistance in *E. coli* isolates. In *E. coli*, the highest proportions of resistance were observed for amoxicillin (28.1%) and tetracycline (23.1%). Resistance to third-generation cephalosporins in *E. coli* from dairy cattle was almost nil in 2006, but reached 2.4% in December 2016. This increase is particularly concerning because these antibiotics constitute one of the latest therapeutic alternatives to fight severe infectious diseases in humans. Except for penicillin (33.9%), the proportions of resistance in coagulase-positive staphylococci were below 11% during the whole study period. Multidrug resistance (isolates with acquired resistance to at least one antibiotic in 3 or more antibiotic classes) ranged from 2.4% for coagulase-positive staphylococci to 9.9% for *S. uberis*. These findings can serve as guidelines for practitioners in the choice of the most appropriate antibiotic according to the prevailing epidemiological context. Ultimately, our results contribute to risk assessment of AMR and provide a baseline for setting up and evaluating control measures and designing strategies to limit AMR.
Key words: antimicrobial resistance, mastitis, time series, dairy cattle, RESAPATH

INTRODUCTION

Mastitis, the inflammation of the mammary gland, is the most frequent bacterial infection encountered in dairy cattle and is associated with reduced milk production and changes in milk composition. Dairy cattle mastitis is mainly caused by bacteria, and antibiotics are an important component of their treatment and control. In France (Guérin-Faublée et al., 2003; Botrel et al., 2010), as well as in other European, American, and African countries, *Streptococcus uberis*, *Escherichia coli*, and coagulase-positive staphylococci (**CPS**) are the most frequent causative pathogens of clinical mastitis (Tenhagen et al., 2006; Bradley et al., 2007; Ericsson Unnerstad et al., 2009; Kateete et al., 2013). For subclinical mastitis, *E. coli* appear to be less prevalent than CPS, CNS, and streptococci (Botrel et al., 2010; Persson et al., 2011). These 4 bacteria are of real concern for public health: they can be a reservoir for antimicrobial resistance (**AMR**) genes and can play a role in the spread of genes to other pathogenic and

Received April 5, 2018.
Accepted June 24, 2018.
[1]Corresponding author: emilie.gay@anses.fr

commensal bacteria in the farm environment (Aarestrup, 2015).

Because the use of antibiotics can lead to resistance (Aarestrup, 2015), AMR occurrence must be carefully monitored to guide prudent prescription (Thomas et al., 2015). Hundreds of publications describe the proportion of AMR in bovine mastitis pathogens in the last decades (Barlow, 2011), highlighting differences in AMR proportions between areas and populations (Erskine et al., 2002; Makovec and Ruegg, 2003; Pitkälä et al., 2004; Osterås et al., 2006; Tenhagen et al., 2006; Botrel et al., 2010; Idriss et al., 2014). But most studies are based on specific selected animal populations and represent point-in-time estimates of AMR in specific geographic regions: they do not provide an overall picture of the situation. In addition, AMR in cow mastitis has never been studied in Europe over a long (at least 4 yr) and continuous period of time to detect emergence and characterize AMR trends. However, the estimation of resistance levels and trends in udder pathogens is crucial to guide the appropriate prescription of antibiotics and thus preserve the therapeutic arsenal ensuring the long-term efficacy of antibiotics.

The aim of our study was to estimate the AMR levels in the 3 most frequent causative agents of mastitis in dairy cattle among those collected by the French national surveillance network for AMR, and to describe their variations from 2006 and 2016.

MATERIALS AND METHODS

Source of Data

This retrospective study was performed using data from the French established national surveillance network for AMR in pathogenic bacteria of animal origin, called **RESAPATH**. This network was created in 1982 and monitors AMR in all animal species. It is coordinated by the French Agency for Food, Environmental and Occupational Health and Safety (**ANSES**). RESAPATH collects antibiogram results from participating French veterinary laboratories (74 members in 2016 out of 112 in the country). These antibiograms are requested by veterinarians confronted with a clinical case of the pathology for diagnostic and treatment purposes.

The RESAPATH laboratories use standard bacteriological cultures and methods for bacterial isolation and identification. Even if each laboratory has its own strategy of bacterial identification, the biggest ones use mass spectrometers (Singhal et al., 2015). Antibiograms are performed using the disk diffusion method, according to recommendations of the Antibiogram Committee of the French Society of Microbiology (**CA-SFM**). Inhibition zone diameters are communicated to ANSES and compiled in a database. In accordance with the breakpoints recommended by the veterinary section of the CA-SFM (2017), isolates are then categorized as susceptible, susceptible, or resistant. The RESAPATH laboratories have participated in annual quality assurance proficiency tests since 2006, which contributes to the quality control of the data.

From the RESAPATH database, we extracted data involving the 3 most frequent bacteria isolated from dairy cattle mastitis from 2006 to 2016, namely *S. uberis*, *E. coli*, and CPS. For CPS isolates, the information sent by several laboratories did not allow us to strictly distinguish between species so we chose to perform analysis on the category CPS. Variables extracted included bacterial species, sampling date, and susceptibility categories (susceptible, susceptible, or resistant) to each tested antibiotic. For the 3 bacteria considered, we selected antibiotics of relevance in veterinary and human medicine (Table 1).

Data Analysis

From an epidemiological point of view, the event of interest is the nonsusceptibility of the pathogen to the antibiotic tested, indicating that the isolated bacteria is no longer a wild-type strain. Therefore, intermediate isolates were grouped together with resistant isolates in the nonsusceptible bacterial population, referred to as resistant in this study. The indicator of AMR was defined for each bacteria and antibiotic as the proportion of the number of resistant isolates relative to the total number of isolates tested.

In a time series analysis, trends reflect structural dynamics and the detection of trends was used to monitor long-term movement, particularly in AMR (López-Lozano et al., 2000; Mühlemann et al., 2006; Doernberg et al., 2015; Boireau et al., 2018b). A trend is defined as the long-term variation along with seasonality and noise (i.e., the residual components). To compare our results with previous studies, we used generalized additive models (**GAM**; Dominici et al., 2002) to capture trends and seasonality. The time step was chosen according to the number of data available such that there were at least 25 antibiograms in each time step (Barlow, 2011) and to ensure the validity of the model (independent and normally distributed residuals); we used a bimonthly (every 2 mo) time step. Using count data, the bimonthly number of resistant isolates was modeled using a quasi-Poisson regression with an offset equal to the log of the total number of isolates submitted during the same period. The AMR trends were modeled for each bacterial species and ana-

Table 1. Selected antibiotics and the corresponding antibiotic classes

Bacterial species	Antibiotic class	Antibiotic
Streptococcus uberis	Penicillins	Oxacillin
	Aminoglycosides	Gentamicin
	Fluoroquinolones	Enrofloxacin
	Tetracyclines	Tetracycline
	Folate pathway inhibitors	Trimethoprim-sulfamethoxazole
	Macrolides	Erythromycin
	Lincosamides	Lincomycin
Escherichia coli	Penicillins	Amoxicillin
	Cephalosporins	Ceftiofur
	Aminoglycosides	Gentamicin
	Fluoroquinolones	Enrofloxacin
	Tetracyclines	Tetracycline
	Folate pathway inhibitors	Trimethoprim-sulfamethoxazole
Coagulase-positive staphylococci	Penicillins	Penicillin G
	Cephalosporins	Cefoxitin
	Aminoglycosides	Gentamicin
	Fluoroquinolones	Marbofloxacin
	Tetracyclines	Tetracycline
	Folate pathway inhibitors	Trimethoprim-sulfamethoxazole
	Macrolides	Erythromycin
	Lincosamides	Lincomycin

lyzed using a separate and independent GAM for each antibiotic. The models presented in this paper included nonparametric smooth functions of calendar time selected by cross-validation and designed to control for trend and seasonality (Wood, 2008). The GAM models were structured and analysis performed as described in Boireau et al. (2018b). Smoothing parameters were estimated using cross-validation. The adequacy of the models for the series was verified using white noise tests (Box-Ljung test, skewness-kurtosis, and Shapiro test) to check whether the residuals were independent and normally distributed. A P-value of ≤ 0.05 was considered statistically significant. If trend variations were not significant, the trend was stationary. R (R Core Team, 2017, R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria), version 3.4.0. (2017–04–21), was used for all statistical analyses (gamm4 package for GAM implementation) and graphic illustrations.

Multidrug resistance analysis was carried out according to the definition proposed by Magiorakos et al. (2012). Isolates with acquired resistance to at least one antibiotic in 3 or more antibiotic classes (from those selected) were considered as multidrug resistant. The proportions of multi-susceptible isolates (susceptible to all classes of antibiotics selected for analysis), resistant to 1 or 2 antibiotic classes, multidrug-resistant, and resistant to all classes of antibiotics were calculated. Confidence intervals were calculated using the exact binomial method (2-sided P-values). These analyses were performed using 6 antibiotic classes for *E. coli*, 7 for *S. uberis*, and 8 classes for CPS (Table 1). Isolates with missing inhibition diameters to the aforementioned antibiotic classes were excluded.

RESULTS

A total of 27,888 antibiograms met the selection criteria (linked with mastitis in dairy cattle due to 1 of the 3 most frequent bacterial species isolated and including at least one of the selected antibiotics) in the RESAPATH database between January 1, 2006, and December 31, 2016. Among these, 49.7% of antibiograms involved *S. uberis*, 25.4% *E. coli*, and 24.9% CPS.

Resistance Levels over the Whole Period

Over the period, resistance levels varied between bacteria and antibiotics (Table 2). Resistance levels for *S. uberis* were low for oxacillin (2.2%) and gentamicin (2.4%), and attained 9.3% for trimethoprim-sulfamethoxazole (**SXT**), whereas resistance levels to tetracycline (18.1%), lincomycin (19.1%), and erythromycin (20.0%) were around 20%, and resistance to enrofloxacin reached 32.9%. For *E. coli* and CPS isolates, levels of resistance to cephalosporins were low (1.4 and 7.9%, respectively), but higher to penicillins (28.1 and 33.9%, respectively). In contrast to *S. uberis*, the resistance levels to fluoroquinolones was close to zero for CPS (0.7%) and low for *E. coli* (2.6%). Resistance levels to SXT and gentamicin were below 10% for the 3 bacterial species studied (Table 2). In contrast, resistance to tetracycline differed between the 3 pathogens: low for

Table 2. Proportion of resistance [%, (95% CI)] of mastitis pathogens in dairy cattle in France over the 2006–2016 study period

Bacterial species (total no. of isolates)	Antibiotic[1]												
	AMX	OXA	PEN	FOX	CEF	MAR	ENR	SXT	TET	GEN	ERY	LIN
Streptococcus uberis (13,862)												
No. of resistant isolates	—	226	—	—	—	—	3,638	1,158	2,151	279	2,413	2,338
Total no. of isolates	—	10,323	—	—	—	—	11,070	12,434	11,895	11,840	12,052	12,268
Proportion of resistant	—	2.2 (1.9; 2.5)	—	—	—	—	32.9 (32.0; 33.7)	9.3 (8.8; 9.8)	18.1 (17.4; 18.8)	2.4 (2.1; 2.6)	20.0 (19.3; 20.7)	19.1 (18.4; 19.8)
Escherichia coli (7,072)												
No. of resistant isolates	1,689	—	—	—	77	—	158	560	1,484	138	—	—
Total no. of isolates	5,995	—	—	—	5,521	—	5,993	6,524	6,416	6,956	—	—
Proportion of resistant	28.1 (27.0; 29.3)	—	—	—	1.4 (1.1; 1.7)	—	2.6 (2.2; 3.1)	8.6 (7.9; 9.3)	23.1 (22.1; 24.2)	2.0 (1.7; 2.3)	—	—
Coagulase-positive staphylococci (6,954)												
No. of resistant isolates	—	—	2,301	429	—	43	—	73	426	103	354	265
Total no. of isolates	—	—	6,796	5,433	—	6,084	—	5,501	6,620	6,546	5,576	5,986
Proportion of resistant	—	—	33.9 (32.7; 35.0)	7.9 (7.2; 8.6)	—	0.7 (0.5; 1.0)	—	1.3 (1.0; 1.7)	6.4 (5.9; 7.1)	1.6 (1.3; 1.9)	6.3 (5.7; 7.0)	4.4 (3.9; 5.0)

[1]Antibiotics: AMX = amoxicillin; OXA = oxacillin; PEN = penicillin G; FOX = cefoxitin; CEF = ceftiofur; MAR = marbofloxacin; ENR = enrofloxacin; SXT = trimethoprim-sulfamethoxazole; TET = tetracycline; GEN = gentamicin; ERY = erythromycin; LIN = lincomycin.

CPS (6.4%), but around 20% for *S. uberis* (18.1%) and for *E. coli* (23.1%).

Antimicrobial Resistance Trends

Based on graphical analyses, no seasonal cycle was observed and the seasonal component of the models was not significant for any of the pathogens studied (Supplemental Table S1; https://doi.org/10.3168/jds.2018-14835).

For *S. uberis*, significant ($P < 0.05$ for all trends) increasing AMR trends were demonstrated for all antibiotics during the second half of the study period (Figure 1). Resistance to tetracycline showed a linear increase from 15.7% (14.2; 17.2) in January 2006 to 20.4% (18.7; 22.1) in December 2016. In contrast, the trends were nonlinear for the other antibiotics tested. The proportion of resistance to oxacillin remained under 5% over the period: it declined slightly from 2006 to 2010 and then rapidly increased from 0.7% (0.4; 1.0) in May 2010 up to 4.5% (3.1; 5.9) in July 2014, and decreased again in 2015 and 2016. The proportion of resistance to gentamicin was always low: it decreased from 3.7% (1.9; 5.5) in January 2006 to 1.5% (1.1; 1.9) in January 2012 and then increased up to 3.4% (2.0; 4.7) in December 2016. The proportion of resistance to lincomycin declined in the first half of the study period and then increased up to 22.4% (20.2; 24.7) in July 2015, before stabilizing. The proportion of resistance to SXT was stable around 6% from 2006 to 2012, increasing in January 2012 and reaching 16.0% (11.0; 21.0) in December 2016. Although the resistance to erythromycin was not stationary, the proportion of resistance varied little over the period. Finally, resistance to enrofloxacin slightly declined during the first half of the study period and then increased up to 41.8% (36.4; 47.2) in July 2015, before decreasing again.

For *E. coli*, resistance trends to amoxicillin, enrofloxacin, SXT, and gentamicin were stationary from 2006 to 2016. In contrast, resistance to ceftiofur increased from 0.4% (0.0; 0.7) in January 2006 to 2.4% (1.5; 3.4) in December 2016 (Figure 2). Resistance to tetracycline showed large fluctuations over the study period, increasing from 19.5% (11.9; 27.2) in January 2006 up to a peak at 42.4% (37.0; 47.8) in July 2009, before dropping to 15.7% (13.2; 18.2) in May 2012. Afterward, it rose slightly reaching 20.6% (16.1; 25.0) in December 2016.

For CPS, resistance trends to marbofloxacin, tetracycline, erythromycin, and gentamicin were stationary from 2006 to 2016. In contrast, the resistance trend to SXT was linear, decreasing from 2.1% (1.2; 3.1) in January 2006 to 0.8% (0.4; 1.2) in December 2016 (Fig-

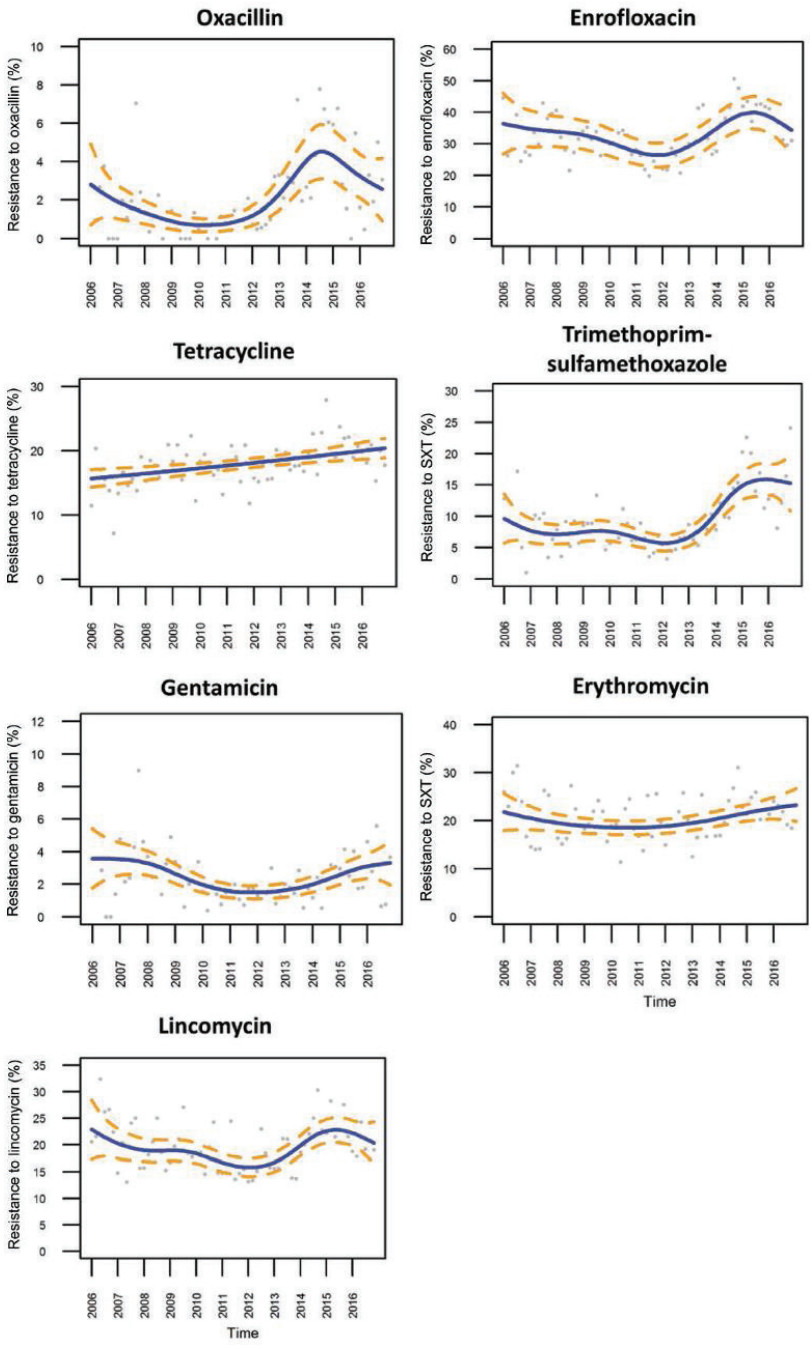


Figure 1. Trends (and 95% CI; dashed lines) of antimicrobial resistance for *Streptococcus uberis* isolates from dairy cattle mastitis cases during the 2006–2016 period (bimonthly time step). Color version available online.

ure 3). Similarly, the resistance trend to lincomycin was linear, decreasing from 5.8% (4.8; 6.8) in January 2006 to 3.5% (2.9; 4.0) in December 2016. The resistance to penicillin was primarily stable and then resistance proportions also decreased, from 39.1% (36.6; 41.7) in September 2008 to 23.4% (19.9; 26.9) in December 2016. Finally, the proportion of resistance to cefoxitin dropped from 27.6% (13.4; 41.9) in January 2006 to

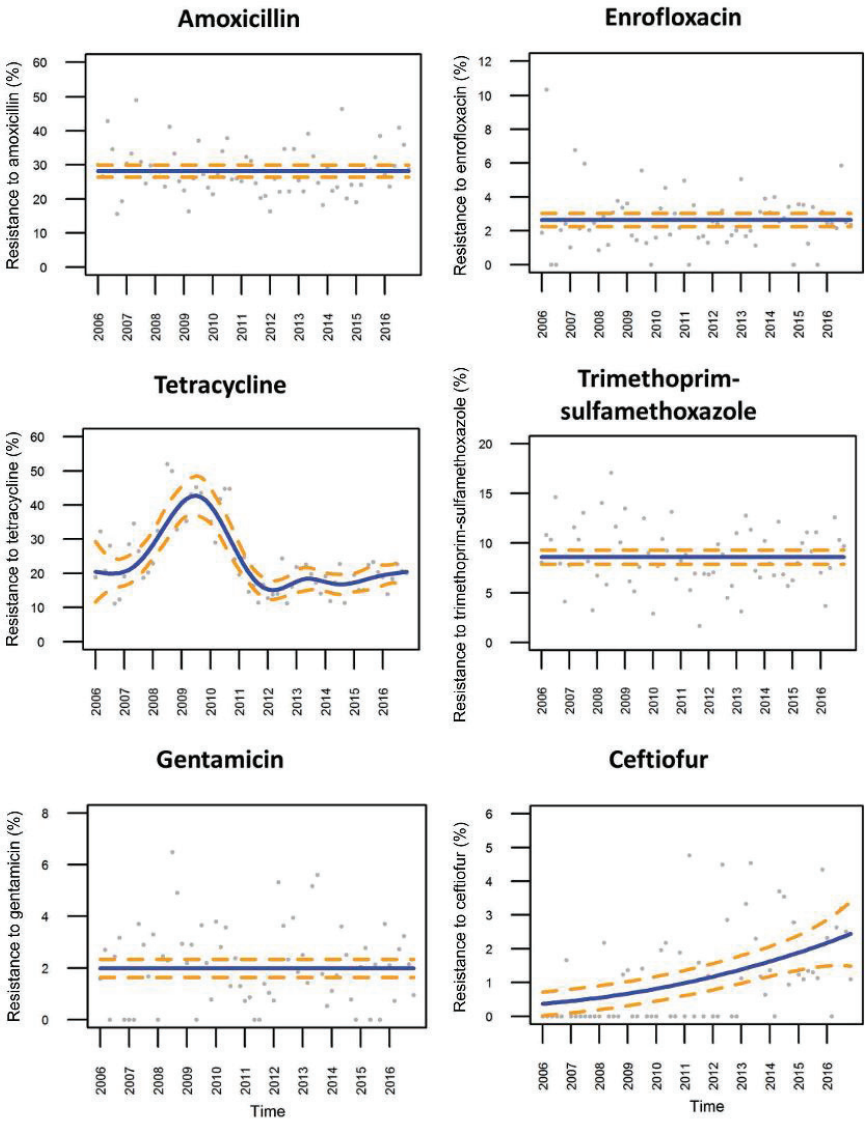


Figure 2. Trends (and 95% CI; dashed lines) of antimicrobial resistance for *Escherichia coli* isolates from dairy cattle mastitis cases during the 2006–2016 period (bimonthly time step). Color version available online.

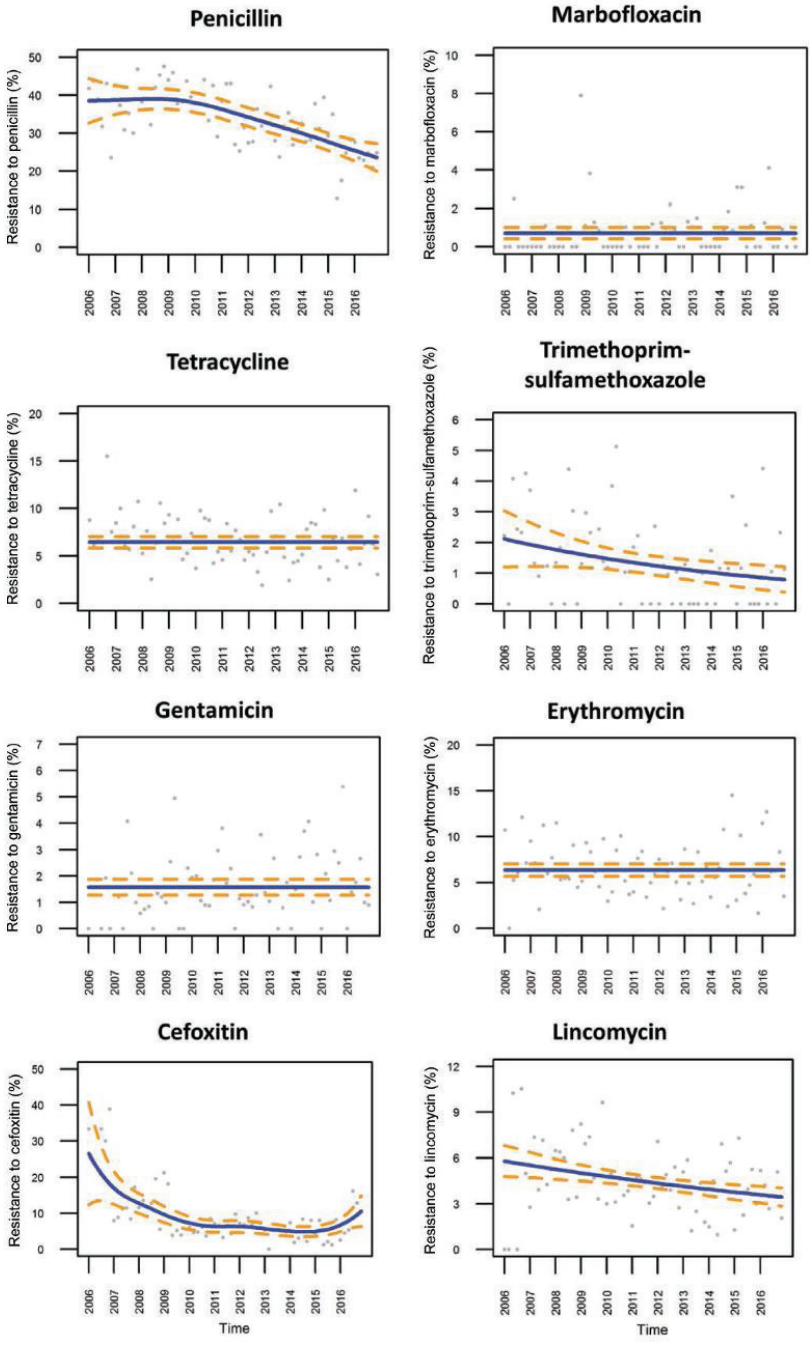


Figure 3. Trends (and 95% CI; dashed lines) of antimicrobial resistance for coagulase-positive staphylococci isolates from dairy cattle mastitis cases during the 2006–2016 period (bimonthly time step). Color version available online.

4.7% (3.4; 6.1) in September 2014 and then increased up to 10.3% (5.8; 14.8) in December 2016.

Multidrug Resistance

The analysis included 13,436 isolates for which complete records on resistance to the aforementioned antibiotic classes were available (5,867 for *S. uberis*, 3,760 for *E. coli*, and 3,809 for CPS). For the 3 bacterial species studied, more than half of the isolates were susceptible to all classes of antibiotics considered (Table 3). Multidrug resistance proportions reached 3.6% for CPS, 7.6% for *E. coli*, and 14.5% for *S. uberis*. Only a few isolates were resistant to all classes considered.

DISCUSSION

Antimicrobial Resistance in Bacteria Involved in Mastitis

Here, we estimated the AMR of the 3 main bacteria isolated from mastitis cases in dairy cattle in France and its changes over time. To the best of our knowledge, this is the first study describing the resistance trends of udder pathogens using nonlinear time series analysis, even though the picture may be imperfect, considering the potential selection biases. Indeed, bacterial isolations and antibiograms are not systematically performed, relying on the decision taken by veterinarians during their clinical activity. Overall, these biases may lead to a lack of representativeness. However, providing that these biases do not vary over time, the resistance trends are meaningful. These findings also highlight the importance of considering both the level of resistance and any temporal variation to characterize the AMR and estimate its potential threat. Besides, a study regarding the RESAPATH network in 2015 concluded that the geographical coverage of the RESAPATH was broadly consistent with the geographical distribution of the estimated animal populations over the territory (Boireau et al., 2018a).

Antimicrobial resistance may vary between clinical and subclinical mastitis. *Escherichia coli* is an environmental pathogen strongly associated with severe clinical mastitis. However, for *S. uberis* and CPS, we could not distinguish between clinical and subclinical mastitis in this study, even if we assume that the vast majority of bacteria were isolated from clinical mastitis, because a history of clinical illness generally prompts sample submission by veterinarians. This assumption was also supported by the concordance between the distribution of pathogens collected in our study and the distribution of pathogens isolated from clinical mastitis in France in an earlier study (Botrel et al., 2010). In this study, we were also not able to distinguish between CPS species, because not all participating laboratories transferred the same detailed information concerning species identification for CPS. We know that among 6,954 CPS isolates at least 4,900 were *Staph. aureus* and we assume that the vast majority of the other isolates were *Staph. aureus* also as it was previously described in the literature (Bengtsson et al., 2009; Botrel et al., 2010). Considering the literature and that *Staph. aureus* was always distantly the first species isolated by laboratories transferring the full species identification, we also assume that if a change in species had occurred over the period, it had minimal effect on the results of this study, even if their accuracy might be affected.

Compared with monoresistance analyses, the multidrug resistance estimates were performed on a limited number of isolates, especially for *S. uberis*, because many records on resistance to the selected antibiotics were incomplete, due to nonsystematic testing across antibiotic panels for a given bacteria at veterinary

Table 3. Proportions [%, (95% CI)] of isolates that were multi-susceptible, resistant to 1 or 2 antibiotic classes, multidrug-resistant, and resistant to all classes of antibiotics selected for analysis over the 2006–2016 period

Bacterial species (total number of isolates)	Susceptibility patterns of isolates	No. of isolates	Proportion (95% CI)
Streptococcus uberis (5,867)	Multi-susceptible	3,105	52.9 (51.6; 54.2)
	Resistant to 1 or 2 antibiotic classes	1,911	32.6 (31.4; 33.8)
	Multidrug-resistant	851	14.5 (13.6; 15.4)
	Resistant to all classes of antibiotics selected	28	0.5 (0.3; 0.7)
Escherichia coli (3,760)	Multi-susceptible	2,580	68.6 (67.1; 70.1)
	Resistant to 1 or 2 antibiotic classes	896	23.8 (22.5; 25.2)
	Multidrug-resistant	284	7.6 (6.7; 8.4)
	Resistant to all classes of antibiotics selected	6	0.2 (0.1; 0.3)
Coagulase-positive staphylococci (3,809)	Multi-susceptible	2,362	62.0 (60.4; 63.6)
	Resistant to 1 or 2 antibiotic classes	1,311	34.4 (32.9; 36.0)
	Multidrug-resistant	136	3.6 (3.0; 4.2)
	Resistant to all classes of antibiotics selected	3	0.1 (0.0; 0.2)

laboratories. Nevertheless, our study showed that resistance levels varied greatly among antibiotic classes. Unfortunately, the limited number of isolates prevented modeling the proportions of multidrug resistance over time. From a surveillance point of view, there is clearly a need to harmonize practices between laboratories at the national level to help improve the surveillance of AMR in France.

To properly compare results of AMR between studies, various elements need to be considered: the sample selection and size, the design of isolate collection, the bacterial population studied, the time and place of the study, the methods of susceptibility testing performed, the breakpoints and references used, and the analyses carried out. Meeting all these criteria make data comparison difficult.

The resistance proportions in streptococci isolated from mastitis have rarely been assessed in the literature due to the lack of available breakpoints (Tenhagen et al., 2006; Persson et al., 2011). For *S. uberis*, the highest level of resistance was observed for enrofloxacin (32.9%) in our study. However, we very likely overestimated the resistance to fluoroquinolones in streptococci isolates because we grouped intermediate and resistant isolates. Due to their intrinsic resistance to quinolones, streptococci isolates may appear phenotypically intermediate using the disk diffusion method, despite the lack of any acquired resistance. We observed that resistance to oxacillin was low for *S. uberis* from 2006 to 2016 (2.2%), whereas a previous French study conducted in 2007 and 2008 in a single French region reported a much higher level of resistance (12.6%; Botrel et al., 2010). This difference is most likely due to the change in breakpoint recommendations for this bacteria-antibiotic combination in 2010. In this same study, the authors reported lower levels of resistance to tetracycline (7.2%) than ours (18.1%); this may also be due to differences in breakpoints used and a heterogeneous spatial distribution of AMR in mastitis, potentially linked to a heterogeneous spatial distribution of practices and farm management. Recently, a European study performed on 282 *S. uberis* isolates from dairy cattle with clinical mastitis found results similar to ours for erythromycin resistance (20.0%), but they identified higher resistance to tetracycline (28.7% using the CLSI breakpoint; Thomas et al., 2015).

For *E. coli.*, the resistance to tetracycline (23.1%) over the whole study period was similar to results obtained in the Netherlands, Switzerland, and Belgium (Hendriksen et al., 2008; Supré et al., 2014). In comparison with a previous French study (Botrel et al., 2010; data from 2007 to 2008), we systematically observed higher resistance levels for amoxicillin (28.1 vs. 9.7%), tetracycline (23.1 vs. 10.4%), and gentamicin resistance (2.0 vs. 0.7%). As mentioned above, these differences may be due to the spatial sampling, suggesting potential difference in antibiotics use or practices between French regions. Previous studies based on the disk diffusion method have observed very low or nil resistance to ceftiofur in European countries and France (Hendriksen et al., 2008; Bengtsson et al., 2009; Botrel et al., 2010; Idriss et al., 2014; Thomas et al., 2015). Our findings especially showed an increase in resistance to third-generation cephalosporins (**3GC**) in *E. coli* collected from dairy cattle. Even if the amplitude is limited, this rise is particularly worrying because 3GC have been classified as critically important antibiotics (Collignon et al., 2009). In comparison with other animal production sectors, a previous study reported that after reaching high levels of resistance, trends in 3GC resistance have been declining in poultry and swine production since 2010 and in 2015 their proportions of resistance were below 10% (Boireau et al., 2018b). Resistance dynamics are clearly different between animal species and pathologies. In cattle (across all pathology and livestock production sectors), Boireau et al. (2018b) similarly reported low but increasing resistance from 2002 to 2014, with a stabilizing trend since 2014. Here, in contrast, our results showed that 3GC resistance in dairy cattle with mastitis has been continuously increasing. The dynamics of 3GC resistance observed in the present study underscores the importance of focusing studies on specific production sectors or particular pathologies (or both) to fine-tune the characterization of AMR and detect changes.

The proportions of resistance for CPS isolates in the present study are consistent with previous French results (Botrel et al., 2010; data from 2007 to 2008), except for higher resistance to penicillin (33.9 vs. 14.1%). However, more recent studies indicate similar levels of resistance in France (37.5%; Thomas et al., 2015). Changes over time may explain these differences between studies; our results confirmed that penicillin resistance varied from 2006 to 2016, but this variation cannot be the only explanation for the discrepancies between estimates. Although most resistance trends in CPS were stationary, resistance to penicillin, SXT and cefoxitin (marker for methicillin resistance) varied over the period. We can speculate that the observed changes in proportion of resistance might be related to a shift in *Staph. aureus* strains over the period (Sakwinska et al., 2011). Due to a lack of species identification for CPS and a lack of further genetic investigations (for example, *mecA*-specific detection by PCR), we may

have overestimated the actual proportion of methicillin-resistant *Staph. aureus* (**MRSA**). Nevertheless, even if this is an overestimate of the real proportion of MRSA, we can consider that the bias is constant over time, providing for a meaningful trend. The proportion of phenotypically MRSA decreased rapidly in the first half of the period, but increased from 4.7 to 10.3% in the recent years, which is cause for concern.

Consequences for Antimicrobial Therapy

According to antibiotics sales records, penicillins, cephalosporins (first and second generations), aminoglycosides, polymyxins, and tetracyclines are the antibiotic classes the most frequently used for intramammary infusion in France (ANSES-ANMV, 2016). Moreover, the sales of last-generation cephalosporins for intramammary infusion increased by 20.3% between 2007 and 2011 and then decreased by 79.5% between 2013 and 2016, due to new regulations restraining their use in veterinary medicine and the increasing awareness of professionals (ANSES-ANMV, 2017). Considering the trend for 3GC resistance, we can suppose that the use of last-generation cephalosporins likely have selected for resistant bacteria, leading to *E. coli* mastitis more frequently caused by 3GC-resistant isolates, that 3GC-resistant *E. coli* isolates are more frequent in the environment, or both.

Among the 29 intramammary infusions available in France in 2017, 15 contained penicillins, 8 contained aminoglycosides, 6 contained first-generation cephalosporins, and 2 contained last-generation cephalosporins (one with cefoperazone and another with cefquinome). Our findings characterized AMR to all antibiotic classes available on the French market, except polymyxins and ansamycins. The latter class is not routinely tested by veterinary laboratories and we could not investigate its resistance. We were not able to analyze AMR to polymyxins because the disk diffusion method used by the RESAPATH laboratories cannot clearly discriminate susceptible and resistant isolates due to poor diffusion of polypeptide antibiotics in agar (Humphries, 2015).

Our findings can assist French veterinarians in their selection of the most appropriate antimicrobial agent for initial empirical therapy. They can also supplement therapeutic guidelines (SNGTV, 2014), which steer the therapeutic strategy in a given clinical and epidemiological context. Thus our results are part of comprehensive strategy to fight AMR (CGAAER, 2016). However, the control of mastitis cannot be reduced to antimicrobial susceptibility testing and prudent antibiotic use. Mastitis control and prevention is first based on (1) the identification of the mechanisms of infection, with the definition of the clinical and subclinical states of the disease, (2) the discovery of appropriate screening tests, (3) the determination of likely points of exposure, and (4) the identification of pathogen-specific characteristics, such as AMR (Ruegg, 2017). Most of all, proper biosecurity, improved hygiene (postmilking teat dipping, hygienic milking procedures), and minimizing exposure to antibiotics may be important factors to reduce the burden of resistant bacteria on dairy farms.

CONCLUSIONS

This study provides a consistent source of data on AMR levels and trends of mastitis pathogens in French dairy cattle. Using time-series analyses, we detected trends in this complex and multifactorial phenomenon from 2006 to 2016. Despite resistance variations during the study period, we showed that for the vast majority of combinations of bacteria-antibiotic considered, antimicrobial resistance has not globally increased in mastitis pathogens from 2006 to 2016. The usefulness of monitoring programs such as RESAPATH to guide therapeutic practices, design control strategies, and detect emergence is substantial: there is clearly a need to set up national surveillance networks that can monitor AMR of pathogens isolated in dairy cattle and more generally in food-producing animals and pets. Overall, our results contribute to assessing the risk of AMR and provide an objective baseline to test the efficacy of AMR control measures. Ultimately, the knowledge of AMR trends in mastitis pathogens promotes the responsible use of antibiotics, which is required to curb AMR.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank all the RESAPATH laboratories that have been collecting and transmitting antibiogram results for several years. The authors are particularly grateful to Christelle Philippon (RESAPATH secretary) for her meticulous follow-up of laboratories and careful data collection and Jean-Luc Vinard (RESAPATH data architect) for his careful management of the database. This work was partly supported by the French Ministry of Agriculture (http://agriculture.gouv.fr). No additional external funding was received for this study. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript. The authors declare no potential conflicts of interest with respect to the research, authorship, or publication of this article. The data used for this study was obtained from the RESAPATH network. Conditions of approval (respecting the anonymity of farms

and laboratories) do not allow us to distribute or make data available directly to other parties. All the authors read and approved the final manuscript.

REFERENCES

Aarestrup, F. M. 2015. The livestock reservoir for antimicrobial resistance: A personal view on changing patterns of risks, effects of interventions and the way forward. Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci. 370:20140085. https://doi.org/10.1098/rstb.2014.0085.

ANSES-ANMV. 2016. Suivi des ventes de médicaments vétérinaires contenant des antibiotiques en France en 2015. ANSES, Lyon, France.

ANSES-ANMV. 2017. Suivi des ventes de médicaments vétérinaires contenant des antibiotiques en France en 2016. ANSES, Lyon, France.

Barlow, J. 2011. Mastitis therapy and antimicrobial susceptibility: A multispecies review with a focus on antibiotic treatment of mastitis in dairy cattle. J. Mammary Gland Biol. Neoplasia 16:383–407. https://doi.org/10.1007/s10911-011-9235-z.

Bengtsson, B., H. E. Unnerstad, T. Ekman, K. Artursson, M. Nilsson-Ost, and K. P. Waller. 2009. Antimicrobial susceptibility of udder pathogens from cases of acute clinical mastitis in dairy cows. Vet. Microbiol. 136:142–149. https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2008.10.024.

Boireau, C., N. Jarrige, G. Cazeau, É. Jouy, M. Haenni, C. Philippon, D. Calavas, J.-Y. Madec, A. Leblond, and E. Gay. 2018a. Représentativité et couverture du résapath, le réseau d'épidémiosurveillance de l'antibiorésistance des bactéries pathogènes animales. Bull. Épidémiologique Santé Anim. Aliment. 80:10–14.

Boireau, C., É. Morignat, G. Cazeau, N. Jarrige, É. Jouy, M. Haenni, J.-Y. Madec, A. Leblond, and É. Gay. 2018b. Antimicrobial resistance trends in *Escherichia coli* isolated from diseased food-producing animals in France: A 14-year period time-series study. Zoonoses Public Health 65:e86–e94. https://doi.org/10.1111/zph.12412.

Botrel, M.-A., M. Haenni, E. Morignat, P. Sulpice, J.-Y. Madec, and D. Calavas. 2010. Distribution and antimicrobial resistance of clinical and subclinical mastitis pathogens in dairy cows in Rhône-Alpes, France. Foodborne Pathog. Dis. 7:479–487. https://doi.org/10.1089/fpd.2009.0425.

Bradley, A. J., K. A. Leach, J. E. Breen, L. E. Green, and M. J. Green. 2007. Survey of the incidence and aetiology of mastitis on dairy farms in England and Wales. Vet. Rec. 160:253–257.

CA-SFM. 2017. Recommandations 2017 du comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie, Groupe de Travail Antibiogramme Vétérinaire.

CGAAER. 2016. Le plan écoantibio 2012–2016: Evaluation, Recommandations pour le plan suivant. Conseil général de l'alimentation de l'agriculture et des espaces ruraux (CGAAER). MAAF, Paris, France.

Collignon, P., J. H. Powers, T. M. Chiller, A. Aidara-Kane, and F. M. Aarestrup. 2009. World Health Organization ranking of antimicrobials according to their importance in human medicine: A critical step for developing risk management strategies for the use of antimicrobials in food production animals. Clin. Infect. Dis. 49:132–141. https://doi.org/10.1086/599374.

Doernberg, S. B., V. Dudas, and K. K. Trivedi. 2015. Implementation of an antimicrobial stewardship program targeting residents with urinary tract infections in three community long-term care facilities: A quasi-experimental study using time-series analysis. Antimicrob. Resist. Infect. Control 4:54. https://doi.org/10.1186/s13756-015-0095-y.

Dominici, F., A. McDermott, S. L. Zeger, and J. M. Samet. 2002. On the use of generalized additive models in time-series studies of air pollution and health. Am. J. Epidemiol. 156:193–203.

Ericsson Unnerstad, H., A. Lindberg, K. Persson Waller, T. Ekman, K. Artursson, M. Nilsson-Ost, and B. Bengtsson. 2009. Microbial aetiology of acute clinical mastitis and agent-specific risk factors. Vet. Microbiol. 137:90–97. https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2008.12.005.

Erskine, R. J., R. D. Walker, C. A. Bolin, P. C. Bartlett, and D. G. White. 2002. Trends in antibacterial susceptibility of mastitis pathogens during a seven-year period. J. Dairy Sci. 85:1111–1118. https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(02)74172-6.

Guérin-Faublée, V., G. Carret, and P. Houffschmitt. 2003. In vitro activity of 10 antimicrobial agents against bacteria isolated from cows with clinical mastitis. Vet. Rec. 152:466–471.

Hendriksen, R. S., D. J. Mevius, A. Schroeter, C. Teale, D. Meunier, P. Butaye, A. Franco, A. Utinane, A. Amado, M. Moreno, C. Greko, K. Stärk, C. Berghold, A.-L. Myllyniemi, D. Wasyl, M. Sunde, and F. M. Aarestrup. 2008. Prevalence of antimicrobial resistance among bacterial pathogens isolated from cattle in different European countries: 2002–2004. Acta Vet. Scand. 50:28. https://doi.org/10.1186/1751-0147-50-28.

Humphries, R. M. 2015. Susceptibility testing of the polymyxins: Where are we now? Pharmacotherapy 35:22–27. https://doi.org/10.1002/phar.1505.

Idriss, S. E., V. Foltys, V. Tancin, K. Kirchnerova, D. Tancinova, and K. Zaujec. 2014. Mastitis pathogens and their resistance against antimicrobial agents in dairy cows in Nitra, Slovakia. Slovak J. Anim. Sci. 47:33–38.

Kateete, D. P., U. Kabugo, H. Baluku, L. Nyakarahuka, S. Kyobe, M. Okee, C. F. Najjuka, and M. L. Joloba. 2013. Prevalence and antimicrobial susceptibility patterns of bacteria from milkmen and cows with clinical mastitis in and around Kampala, Uganda. PLoS One 8:e63413. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0063413.

López-Lozano, J. M., D. L. Monnet, A. Yagüe, A. Burgos, N. Gonzalo, P. Campillos, and M. Saez. 2000. Modelling and forecasting antimicrobial resistance and its dynamic relationship to antimicrobial use: A time series analysis. Int. J. Antimicrob. Agents 14:21–31.

Magiorakos, A.-P., A. Srinivasan, R. B. Carey, Y. Carmeli, M. E. Falagas, C. G. Giske, S. Harbarth, J. F. Hindler, G. Kahlmeter, B. Olsson-Liljequist, D. L. Paterson, L. B. Rice, J. Stelling, M. J. Struelens, A. Vatopoulos, J. T. Weber, and D. L. Monnet. 2012. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: An international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. Clin. Microbiol. Infect. 18:268–281. https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x.

Makovec, J. A., and P. L. Ruegg. 2003. Antimicrobial resistance of bacteria isolated from dairy cow milk samples submitted for bacterial culture: 8,905 samples (1994–2001). J. Am. Vet. Med. Assoc. 222:1582–1589.

Mühlemann, K., D. E. Uehlinger, W. Büchi, M. Gorgievski, and C. Aebi. 2006. The prevalence of penicillin-non-susceptible *Streptococcus pneumoniae* among children aged < 5 years correlates with the biannual epidemic activity of respiratory syncytial virus. Clin. Microbiol. Infect. 12:873–879. https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2006.1472_1.x.

Osterås, O., L. Sølverød, and O. Reksen. 2006. Milk culture results in a large Norwegian survey–Effects of season, parity, days in milk, resistance, and clustering. J. Dairy Sci. 89:1010–1023. https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(06)72167-1.

Persson, Y., A.-K. J. Nyman, and U. Grönlund-Andersson. 2011. Etiology and antimicrobial susceptibility of udder pathogens from cases of subclinical mastitis in dairy cows in Sweden. Acta Vet. Scand. 53:36. https://doi.org/10.1186/1751-0147-53-36.

Pitkälä, A., M. Haveri, S. Pyörälä, V. Myllys, and T. Honkanen-Buzalski. 2004. Bovine mastitis in Finland 2001–Prevalence, distribution of bacteria, and antimicrobial resistance. J. Dairy Sci. 87:2433–2441. https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(04)73366-4.

Ruegg, P. L. 2017. A 100-Year Review: Mastitis detection, management, and prevention. J. Dairy Sci. 100:10381–10397. https://doi.org/10.3168/jds.2017-13023.

Sakwinska, O., M. Giddey, M. Moreillon, D. Morisset, A. Waldvogel, and P. Moreillon. 2011. *Staphylococcus aureus* host range and human-bovine host shift. Appl. Environ. Microbiol. 77:5908–5915. https://doi.org/10.1128/AEM.00238-11.

Singhal, N., M. Kumar, P. K. Kanaujia, and J. S. Virdi. 2015. MALDI-TOF mass spectrometry: An emerging technology for microbial identification and diagnosis. Front. Microbiol. 6:791. https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00791.

SNGTV. 2014. Recommandations de bonnes pratiques d'utilisation des antibiotiques en filière bovine. Société Nationale des Groupements Techniques Vétérinaires (SNGTV), Paris, France.

Supré, K., K. Lommelen, and L. De Meulemeester. 2014. Antimicrobial susceptibility and distribution of inhibition zone diameters of bovine mastitis pathogens in Flanders, Belgium. Vet. Microbiol. 171:374–381. https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2014.02.045.

Tenhagen, B.-A., G. Köster, J. Wallmann, and W. Heuwieser. 2006. Prevalence of mastitis pathogens and their resistance against antimicrobial agents in dairy cows in Brandenburg, Germany. J. Dairy Sci. 89:2542–2551. https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(06)72330-X.

Thomas, V., A. de Jong, H. Moyaert, S. Simjee, F. El Garch, I. Morrissey, H. Marion, and M. Vallé. 2015. Antimicrobial susceptibility monitoring of mastitis pathogens isolated from acute cases of clinical mastitis in dairy cows across Europe: VetPath results. Int. J. Antimicrob. Agents 46:13–20. https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2015.03.013.

Wood, S. N. 2008. Fast stable direct fitting and smoothness selection for generalized additive models. J. R. Stat. Soc. Ser. B Stat. Methodol. 70:495–518. https://doi.org/10.1111/j.1467-9868.2007.00646.x.

Annexe 4 : Troisème article – Why do veterinarians ask for antimicrobial susceptibility testing? A qualitative study exploring determinants and evaluating the impact of antibiotic reduction policy

Preventive Veterinary Medicine 159 (2018) 123–134

Contents lists available at ScienceDirect

Preventive Veterinary Medicine

journal homepage: www.elsevier.com/locate/prevetmed

Why do veterinarians ask for antimicrobial susceptibility testing? A qualitative study exploring determinants and evaluating the impact of antibiotic reduction policy

Clémence Bourély[a,b,c], Nicolas Fortané[d], Didier Calavas[b], Agnès Leblond[c], Émilie Gay[b,*]

[a] École Nationale des Services Vétérinaires, VetagroSup, 69280, Marcy l'Étoile, France
[b] Lyon University-ANSES, Laboratoire de Lyon, Unité Épidémiologie, 31 Avenue Tony Garnier, 69007, Lyon, France
[c] EPIA, Epidémiologie des Maladies Animales et Zoonotiques, INRA, VetagroSup, Université de Lyon, 69280, Marcy L'Etoile, France
[d] IRISSO, CNRS, INRA, Université Paris-Dauphine, PSL Research University, 75016, Paris, France

ARTICLE INFO

Keywords:
Antibiogram
Veterinarian
Antimicrobial resistance
Critically important antibiotic
Acceptability
Qualitative research

ABSTRACT

For public health reasons, increasing attention has focused on more rational use of antimicrobials in farm animals. Guidance concerning the prescription of antibiotics and antimicrobial susceptibility testing (antibiograms in this case) are beneficial tools to help control the development of antimicrobial resistance. Nevertheless, even though there are already several qualitative studies analysing the determinants of antimicrobial prescription and use in veterinary medicine, little is known about decision-making concerning the use of antibiograms. The aim of this study was to provide a better understanding of veterinarians' motivations and role-players' influence concerning the choice of whether to ask for an antibiogram in the bovine, porcine, poultry and equine sectors in France. We concurrently evaluated the impact of a new French decree (2016) requiring an antibiogram before certain critically important antimicrobial agents can be used in veterinary medicine. Semi-structured interviews with veterinarians were conducted in France. Thematic analysis was used to analyse transcripts. In all, we surveyed 66 veterinarians. Use of antibiograms in veterinary medicine was multifactorial - 46 factors grouped into 11 categories were identified - and differed between animal sectors: use was almost systematic in poultry, frequent in pigs and rare in both the bovine and equine sectors. The decree has not increased the use of antibiograms but has induced a change in prescriptions due to field constraints and the time needed to obtain the results of antibiograms. Respondents see the decree as an aid in promoting responsible and rational use of antibiotics, fostering the use of alternatives. Our findings provide the basis of veterinarians' position regarding antibiogram use and antimicrobial resistance, pointing out levers to facilitate the use of antibiograms in veterinary medicine (for example communication on the benefits of this test and external financial support). Furthermore, the evaluation of the impact of the decree aimed at reducing the use of critically important antibiotic highlights key factors for a successful change in regulations, such as advance planning, precise and adapted communication, and demonstration of the measure's legitimacy. These results will be useful in guiding representative veterinary bodies and regulatory authorities during their decision-making, communication, and policy and regulation choices to combat antimicrobial resistance.

1. Background

In the field of animal health, veterinarians are generally allowed to prescribe, sell and administer antibiotics. They are therefore considered key players in the fight against antimicrobial resistance and overuse of antibiotics (Morley et al., 2005; WHO et al., 2016). Their freedom to prescribe is nevertheless limited by regulations. Over the last decade, the animal health authorities in France have enacted and enforced new regulations regarding the prescription and use of antibiotics in veterinary medicine, the most recent one being the decree regarding critically important antimicrobials (CIAs: third- and fourth-generation cephalosporins and fluoroquinolones) published in March 2016 (Anonymous, 2016). This decree requires bacterial identification and susceptibility testing (antibiogram) prior to the use of CIAs in

Abbreviations: CIA, critically important antimicrobials

* Corresponding author.
E-mail address: emilie.gay@anses.fr (É. Gay).

https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2018.09.009
Received 24 April 2018; Received in revised form 8 August 2018; Accepted 10 September 2018
0167-5877/ © 2018 Elsevier B.V. All rights reserved.

veterinary medicine.

After bacterial identification, an antibiogram has two objectives in the fight against antimicrobial resistance: it guides practitioners in their prescription and allows resistance to be monitored (Boireau et al., 2018). Therefore, a comprehensive and objective understanding of the drivers, incentives and reasons underpinning the use of antibiograms would: *(i)* highlight opportunities to encourage and support veterinarians in prescribing responsibly and prudently, *(ii)* help in evaluating the impact of policies such as the decree on CIAs to guide antibiotic stewardship or design control strategies and *(iii)* help in interpreting surveillance data (model choices, stratification). Several qualitative studies analysing the determinants of antimicrobial prescription and use in veterinary medicine have been carried out (De Briyne et al., 2013; Gibbons et al., 2013; Mateus et al., 2014; Speksnijder et al., 2015; Coyne et al., 2016). However, little is known about the decision-making concerning antibiograms (De Briyne et al., 2013), which can be seen as an earlier stage in the decision-making process of whether to prescribe and use antimicrobials or not. This is, nonetheless, a very important element for veterinarians to make informed decisions. Analysing the reasons and circumstances under which antibiograms are used would provide a better understanding of the drivers of antimicrobial use in livestock, and of possible levers for a change towards more prudent or judicious prescription practices.

The aim of this study was to provide a better understanding of veterinarians' motivations and the influences of different stakeholders on the decision to perform an antibiogram (this test is conditioned by preliminary identification of bacteria). The decision-making process relies on several social interactions because, even though veterinarians ask for the test, farmers have to pay for it, and veterinary laboratories usually perform the test. This raises the question of the importance of surrounding influences when deciding to use this test in veterinary medicine. First of all, we aimed to explore the factors driving the use of bacterial identification and antibiograms in veterinary practices. More precisely, we wished to describe and understand veterinarians' views of antibiograms and their use, and to clarify to what extent their opinion could impact their decision process. Secondly, we sought to identify the impact of regulatory measures restricting the use of CIAs in veterinary medicine. Ultimately, this research explored the viewpoint of French veterinarians and the challenges they are facing in the fight against antimicrobial resistance, within the context of changing regulations.

2. Methods

2.1. Study design and ethics

We used a qualitative approach which is a valuable way of understanding the diversity and depth of opinions of stakeholders (Kaufmann, 2011). The survey was a qualitative study based on interviews of veterinarians practicing in one of the four main areas of livestock production in France, namely the porcine, poultry, bovine (dairy and beef) and equine sectors. These four sectors are well represented in the five French administrative regions chosen: Bretagne, Normandie, Pays-de-la-Loire, Bourgogne-Franche-Comté and Auvergne-Rhône-Alpes. The selection criteria for participants were their area of expertise and the region in which they practised (Table 1). All the veterinarians matching the selection criteria were chosen from the French veterinary directory (http://www.lepointveterinaire.fr/roy) and then randomly selected to be interviewed.

A French ethics committee "*Comité de protection des personnes*" was contacted but the present study did not require formal consent or approval because it was not a clinical trial. Our research nonetheless followed ethical rules in compliance with the Statement of Ethical Practice for the British Sociological Association (British Sociological Association, 2002). The selected participants were contacted individually by phone (using a call guide) and/or e-mail to provide information on the purpose, nature and background of the study. Specifically, potential participants were advised that the study involved seeking their views and thoughts about antibiograms. Participants were informed that their opinions and the conversation would remain anonymous, and that any material potentially leading to individual identification would be removed during the analysis. Participants were asked to find out about the opinion of their colleagues working in the same clinic or practice about antibiograms and the decree prior to the interview. It was made clear that by agreeing to be interviewed, participants agreed to be part of the study. Once verbal consent was obtained, an individual interview was scheduled. Only three veterinarians contacted did not agree to be interviewed, without giving further details.

2.2. Data collection

Semi-structured interviews were used as they are appropriate for studying attitudes, concepts, beliefs, experience, knowledge, values and standards, which are difficult to observe directly (Beaud and Weber, 2003; Given, 2006). They can be used to obtain information and collect qualitative data through open-ended questions. In order to maximise both the quantity and quality of data collected, an interview guide was drafted for each animal production sector to adapt vocabulary to the specificity of each sector. Expert views were collected concerning the guides, which were then pre-tested through two exploratory interviews. The topics presented in Table 2 were addressed and the questions of the interviewer changed to delve into participants' individual responses.

Interviews were conducted at the participants' location of choice, most often in their veterinary practice: *(i)* individually and without witnesses to facilitate the expression of personal opinions and/or controversial views, and *(ii)* face to face by the same person (first author) in order to encourage respondents and ensure the comparability of collected information (Beaud and Weber, 2003).

At the beginning of the interview, the aim and background of the study were explained, as well as the interview's confidentiality, and the characteristics of the participating veterinarians were collected. Interviews were recorded to facilitate the dialogue, but as expected, most participants gave further information or details after the formal end of the interview, once the digital audio recorder had been turned off. The interviewer also made note of this information, and these field notes were reviewed after each interview. Data continued to be

Table 1
Selection criteria of participants.

Criteria	Description
Criteria for pre-selection of veterinary clinics	- structure (clinic, hospital, practice) with veterinarians working mainly in one of the four targeted livestock production sectors: bovine, porcine, poultry or equine - for the rural sector: structure with at least two partners (they are specialised and more likely to be available for the survey)
Criteria for pre-selection of veterinarians	- strictly practitioners (no teachers, slaughterhouse inspectors, pharmaceutical industry employees or civil servants) - working mainly in one of the four targeted production sectors - possible selection of two veterinarians from the same structure only if they exercised in two distinct sectors
Criteria for selection of veterinarians	- use of at least one bacterial identification with antibiogram in their career for their dominant activity - willingness to participate

Table 2
Topics and underlying topics of discussion during the interviews.

Topic	Underlying topics
Opening question	Please describe the process of using an antibiogram?
Decision to use an antibiogram	Factors involved in recourse to an antibiogram
	Presentation of the decision-making process
	Role-players involved/people influencing the decision
	Evolution of the process and practices
Perception and opinion of antibiograms	Knowledge about antibiograms
	Ability to talk about and present the test
	Information received: relevance, quantity and quality
	Opinion about the test and its utility
	Purpose of an antibiogram
	Antibiograms as a means of fighting antimicrobial resistance
	Evolution of this perception
	Differences with their colleagues' opinion or perception
Impact of the new decree requiring the use of an antibiogram before prescribing a CIA	Knowledge regarding the decree
	Change in practice
	Reasons of satisfaction/dissatisfaction
	Personal interest
	Opinion and insight about the decree
	Evolution of this insight
Closing question(s)	Differences with their colleagues' opinion and practices
	General feeling on the fight against antimicrobial resistance in France
	Any further elements

Table 3
Characteristics of the interviews (animal sector and years of practice of the veterinarians with mean, minimum and maximum).

Sector	Participants				Time of the interviews (min)	
	Total	Female	Male	Years of practice	Average length	Range
Equine	19	8	11	18 [2; 40]	59	[36; 87]
Porcine	16	3	13	21 [6; 36]	65	[40; 93]
Poultry	11	3	8	13 [2; 26]	63	[42; 112]
Bovine	20	3	17	20 [3; 37]	61	[38; 83]

collected until saturation occurred for each sector. Saturation means that a point is reached where collecting more data will not lead to new information related to the research questions (Mukamurera et al., 2006).

2.3. Data analyses

The *verbatim* interviews were manually transcribed and field notes added. The first step in data analysis involved reading through all of the transcripts to get a sense of the data set as a whole. The transcripts were then subjected to thematic analysis (Graneheim and Lundman, 2004), following the methodology outlined by Beaud and Weber (Beaud and Weber, 2003). This method provides a robust framework for coding qualitative data and for then using the coding to identify patterns across the dataset in relation to the research question (Braun and Clarke, 2014). Significant text fragments were identified in relation to the research questions and initial codes established for concepts (basic units of analysis whose central meaning is described in a short statement referring to a code). Fragments were grouped into categories sharing common features and categories were organised around themes in order to link underlying meanings that reoccurred within categories (Bardin, 2013; Paillé and Mucchielli, 2012). The analysis was conducted in a circular process and used a constant comparative method (Braun and Clarke, 2014): repetitions of forward and backward movements from transcripts, gathering of text fragments, attribution of codes and the introduction of inferences (Mukamurera et al., 2006). Before making any inference, evidence to the contrary was sought and the fact that some subjects were not mentioned was explored. The triangulation principle (cross-checking information to validate each inference) and iteration principle (involving looking for repeats and synergy in transcripts) were strictly applied (Olivier De Sardan, 2008). In accordance with conventional methodology, the study results were first submitted to all respondents. These steps in the analysis process fulfilled the expectations of trustworthiness and rigour (Guest et al., 2006; Tracy, 2010). In order to maintain participant confidentiality and to protect identity, the age and gender of respondents are not detailed in this paper. Note that all *verbatim* texts cited in this paper have been translated from French (Supporting information 1. Table).

3. Results

Sixty-six semi-structured interviews were held from October to December 2016 (Table 3 and Supporting information 2. Table). They lasted between 36 and 112 min (recorded time). Thematic analysis revealed seven major themes linked to the three research aims (Table 4).

3.1. Investigating veterinarians' perceptions of antibiograms

3.1.1. Antibiograms as an additional examination

3.1.1.1. Paradigms: herd medicine vs individual medicine. According to respondents, there are two ways of understanding veterinary medicine: population medicine, when a whole herd or a batch of animals is treated; and individual medicine, when only one animal is considered. Additional examinations do not have the same role, or status, in these two different types of medicine. In herd medicine, the special and preponderant place of additional examinations to refine diagnosis and find precise solutions to breeding problems is easily understood. In this context, the cost of the analysis is kept in perspective by the benefit of investigating the cause and saving the rest of the batch or herd.

> "Implicitly, at least in the case of pigs, they know that it's going to cost less to confirm, to actually diagnose the problem, than to just treat blindly; especially if it's a recurring illness." No. 16.

In contrast, according to the individual medicine paradigm, the cost of additional examination is relatively high because it is only used for an individual animal. Therefore, the value of the animal, its sporting career, and/or its genetic potential are key factors determining use of additional examinations. Herd and individual medicine paradigms can be interlaced in veterinary practices, especially in the bovine and equine sectors.

Table 4
Overview of research aims related to the themes and categories that emerged during data analysis.

Research aim Theme Category
Investigating veterinarians' perceptions of antibiograms
Antibiograms as an additional examination
Paradigms: herd medicine *vs* individual medicine
The place of additional examinations and antibiograms in diagnosis
Purpose of antibiograms in veterinary medicine
Antibiograms to guide veterinary practices
The role of antibiograms in their relationship with clients
Antibiograms as a tool to fight antimicrobial resistance
Use of antibiograms in daily veterinary practices
Antibiograms and treatment
Association of bacterial identification and antibiogram
Investigating the factors that influence veterinarians' decisions to ask for an antibiogram
Reasons and limits: factors explaining the recourse to antibiograms in veterinary medicine
Analysis and sampling modalities
Factors attributable to the client
Factors attributable to the veterinarian
The influence of different stakeholders
Relationship with the client
Relationship with the laboratory
Relationship between vets
Investigating the impact of the new decree regarding the prescription of CIAs and the stance of veterinarians
Impact of the decree on veterinary practices
Understanding why last-generation antibiotics were used (prior to the decree)
Different effects of the decree on veterinary practices
Acceptability of the change by veterinarians
A measure expected by veterinarians
Legitimacy of the measure
A well-accepted regulation implemented by veterinarians
Nevertheless some criticisms

3.1.1.2. The place of additional examinations and antibiograms. All respondents considered additional examinations as a means of supporting reliable diagnosis. They used the semantic fields of "*completeness*" and "*purpose*". When respondents were asked to describe a standard visit in a pathological context, poultry and pig veterinarians mentioned additional examinations, unlike equine and bovine veterinarians. In poultry production, the cost-benefit calculation is highly in favour of antibiograms to find an effective treatment as soon as possible, and the use of additional examinations was more or less systematic. The porcine sector also had very frequent use of antibiograms.

> *"For individual medicine, analysis is not systematic, but for population medicine, it's absolutely essential!"* No. 34

In the equine and bovine sectors, the use of antibiograms and, more broadly, the use of additional examinations depended on the type of veterinarians, their clients and their facilities. Through this study, we identified three types of equine veterinarians: field veterinarians (dealing primarily with emergencies), clinicians (having facilities equipped to stall private horses) and referring veterinarians or veterinarians in an animal hospital practice (specialists); and two types of bovine veterinarians: consulting veterinarians, and field veterinarians. Antibiograms were mainly used for herd diseases such as mastitis or neonatal diseases in cattle, and for reproductive disorders, arthritis and recurrent respiratory infections in horses.

> "*For financial reasons, these additional examinations will be used more for racehorses or valuable horses like sport horses than for pleasure horses. For owners who don't have much money, we try to limit expenses."* No. 14.

Regardless of the animal sector, veterinarians did not oppose additional examinations and empirical diagnosis. They argued that while clinical skills can be sufficient to support a diagnosis, an additional examination does not dispense veterinarians from using their clinical common sense.

3.1.2. Purpose of antibiograms

3.1.2.1. Antibiograms to guide veterinary practices. Veterinarians considered the combination of bacterial identification and antibiogram to be a diagnostic, prognostic, therapeutic and epidemiological tool. Using an antibiogram allowed them to consolidate their knowledge and confirm the validity of their clinical common sense regarding their best-efforts obligation to their client.

3.1.2.2. Antibiograms in their relationships with clients. The antibiogram was used by all veterinarians as an educational medium through which they could explain their clinical approach to the clients (farmer, owner or breeder). It was also a way of raising their awareness of antimicrobial resistance or of convincing them to adopt new preventive measures. According to respondents, antibiogram results were effective in changing clients' mentalities because they were perceived as an impartial and outside viewpoint, independent of the veterinarian.

> "*He* [the farmer] *thought it was the antibiotic that wasn't working properly, that was not suitable. So the antibiogram was a real educational opportunity to show that there was absolutely no sensitivity issue, so the problem lay elsewhere."* No. 25.

In the equine sector, asking for an antibiogram was also a means of making sure that the client did not question the veterinarian's clinical approach, should a conflict arise.

3.1.2.3. A tool to fight antimicrobial resistance. The antibiogram was considered useful at different steps of the decision-making process during the visit: in pushing through alternatives to antibiotics or promoting good breeding practices, in guiding the prescription, in diversifying the prescription when possible and in monitoring antimicrobial resistance trends.

> "*As far as I know, I think that it's clearly the best way of assessing antimicrobial resistance and its development."*No. 14.

The aims assigned to antibiograms by respondents were common to all the animal sectors considered except as an insurance against client conflict, which was mentioned only by equine veterinarians. These aims are summarised in Fig. 1.

3.1.3. Use of antibiograms

3.1.3.1. Antibiograms and treatment. In the poultry and porcine sectors, the use of bacterial identification and antibiogram did not necessarily imply the use of antibiotics afterwards. On the other hand, in the bovine and equine sectors, most of the time an antibiogram was used to guide the prescription for second-line treatment and consequently implied the use of antibiotics afterwards.

> *"Then, we have a plan too. We kick off with the antibiogram, or rather the samples then the antibiogram, but if there's no increase in the death rate or if it drops, we don't carry through with the treatment. Treatment is really the last resort; we first try to work on the farming conditions, we administer antioxidants and if that's not enough, we move on. But that's a third stage. So we always start with the analysis."* No. 56 (avian veterinarian).

3.1.3.2. Bacterial identification and antibiogram. In the poultry, porcine and equine sectors, veterinarians systematically combine bacterial identification with an antibiogram. This was similar in the bovine sector, except for mastitis. Most of the dairy veterinarians did not

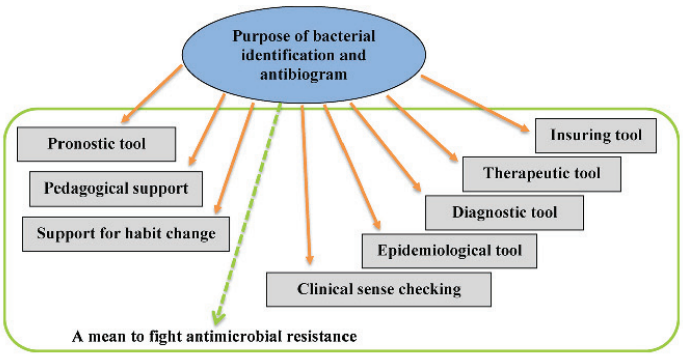


Fig. 1. Purposes of antibiograms in veterinary medicine.

associate the two tests because they performed simplified bacterial identification at the clinic to avoid sending samples to the laboratory.

> *"We thought we'd start by just doing the bacterial ID, which doesn't require much investment in terms of equipment and knowledge. But we realised that once we knew the type of germ, we could target the treatment better; we already had an answer. So quite honestly we based things on the field response and didn't use an antibiogram."*No. 24.

3.2. Investigating the factors that influence veterinarians' decisions to ask for an antibiogram

3.2.1. Reasons and limits

Among the reasons for and limits to the use of antibiograms, our study identified 46 factors gathered into 11 categories (Supporting information 3. Table). Fig. 2 illustrates the relationship between factors. Given the details provided by the respondents, the diagram was built to represent links between factors and/or categories, and to illustrate the diversity of their interactions. We only represented links mentioned by respondents during the interviews.

The factors could act as incentives or disincentives. Some of them were common to the animal sectors, such as the services provided by a laboratory (depositing zone, attendance at autopsies, report sent by e-mail or displayed on a website), its proximity, the working habits of veterinarians, and determinants linked to the disease, while others were specific to one sector (S3 Table). For instance, the seasonality of the use of antibiograms was only mentioned in the bovine sector: at the beginning of the calving season, veterinarians were more prone to use an

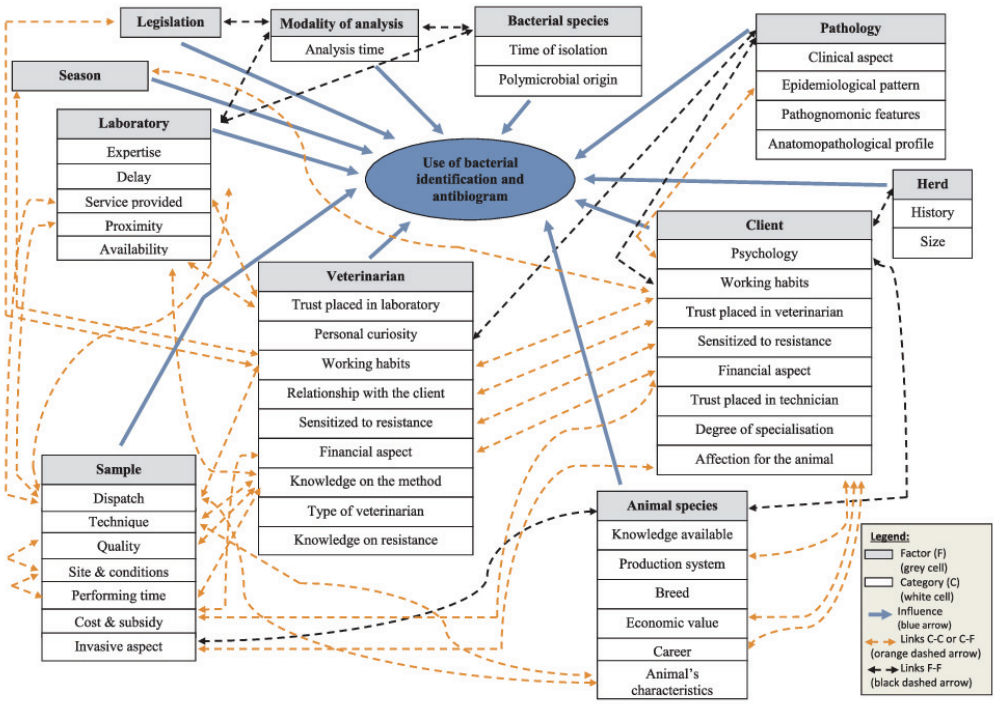


Fig. 2. Map demonstrating the relationships between determinants and categories of determinants. mentioned by veterinarians regarding their use of antibiograms.

antibiogram than at the end, because the test is thought to be useful for the calves to come. As a result of batch management, this factor was not mentioned by pig or poultry veterinarians.

3.2.1.1. Analysis and sampling modalities. Except in the poultry sector, the time required for analysis was considered by the vast majority of respondents (47 out of 55) as the main obstacle to the use of antibiograms. Almost all the poultry veterinarians interviewed (10 out of 11) had a veterinary laboratory close to their clinic. In other sectors, veterinarians who did not have a local laboratory emphasised the difficulty in using laboratory services owing to higher costs and longer timeframes to obtain a result. Related to the network density of laboratories in the poultry and porcine sectors, proximity to the laboratory did not limit the use of antibiograms in western of France, but did in other regions studied. In the equine and bovine sectors, the collection of samples in the field was a real constraint for veterinarians. On the other hand, equine veterinarians practising in a clinic or hospital found it easier to perform swabs in order to ask for bacterial tests for reasons of hygiene, equipment availability, restraining measures and safety.

> "*It's complicated when you're at the far end of a field with a rearing horse that the owner can't control. You think 'Well, I'd really like to do a transtracheal aspiration…' then you think it's a pity, you give the horse a small injection and off you go."* No. 65.

In the bovine, porcine and equine sectors, the financial aspect (linked to sampling or analysis) was one of the biggest hurdles to the use of antibiograms, though in the poultry sector, cost was only mentioned by two out of the 11 veterinarians interviewed. In the bovine and equine sectors, some veterinarians expressed frustration with the financial limits of their clients.

> "*Lots of clients say 'I don't care about the diagnosis, just give me the treatment!' It happens all the time! It's complicated, difficult, but it's our experience. The client often has a limited budget and can only spend a certain overall amount. So the more you spend on diagnosis, the more satisfied you are, the more accurate you are and the better your treatment will be, but you'll have less money available for the actual treatment!"*No. 15 (equine veterinarian).

3.2.1.2. Factors attributable to the client. In addition to financial aspects, three other factors attributable to clients were common to the sectors studied: the client's psychology, working habits and personal sensitivity to antimicrobial resistance issues. The majority of respondents (52 out of 66) explained that breeders were more likely to accept analysis if they understood the usefulness of antibiograms in managing their farms, or if they had been alerted to or made aware of antimicrobial resistance issues. In the bovine sector, 15 out of 20 veterinarians mentioned that the self-medication practised by breeders hindered bacterial identification and antibiogram use due to the period required between antibiotic treatment and the possibility of obtaining a valid sample. In the equine sector, the owner's psychology was related to the horse's value, whether affective or economic.

3.2.1.3. Factors attributable to the veterinarian. Regardless of the sector of activity, the age of the veterinarian - linked to their years of experience - was mentioned by many respondents. However, in the analysis, there was no distinction between the practices of veterinarians according to their age. The suspected difference mentioned by respondents was thus considered according to two other factors: the veterinarian's habits and his/her personal awareness of antimicrobial resistance issues. Depending on their clinical habits, some veterinarians considered a particular anatomical pathology profile to be characteristic, while others preferred to support their diagnosis with more systematic laboratory analyses. In the poultry, porcine and bovine sectors, veterinarians' habits included their propensity to focus on prevention, animal husbandry or on looking for an alternative to antibiotics.

3.2.2. The influence of different stakeholders

3.2.2.1. Relationship with the client. The decision to request bacterial identification and an antibiogram was based on a bipartite set of stakeholders (veterinarian-farmer) in the equine, bovine and porcine sectors. In the poultry sector, the set was often tripartite (veterinarian-breeder-technician).

When a bacterial infection was suspected in the poultry sector, the systematic use of additional examinations limited the veterinarian's role in the decision-making process, because farmers and technicians were particularly keen on using laboratory tests. In the equine sector, the role of veterinarians dealing with referred cases and those practising in hospitals or large clinics was limited because owners came to them for a precise diagnosis and expected additional examinations. The client's visit already acted as a clear declaration of consent for carrying out additional examinations. On the contrary, field veterinarians must present strong arguments for their proposal in order to convince clients.

In many interviews in the poultry (9 out of 11) and porcine sectors (13 out of 16), veterinarians described the decision-making process as follows: the veterinarian suggested, the technician advised, and the farmer paid. In the bovine and equine sectors, the process was more direct: the veterinarian proposed and the farmer (owner) agreed and paid. The analysis of the interviews made it clear that veterinarians did not just propose tests, in the sense of the pure and simple suggestion of the analysis. Describing their own proposal, veterinarians explained how they actually encouraged farmers to agree. The veterinarian's arguments and guidance were crucial in the client's ultimate decision.

> *"We get to decide, but the owner or keeper has to validate our decision. We explain why we want to do it. Generally speaking, if needed we can be pretty persuasive* [laughs] *and the client can't really say no!* [laughs] *But then we're taking on responsibility when we explain things; people trust us; they know that when we think an additional examination is necessary, there's a good reason. They usually agree quite quickly."*No. 10.

The notion of "trust" was very often used to justify the decision-making process. Moreover, according to respondents, the antibiogram could support this trust in the sense that it was a means for the veterinarian to respond effectively to the farmers' needs. In the equine and bovine sectors (unlike the others), the client could blame the veterinarian for proposing an additional examination, whether justified or not. The veterinarian might interpret this as a breach of the trusting relationship established. This was why some veterinarians preferred not to propose an antibiogram.

> *"I was the young vet straight out of university or an equivalent structure, a graduate new to the job and unable to diagnose an illness and start treatment without taking samples. So at the start, I didn't do as many; I didn't propose much at all, I tried to do everything myself with the few resources available to me. Nowadays, the clients know me and they know that I don't suggest anything and everything, they know it, see. Now I propose more things and they agree, they accept!"* No. 53.

While veterinarians were able to persuade clients to accept an antibiogram, it must be emphasised that respondents could also choose to dissuade them if they themselves were not sure of its value.

3.2.2.2. Relationship with the laboratory. Even though the laboratory was not directly involved in the veterinarians' decision to ask for an antibiogram, it played an indirect role and could even determine the use of additional examinations. To perform bacterial identification and antibiograms, our analysis highlighted that veterinarians usually worked with only one laboratory, selected mainly because of its expertise and availability. In the poultry and porcine sectors, after the autopsy, laboratory workers advised the veterinarian on bacterial

identification in agreement with the anatomical pathology profile. When a pathogenic bacterium was identified, the antibiogram was performed *de facto*. In all sectors, respondents mentioned the importance of communication with the laboratory to discuss the case and choose the appropriate clinical strategy. In the bovine and equine sectors (more rarely in the porcine sector), respondents reported difficulties getting in touch with laboratory staff to discuss the test before and after it was performed. The availability and the service provided by the laboratory (such as the transmission of a comprehensive and clear analysis report) appeared to be critical in the decision to ask for an antibiogram (Fig. 2 and Supporting information 3. Table).

3.2.2.3. Relationship between veterinarians. Almost all the veterinarians interviewed (61 out of 66) mentioned having similar practices to those of their colleagues in the same clinic and in the same sector of activity, and having analogous opinions about antibiograms. We noticed that young veterinarians adapted their practices to those of their elders. Paradoxically, even though younger generations were more aware of the need for antibiograms, the analysis showed that they tended to limit their actions so as to fit in with their colleagues' habits. Thus the consistency in practices among veterinarians results from the subordinate relationship between them (experienced *versus* young professionals), the veterinarian's habits, and the personal awareness of antimicrobial resistance issues.

> "*At the start, my previous partners didn't do them* [antibiograms], *so I followed their example. Later, I became more independent, and made my own decisions. It's easier when you're the boss.* [sour laugh]" No. 1.

3.3. Investigating the impact of the new decree regarding the prescription of CIAs and the stance of veterinarians

3.3.1. Impact of the decree on veterinary practices

3.3.1.1. Why were CIAs used?. Respondents explained that they used CIAs prior to the decree because of their various advantages, which include their galenic properties (small administered volume, delayed-release, palatability, no doping agent), broad spectrum of action, bactericidal activity, low toxicity, and pharmacokinetic benefits (rapid efficacy and short withdrawal period). Some veterinarians associated these advantages with animal welfare, because the large administered volume of older-generation antibiotics can be painful. Importantly, veterinarians were sometimes pressured to prescribe CIAs, which were deemed more effective by clients.

> *"You know, it's not easy for a 28-year-old vet who comes along and prescribes penicillin for a 7-month-old foal with a runny nose to have his treatment refused by somebody who says 'No, I need something else'. When you ask why, the person replies, 'I want something oral, else I'm not going to be held accountable for the injections.' There's a whole set of factors that are certainly not taken into consideration because everybody is confronted with this situation, but it's not often mentioned. That's the problem with compliance; it's a problem of managing the horses and of accountability."* No. 33.

3.3.1.2. Effects of the decree. Ultimately, according to respondents and with limited exceptions, the decree has not increased the use of antibiograms in the studied sectors, but it has induced a change in prescriptions due to field constraints and time taken for analysis. In the poultry sector, it has had practically no repercussions because veterinarians already used analysis to justify any treatment. Pig veterinarians have revised their prescriptions for urinary infections (florfenicol instead of fluoroquinolones), post-weaning diarrhoea, and diseases occurring at the end of the fattening period, and few of them have reported that they have been using antibiograms more frequently since the decree had been published. In the bovine sector, the analysis distinguished veterinarians rarely using CIAs from veterinarians prescribing CIAs for over 50% of the time, when they prescribed antibiotics prior to the decree. The latter have drastically changed their prescriptions. Since the decree, referring equine veterinarians have used antibiograms more frequently, while clinicians or field equine veterinarians have changed their prescription practices if they used to prescribe CIAs regularly. However, for foals, the behaviour of veterinarians still varied: some still regularly used CIAs with or without an antibiogram, while others have changed their therapeutic strategies. Finally, regardless of the sector, in the event of an emergency, no veterinarians would wait for the results of an antibiogram before treating animals with a CIA (a procedure authorised by the decree).

3.3.2. Acceptability of the change by veterinarians

All the veterinarians interviewed mentioned sharing the same view about the decree with their colleagues in the same clinic.

3.3.2.1. An expected measure. The respondents reported that the decree had been widely publicised for a long time and information had been relayed, whether through the professional press, veterinary associations, trade unions, the College, delegates from the pharmaceutical industry, or through discussions between veterinarians. Hence, the decree was expected. Consequently, veterinarians explained that they had prepared for the new regulation in several ways: they had explained it to their clients during visits, meetings, through mailing or leaflets, and they state that they had decreased their prescription of CIAs before the decree.

3.3.2.2. Legitimacy of the measure. Respondents emphasised that the decree was logical and fair because it has harmonised practices between veterinarians, limited client pressure on veterinary prescriptions, and has put an end to the misuse of CIAs in livestock farming. Hence, the decree was perceived as a regulatory support.

> "*That's the big advantage of the decree: even if they* [the farmers] *go somewhere else, the answer will be the same!*" No. 49.

Furthermore, veterinarians felt that the new regulation did not lead to more treatment failures, proving that other molecules were still effective. More importantly, veterinarians from all sectors raised the issue of measures like this one being necessary to cope with antimicrobial resistance: the effective treatment of bacterial infections was a major issue for them in terms of public health, sustainability of livestock farming, and animal welfare.

> "*The day that we don't have any more antibiotics, we won't be able to offer any treatment, so it's to protect our future, to be able to continue our job and not be stuck in ten years' time because nothing works.*" No. 37.

3.3.2.3. A well-accepted regulation implemented by veterinarians. For the reasons explained above, the decree has been well accepted by veterinarians. Respondents perceived it as an aid that could be used to change clients' habits, promote responsible and prudent use of antibiotics and foster the use of alternatives (first-generation antibiotics, phytotherapy).

> "*It helps us emphasise the use of those* [first-generation] *antibiotics too, as well as compliance; I think that it's almost more educational.*" No. 39.

Analysis revealed that the decree strengthened their role in the field through an increase in farmers' calls before undertaking any treatment.

> *"It forces the farmer to call us more regularly, which is a good thing. Because many times, the farmer has a problem but he doesn't necessarily call us because he just does what he has always done. It's self-prescription, but this puts vets back in their place, on the farm; and that's*

*positive!"*No. 49.

In addition, the decree was also seen as a way to urge farmers to implement preventive measures or good practices: respondents used it as an educational support. Besides the educational aspect of antibiograms (Fig. 1), changes in prescriptions and the development of preventive measures provided farmers with evidence of the efficiency or usefulness of vaccination, hygiene, biosecurity, and animal husbandry procedures to fight bacterial infections.

> *"Now we have a legal basis for explaining to farmers that we can no longer dispense treatment without additional examinations."* No. 58.
> *"It's more preventive medicine now: if the germ is in the environment, we try to improve the environment and any soaking products used, to ensure the litter is clean and to decrease density; we look at all these things with the farmer."* No. 2.

3.3.2.4. Some criticism. There was only a small amount of criticism against the decree. In the bovine and porcine sectors, some veterinarians were sceptical about the effectiveness of the decree. They assumed that replacing CIAs with first-generations antibiotics would not solve the initial issue: instead, there was a need to improve animal husbandry and the control of breeding conditions.

> *"Realistically, the problem is there: the antibiotics helped to compensate for investment deficiencies in the buildings. So if we take them away, I think that market rates will need to be more remunerative for farmers, so that they can invest in buildings."* No. 19

The main criticisms were always about two aspects: the lack of an impact on the use of CIAs without veterinary prescription (illegal import or illegal delivery by pharmacies) and the lack of harmonisation in regulations between countries, leading to distorted competition.

> *"As usual, I think we're well ahead of others because this decree is not applied in all countries. I think we are right. Well, now it would be nice if it could be harmonised at the European level, because we are always more papist than the Pope! It would avoid negative spillovers and distortions of competition with other European countries, because antimicrobial resistance has no borders."* No. 23

4. Discussion

4.1. Specificity of the qualitative approach

To the authors' knowledge, this paper is the first to explore determinants of the use of antibiograms by veterinarians using a qualitative approach. Contrary to the quantitative method, this type of approach suited the study's aims because it is a valuable way of understanding the diversity and depth of opinions, and provides a deeper and objective understanding of the role that circumstances, motivations, relationships and context play in a variety of human behaviours (Kaufmann, 2011). We assume that our selection criteria (Table 1) allowed us to sample a wide range of behaviour regarding the use of antibiograms in animal health in France. The choice to interview only one veterinarian per clinic or practice appeared to be valid because almost all respondents asserted that their colleagues in the same sector and the same practice shared their opinion and perception about antibiograms and the decree, and had similar prescribing habits. This selection strategy was particularly relevant for the poultry sector because veterinarians were gathered in a limited number of practices.

Furthermore, the confidentiality of the interviews warranted the trustworthiness of participants' answers (Mukamurera et al., 2006). The use of a standardised approach, a strict recruitment method, individual interviews and a careful sequence of questions improved the study's reliability. Through application of analysis and sampling rules (triangulation, iteration and saturation) (Beaud and Weber, 2003; Tracy, 2010), we can validate study results and extrapolate findings to a national level.

Our study highlighted strong convergences within certain themes and categories, and has captured novel information that was not possible to obtain through a quantitative questionnaire. This is one of the main advantages of the qualitative approach: although the interviewer used guides, participants were free to elaborate or introduce any other information they felt was relevant, and were indeed encouraged to do so. In 2013, De Briyne et al. used an electronic questionnaire to identify factors influencing the use of sensitivity testing amongst veterinarians in Europe (De Briyne et al., 2013). Using this methodology, they could neither identify any differences between sectors of activity nor the impact of factors not mentioned in the questionnaire.

4.2. Response to the objective and limits

The decision of whether to ask for bacterial identification and an antibiogram is influenced by a number of complex factors in porcine, poultry, equine and bovine veterinary medicine. Logically, some of the determinants are related to factors associated with antimicrobial veterinary prescriptions, such as risk avoidance, disease epidemiology, client pressure, antimicrobial awareness, working habits or economic aspects (Gibbons et al., 2013; Coyne et al., 2016; Speksnijder et al., 2015). The identified reasons explaining the use of CIAs before the decree were in accordance with determinants previously reported in the literature from different countries (De Briyne et al.,2013; Gibbons et al., 2013; Speksnijder et al., 2015; Coyne et al., 2016). More precisely, the link between treatment and animal welfare, and belief in the professional obligation to alleviate animal suffering had already been mentioned by Speksnijder et al. (2015), as well as client pressure. However, our study went further, underscoring why veterinarians had preferred to use last generations antibiotics instead of first generations compounds.

In this study, we also highlighted the influences of stakeholders on the decision to perform an antibiogram. Influence of stakeholders' relationships in the decision-making process is exercised at three different levels: *(i)* individual (the veterinarian can have personal satisfaction to use antibiograms and/or increasing their use), *(ii)* interpersonal (between vets, vets and clients or vets and the laboratory) and *(iii)* organisational through changes in habits and new regulations. Knowing the influence of stakeholders and the determinants driving the use of antibiograms is helpful to risk-management authorities in order to inform efforts to remove specific barriers, and thereby create favourable conditions that will foster antibiogram use. Ultimately, considering susceptibility testing as the best tool for monitoring antimicrobial resistance (Boireau et al., 2018; Silley et al., 2012), this study provides keys with which to properly use and interpret surveillance data (model selection, scope of results).

Our study focused on the perception of veterinarians and on the impacts of the decree on their usual practices. To address the issues through a more cross-cutting approach, interviews should also be performed with their clients and with laboratory staff (Boireau et al., 2017; Boireau and Praud, 2016). Nevertheless, focusing on veterinarians, and interviewing all types of veterinarians in the animal sectors studied, enabled us to detect variability between sectors and between veterinarians in the same sector (equine and bovine). Our research strategy was an effective and pragmatic choice because it enabled the large-scale analysis of factors that influence veterinarians' decision-making to ask for an antibiogram during their activities, while avoiding a study with other methodologies, more stakeholders and, consequently, a greater financial commitment.

4.3. The importance of a laboratory network for veterinarians

All the respondents recognised the technical skills of the laboratory and its in-house expertise (S3 Table). Thus, most veterinarians did not

want to carry out the bacterial identification and antibiogram themselves. Even though certain analyses can be carried out at the animal's location or in the veterinary clinic (X-rays or blood tests), public and private veterinary laboratories are an indispensable complement to any veterinary activity, performing official or diagnostic analyses for which they are accredited (McInerney, 2016; Mendez et al., 2013).

It was perhaps foreseeable that veterinarians' choice of laboratory would be linked to proximity, availability (Mendez et al., 2013; Robinson et al., 2012), responsiveness (Robinson and Epperson, 2013) and the services offered (Fig. 2 and Supporting information 3. Table). However, the laboratory's expertise and renown were found to be another factor especially relevant for veterinarians, who evaluate this expertise through the laboratory's publications, communication about services offered, and direct contacts with laboratory staff when they have questions. Thus, in order to facilitate the use of antibiograms performed in the laboratory, it appears judicious for laboratories to take great care in actively informing veterinarians of their capabilities and technical competencies, and in communicating their expertise, as well as the work and analyses they can carry out and even develop.

The analysis identified various points that could be improved in order to strengthen links between rural veterinarians and laboratories. During the interviews, respondents asked for more communication from the laboratories concerning antibiogram techniques, the samples to be taken, and a report on the results. We can assume that veterinarians who have constructive dialogue with their laboratory are better able to explain the analysis to farmers and eventually to defend its advantages. Communicating with laboratories is also a way for veterinarians to complete an analysis report that could otherwise be too concise or patchy (Robinson and Epperson, 2013). This study showed that veterinarians were not always satisfied with the analysis reports transmitted by laboratories because they did not clarify the inferences made as to which treatment to choose (which antibiotic tested characterises sensitivity to a family of antibiotics, for example). While the role of the laboratory is undeniable to inform and advise veterinarians (Mendez et al., 2013; Vandeweerd et al., 2012; Robinson et al., 2012; Robinson and Epperson, 2013), it should also be noted that technical veterinary groups or associations (*Groupements Techniques Vétérinaires* in France) could actively contribute to the training of veterinarians on this specific subject.

4.4. Levers to facilitate the use of antibiograms: requests and reality

Alongside the time taken for analysis, the financial aspect of bacterial identification and antibiograms is undoubtedly the most important factor in the equine and bovine sectors. Veterinarians critics costs that they found were still too high, hindering broader use of antibiograms. It is clear from our findings that subsidies from pharmaceutical industries financially support the use of antibiograms in the porcine and bovine sectors. In this context, many veterinarians are concerned that the risk-management authority prevents pharmaceutical industries from subsidising part of the laboratory tests. Alternative forms of subsidies and procedures may also be considered, such as animal insurance, subsidies from regional councils or grants from livestock groups. This highlights the need to develop partnerships.

We found that the benefit of antibiogram use is still underestimated in terms of resistance containment. This suggests that there is also a need to effectively communicate to animal owners, breeders, keepers, farmers and veterinarians on antimicrobial resistance, on the cost benefit of antibiograms and their benefits with respect to prescribing antibiotics responsibly, in order to support the communication of veterinarians at the field level, and to change the habits and attitudes of clients as well as veterinarians. Over the last ten years, numerous recommendations and treatment guidelines on responsible use of antibiotics have been developed by national (Anonymous, 2011), European (EPRUMA, 2008; FVE, 2012) and international bodies (EMA and EFSA, 2017; WHO et al., 2016). Our results indicate that when the use of an antibiogram is strongly recommended in food production guidelines, it is performed more regularly (*e.g.* the poultry sector compared to the bovine sector). Similar results had previously been found by De Briyne et al (De Briyne et al., 2013).

In the porcine, equine and bovine sectors, one of the most important factors influencing greater use of antibiograms is the ability to obtain rapid results. Previous studies conducted in the United Kingdom (Coyne et al., 2016) and the Netherlands (Speksnijder et al., 2015) report concerns over the time taken to obtain antibiogram results. Peterson et al. argue that to reverse the antimicrobial resistance trend, rapid tests are more promising than the current approach in human health (control programme, improvements in hygiene, synthesis of new molecules) (Peterson and Dalhoff, 2004). Dunne et al. suggested that rapid antibiograms are equally as important in the battle against resistance (Dunne and van Belkum, 2014). As reported in 2013 (van Belkum and Dunne, 2013), new rapid susceptibility methods are available, but their performances vary and speed must be balanced with the risk of underestimating resistance.

4.5. The decree regarding prescription of antimicrobials: success factors of this change

Surprisingly, even though the decree implied a restriction on prescriptions, we have demonstrated that it has been well received by veterinarians, raising the question of the reasons for the success of this change in veterinary medicine. The analysis of factors leading to success or failure demonstrates the importance of communicating, meeting the needs of stakeholders, and providing clear and accurate information in order to encourage stakeholders to commit to a change in routine dynamics (Bernoux, 2002; Dent and Goldberg, 1999; Kotter, 1995; Pascal Paillé, 2003) and to the development of a technology (here the antibiogram) over a long period of time (Boireau et al., 2017; Labatut et al., 2012).

We should first consider that prior to the decree, much more restrictive measures had been considered, including decoupling prescriptions from the dispensing of antibiotics (decoupling means that veterinarians would no longer be authorised to dispense antibiotics). Thus, veterinarians may have been satisfied with this less restrictive decree. Secondly, according to respondents the decree is clear and they were informed well beforehand about its implementation. Thirdly, the decree gives two options adjusting to the discrepancy in practices between sectors: change the treatment or perform an antibiogram. In the equine and bovine sectors, it is easier for veterinarians to change their treatment, because antibiograms are not really part of their routine. On the contrary in the porcine sector, the new decree is sometimes an additional and compelling reason to foster the use of antibiograms. Moreover, respondents noted that the decree has been well received by farmers. Considering the influence of stakeholders described in our study and echoed in the literature (Alarcon et al., 2014; Boireau and Praud, 2016) this may have contributed to its acceptance by veterinarians. Finally, most veterinarians are convinced of its utility in fighting antimicrobial resistance and guiding good practices: we assume that this helped to develop the interest of stakeholders, thus attributing legitimacy to the change. In fact, veterinarians anticipated, accompanied and facilitated the change without being the instigator of the decree.

More generally, to increase veterinarians' and farmers' confidence in achieving responsible and reduced use of antibiotics, they should be provided with evidence (proof of concept, demonstration of usefulness and feasibility) and the tools with which to achieve change (Bard et al., 2017; Bernoux, 2002; Boireau et al., 2017). We assume that the decree contributes to these objectives by providing regulatory support (here the tool) to change the habits of veterinarians and farmers. Furthermore, the way veterinarians have applied the decree and interpreted its effects satisfies the need for evidence by demonstrating of the effectiveness of first-generation antibiotics in a context where CIAs were

routinely used.

4.6. The new paradigm of veterinary practice

Alongside farmers, veterinarians play a prominent role in the health and food safety framework as a trustworthy source (Alarcon et al., 2014; Dean et al., 2011; Garforth, 2015), particularly in terms of surveillance, animal disease prevention and control (Alarcon et al., 2014; Boireau and Praud, 2016; Richens et al., 2015; Visschers et al., 2015). They serve as an interface between farmers and administrative authorities: they have to defend and promote measures that they did not choose (Enticott, 2012), while maintaining a good relationship with their clients (Dean et al., 2011). The implementation of the decree regarding CIAs has underscored the importance of their role in the rural sector. The different channels used by respondents to communicate with their clients about the decree match the need to multiply communication tools to reach farmers (Ellis-Iversen et al., 2010).

Much more than just accepting change, respondents actively embraced the decree as if it were their own in order to improve their development prospects and fulfil their moral obligations in the fight against antimicrobial resistance. The notion of ownership covers such concepts as accepting responsibility, taking initiatives and, especially, making independent decisions or taking action about matters that have intentionally been delegated to or imposed upon you (Bernoux, 2002; Hussenot, 2009). Even though the requirement to use antibiograms before using CIAs calls into question their work experience, diagnostic skills and competence, veterinarians explained that they used it as an opportunity to change habits and methods in the context of a paradigm shift.

Several studies outside France have highlighted that changes in veterinary methods go hand in hand with changes in methods in animal husbandry and regulations (Sawford et al., 2013; Woods, 2013). To combat antimicrobial resistance, veterinarians tackle health issues comprehensively, reinforcing their competencies in a very broad range of activities, including animal nutrition and feeding, or environmental conditions (ambience, light), for instance (Dean et al., 2011; Lowe, 2009). From a cultural and social point of view, these efforts have led to a paradigm change in veterinary methods, shifting the emphasis to a more preventive approach (Vet Futures Project Board, 2015), regardless of the sector. Demonstrating its cost-effectiveness, the fight against antimicrobial resistance updates the belief or notion that “prevention is better than cure” (Woods, 2013) and converts it into an urgent, vital reality. To cope with the decrease in the use of antibiotics, veterinarians and farmers have to develop new strategies (Visschers et al., 2016), and veterinarians have to reconsider their profession to ensure sustainable activity (Henry et al., 2016; Lowe, 2009; Ruston et al., 2016). Veterinarians specialise in technical fields where they have strong core knowledge thanks to their veterinary education (Vet Futures Project Board, 2015), and develop new services like consultancy activities such as audits for dairy cattle, advice on livestock buildings, feed and biosecurity. Previous studies in Canada and the Netherlands have found that offering veterinary advice is an increasing part of their daily work, and have indicated that they need to extend their knowledge and skill base in animal nutrition, the environment, housing conditions, animal husbandry and pathogen control (Sawford et al., 2013; Speksnijder et al., 2015) in order to advise their clients on how to manage and prevent problems through attention to various factors influencing herd health (Vet Futures Project Board, 2015).

However in France, such shifts have not yet been documented. Although further work is needed to confirm this, our study suggests that these trends are also under way in France. Respondents described difficulties in repositioning themselves on technical animal health subjects because they are in competition with other professionals such as feed or phytotherapy sales people, agronomists, farriers, agricultural consultants, and technicians who also provide advice to farmers. In this context, several authors argue that a corresponding shift in undergraduate and postgraduate veterinary education (management and business) is needed to prepare and support veterinarians throughout this change (Richens et al., 2015) and to deal with competition (Lowe, 2009; Vet Futures Project Board, 2015).

To meet field demands and provide a faster result at a lower cost than laboratory analysis, we observed that most dairy veterinarians carry out bacterial identification themselves on milk samples. Interestingly, developing new services constitutes an opportunity to maintain their activities in rural regions, to consolidate their network by adding value to a local service, and to create a new source of income (Ruston et al., 2016). This seems particularly relevant in a context where revenue from the sale of medicines is declining due to new regulations related to antibiotics (Speksnijder et al., 2015), threatening the continuity of their activities.

5. Conclusion

Veterinarians are increasingly at the forefront of public health and biosecurity challenges posed by antimicrobial resistance. Using qualitative research methods allowed the voice of veterinary practitioners to be heard, which is an essential step in finding appropriate strategies for managing antimicrobial resistance in animal health. The use of bacterial identification and antibiograms in veterinary medicine is multifactorial: it can be explained by the development of analyses by laboratories, increasing herd sizes, the relationship between farmers and veterinarians or between veterinarians and laboratory staff, the intention of veterinarians to rely more and more on additional examinations such as these in their diagnostic approach, the growing awareness of the problem of antimicrobial resistance, the regulatory changes in recent years and, last but not least, changes in animal husbandry practices. French veterinarians have embraced the new regulation regarding the prescription of CIAs in order to fight antimicrobial resistance and to reinforce or redefine their role. These findings will be useful in helping representative veterinary bodies and regulatory authorities to design new measures, targeted communication, policies and regulations. Moreover, considering the antibiogram as the best tool for monitoring antimicrobial resistance, our results are essential for correctly using surveillance data and guiding control strategies.

Ethics approval and consent to participate

A French ethics committee “Comité de protection des personnes” was contacted but the present study did not require formal consent or approval because it was not a clinical trial. Our research nonetheless followed ethical rules in compliance with the Statement of Ethical Practice for the British Sociological Association, and consent was obtained from veterinarians before all interviews.

Consent for publication

All the authors have seen and approved this version of the manuscript. All the authors have given their consent for publication.

Availability of data and material

The data used for this study waere obtained through semi-structured interviews of veterinarians. All data analysed are included in this published article and its supplementary information files. Conditions of approval (respecting the anonymity of veterinarians) do not allow us to distribute or make available data directly to other parties.

Conflicts of interest

The authors declare no potential conflicts of interest with respect to the research, authorship, and/or publication of this article.

Funding

This work was partly supported by the French Ministry of Agriculture (http://agriculture.gouv.fr). No additional external funding was received for this study. The funders had no role in the study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Author contributions

CB, NF, AL and EG conceptualised and designed the study. DC provided resources. CB collected the data. CB, NF, AL and EG analysed and interpreted the data. CB wrote the original draft. All the authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

We would like to thank all the veterinarians who kindly gave of their valuable time to participate in this study, making this research possible.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary material related to this article can be found, in the online version, at doi:https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2018.09.009.

References

Alarcon, P., Wieland, B., Mateus, A.L.P., Dewberry, C., 2014. Pig farmers' perceptions, attitudes, influences and management of information in the decision-making process for disease control. Prev. Vet. Med. 116 (3), 223–242. https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2013.08.004.

Anonymous, 2011. Le Plan Ecoantibio 2012-2016 : réduire l'utilisation des antibiotiques vétérinaires. http://agriculture.gouv.fr/plan-antibioresistance-ecoantibio-les-40-mesures-ecoantibio-2012-2017.

Anonymous, 2016. Décret n°2016-317 du 16 mars 2016 relatif à la prescription et à la délivrance des médicaments utilisés en médecine vétérinaire contenant une ou plusieurs substances antibiotiques d'importance critique. https://www.legi-france.gouv.fr /eli/decret/2016/3/16/AGRG1515288D/jo/texte.

Bard, A.M., Main, D.C.J., Haase, A.M., Whay, H.R., Roe, E.J., Reyher, K.K., 2017. The future of veterinary communication: Partnership or persuasion? A qualitative investigation of veterinary communication in the pursuit of client behaviour change. PLoS One 12 (3), e0171380. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0171380.

Bardin, L., 2013. L'analyse de contenu (2ème édition). Presses Universitaires de France, pp. 296.

Beaud, S., Weber, F., 2003. Guide de l'enquête de terrain : Produire et analyser des données ethnographiques (Nouv. éd). La Découverte, pp. 336.

Bernoux, P., 2002. Le changement dans les organisations. Entre structures et interactions. Ind. Relat. 57-1, 77–99.

Boireau, C., Praud, A., 2016. Analyse qualitative de la participation volontaire des éleveurs français au protocole expérimental d'évaluation du test interféron-gamma. Epidémiologie et Santé Animale 69, 105–122.

Boireau, C., Dufour, B., Praud, A., 2017. The importance of communication in promoting voluntary participation in an experimental trial: a qualitative study based on the assessment of the gamma-interferon test for the diagnosis of bovine tuberculosis in France. PLoS One 12 (10), e0185799. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0185799.

Boireau, C., Morignat, É., Cazeau, G., Jarrige, N., Jouy, É., Haenni, M., Gay, É., 2018. Antimicrobial resistance trends in Escherichia coli isolated from diseased food-producing animals in France: a 14-year period time-series study. Zoonoses Public Health 65 (1), 86–94. https://doi.org/10.1111/zph.12412.

Braun, V., Clarke, V., 2014. What can "thematic analysis" offer health and wellbeing researchers? Int. J. Qual. Stud. Health Wellbeing 9. https://doi.org/10.3402/qhw.v9.26152.

British Sociological Association, 2002. Statement of Ethical Practice for the British Sociological Association (March 2002). p. 10. https://www.britsoc.co.uk/equality-diversity/statement-of-ethical-practice/#_cov.

Coyne, L.A., Latham, S.M., Williams, N.J., Dawson, S., Donald, I.J., Pearson, R.B., Pinchbeck, G.L., 2016. Understanding the culture of antimicrobial prescribing in agriculture: a qualitative study of UK pig veterinary surgeons. J. Antimicrob. Chemother. 71 (11), 3300–3312. https://doi.org/10.1093/jac/dkw300.

De Briyne, N., Atkinson, J., Pokludová, L., Borriello, S.P., Price, S., 2013. Factors influencing antibiotic prescribing habits and use of sensitivity testing amongst veterinarians in Europe. Vet. Rec. 173 (19), 475. https://doi.org/10.1136/vr.101454.

Dean, W.R., Mcintosh, W.A., Morgan Scott, H., Barling, K.S., 2011. The role of trust and moral obligation in beef cattle feed-lot veterinarians' contingent adoption of antibiotic metaphylaxis recommendations. Int. Jrnl. of Soc. Agr. Food 18 (2), 104–120.

Dent, E.B., Goldberg, S.G., 1999. Challenging "Resistance to Change". J. Appl. Behav. Sci. 35 (1), 25–41. https://doi.org/10.1177/0021886399351003.

Dunne Jr., W.M., van Belkum, A., 2014. More timely antimicrobial susceptibility testing as a tool in combatting antimicrobial resistance in clinically relevant microorganisms: is there more than one way to skin a cat? Clin. Microbiol. Newsl. 36 (19), 149–153. https://doi.org/10.1016/j.clinmicnews.2014.09.001.

Ellis-Iversen, J., Cook, A.J.C., Watson, E., Nielen, M., Larkin, L., Wooldridge, M., Hogeveen, H., 2010. Perceptions, circumstances and motivators that influence implementation of zoonotic control programs on cattle farms. Prev. Vet. Med. 93 (4), 276–285. https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2009.11.005.

EMA, EFSA, 2017. EMA and EFSA joint scientific opinion on measures to reduce the need to use antimicrobial agents in animal husbandry in the European Union, and the resulting impacts on food safety. EFSA J. 245.

Enticott, G., 2012. The local universality of veterinary expertise and the geography of animal disease. Trans. Inst. Br. Geogr. 37 (1), 75–88. https://doi.org/10.1111/j.1475-5661.2011.00452.x.

EPRUMA, 2008. Best-practice Framework for the Use of Antimicrobials in Food-producing Animals in the EU. (p. 16) FVE. (2012). Veterinarians care for animals and people: how to use antimirobials responsibly: advice for veterinarians. http://www.fve.org/veterinary/pdf/medicines/AMR%20leaflets/Horses/FVE_sheet_horses_lowres.pdf (p. 1). www.epruma.eu/component/downloads/downloads/20.html.

Garforth, C., 2015. Livestock keepers' reasons for doing and not doing things which governments, vets and scientists would like them to do. Zoonoses Public Health 62 (Suppl 1), 29–38. https://doi.org/10.1111/zph.12189.

Gibbons, J.F., Boland, F., Buckley, J.F., Butler, F., Egan, J., Fanning, S., Markey, B.K., Leonard, F.C., 2013. Influences on antimicrobial prescribing behaviour of veterinary practitioners in cattle practice in Ireland. Vet. Rec. 172 (1), 14. https://doi.org/10.1136/vr.100782.

Given, L., 2006. Qualitative research in evidence-based practice: a valuable partnership. Libr. Hi Tech. 24 (3), 376–386.

Graneheim, U.H., Lundman, B., 2004. Qualitative content analysis in nursing research: concepts, procedures and measures to achieve trustworthiness. Nurse Educ. Today 24 (2), 105–112. https://doi.org/10.1016/j.nedt.2003.10.001.

Guest, G., Bunce, A., Johnson, L., 2006. How many interviews are enough? An experiment with data saturation and variability. Field methods 18 (1), 59–82. https://doi.org/10.1177/1525822X05279903.

Henry, C., Rushton, J., Baillie, S., 2016. Exploring the sustainability of small rural veterinary enterprise. J. Small Bus. Enterp. Dev. 23 (1), 259–273. https://doi.org/10.1108/JSBED-10-2014-0166.

Hussenot, A., 2009. Manager l'appropriation des solutions TIC : des controverses aux modes d'appropriation. Systèmes d'information & management 14 (2), 65–83.

Kaufmann, J.-C., 2011. L'entretien compréhensif - L'enquête et ses méthodes (3e édition). Armand Colin p. 128.

Kotter, J.P., 1995. Leading change: why transformation efforts fail. Harv. Bus. Rev. 59–67.

Labatut, J., Aggeri, F., Girard, N., 2012. Discipline and change: how technologies and organizational routines interact in new practice creation. Organ. Stud. 33 (1), 39–69. https://doi.org/10.1177/0170840611430589.

Lowe, P., 2009. Unlocking Potential: a Report on Veterinary Expertise in Food Animal Production. p. 85. https://www.vetfutures.org.uk/download/reports/Unlocking_Potential.pdf.

Mateus, A.L., Brodbelt, D.C., Barber, N., Stärk, K.D., 2014. Qualitative study of factors associated with antimicrobial usage in seven small animal veterinary practices in the UK. Prev. Vet. Med. 117 (1), 68–78.

McInerney, J., 2016. The role of the veterinary laboratory in achieving and maintaining improved herd health. Vet. Irel. J. 6 (5), 279–283.

Mendez, D., Judd, J., Speare, R., 2013. Testing for Hendra virus: difficulties experienced by veterinarians in Queensland prior to 2011. Aust. Vet. J. 91 (8), 323–327. https://doi.org/10.1111/avj.12091.

Morley, P.S., Apley, M.D., Besser, T.E., Burney, D.P., Fedorka-Cray, P.J., Papich, M.G., 2005. American college of veterinary internal medicine. Antimicrobial drug use in veterinary medicine. J. Vet. Internal Med. 19 (4), 617–629.

Mukamurera, J., Lacourse, F., Couturier, Y., 2006. Des avancées en analyse qualitative : pour une transparence et une systématisation des pratiques. Recherches Qualitatives 26 (1), 110–138.

Olivier De Sardan, J.-P.O., 2008. La rigueur du qualitatif : Les contraintes empiriques de l'interprétation socio-anthropologique. Anthropologie prospective. Editions Academia p. 365.

Paillé, P., 2003. Changement organisationnel et mobilisation des ressources humaines. L'Harmattan p. 260.

Paillé, P., Mucchielli, A., 2012. L'analyse qualitative en sciences humaines et sociales. Armand Colin p. 424.

Peterson, L.R., Dalhoff, A., 2004. Towards targeted prescribing: will the cure for antimicrobial resistance be specific, directed therapy through improved diagnostic testing? J. Antimicrob. Chemother. 53 (6), 902–905. https://doi.org/10.1093/jac/dkh187.

Richens, I.F., Hobson-West, P., Brennan, M.L., Lowton, R., Kaler, J., Wapenaar, W., 2015. Farmers' perception of the role of veterinary surgeons in vaccination strategies on British dairy farms. Vet. Rec. 177 (18), 465. https://doi.org/10.1136/vr.103415.

Robinson, P.A., Epperson, W.B., 2013. Farm animal practitioners' views on their use and expectations of veterinary diagnostic laboratories. Vet. Rec. 172, 503.

Robinson, P.A., Epperson, W.B., Huston, C.L., Pace, L.W., Wills, R.W., Cosby, A.G., 2012. Factors influencing diagnostic sample submission by food animal veterinarians in

Mississippi. Vet. Ital. 48, 31–39.
Ruston, A., Shortall, O., Green, M., Brennan, M., Wapenaar, W., Kaler, J., 2016. Challenges facing the farm animal veterinary profession in England: a qualitative study of veterinarians' perceptions and responses. Prev. Vet. Med. 127, 84–93. https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2016.03.008.
Sawford, K., Vollman, A.R., Stephen, C., 2013. A focused ethnographic study of Alberta cattle veterinarians' decision making about diagnostic laboratory submissions and perceptions of surveillance programs. PLoS One 8 (5), e64811. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0064811.
Silley, P., Simjee, S., Schwarz, S., 2012. Surveillance and monitoring of antimicrobial resistance and antibiotic consumption in humans and animals. Revue Scientifique Et Technique (International Office of Epizootics) 31 (1), 105–120.
Speksnijder, D.C., Jaarsma, A.D.C., van der Gugten, A.C., Verheij, T.J.M., Wagenaar, J.A., 2015. Determinants associated with veterinary antimicrobial prescribing in farm animals in the Netherlands: a qualitative study. Zoonoses Public Health 62 (Suppl 1), 39–51. https://doi.org/10.1111/zph.12168.
Tracy, S.J., 2010. Qualitative quality: eight a"big-tent" criteria for excellent qualitative research. Qual. Inq. 16 (10), 837–851. https://doi.org/10.1177/1077800410383121.
van Belkum, A., Dunne, W.M., 2013. Next-generation antimicrobial susceptibility testing. J. Clin. Microbiol. 51 (7), 2018–2024. https://doi.org/10.1128/JCM.00313-13.
Vandeweerd, J.-M., Vandeweerd, S., Gustin, C., Keesemaecker, G., Cambier, C., Clegg, P., Gustin, P., 2012. Understanding veterinary practitioners' decision-making process: implications for veterinary medical education. J. Vet. Med. Educ. 39 (2), 142–151. https://doi.org/10.3138/jvme.0911.098R1.
Vet Futures Project Board, 2015. Taking Charge of Our Future: a Vision for the Veterinary Profession for 2030 (Vetfutures). p. 64. https://vetfutures.org.uk/download/reports/Vet%20Futures%20report.pdf.
Visschers, V.H.M., Backhans, A., Collineau, L., Iten, D., Loesken, S., Postma, M., Stärk, K.D.C., 2015. Perceptions of antimicrobial usage, antimicrobial resistance and policy measures to reduce antimicrobial usage in convenient samples of Belgian, French, German, Swedish and Swiss pig farmers. Prev. Vet. Med. 119 (1–2), 10–20. https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2015.01.018.
Visschers, V.H.M., Backhans, A., Collineau, L., Loesken, S., Nielsen, E.O., Postma, M., Stärk, K.D.C., 2016. A comparison of pig farmers' and veterinarians' perceptions and intentions to reduce antimicrobial usage in six european countries. Zoonoses Public Health 63 (7), 534–544. https://doi.org/10.1111/zph.12260.
WHO, FAO, OIE, 2016. Antimicrobial Resistance: a Manual for Developing National Action Plans. p. 32. http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/204470/9789241549530_eng.pdf?sequence=1&isAllowed=y.
Woods, A., 2013. Is prevention better than cure? The rise and fall of veterinary preventive medicine, c.1950-1980. Soc. Hist. Med. 26 (1), 113–131. https://doi.org/10.1093/shm/hks031.

Annexe 5 : Quatrième article – Comparative epidemiology of *E. coli* resistance to third-generation cephalosporins in diseased food-producing animals

Veterinary Microbiology 223 (2018) 72–78

Contents lists available at ScienceDirect

Veterinary Microbiology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/vetmic

Comparative epidemiology of *E. coli* resistance to third-generation cephalosporins in diseased food-producing animals

Clémence Bourély[a,b,c], Claire Chauvin[d], Éric Jouy[e], Géraldine Cazeau[b], Nathalie Jarrige[b], Agnès Leblond[c], Émilie Gay[b,*]

[a] *École Nationale des Services Vétérinaires, ENSV, VetagroSup, Marcy l'Étoile, France*
[b] *Université de Lyon, ANSES, Laboratoire de Lyon, Unité EAS, 31 avenue Tony Garnier, 69007 Lyon, France*
[c] *EPIA, UMR 0346, Epidémiologie des maladies Animales et zoonotiques, INRA, VetagroSup, University of Lyon, F-69280, Marcy L'Etoile, France*
[d] *ANSES, Laboratoire de Ploufragan-Plouzané, Unité Epidémiologie et Bien-être du porc, Université Bretagne Loire, Technopôle Saint-Brieuc Armor, 22440 Ploufragan, France*
[e] *ANSES, Laboratoire de Ploufragan-Plouzané, Unité Mycoplasmologie, Bactériologie et Antibiorésistance, Université Bretagne Loire, Technopôle Saint-Brieuc Armor, 22440 Ploufragan, France*

ARTICLE INFO

Keywords:
Antimicrobial resistance
Third-generations cephalosporin
Surveillance
Critically important antimicrobial
Animal health
RESAPATH

ABSTRACT

Categorized by WHO as critically important antibiotics, third-generation cephalosporins (3GCs) are one of the latest therapeutic alternatives to fight severe infectious diseases in humans. Some antibiotics belonging to this class are prescribed to treat food-producing animals in specific pathological contexts. Preserving the effectiveness of 3GCs requires characterization and careful monitoring of 3GCs resistance and the identification and implementation of measures that can limit this antimicrobial resistance (AMR). Here, we characterized the 3GCs resistance in *Escherichia coli* isolated from diseased animals. Using data collected from broilers, hens, calves, piglets, sows, turkeys and ducks between 2006 and 2016 by the French surveillance network of AMR in pathogenic bacteria of animal origin (called RESAPATH), we investigated the dynamics of resistance to 3GCs. Our non-linear analysis applied to time series showed that the evolution of *E. coli* resistance to 3GCs is specific to each animal category. From 2006 to 2010, resistance to 3GCs increased for most animal categories. We observed peaks of high-level of resistance for hens (21.5% in 2010) and broilers (26.7% in 2011), whereas trends stayed below 10% for the other animal categories throughout the study period. Resistance later decreased and, since 2014, 3GCs resistance has dropped below 10% for all animal categories. The parallel between trends and measures to limit AMR over the period shed lights on the impact of practices changes, public policies (EcoAntibio Plan) and sector-led initiatives (moratorium in swine sector). Finally, they highlight the usefulness and importance of AMR surveillance networks in animal health, such as RESAPATH.

1. Introduction

The last-generation cephalosporins (i.e. third-generation (3GCs) and fourth-generation cephalosporins (4GCs)) are one of the last therapeutic alternatives to fight severe infectious diseases in humans (WHO, 2017). Considered as critically important antibiotics (CIA) (Collignon et al., 2009; WHO, 2017), these antibiotics have been classified of highest priority for human medicine. In France, last-generation cephalosporins are used in veterinary medicine primarily to fight infections caused by *Escherichia coli*, a major pathogen in animal health. Four 3GCs and 4GCs antibiotics (cefovecin, cefoperazone, cefquinome and ceftiofur) are licensed and sold in France for animal use. These antibiotics are approved for parenteral administration in calves, beef cattle, pigs, cats, dogs and horses, for parenteral and intramammary administration in dairy cattle, and they have no label for poultry (Anses-ANMV, 2017a) but *in ovo* injections of 3GCs were reported before 2014 (Anses, 2014).

Resistance to 3GCs and 4GCs is a major public health concern. Around the world, attention mainly focuses on livestock animals due to their potential role in the global transfer of resistant bacteria and resistance genes to humans though the food chain or by contamination of the environment (Hale et al., 2012; Geenen et al., 2013; Woolhouse et al., 2015). In addition, bacteria in farm animals are widely considered as the reservoir for antibiotic resistance genes (Hu et al., 2016). Preserving the effectiveness of 3GCs and 4GCs, requires characterization and careful monitoring of the dynamics of bacterial resistance to

* Corresponding author.
E-mail address: emilie.gay@anses.fr (É. Gay).

https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2018.07.025
Received 27 March 2018; Received in revised form 30 July 2018; Accepted 30 July 2018
0378-1135/ © 2018 Elsevier B.V. All rights reserved.

these antibiotics and identification and implementation of measures that can curb this resistance. In this context, studying resistance to last-generations cephalosporins relies strongly on efficient surveillance and monitoring systems in both humans and animals. Hence, continuous surveillance of resistance at national and international levels is important to quantify the spread of resistance, to guide the design of appropriate policies and antimicrobial stewardship, and to assess the efficacy of sector-led initiatives or measures already implemented (WHO, 2014).

E. coli, a member of the *Enterobacteriaceae* family, is both a common commensal organism of the mammalian intestinal tract and one of the most frequently isolated pathogens in food-producing animals. *E. coli* is also considered to be an excellent sentinel of antimicrobial resistance (AMR) for a wide range of animal species (De Graef et al., 2004; Aarestrup et al., 2008). *E. coli* can potentially confer resistance to other bacteria through horizontal gene transfer and it is a key source of dissemination of resistance genes (Tenover, 2006). In bovine and swine productions, *E. coli* is one of the most frequent etiological agents of digestive disorders in calves and piglets (DebRoy and Maddox, 2001) and the most frequent bacterial species isolated from sows with urinary tract infections (Moreno et al., 2017). In the avian sector, *E. coli* causes mainly acute fatal septicaemia (Dho-Moulin and Fairbrother, 1999). In animal health, ceftiofur is used as antibiotic resistance marker for 3GCs resistance. Previous studies has shown that the resistance of *E. coli* strains to ceftiofur varies according to the animal species considered (Zhang et al., 2017; Boireau et al., 2018b), but these studies have not examined resistance according to age, production type nor pathology. However, due to differences in practices (e.g. production system, antibiotic use and control measures), the evolution of 3GCs resistance in *E. coli* may vary over time and between animal categories (animal species and production types). The description of resistance to 3GCs lays the groundwork for understanding the evolution of resistance and for assessing the potential impact of control measures implemented to limit AMR. A risk analysis perspective requires a more detailed characterization of 3GCs resistance levels and trends in animal health.

The aim of this study was to characterize the trends of resistance to 3GCs in *E. coli* isolates from seven food-producing animal categories (broilers, hens, calves, piglets, sows, turkeys and ducks) in specific pathological contexts between 2006 and 2016. The comparison of resistance trends and policy measures or sector-led initiatives to limit AMR over the period provided the opportunity to examine the potential impact of changes in practices.

2. Materials and methods

2.1. Source of data

This retrospective study was performed using data from the French Surveillance Network for AMR in pathogenic bacteria from animals, called RESAPATH. It is coordinated by the French Agency for Food, Environmental and Occupational Health & Safety (ANSES). Created in 1982 to monitor AMR in cattle, RESAPATH has expanded to include swine and poultry since 2000 and all animal species since 2007. RESAPATH collects data from antimicrobial susceptibility testing (more than 50,000 in 2016) performed by French veterinary laboratories that have joined the surveillance network voluntarily (ANSES, 2017). Initially, antimicrobial susceptibility testing (antibiograms) are requested by veterinarians in a pathological context for diagnostic purposes. Laboratories participating in RESAPATH use standard bacteriological culture techniques and methods for bacterial isolation and identification. Antibiograms are performed using the disk diffusion method, according to the recommendations of the Antibiogram Committee of the French Society of Microbiology (CA-SFM). Inhibition zone diameters are communicated to ANSES and compiled in a database. The RESAPATH laboratories have been participating in annual ring trials since 2006, which contributes to the quality control of the data.

From the RESAPATH database, we extracted data regarding *E. coli* resistance to ceftiofur from 2006 to 2016. We selected the seven food-producing animal species or production type for which *E. coli* was the most frequent bacterial species isolated by the network: broilers, hens, turkeys, ducks, piglets, sows and calves (the RESAPATH did not collect enough data to investigate 3GCs AMR in fish and rabbits over the period). For each livestock animal category, considering antibiotic use and practices depending on the pathological context, we selected the major disease caused by *E. coli:* septicaemia for poultry, digestive disorder for piglets and calves, genitourinary infection for sows. Thus, variables extracted included animal species, production type, clinical disease, sampling date and inhibition zone diameter. In accordance with the approved breakpoints from the veterinary section of the CA-SFM, we categorized the isolates as susceptible ($S \geq 21$ mm), intermediate ($18 \leq I < 21$) or resistant ($R < 18$ mm).

To examine a parallel between the evolution of resistance of *E. coli* to 3GCs over the period and potential changes in antibiotic use, we listed all the events (regulatory measures, action plan to fight AMR, initiatives by sector professionals) potentially related to the control of antimicrobial use and AMR or change in husbandry practices in animal health in France from 2006 to 2016. We questioned French experts in different livestock animal sectors to compile information on changes in practices. From the French Agency for Veterinary Medicinal Products (ANMV), we collected data regarding the Animal Level of Exposure to Antimicrobials (ALEA) indicators for 3GCs,which represent the levels of exposure to 3GCs through oral and parenteral administrations routes by dividing the weight of animals treated with the weight of the population potentially consuming antimicrobials (ANSES-ANMV, 2017b). As off-label uses are not recorded through sales data (ANSES-ANMV, 2017b), no ALEA does not mean no usage. In addition, we consulted French regulations to identify policy and regulatory measures linked to the control of AMR.

2.2. Data analysis

From an epidemiological point of view, the event of particular interest is the non-susceptibility of the pathogen to ceftiofur, indicating that it is no longer a wild-type strain. Intermediate isolates were therefore grouped together with resistant isolates in the non-susceptible population, referred to as resistant in this study. The indicator of AMR was defined for each animal category as the proportion of the number of resistant strains relative to the total number of strains tested.

In time-series analysis, a trend reflects the structural dynamics of a phenomenon and is used to monitor long-term movements (Bourbonnais and Terraza, 2010), in particular in AMR (López-Lozano et al., 2000; Mühlemann et al., 2006; Doernberg et al., 2015; Boireau et al., 2018b). By definition, a trend is the long-term variation and is one of the components of a time series along with seasonality and noise (i.e. the residual component). The dynamics of 3GCs resistant *E. coli* isolates was modelled using generalized additive models (GAM) (Dominici et al., 2002) to capture trends and seasonality. The time step was chosen so as to be able to include at least 25 antibiograms per time step (Barlow, 2011) and to ensure the validity of the model (independent and normally distributed residuals). For broilers, hens, piglets and calves we used a monthly time step, whereas we chose a bimonthly time step for turkeys, ducks, and sows.

The time-series analysis spanned a period running from January 2006 to December 2016, except for ducks, for which the study period was reduced to 2008–2016 (due to the limited number of antibiograms collected by the network before 2008). Using count data, the monthly or bimonthly number of resistant strains was modelled with a quasi-Poisson regression with an offset equal to the log of the total number of strains submitted monthly or bimonthly. AMR trends were modelled for each animal category and analysed using a separate and independent GAM. The models used in this paper included non-parametric smoothing functions of calendar time selected by cross-validation and

Table 1
Proportion of resistance to ceftiofur in *E. coli* isolates, according to livestock animal category and pathology, between 2006 and 2016 (2008 and 2016 for ducks).

Animal category	Pathology	Total number of antibiograms (disk diffusion method)	Number of resistant isolates (proportion)
Broilers	Septicaemia	12,758	992 (7.8%)
Hens	Septicaemia	10,527	715 (6.8%)
Turkeys	Septicaemia	10,835	169 (1.6%)
Ducks	Septicaemia	4,875	70 (1.4%)
Calves	Digestive disorder	25,246	1,766 (7.0%)
Piglets	Digestive disorder	6,055	337 (5.6%)
Sows	Genitourinary infection	4,378	119 (2.7%)

designed to control for trend and seasonality. The models were structured and analysis performed as described in Boireau et al. (Boireau et al., 2018b). Confidence intervals (CIs) of the predictions and proportions were calculated using the exact binomial method (p-values were two-sided). We used P-values of ≤ 0.05 to identify statistically significant differences. R (R Core Team, 2017), version 3.4.0. (2017-04-21) was used for all data manipulations and statistical analyses (gamm4 package for GAM implementation).

3. Results

3.1. Resistance trends

A total of 74,674 antibiograms collected by the RESAPATH between 1 January 2006, and 31 December 2016 were analysed (Table 1). The proportion of *E. coli* isolates resistant to ceftiofur across the entire study period ranged from 1.6% for turkeys with septicaemia to 7.8% for broilers with septicaemia. Considering the levels of resistance over the entire period (Table 1), they were relatively low and similar between all animal categories.

However, time-series analyses showed that the dynamics of the proportions of resistant *E. coli* strains over the period varied among the seven animal categories investigated (Fig. 1 - in the interest of clarity, CIs are not given in this figure but in the Supplementary Figure). There were no seasonal cycles: the seasonal component in the models was not significant for any animal category. Trend curves of resistances were non-linear, except for ducks, whose resistance trend to ceftiofur was stationary at 1.4% [1.1; 1.8].

We distinguished three resistance dynamics according to levels of resistance and the variations observed: *(i)* resistance with variations of high amplitude and rapid changes for broilers and hens, *(ii)* resistance with variations of relatively lower amplitude for piglets, sows, calves, turkeys, *(iii)* stable resistance levels for ducks. From 2006–2016, the proportions of resistance to ceftiofur exceeded 10% only for broilers and hens. For calves, resistance mainly varied between 5 and 10%, but fluctuated between 0 and 5% for sows and turkeys over the study period.

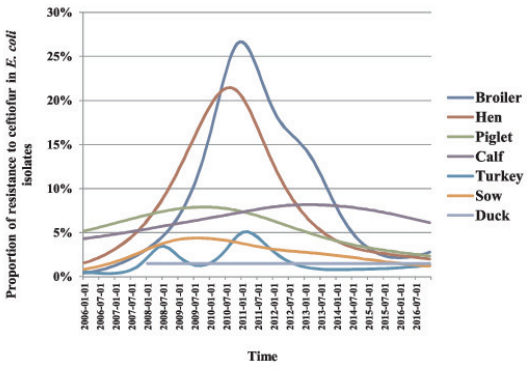


Fig. 1. Trends of resistance to ceftiofur in *E. coli* isolates from broilers, hens, ducks, piglets, calves, turkeys and sows between 2006 and 2016, based on RESAPATH data.

The trends of resistance to ceftiofur were quite similar in amplitude and variation for hens and broilers compared with resistance trends in other animal categories. We observed a steep increase from 2006 to 2010, reaching a peak of 21.5% [18.5; 24.4] in August 2010 for hens and of 26.7% [22.9; 30.4] in December 2010 for broilers. Thereafter, the proportions of resistance dropped sharply before stabilizing between 2 and 3% of resistance in 2015 and 2016 (in December 2016, 2.0% [1.2; 2.8] for hens and 2.8% [1.7; 3.9] for broilers). For calves with digestive disorders, resistance rose from 4.3% [3.0; 5.7] in January 2006 to a maximum of 8.2% [7.3; 9.0] in February 2013. Thereafter, resistance stabilized and declined to 6.2% [5.1; 7.2] in December 2016. In comparison, for piglets with digestive disorders the increase occurred over shorter period of time: proportion of resistance increased up to 8.0% [6.5; 9.3] in November 2009 and then decreased to 2.4% [1.2; 3.5] in December 2016. For sows with genitourinary infections, resistance to ceftiofur rose during the period from nearly nil resistance 0.8% [0.0; 1.6] in January 2006 to up to 4.4% [3.1; 5.7] in July 2009, before decreasing slightly in 2015 and 2016. Resistance trends to ceftiofur clearly evolved in parallel for piglets and sows. Contrary to the other animal categories, the trend of resistance to ceftiofur in *E. coli* isolated from turkeys with septicaemia showed two peaks of resistance: the first one at 3.5% [2.6; 4.4] in July 2008 and the second peak occurred in March 2011 at 5.1% [4.1; 6.1].

3.2. List of initiatives and control measures

We identified and listed all the French measures and initiatives (Table 2) related to AMR control and particularly 3GCs resistance during the 2006–2016 period. Most measures and initiatives recorded took place during the second half of the study period, between 2011 and 2016.

3.3. 3GCs usage indicator

ALEA annual indicators were only available in cattle and swine, all production types considered. In cattle, ALEA annual indicator increased from 0.026 in 2006 to 0.034 in 2012 and decrease afterwards (Fig. 2, ANSES-ANMV, 2017b). In swine sector, ALEA annual indicator was around 0.015 before decreasing from 2011 to 2016.

4. Discussion

4.1. The 3GCs resistance dynamics in E. coli isolates from food-producing animals

Here, we characterized the 3GCs resistance dynamics in *E. coli* isolates from seven diseased food-producing animal categories using data collected from the RESAPATH network. Using GAM models, we assessed the changes in AMR over an 11 year period (2006–2016). To the best of our knowledge, this is the first study to provide such large overview of 3GCs resistance in pathogenic *E. coli* in food production animals. Trend analyses showed significant variation for almost all animal categories considered. Overall, the resistance proportion dynamics showed notable differences in the dynamics of the various animal categories, and in comparison with a previous study performed in France (Boireau et al., 2018b), the stratification by animal categories provided a more accurate description of resistance to 3GCs. We observed high peaks of resistance for broilers and hens, whereas levels

Table 2
List of the measures and initiatives related to the fight against antimicrobial resistance between 2006 and 2016 in France.

Measures and initiatives	Sector concerned	Period/Date	Short description
Moratorium in swine sector	Swine sector	Announced in 2010 and officially enforced since 1 May 2011	Initiative by sector professionals to voluntarily limit the use of third-generation and four-generation cephalosporins (3GCs and 4GCs) on all French farms
EcoAntibio Plan	All	Launched in November 2011 after two years of preparatory work, the plan was considered effective from 2012 to 2016	National action plan to fight antimicrobial resistance in animal health, intended to promote the responsible use of antibiotics. It set a quantitative target (25% reduction in the use of antibiotics in veterinary medicine in 5 years) and qualitative objectives (reduction of the use of critically important antibiotics (CIAs)). It included two awareness campaigns: the first in September 2014, the second in September 2016.
European decision	All	EMA Opinion on the referral procedure regarding all veterinary medicinal products containing 3GCs and 4GCs, adopted in October 2011, became a decision on 13 January 2012	Decision by the European Commission based on the European Medicine Agency opinion regarding all veterinary medicinal products containing systemically administered (parenteral and oral) 3GCs and 4GCs intended for use in food-producing species (Article 35 of Directive 2001/82/EC). This decision recommended changes for the product information sheet: to delete, where applicable, all indications related to poultry, and to add for all products: "*Do not use in poultry (including eggs) due to risk of spread of antimicrobial resistance to humans*".
Good practices guide for antibiotic use	Bovine, poultry and swine sectors	Announced by the EcoAntibio Plan, published in June 2014	Guide established by technical veterinary association in charge of continuing education and training of members
Law for the future of agriculture, food and forestry	All	Announced in November 2012 and officially published in October 2014	This act regulates the marketing of antibiotics, putting an end to rebates, and discounts on antibiotics (Article 48) and sets a goal of reducing the consumption of CIAs by 25% by the end of 2016.
Ministerial Order of 19 December 2014	All	Announced by the EcoAntibio Plan, published in December 2014	This order published the list of authorized veterinary medicines for approved groups of breeders (antibiotics were removed from this list).
Ministerial Order of 22 July 2015	All	Announced by the EcoAntibio Plan, published in July 2015	This order mentions good practices related to the use of drugs containing one or more antibiotics in veterinary medicine (included 3GCs and 4GCs)
Good practices guide for antibiotic use	Veal calves	Announced by the EcoAntibio Plan, published in September 2015	Guide established by the technical veterinary association in charge of continuing education and training of members
Decree no. 2016-317 and Ministerial Order of 18 March 2016	All	Announced by the EcoAntibio Plan, published in March 2016 and officially applied since 1 April 2016	The order lists the CIAs available in veterinary medicine (3GCs, 4GCs and fluoroquinolones, based on previous WHO lists). The decree restricts the use of CIAs in animal health, requiring bacterial identification and susceptibility testing prior to their use.

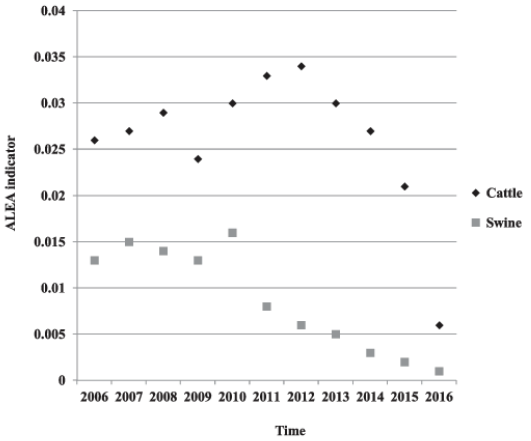


Fig. 2. Evolution of the annual Animal Level of Exposure to Antimicrobials (ALEA) indicators in cattle and swine (all production types considered) over the period 2006–2016 (ANSES-ANMV, 2017b).

stayed below 10% for the other animal categories throughout the period. Our results also highlighted an increase in 3GCs resistance for turkeys, broilers and sows, for which levels were close to zero in 2006. The proportion of resistance to 3GCs were lower in December 2016 than at other time points during the period studied, but the change in resistance is nevertheless a cause for concern because these last-generation antimicrobial agents constitute last-resort therapy for severe human diseases and our results indicate that resistance can increase very suddenly. Careful monitoring must continue.

To properly compare our results with other published studies, various factors need to be taken into account, including sample selection and size, the method of strain collection, the bacterial population studied, the time and place of the study, the methods of susceptibility testing performed, the breakpoints used and the analyses carried out. Differences in these factors make data comparison difficult.

In Europe, the levels of resistance to 3GCs in commensal *E. coli* isolates from food production animals are annually reported by European Member States through the European plan for the monitoring and control of AMR. Our findings are consistent with levels of resistance observed in commensal *E. coli* isolated from broilers (5.1%) and turkeys (2.3%) in Europe in 2014 (EFSA and ECDC, 2016). More specifically, using logistic regression to assess the statistical significance of temporal variations, the report mentioned that 3GCs resistance proportions in commensal *E. coli* isolates from broilers in France increased between 2008 and 2014, reaching 4.0% in 2014. However, our results showed that 3GCs resistance in clinical *E. coli* isolates from calves with digestive disorders has been greater than 5% since 2007, whereas 3GCs resistance proportion of commensal *E. coli* isolates of caecal content from calves were either not detected or reported at low levels in Europe since 2009 (1.5% in France in 2015) (EFSA and ECDC, 2017). This difference highlights the necessity to monitor AMR in both commensal and pathogenic isolates to capture the full picture of AMR.

In addition to European monitoring, a few studies have to date investigated resistance trends to 3GCs or 4GCs in *E. coli* strains in animal production in other countries: one in the United States about *E.coli*

clinical isolates from cattle, chicken and pigs (Tadesse et al., 2012), two in China (one focusing on *E. coli* from sick chickens (Chen et al., 2014), the other on commensal *E. coli* from chicken and swine (Zhang et al., 2017)) and one in Belgium focusing on commensal *E. coli* from veal calves, broilers and pigs (Hanon et al., 2015). However, these studies generally used tests on annual proportions to detect linear trends (Cochran-Armitage test for trends) and thus were not able to detect non-linear variations in the series. Authors reported resistance to 3GCs below 20%, except Zhang et al. (2017) who described high levels of resistance (ranging between 36 and 61%). We assume that the use of ceftiofur in day-old chicks in China partly explains this difference. This further underscores the importance of monitoring resistance to 3GCs and setting up appropriate policies in countries where the use of these antibiotics is not restricted (Viale et al., 2015).

4.2. RESAPATH: usefulness and limits

The major strength of our study was the availability of data from an ongoing nationwide surveillance system for AMR in animal health: the RESAPATH network. RESAPATH is unique in the world (ANSES, 2017) and our results pointed out its usefulness for monitoring 3GCs resistance in *E. coli*. Focusing on pathogenic animal bacteria, RESAPATH is complementary to the other surveillance systems targeting commensal bacteria isolated from food-producing animals and in the food chain in France (Salmonella Network and European plan for the monitoring and control of AMR) (EFSA and ECDC, 2017). Not all French veterinary laboratories are members of RESAPATH (in 2015, 74 were members out of about 110 in the country), but RESAPATH receives the majority of the antibiograms performed in a clinical context in France (Boireau et al., 2018a). This high amount of data demonstrates that building a surveillance network on existing practices can limit the cost of monitoring. The structure of RESAPATH and its long history provide for the collection of numerous variables on antibiograms performed by member laboratories, such as sampling dates and information on animals. These types of data were particularly useful and relevant for our study to accurately characterize the dynamics of resistance to 3GCs and to carry out comparative epidemiology. Thus, in comparison with the methodological or financial difficulties of obtaining higher quality or quantity data through a one-off monitoring programme (de Jong et al., 2014), RESAPATH is an effective and pragmatic network enabling large-scale analysis of AMR in animal health, especially 3GCs resistance in *E. coli*.

Nevertheless, this study had several limitations due to potential selection bias in our data, because laboratories join the RESAPATH on a voluntary basis and antibiograms rely on decisions taken by veterinarians during their veterinary practice. We could suppose that a history of clinical disease or a large size of the herd could prompt sample submission by veterinarians. In addition, it was not possible to differentiate first and subsequent sample submissions and we simply assumed that multiple sampling from the same animal did not occur frequently. Although these biases can lead to a lack of representativeness and a misestimation of the levels of resistance, if biases do not vary over time, the observed resistance trends remain meaningful. An assessment of the network in 2015 concluded that the antibiograms collected by the RESAPATH were representative of the antibiograms performed in France in animal health (Boireau et al., 2018a). Finally, as RESAPATH laboratories performed antibiograms using disk diffusion method, which is a qualitative method, the network did not collect information regarding the real minimal inhibitory concentrations. Despite a good standardization, isolates could be misclassified as resistant or susceptible (leading to a measurement bias) because disk diffusion method remains manual. Nevertheless, we assume that the annual participation of laboratories to quality assurance proficiency tests contributes to control data and limit such misclassifications.

4.3. Parallel with antibiotic use and control measures

As a relevant surveillance network, RESPATH could contribute to providing up-to-date and relevant information to monitor the effectiveness of antibiotic stewardship programs, public health measures, infection control policies and therapy guidelines. The investigation of changes in resistance to 3GCs over time in *E. coli* make possible to examine the potential impact of changes in antibiotic use and practice. Indeed, the main indications for 3GCs are consistent with the major diseases caused by *E. coli* selected for each livestock animal category in this study (except for poultry, 3GCs have no label for them).

No adequate data are available to draw a relevant parallel between antibiotic use and 3GCs resistance trends in France. Antibiotic use is approximated by annual sales of antibiotics monitored since 1999, but there may be a difference between sales and use, and these data do not distinguish between animal species (broilers *versus* hens for instance) and off-label uses cannot be quantified (ANSES-ANMV, 2017b). However, ALEA annual indicators already provide clues regarding the exposure of cattle and swine to 3GCs over the period 2006–2016 in France. Ceftiofur injection in calves selects for resistance (Pereira et al., 2014), but 3GCs are rarely used to treat sick calves in France (Jarrige et al., 2017). Ingestion of treated cows' milk by calves also selects resistance determinants (Pereira et al., 2014; Maynou et al., 2017): this practice may have contributed to the selection of resistant germs in calves (Berge et al., 2006; Pereira et al., 2014; Maynou et al., 2017) and may explain the increase in resistance from 2006 to 2012. In France, 3GCs and 4GCs are forbidden in broilers and hens, but *in ovo* injections of 3GCs were reported in the first half of the period (ANSES, 2014). This practice is known to select for resistance (Baron et al., 2014) and it can explain the 3GCs resistance dynamics if we consider the vertical dissemination of resistance from hatcheries to downstream productions (Dutil et al., 2010). The inversion of 3GCs resistance trend observed in broilers and hens coincides with changes in hatchery practices. For turkeys, the observed peaks of resistance may be linked to an increase in use due to health issues, as reported in 2007 by the *Observatoire avicole des consommations antibiotiques* (Chauvin et al., 2005). In the swine sector, several studies have demonstrated how the use of 3GCs in pigs contributes to the selection for resistant strains in the digestive tract of animals (Fleury et al., 2015; Lin et al., 2017). The moratorium to limit the use of 3GCs and 4GCs in the swine sector (Table 2) led to a decrease in 3GCs use as described in Fig. 2 with the decrease in annual ALEA indicator from 2011 to 2016 (ANSES-ANMV, 2017b), which likely contributed to the decrease in resistance observed after 2010 in sows and piglets.

Despite continuing uncertainty about the actual effective period of control measures and a certain lag (variable between animal categories) between implementations of measures and their potential effect on AMR, we observed that the stabilization and decrease in 3GCs resistance trends began before the EcoAntibio Plan in the poultry and swine sectors. In contrast, the stabilization and decrease of resistance trends in calves and turkeys coincide with the implementation period of the EcoAntibio plan, related ministerial orders and the production of good practices guides. Except for calves, the drop in 3GCs resistance in *E. coli* strains began before the publication of laws, miniterial orders and decrees related to antibiotic use, particularly the Decree no. 2016-317 (March 2016) that restricts the use of last-generations cephalosporins in veterinary medicine. Nevertheless, we assume that the anticipation of new regulations after 2010 contributed to more prudent use of antibiotics influencing the *E. coli* resistance trends to last-generations cephalosporins.

In this study, we were able to draw a parallel between resistance trends and the time of implementation of measures to limit AMR, but we were not able to confront resistance trends and antimicrobial use directly in the models due to lack of available data by animal production in France. There is a clear need for measuring antimicrobial usage by animal species, or even better by animal productions, to conduct

further analysis to evaluate the impact of usage on resistance. Besides, even if it's not possible to directly demonstrate the causality from the parallel between resistance trends and practices changes (it is not a randomized controlled trial), the time sequence comparisons are essential piece of evidence in favor of a causal inference hypothesis between resistance dynamics, antimicrobial usage and practice changes. We assume that temporality, plausibility and consistency are here important part of the overall evidence about potential causality.

5. Conclusion

Our non-linear analysis applied to time series described the resistance dynamics of *E. coli* to 3GCs in seven animal production categories and specific pathological contexts. The comparative epidemiology of resistance showed that resistance trends to 3GCs varied greatly between the food-production animal categories considered. These changes likely reflect notable differences in practice and use of last-generations cephalosporins. Although variation in resistance can occur very quickly, our findings proved that rising trends can regress rapidly as well. Overall, our results highlighted some parallels between resistance trends and changes in practice. Knowledge of temporal variation in resistance to last-generations cephalosporins with regular updates is essential for estimating the magnitude of the potential threat to public health, for designing efficient control strategies and for assessing their effectiveness in order to preserve these critically important antibiotics. There is a clear need for precisely measuring antimicrobial usage by animal species to conduct further analysis confronting resistance trends and antimicrobial usage in animal health. This work was made possible thanks to the comprehensiveness of an established national surveillance network for AMR in pathogenic bacteria from animals, called RESAPATH. To be able to quantify the burden of AMR and to measure the impact of interventions, there is clearly a need to improve or set up surveillance networks able to monitor resistance, such as resistance to last-generations cephalosporins, in pathogens of food-producing animals in other countries.

Author contributions

All the authors read and approved the final manuscript.

Funding

This work was partly supported by the French Ministry of Agriculture (http://agriculture.gouv.fr). No additional external funding was received for this study. The funders had no role in study design, data collection, and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Conflicts of interest

The authors declare no potential conflicts of interest with respect to the research, authorship, and/or publication of this article.

Data availability

The data used for this study was obtained from the RESAPATH network and the access to data is controlled by the French Agency for Food, Environmental and Occupational Health & Safety (ANSES). Conditions of approval (respecting the anonymity of farms and laboratories) do not allow us to distribute or make available data directly to other parties.

Acknowledgements

The authors would like to thank all the volunteer laboratories that have been collecting and sending antibiogram results for several years. The authors are particularly grateful to Christelle Philippon, RESAPATH's secretary, for her meticulous follow-up of laboratories and careful data collection, and Jean-Luc Vinard, RESAPATH's data architect, for his careful management of the database. We also thank the French Agency for Food, Environmental and Occupational Health & Safety (ANSES) which funded the RESAPATH.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary material related to this article can be found, in the online version, at doi:https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2018.07.025.

References

Aarestrup, F.M., Wegener, H.C., Collignon, P., 2008. Resistance in bacteria of the food chain: epidemiology and control strategies. Expert Rev. Anti. Ther. 6, 733–750. https://doi.org/10.1586/14787210.6.5.733.

ANSES, 2014. Assessment of the Risks of Emergence of Antimicrobial Resistance Associated With Modes of Antibiotic Use in the Field of Animal Health. pp. 94. (Anses opinion). https://www.anses.fr/en/system/files/SANT2011sa0071RaEN.pdf.

ANSES, 2017. Réseau d'épidémiosurveillance de l'antibiorésistance des bactéries pathogènes animales. pp. 148. https://www.anses.fr/fr/system/files/LABO-Ra-Resapath2016.pdf.

ANSES-ANMV, 2017a. Index des Médicaments vétérinaires autorisés en France [WWW Document]. Index RCP. URL. (accessed 8.1.19). http://www.ircp.anmv.anses.fr/.

ANSES-ANMV, 2017b. Suivi des ventes de médicaments vétérinaires contenant des antibiotiques en France en 2016 (Rapport annuel). pp. 108. https://www.anses.fr/fr/system/files/ANMV-Ra-Antibiotiques2016.pdf.

Barlow, J., 2011. Mastitis therapy and antimicrobial susceptibility: a multispecies review with a focus on antibiotic treatment of mastitis in dairy cattle. J. Mammary Gland Biol. Neoplasia 16, 383–407. https://doi.org/10.1007/s10911-011-9235-z.

Baron, S., Jouy, E., Larvor, E., Eono, F., Bougeard, S., Kempf, I., 2014. Impact of third-generation-cephalosporin administration in hatcheries on fecal Escherichia coli antimicrobial resistance in broilers and layers. Antimicrob. Agents Chemother. 58, 5428–5434. https://doi.org/10.1128/AAC.03106-14.

Berge, A.C.B., Moore, D.A., Sischo, W.M., 2006. Field trial evaluating the influence of prophylactic and therapeutic antimicrobial administration on antimicrobial resistance of fecal Escherichia coli in dairy calves. Appl. Environ. Microbiol. 72, 3872–3878. https://doi.org/10.1128/AEM.02239-05.

Boireau, C., Jarrige, N., Cazeau, G., Jouy, É., Haenni, M., Philippon, C., Calavas, D., Madec, J.-Y., Leblond, A., Gay, E., 2018a. Représentativité et couverture du résapath, le réseau d'épidémiosurveillance de l'antibiorésistance des bactéries pathogènes animales. Bull. Épidémiologique Santé Anim. Aliment. 80, 10–14.

Boireau, C., Morignat, É., Cazeau, G., Jarrige, N., Jouy, É., Haenni, M., Madec, J.-Y., Leblond, A., Gay, É., 2018b. Antimicrobial resistance trends in Escherichia coli isolated from diseased food-producing animals in France: a 14-year period time-series study. Zoonoses Public Health 65, 86–94. https://doi.org/10.1111/zph.12412.

Bourbonnais, R., Terraza, M., 2010. Analyse des séries temporelles, 3rd ed. Dunod, Paris.

Chauvin, C., Le Bouquin-Leneveu, S., Hardy, A., Haguet, D., Orand, J.P., Sanders, P., 2005. An original system for the continuous monitoring of antimicrobial use in poultry production in France. J. Vet. Pharmacol. Ther. 28, 515–523. https://doi.org/10.1111/j.1365-2885.2005.00697.x.

Chen, X., Zhang, W., Yin, J., Zhang, N., Geng, S., Zhou, X., Wang, Y., Gao, S., Jiao, X., 2014. Escherichia coli isolates from sick chickens in China: changes in antimicrobial resistance between 1993 and 2013. Vet. J. 1997 (202), 112–115. https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2014.06.016.

Collignon, P., Powers, J.H., Chiller, T.M., Aidara-Kane, A., Aarestrup, F.M., 2009. World Health Organization ranking of antimicrobials according to their importance in human medicine: a critical step for developing risk management strategies for the use of antimicrobials in food production animals. Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am. 49, 132–141. https://doi.org/10.1086/599374.

De Graef, E.M., Decostere, A., Devriese, L.A., Haesebrouck, F., 2004. Antibiotic resistance among fecal indicator bacteria from healthy individually owned and kennel dogs. Microb. Drug Resist. Larchmt. N 10, 65–69. https://doi.org/10.1089/10766290432304782 6.

de Jong, A., Thomas, V., Simjee, S., Moyaert, H., El Garch, F., Maher, K., Morrissey, I., Butty, P., Klein, U., Marion, H., Rigaut, D., Vallé, M., 2014. Antimicrobial susceptibility monitoring of respiratory tract pathogens isolated from diseased cattle and pigs across Europe: the VetPath study. Vet. Microbiol. 172, 202–215. https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2014.04.008.

DebRoy, C., Maddox, C.W., 2001. Identification of virulence attributes of gastrointestinal Escherichia coli isolates of veterinary significance. Anim. Health Res. Rev. 2, 129–140.

Dho-Moulin, M., Fairbrother, J.M., 1999. Avian pathogenic Escherichia coli (APEC). Vet. Res. 30, 299–316.

Doernberg, S.B., Dudas, V., Trivedi, K.K., 2015. Implementation of an antimicrobial stewardship program targeting residents with urinary tract infections in three community long-term care facilities: a quasi-experimental study using time-series analysis. Antimicrob. Resist. Infect. Control 4. https://doi.org/10.1186/s13756-015-0095-y.

Dominici, F., McDermott, A., Zeger, S.L., Samet, J.M., 2002. On the use of generalized

additive models in time-series studies of air pollution and health. Am. J. Epidemiol. 156, 193–203.
Dutil, L., Irwin, R., Finley, R., Ng, L.K., Avery, B., Boerlin, P., Bourgault, A.-M., Cole, L., Daignault, D., Desruisseau, A., Demczuk, W., Hoang, L., Horsman, G.B., Ismail, J., Jamieson, F., Maki, A., Pacagnella, A., Pillai, D.R., 2010. Ceftiofur resistance in Salmonella enterica serovar heidelberg from chicken meat and humans, Canada. Emerging Infect. Dis. 16, 48–54. https://doi.org/10.3201/eid1601.090729.
EFSA, ECDC, 2016. The European Union summary report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2014. EFSA J. 207. https://doi.org/10.2903/j.efsa.2016.4380.
EFSA, ECDC, 2017. The European Union Summary Report on Antimicrobial Resistance in Zoonotic and Indicator Bacteria From Humans, Animals and Food in 2015 (Scientific Report of EFSA). pp. 212. https://doi.org/10.2903/j.efsa.2017.4694.
Fleury, M.A., Mourand, G., Jouy, E., Touzain, F., Le Devendec, L., de Boisseson, C., Eono, F., Cariolet, R., Guérin, A., Le Goff, O., Blanquet-Diot, S., Alric, M., Kempf, I., 2015. Impact of ceftiofur injection on gut microbiota and *Escherichia coli* resistance in pigs. Antimicrob. Agents Chemother. 59, 5171–5180. https://doi.org/10.1128/AAC.00177-15c.
Geenen, P.L., Graat, E.A.M., Haenen, A., Hengeveld, P.D., Van Hoek, A.H.A.M., Huijsdens, X.W., Kappert, C.C., Lammers, G.A.C., Van Duijkeren, E., Van De Giessen, A.W., 2013. Prevalence of livestock-associated MRSA on Dutch broiler farms and in people living and/or working on these farms. Epidemiol. Infect. 141, 1099–1108. https://doi.org/10.1017/S0950268812001616.
Hale, C.R., Scallan, E., Cronquist, A.B., Dunn, J., Smith, K., Robinson, T., Lathrop, S., Tobin-D'Angelo, M., Clogher, P., 2012. Estimates of enteric illness attributable to contact with animals and their environments in the United States. Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am. 54 (Suppl. 5), S472–479. https://doi.org/10.1093/cid/cis051.
Hanon, J.-B., Jaspers, S., Butaye, P., Wattiau, P., Méroc, E., Aerts, M., Imberechts, H., Vermeersch, K., Van der Stede, Y., 2015. A trend analysis of antimicrobial resistance in commensal Escherichia coli from several livestock species in Belgium (2011–2014). Prev. Vet. Med. https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2015.09.001.
Hu, Y., Yang, X., Li, J., Lv, N., Liu, F., Wu, J., Lin, I.Y.C., Wu, N., Weimer, B.C., Gao, G.F., Liu, Y., Zhu, B., 2016. The bacterial mobile resistome transfer network connecting the animal and human microbiomes. Appl. Environ. Microbiol. 82, 6672–6681. https://doi.org/10.1128/AEM.01802-16.
Jarrige, N., Cazeau, G., Morignat, E., Chanteperdrix, M., Gay, E., 2017. Quantitative and qualitative analysis of antimicrobial usage in white veal calves in France. Prev. Vet. Med. 144, 158–166. https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2017.05.018.
Lin, D., Chen, K., Xie, M., Ye, L., Chan, E.W.-C., Chen, S., 2017. Effect of ceftiofur and enrofloxacin on E. coli sub-population in pig gastrointestinal tract. J. Glob. Antimicrob. Resist. 10, 126–130. https://doi.org/10.1016/j.jgar.2017.05.010.
López-Lozano, J.M., Monnet, D.L., Yagüe, A., Burgos, A., Gonzalo, N., Campillos, P., Saez, M., 2000. Modelling and forecasting antimicrobial resistance and its dynamic relationship to antimicrobial use: a time series analysis. Int. J. Antimicrob. Agents 14, 21–31.
Maynou, G., Bach, A., Terré, M., 2017. Feeding of waste milk to Holstein calves affects antimicrobial resistance of Escherichia coli and Pasteurella multocida isolated from fecal and nasal swabs. J. Dairy Sci. 100, 2682–2694. https://doi.org/10.3168/jds.2016-11891.
Moreno, L.Z., Matajira, C.E.C., Poor, A.P., Mesquita, R.E., Gomes, V.T.M., Silva, A.P.S., Amigo, C.R., Christ, A.P.G., Barbosa, M.R.F., Sato, M.I.Z., Moreno, A.M., 2017. Identification through MALDI-TOF mass spectrometry and antimicrobial susceptibility profiling of bacterial pathogens isolated from sow urinary tract infection. Vet. Q. 38, 1–8. https://doi.org/10.1080/01652176.2017.1397302.
Mühlemann, K., Uehlinger, D.E., Büchi, W., Gorgievski, M., Aebi, C., 2006. The prevalence of penicillin-non-susceptible Streptococcus pneumoniae among children aged < 5 years correlates with the biannual epidemic activity of respiratory syncytial virus. Clin. Microbiol. Infect. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 12, 873–879. https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2006.1472_1.x.
Pereira, R.V., Siler, J.D., Ng, J.C., Davis, M.A., Grohn, Y.T., Warnick, L.D., 2014. Effect of on-farm use of antimicrobial drugs on resistance in fecal Escherichia coli of preweaned dairy calves. J. Dairy Sci. 97, 7644–7654. https://doi.org/10.3168/jds.2014-8521.
R Core Team, 2017. R: a Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
Tadesse, D.A., Zhao, S., Tong, E., Ayers, S., Singh, A., Bartholomew, M.J., McDermott, P.F., 2012. Antimicrobial drug resistance in Escherichia coli from humans and food animals, United States, 1950–2002. Emerging Infect. Dis. 18, 741–749. https://doi.org/10.3201/eid1805.111153.
Tenover, F.C., 2006. Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. Am. J. Infect. Control 34https://doi.org/10.1016/j.ajic.2006.05.219. S3-10; discussion S64-73.
Viale, P., Giannella, M., Bartoletti, M., Tedeschi, S., Lewis, R., 2015. Considerations about antimicrobial stewardship in settings with epidemic extended-spectrum β-lactamase-producing or carbapenem-resistant enterobacteriaceae. Infect. Dis. Ther. 4, 65–83. https://doi.org/10.1007/s40121-015-0081-y.
WHO, 2014. Antimicrobial Resistance: Global Report on Surveillance. World Health Organisation, Geneva, Switzerland, pp. 256. http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/112642/9789241564748_eng.pdf?sequence=1.
WHO, 2017. Critically Important Antimicrobials for Human Medicine 5th Revison. pp. 48. http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/255027/9789241512220-eng.pdf;jsessionid=8E0809678E9B5782A65E577E581AE187?sequence=1.
Woolhouse, M., Ward, M., van Bunnik, B., Farrar, J., 2015. Antimicrobial resistance in humans, livestock and the wider environment. Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci. 370, 20140083. https://doi.org/10.1098/rstb.2014.0083.
Zhang, P., Shen, Z., Zhang, C., Song, L., Wang, B., Shang, J., Yue, X., Qu, Z., Li, X., Wu, L., Zheng, Y., Aditya, A., Wang, Y., Xu, S., Wu, C., 2017. Surveillance of antimicrobial resistance among Escherichia coli from chicken and swine, China, 2008–2015. Vet. Microbiol. 203, 49–55. https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2017.02.008.

Annexe 6 : Cinquième article – Antimicrobial resistance patterns of bacteria isolated from dogs with otitis

Epidemiology and Infection

cambridge.org/hyg

Original Paper

Cite this article: Bourély C, Cazeau G, Jarrige N, Leblond A, Madec JY, Haenni M, Gay E (2019). Antimicrobial resistance patterns of bacteria isolated from dogs with otitis. *Epidemiology and Infection* **147**, e121, 1–10. https://doi.org/10.1017/S0950268818003278

Received: 28 May 2018
Revised: 22 October 2018
Accepted: 25 October 2018

Key words:
Antimicrobial resistance; canine otitis; multidrug resistance; RESAPATH; time series

Author for correspondence:
E. Gay, E-mail: emilie.gay@anses.fr

© The Author(s) 2019. This is an Open Access article, distributed under the terms of the Creative Commons Attribution licence (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted re-use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

CAMBRIDGE UNIVERSITY PRESS

Antimicrobial resistance patterns of bacteria isolated from dogs with otitis

C. Bourély[1,2,3], G. Cazeau[2], N. Jarrige[2], A. Leblond[3], J.Y. Madec[4], M. Haenni[4] and E. Gay[2]

[1]École Nationale des Services Vétérinaires, ENSV, VetagroSup, Marcy l'Étoile, France; [2]Université de Lyon, ANSES, Laboratoire de Lyon, Unité Epidémiologie et Appui à la surveillance, 31 avenue Tony Garnier, 69007 Lyon, France; [3]EPIA, UMR 0346, Epidémiologie des maladies Animales et zoonotiques, INRA, VetAgro Sup, University of Lyon, F-69280, Marcy L'Etoile, France and [4]Université de Lyon, ANSES, Laboratoire de Lyon, Unité Antibiorésistance et Virulence Bactériennes, 31 avenue Tony Garnier, Lyon 69007, France

Abstract

Antimicrobial-resistant bacteria in dogs can be transmitted to humans and close contact between dogs and people might foster dissemination of resistance determinants. The aim of our study was to describe the antimicrobial resistance (AMR) pattern of the major causative agents of canine otitis – one of the most common diseases in dogs – isolated in France. Data collected between 2012 and 2016 by the French national surveillance network for AMR, referred to as RESAPATH, were analysed. Resistance trends were investigated using non-linear analysis (generalised additive models). A total of 7021 antibiograms were analysed. The four major causative agents of canine otitis in France were coagulase-positive staphylococci, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis* and streptococci. Since 2013, resistance to fluoroquinolones has been on the decrease in both *P. aeruginosa* and *Staphylococcus pseudintermedius* isolates. For *P. aeruginosa*, 19.4% of isolates were resistant to both enrofloxacin and gentamicin. The levels of multidrug resistance (acquired resistance to at least one antibiotic in three or more antibiotic classes) ranged between 11.9% for *P. mirabilis* and 16.0% for *S. pseudintermedius*. These results are essential to guide prudent use of antibiotics in veterinary medicine. They will also help in designing efficient control strategies and in measuring their effectiveness.

Introduction

Dogs are considered to be one of the potential reservoirs of antimicrobial resistance (AMR) determinants that can be transmitted to humans through direct or indirect contact [1, 2]. The number of people living with pets, especially dogs, has been increasing worldwide over the last few decades [3, 4]. In France, the estimated dog population has been stable since 2012 at around 7.3 million, and about 20% of households in the country accommodate pets [4]. As the selection and spread of AMR has serious consequences for human beings, knowledge of the prevalence of resistance and temporal variations, with regular updates, in both humans and animals, is required to assess the potential threats to public health, to design efficient control strategies, and to measure their effectiveness.

Canine otitis is one of the most common diseases in dogs. Bacteria and yeast are considered to be both predisposing and perpetuating factors [5]. In France, otitis is usually treated empirically at point of diagnosis, with cleaning, administration of antibiotics and topical anti-inflammatory drugs. The choice of antibiotic is based on otoscopic examination of the ear canal, cytological results, the clinical experience of veterinarians and therapeutic guidelines. In particular, the therapeutic choices take into account the spectrum of activity of antibiotics, their administration route and their availability. In France, nine antibiotic classes are recommended and are available on the market for the treatment of canine otitis: penicillins, cephalosporins, aminoglycosides, folate pathway inhibitors, macrolides, phenicol, fusidanin and polymyxins are first-line treatment, whereas fluoroquinolones are recommended as second-line treatment [6]. Even if guidelines recommend prescribing these antibiotic classes, no distinction is made according to the pathogens involved. In this context, knowledge of the resistance to these antibiotic classes of the most common bacteria involved in otitis could greatly help in selecting the appropriate antibiotics and provide a scientific basis for treatment guidelines of dog otitis in France. Indeed, French guidelines point out the lack of French data available on the resistance of bacteria involved to better guide prudent initial prescription [6].

The most common ear pathogens isolated from dogs are coagulase-positive staphylococci (*Staphylococcus pseudintermedius*) and *Pseudomonas aeruginosa* [5, 7]. So far, only few studies conducted in other countries have investigated the resistance of pathogenic strains isolated from canine otitis and they mainly concerned *S. pseudintermedius* [7–9]. The number of

Downloaded from https://www.cambridge.org/core. ANSES Agence nationale de sécurité sanit, on 21 Mar 2019 at 14:45:23, subject to the Cambridge Core terms of use, available at https://www.cambridge.org/core/terms. https://doi.org/10.1017/S0950268818003278

isolates was often limited [7–12], and studies mixed samples collected from the skin, ear or soft tissues [13–16], or gathered samples from sick and healthy dogs [17] to increase the sample size. In addition, these investigations were mainly local (collecting data from one or few practices or data from particular administrative region, e.g.). Therefore, the scope of the results obtained is limited and generalisation to other countries is not possible. In addition, it would be necessary to investigate resistance variations over time to detect potential emergences and assess the efficacy of control strategy. Only one study has explored AMR trends in dog otitis so far, but this work mixed samples from dogs and cats throughout Europe and only linear regression was used to analyse results from 2002 and 2009 [18].

The aim of our study was to characterise the AMR patterns of the most frequent bacterial causative agents of canine otitis isolated in France, and to describe their temporal variations from 2012 to 2016. This study was performed using the dataset from the well-established French national surveillance network for AMR in pathogenic bacteria from animals, referred to as RESAPATH [19], which collects antibiograms, thanks to its laboratory members which are implanted in all administrative regions in France.

Materials and methods

Source of data

This retrospective study was performed using data from the RESAPATH laboratories. Created in 1982, RESAPATH has expanded to include all animal species, including dogs since 2007. It collects results from antibiograms performed by French veterinary laboratories participating in the AMR surveillance network. These antibiograms are initially requested by veterinarians in a context of disease for diagnostic purposes, such as canine otitis. All laboratories perform antibiograms by the disk diffusion method, according to the recommendations of the Antibiogram Committee of the French Society of Microbiology (CA-SFM), and inhibition zone diameters are then compiled in the RESAPATH database. From this database, we extracted data concerning the most frequent bacterial genera isolated from dogs with clinical otitis from 2012 to 2016. Variables extracted included bacterial species, occurrence of clinical otitis, sampling date, administrative region of the sampling and inhibition zone diameters to each tested antimicrobial agent. For the bacterial genera considered, we selected appropriate antibiotics of relevance in veterinary and human medicine; antibiotic were selected according to their spectrum of activity against the pathogen considered, their use to treat canine otitis (topical and systemic antibiotics), their public health interest including critically important antibiotics (fluoroquinolones and third-generation cephalosporins) and their use as specific indicators of resistance (e.g. cefoxitin and cefovecin for the detection of phenotypically methicillin-resistant staphylococci).

Data analysis

Among each bacterial genus, we performed an analysis at the scale of the bacterial species if the number of isolates collected from this bacterial species was above 1000, and otherwise at the genus scale. The first step in the analysis was to categorise isolates as susceptible (S), intermediate (I) or resistant (R), using their inhibition zone diameters compared with the breakpoints recommended by the veterinary section of the CA-SFM. From an epidemiological point of view, the event of interest is the non-susceptibility to a particular antibiotic, indicating that the isolate is no longer a wild-type strain. For this reason, intermediate isolates were grouped together with resistant isolates in the non-susceptible population, referred to as resistant in this paper.

For each bacterial species (or genus)/antibiotic combination, the indicator of resistance was defined as the ratio between the number of resistant isolates and the total number of isolates tested at each time step. To model changes in AMR pattern, we used generalised additive models (GAMs) [20]. GAM extends traditional generalised linear models by replacing the linear predictor with unspecified non-parametric functions. GAM is a flexible and effective technique for conducting non-linear regression analysis in time-series studies. Here, GAM models were used to decompose raw signal (variation of resistance levels over time) and to capture trends and seasonality. Time-series analyses were performed for bacterial species (or genus)/antibiotic combination for which we had at least 25 antibiograms per time step [21]. Using count data, the bimonthly number of resistant isolates was modelled with a binomial negative regression with an offset equal to the log of the total number of isolates submitted bimonthly. The GAM models were structured and analysis performed as described by Boireau *et al.*, using a separate and independent GAM for each bacterial species (or genus)/antibiotic combination [22]. The models presented in this paper included non-parametric smooth functions of calendar time designed to control for trend and seasonality. Smoothing parameters were estimated using cross-validation. We considered a P-value of $\leqslant 0.05$ as a statistically significant difference. If trend variations were not significant, the trend was stationary. R, version 3.4.3 was used for all statistical analyses (gamm4 package for GAM implementation).

We carried out multidrug resistance (MDR) analyses according to the conventional definition: isolates with acquired resistance to at least one antibiotic in three or more antibiotic classes [23]. We considered only the antibiotic classes most frequently tested by veterinary laboratories; the phenicol and fusidanin classes were not taken into account in the MDR analysis. We estimated the proportions of isolates that were pan-susceptible (susceptible to all classes of antibiotics tested), resistant to one or two antibiotics from different classes, MDR and resistant to all classes of antibiotics considered. Confidence intervals (CI) around the proportion estimates were calculated using the exact binomial method (P-values were two-sided).

Results

Bacteria isolated from dogs with otitis

The most frequent bacterial genera isolated from dogs with otitis from 2012 to 2016 in France were: coagulase-positive staphylococci, *Streptococcus* spp., *Pseudomonas* spp. and *Proteus* spp. The distribution among bacterial genera and species is presented in Table 1. Considering the number of isolates, we studied *S. pseudintermedius* (formerly *Staphylococcus intermedius*), *P. aeruginosa* and *Proteus mirabilis* at the species level. Considering the zoonotic potential of *Staphylococcus aureus* [13–15], and the importance of this pathogen in nosocomial infections in both human and veterinary medicine [24, 25], we also performed analysis on this bacterial species, in spite of the limited number of isolates collected over the period. Streptococci were analysed at

Downloaded from https://www.cambridge.org/core. ANSES Agence nationale de sécurité sanit, on 21 Mar 2019 at 14:45:23, subject to the Cambridge Core terms of use, available at https://www.cambridge.org/core/terms. https://doi.org/10.1017/S0950268818003278

Table 1. Number of isolates collected from dogs with otitis between 2012 and 2016 by genus and bacterium identified

Genus	Bacterial species	Number of isolates	Proportion of isolates (%)	Total number of isolates per genus
Coagulase-positive staphylococci	*Staphylococcus pseudintermedius*	2513	33.0	3133
	Staphylococcus aureus	294	3.9	
	Other	326	4.3	
Pseudomonas spp.	*Pseudomonas aeruginosa*	2103	27.5	2315
	Other	212	2.8	
Proteus spp.	*Proteus mirabilis*	1039	13.6	1103
	Other	64	0.8	
Streptococcus spp.	*Streptococcus canis*	447	5.9	1072
	Other	625	8.2	

the bacterial genus level. On the basis of the extracted data (7623 isolates in total, Table 1), 33.0% of the antibiograms concerned *S. pseudintermedius*, 3.9% *S. aureus*, 27.5% *P. aeruginosa*, 13.6% *P. mirabilis* and 14.1% streptococci (Table 1). A total of 7021 isolates regarding *S. pseudintermedius*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *P. mirabilis* and streptococci collected by RESAPATH between 1 January 2012 and 31 December 2016 were analysed in this study. Considering the bacterial genera identified, we selected the antibiotics presented in Table 2 for further analyses.

Levels of resistance over the entire period 2012–2016

Over the studied period, resistance to penicillin was high for staphylococci (68.5% (66.6–70.3) for *S. pseudintermedius*, 70.9% (65.1–76.3) for *S. aureus*), whereas it was lower for *P. mirabilis* (28.9% (26.1–31.9)) and streptococci (14.4% (12.0–17.1)) (Table 3). The level of resistance to ceftiofur was low for *P. mirabilis* (2.4% (1.6–3.6)). Concerning resistance to cephalosporins in Gram-positive isolates, 9.4% (7.8–11.2) of *S. pseudintermedius* were resistant to cefovecin (phenotypically methicillin-resistant *S. pseudintermedius* – MRSP) and 10.6% (7.0–15.1) of *S. aureus* were resistant to cefoxitin (phenotypically methicillin-resistant *S. aureus* – MRSA). The levels of resistance to erythromycin and chloramphenicol were between 25% and 40% and were similar for *S. pseudintermedius*, *S. aureus* and streptococci. The resistance to trimethoprim-sulfamethoxazole ranged from 10.2% to 22.9% for the studied bacteria. The level of resistance to gentamicin was low for *Streptococcus* spp. (3.3% (2.2–4.8)), higher for *P. mirabilis* (10.3% (8.5–12.3)), *S. aureus* (12.9% (9.2–17.5)) and *S. pseudintermedius* (13.5% (12.2–14.9)), and reached 17.9% (16.3–19.6) for *P. aeruginosa*. Finally, the level of resistance to fluoroquinolones was below 15% for *P. mirabilis* and staphylococci isolates, but higher for *Streptococcus* spp. (62.9% (59.8–65.9)) and *P. aeruginosa* (67.7% (65.6–69.8)).

AMR trends

We analysed the variations in resistance levels over the 2012–2016 period for all bacterial species presenting sufficient amounts of data, i.e. *S. pseudintermedius* (excluding cefovecin, fusidic acid and chloramphenicol) and *P. aeruginosa* isolates. Based on graphical analyses, no seasonal cycle was observed and the seasonal component in the model was never significant (data not shown). For *S. pseudintermedius*, resistance trends to erythromycin, gentamicin and trimethoprim-sulfamethoxazole were stationary from 2012 to 2016 (Fig. 1). The resistance trend to penicillin G was primarily stable, and then the resistance level increased from 62.5% (57.4–67.5) in March 2013 to 77.7% (70.4–85.0) in December 2016. By contrast, the resistance proportion to enrofloxacin increased at the beginning of the period, then decreased from 17.0% (13.5–20.4) in September 2013 to 7.8% (4.8–10.8) in December 2016. For *P. aeruginosa*, the resistance trend to gentamicin was stationary from 2012 to 2016 at 17.9% resistance (Fig. 2). The resistance trend to enrofloxacin varied: the resistance level first increased from 68.6% (55.3–82.0) in January 2012 to a maximum of 74.7% (68.2–81.2) in November 2013, and then decreased to 57.8% (51.1–64.5) in December 2016.

Multidrug resistance

The MDR analyses were performed using five antibiotic classes for *P. mirabilis* and streptococci, and six classes for coagulase-positive staphylococci. Because only two antibiotics are commonly tested for *P. aeruginosa* by veterinary laboratories in France (enrofloxacin and gentamicin), the analysis for this bacterium was limited to these two antibiotics. The analysis of MDR included 4827 isolates for which complete records on resistance to the aforementioned antimicrobials classes were available (Table 2). Depending on the bacterial species studied, 20–30% of the isolates were susceptible to all antibiotic classes tested, except for *P. mirabilis* for which this proportion reached 63.8% (Table 4). The MDR proportions ranged between 11.8% for *P. mirabilis* and 20.7% for *S. pseudintermedius*. Only rare isolates were resistant to all antibiotic classes tested.

Discussion

Aims and limits

The aim of our study was to determine the antimicrobial patterns of the most frequent bacterial causative agents of canine otitis isolated in France, and to describe the variations in resistance from 2012 to 2016. Using national data collected by the RESAPATH, we succeeded in assessing the levels of resistance for coagulase-positive staphylococci, *P. aeruginosa*, *P. mirabilis* and streptococci to antibiotics of relevance in veterinary and human medicine.

Downloaded from https://www.cambridge.org/core. ANSES Agence nationale de sécurité sanit, on 21 Mar 2019 at 14:45:23, subject to the Cambridge Core terms of use, available at https://www.cambridge.org/core/terms. https://doi.org/10.1017/S0950268818003278

Table 2. Antibiotics tested and the corresponding antibiotic classes for each bacterial genus

Bacterial genus	Antibiotic	Antibiotic class
Coagulase-positive staphylococci	Gentamicin	Aminoglycosides
	Cefoxitin or cefovecin	Cephalosporins
	Enrofloxacin	Fluoroquinolones
	Trimethoprim-sulfamethoxazole	Folate pathway inhibitors
	Fusidic acid	Fusidanin
	Erythromycin	Macrolides
	Penicillin G	Penicillins
	Chloramphenicol	Phenicol
Pseudomonas spp.	Gentamicin	Aminoglycosides
	Enrofloxacin	Fluoroquinolones
Proteus spp.	Gentamicin	Aminoglycosides
	Ceftiofur	Cephalosporins
	Enrofloxacin	Fluoroquinolones
	Trimethoprim-sulfamethoxazole	Folate pathway inhibitors
	Amoxicillin,	Penicillins
Streptococcus spp.	Gentamicin	Aminoglycosides
	Enrofloxacin	Fluoroquinolones
	Trimethoprim-sulfamethoxazole	Folate pathway inhibitors
	Erythromycin	Macrolides
	Chloramphenicol	Phenicol
	Oxacillin	Penicillins

From an epidemiological point of view, our findings address the knowledge gap regarding the resistance of *P. aeruginosa* and streptococci in animal health. To our best knowledge, this is the first study investigating resistance trends of the major causative agents of canine otitis in their full complexity, with methods ensuring non-linear trend detection. Using GAM models, we revealed the changes in AMR over the period 2012–2016.

With respect to the common genera and species of bacteria isolated from canine otitis, our findings are consistent with previous studies [5, 7, 11, 12, 17, 26, 27]: *S. pseudintermedius* is the most common ear pathogen isolated, followed by *P. aeruginosa*. However, the differences between sample selection and size, the method of strain collection, the bacterial population studied (commensal *vs.* pathogenic), the area of origin and the site of sampling (ears *vs.* dermatological sites including skin and mucosa) can explain variabilities between results and make data comparison between studies difficult. Only three studies had already explored the resistance of streptococci isolated from canine otitis or healthy ears [17, 27, 28]. Similarly to Bugden *et al*, we found high level of resistance to enrofloxacin (62.9%). However, contrary to their results and those of Hariharan *et al*, resistance to gentamicin was low in our study (3.3%) and consistent with results reported by Lyskova *et al*, whereas resistance to gentamicin in streptococci isolated in human medicine is almost non-existent [29]. In the present study, ceftiofur and gentamicin were the most effective antibiotics against *P. mirabilis*. To the best of our knowledge, the epidemiology of susceptibility to ceftiofur has not been investigated to date, even though one study in the literature reported *P. mirabilis* as a carrier of extended-spectrum β-lactamase genes and carbapenemases in France [30].

The major strength of our study was the availability of data regarding the susceptibility of canine otitis pathogens from an ongoing nationwide surveillance system for AMR in animal health: the RESAPATH network [19, 31]. Nevertheless, this study had several limitations due to potential selection bias, because laboratories join the RESAPATH on a voluntary basis and antibiograms rely on decisions taken by veterinarians during their veterinary practice. We could suppose that chronic otitis could prompt sample submission by veterinarians. The proportions of samples from previously untreated compared with treated dogs were also unknown and could potentially impact differently the results of resistance (i.e. through the selective antimicrobial pressure). The lack of information regarding antibiotic use in sampled dogs also limited us to confront directly in the models antibiotic use and resistance. In addition, it was not possible to differentiate first and subsequent sample submissions and we simply assumed that multiple sampling from the same dog did not occur frequently considering the cost of the analysis [32]. Although these biases can lead to a lack of representativeness and a misestimation of the levels of resistance, if biases do not vary over time, the observed resistance trends remain meaningful. Moreover, RESAPATH covers the full territory, thanks to its laboratory members which are implanted in all administrative regions in France. Not all French veterinary laboratories are members of RESAPATH (in 2015, 74 were members out of about 110 in the country), but RESAPATH receives the majority of the

Downloaded from https://www.cambridge.org/core. ANSES Agence nationale de sécurité sanit, on 21 Mar 2019 at 14:45:23, subject to the Cambridge Core terms of use, available at https://www.cambridge.org/core/terms. https://doi.org/10.1017/S0950268818003278

Table 3. Resistance of isolates from dogs with otitis in France over the period 2012–2016

Bacterium	Antibiotic	Number of resistant isolates	Total number of isolates	Level of resistance (%) with 95% CI	Resistance trend from GAM model
Staphylococcus pseudintermedius	Penicillin G	1650	2409	68.5 (66.6–70.3)	Non-linear
	Cefovecin	112	1187	9.4 (7.8–11.2)	–
	Erythromycin	716	2401	29.8 (28.0–31.7)	Stationary
	Gentamicin	337	2491	13.5 (12.2–14.9)	Stationary
	Enrofloxacin	274	2115	13.0 (11.6–14.5)	Non-linear
	Fusidic acid	108	1757	6.1 (5.2–7.4)	–
	Chloramphenicol	196	700	38.9 (34.6–43.3)	–
	SXT[a]	297	2432	12.2 (10.9–13.6)	Stationary
Staphylococcus aureus	Penicillin G	190	268	70.9 (65.1–76.3)	–
	Cefoxitin	26	246	10.6 (7.0–15.1)	–
	Erythromycin	80	265	30.2 (24.7–36.1)	–
	Gentamicin	36	278	12.9 (9.2–17.5)	–
	Enrofloxacin	32	267	12.0 (8.3–16.5)	–
	Fusidic acid	17	148	11.5 (6.8–17.8)	–
	Chloramphenicol	37	119	31.1 (22.9–40.2)	–
	SXT[a]	28	274	10.2 (6.9–14.4)	–
Streptococcus spp.	Oxacillin	112	778	14.4 (12.0–17.1)	–
	Erythromycin	253	1021	24.8 (22.2–27.5)	–
	Gentamicin	26	790	3.3 (2.2–4.8)	–
	Enrofloxacin	627	997	62.9 (59.8–65.9)	–
	Chloramphenicol	89	252	35.3 (29.4–41.6)	–
	SXT[a]	210	1013	20.7 (18.3–23.4)	–
Pseudomonas aeruginosa	Gentamicin	375	2096	17.9 (16.3–19.6)	Stationary
	Enrofloxacin	1352	1996	67.7 (65.6–69.8)	Non-linear
Proteus mirabilis	Amoxicillin	284	982	28.9 (26.1–31.9)	–
	Ceftiofur	24	987	2.4 (1.6–3.6)	–
	Gentamicin	106	1034	10.3 (8.5–12.3)	–
	Enrofloxacin	134	1013	13.2 (11.2–15.5)	–
	SXT	232	1015	22.9 (20.3–25.6)	–

[a]Trimethoprim-sulfamethoxazole; '–': no analysis performed (<25 isolates per time step).

antibiograms performed in a clinical context in France [33]. Besides, an assessment of the network in 2015 concluded that the antibiograms from dogs collected by the RESAPATH were representative of the antibiograms from dogs performed in France [33]. Finally, epidemiological cut-off values were used in this study, but clinical breakpoints for antibiotics used in veterinary medicine would have been more reliable because they constitute more appropriate interpretative criteria for antibiogram results, but such criteria are not yet available in animal health in Europe [34].

Public health interest

The high level of resistance of *S. pseudintermedius* isolates to penicillin G (68.5%) has been reported by other authors [12, 17, 27, 35] and mirror the situation in human clinical *S. aureus* isolates, where penicillin G resistance now exceeds 90%. In our study, despite the lack of further genetic investigations, methicillin resistance in *S. pseudintermedius* and *S. aureus* can be approximated by resistance to cefovecin (9.4%) and cefoxitin (10.6%), respectively. Here we clearly have an overestimation of the real levels of MRSP and MRSA, since these proportions aggregate resistant and intermediate isolates, while intermediate isolates should be confirmed as resistant by a molecular method. Nevertheless, our results indicated that the proportion of resistance to methicillin in staphylococci isolated from dogs with otitis in France is not negligible but remains below 10%. *S. pseudintermedius* is a much more prevalent pathogen in dogs (including for dogs presenting otitis infections) than *S. aureus*, suggesting that *S. pseudintermedius* is more adapted to colonise canine skin. In contrary, *S. pseudintermedius* remains a rare pathogen in humans and people in contact with dogs are more at risk to carry them

Downloaded from https://www.cambridge.org/core. ANSES Agence nationale de sécurité sanit, on 21 Mar 2019 at 14:45:23, subject to the Cambridge Core terms of use, available at https://www.cambridge.org/core/terms. https://doi.org/10.1017/S0950268818003278

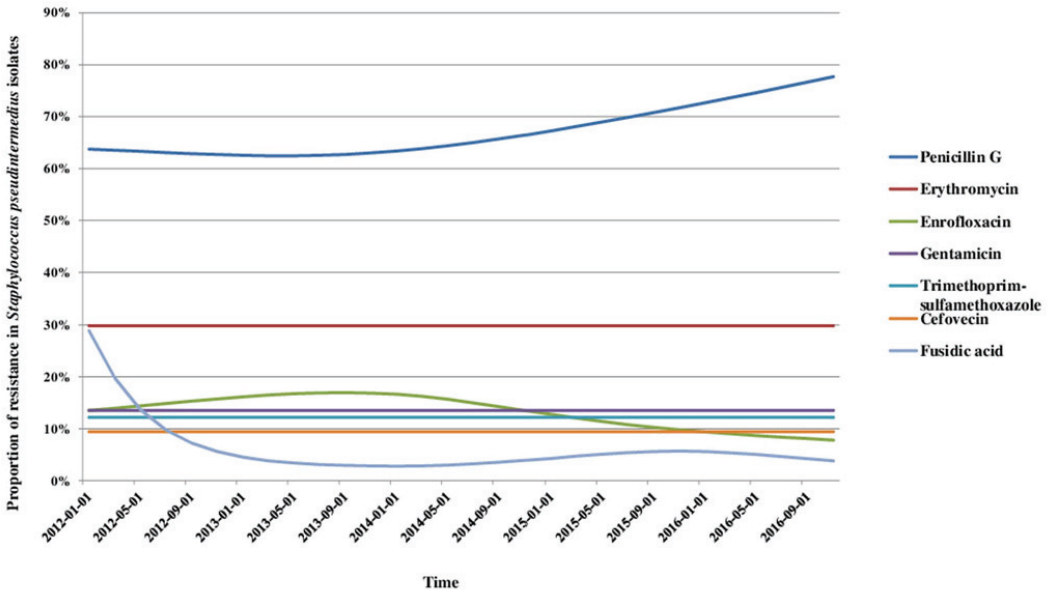


Fig. 1. Trends for antimicrobial resistance in *Staphylococcus pseudintermedius* isolates from dogs with otitis during the period 2012–2016, on a bimonthly time step.

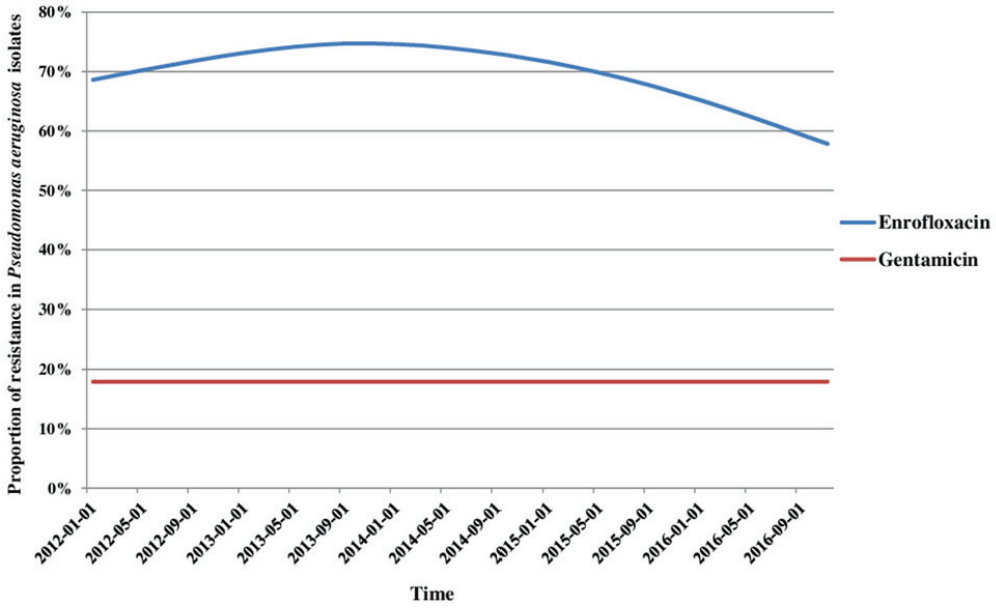


Fig. 2. Trends for antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from dogs with otitis during the period 2012–2016, on a bimonthly time step.

[36, 37]. Guardabassi *et al.* highlighted that owners of dogs affected by chronic deep pyoderma often carry the same *S. pseudintermedius* strains as their dogs. Therefore, the zoonotic risk of transmission of MRSP between dogs with otitis and humans is considered limited for the general population, but might be higher for owners of dogs.

For *P. aeruginosa*, only two antibiotics (gentamicin and enrofloxacin) are routinely tested by French veterinary laboratories

Downloaded from https://www.cambridge.org/core. ANSES Agence nationale de sécurité sanit, on 21 Mar 2019 at 14:45:23, subject to the Cambridge Core terms of use, available at https://www.cambridge.org/core/terms. https://doi.org/10.1017/S0950268818003278

Table 4. Proportions of isolates (in % with 95% CI) that were pan-susceptible, resistant to one or two antibiotics from different classes, multidrug-resistant and resistant to all classes of antibiotics considered for analysis over the period 2012–2016

Bacterial species (total number of isolates)	Susceptibility patterns of isolates	Number of isolates	Proportion
Staphylococcus pseudintermedius (1066)	Pan-susceptible	248	23.3 (20.8–25.9)
	Resistant to one or two antibiotics classes	597	56.0 (53.0–59.0)
	Multidrug-resistant	221	20.7 (18.3–23.3)
	Resistant to the six classes of antibiotics considered	2	0.2 (0.0–0.7)
Staphylococcus aureus (212)	Pan-susceptible	52	24.5 (18.9–30.9)
	Resistant to one or two antibiotics classes	124	58.5 (51.5–65.2)
	Multidrug-resistant	36	17.0 (12.2–22.7)
	Resistant to the six classes of antibiotics considered	6	2.8 (1.0–6.1)
Streptococcus spp. (638)	Pan-susceptible	183	28.7 (25.2–32.4)
	Resistant to one or two antibiotics classes	373	58.4 (54.5–62.3)
	Multidrug-resistant	82	12.9 (10.4–15.7)
	Resistant to the five classes of antibiotics considered	4	0.6 (0.2–1.6)
Pseudomonas aeruginosa (1989)	Pan-susceptible	592	29.8 (27.8–31.8)
	Resistant to enrofloxacin and gentamicin	304	15.3 (13.7–16.9)
Proteus mirabilis (922)	Pan-susceptible	588	63.8 (60.6–66.9)
	Resistant to one or two antibiotics classes	225	24.4 (21.7–27.3)
	Multidrug-resistant	109	11.8 (9.8–14.1)
	Resistant to the five classes of antibiotics considered	6	0.7 (0.2–1.4)

because only few antibiotics are authorised for veterinary use (aminoglycosides, fluoroquinolones and polymyxins). The high resistance of *P. aeruginosa* isolates from canine otitis to gentamicin (22.9%) found in this study is consistent with the findings of previous studies in Spain [38] and in Croatia [39]. Note that the resistance to gentamicin indicates resistance to all aminoglycosides used for the treatment of canine otitis in France (neomycin, framycetin, gentamicin). The high level of resistance of *P. aeruginosa* to enrofloxacin over the entire studied period (67.7%) is in accordance with results from many other studies [15, 16, 27, 29, 33–35] and is alarming, considering that fluoroquinolones are critically important antibiotics in human medicine. However, ciprofloxacin is considered to be a better marker of fluoroquinolones resistance for *P. aeruginosa* than enrofloxacin because resistance to ciprofloxacin indicates more precisely the resistance to fluoroquinolones [40]. But ciprofloxacin is not routinely tested by veterinary laboratories because it is restricted to human medicine. Therefore, the proportions of resistance to fluoroquinolones might have been overestimated in our study, but remain worrisome. In addition, we found that the proportion of *P. aeruginosa* isolates resistant to both gentamicin and enrofloxacin was 19.4% (17.7–21.2). This proportion is particularly worrying because *P. aeruginosa* is intrinsically resistant to many antibiotics including *β*-lactams, tetracycline, chloramphenicol, trimethoprim, kanamycin and quinolones [41, 42], and is also known for its ability to rapidly acquire additional resistances [38, 39]. The use of aminoglycosides and fluoroquinolones is also known to select *P. aeruginosa* isolates resistant to carbapenems, last resort antibiotics reserved for human medicine [43]. Thus, intrinsic and acquired resistance determinants potentially lead to therapeutic failures [43, 44].

Parallel with antibiotic use and control measures

Our findings highlighted that resistance to fluoroquinolones has decreased since 2013 for both *S. pseudintermedius* and *P. aeruginosa*. Although the data regarding the use of antibiotics does not enable us to assess the current impact of use on AMR dynamics, one can assume that it contributed to the decrease in resistance observed in this study. In fact, between 2011 and 2016, the use of antibiotics in companion animals decreased overall and antibiotic exposure (Animal Level of Exposure to Antimicrobials indicators estimated by the French Agency for Veterinary Medicinal Products) dropped by 19.4% (all antibiotics considered) [45]. More specifically, fluoroquinolone exposure decreased by 56.6% [45]. However, the increase in penicillin resistance in *S. pseudintermedius* isolates does not coincide with the overall use of penicillins in pets, which dropped by 19.3% between 2011 and 2016. More accurate data on the specific use of antibiotics for canine otitis treatment are absolutely necessary to clearly document the relationship between use and resistance [46].

Besides, over the studied period, different measures related to AMR control might have also influenced resistance trends [19]: (i) the EcoAntibio plan, a National action plan to fight AMR in animal health, intended to promote the responsible use of antibiotics and effective from 2012 to 2016, (ii) the Law for the future of agriculture, food and forestry (October 2014) which sets a goal of reducing the consumption of CIAs by 25% by the end of 2016, and (iii) the Decree no. 2016–317 and Ministerial Order of 18 March 2016, which restrict the use of fluoroquinolones and last generations cephalosporins in animal health. Despite the uncertainty regarding the real period of effectiveness for these control measures, and a certain lag between implementations of measures

Downloaded from https://www.cambridge.org/core. ANSES Agence nationale de sécurité sanit, on 21 Mar 2019 at 14:45:23, subject to the Cambridge Core terms of use, available at https://www.cambridge.org/core/terms. https://doi.org/10.1017/S0950268818003278

and their potential effect on AMR, we observed that the drop in fluoroquinolone resistance began before the publication of law, ministerial orders and decrees that restricts the use of fluoroquinolones in veterinary medicine. We assume that the anticipation of new regulations and the EcoAntibio Plan contributed to more prudent use of antibiotics influencing the resistance trends to fluoroquinolones.

Consequences for antimicrobial therapy

Our results underscore that dogs with otitis are a reservoir of resistant and multidrug-resistant bacteria. Knowledge of resistance levels and trends makes it possible to use antibiotics in animals in a careful and rational manner: our findings provide French veterinarians with comprehensive data to guide their initial empirical therapy of canine otitis. Guidelines are already available in France to assist veterinarians in their selection of the most appropriate antibiotics for initial therapy, but they do not provide specific recommendations according to the pathogen involved. Our results are essential to support and supplement them. The guidelines stress that knowledge of bacteria involved and antibiotic susceptibility patterns help in selecting an appropriate antibiotic for initial therapy of uncomplicated canine otitis. For otitis externa, French guidelines recommend to use topical treatment among the antibiotics available on the market (neomycin, framycetin, gentamicin, chloramphenicol, florfenicol, fusidic acid, trimethoprim-sulfamethoxazole or polymyxin B). Our findings characterised resistance to all of these antibiotics, except polymyxin B. We were not able to describe resistance to polymyxins because French veterinary laboratories use the disk diffusion method, which cannot clearly discriminate susceptible and resistant isolates due to poor diffusion of polypeptide antibiotics in agar [47]. Guidelines also stress the importance of carefully cleaning the ear canal [41] to limit inflammation. For otitis media, French guidelines point out the lack of data available on the susceptibility of bacteria involved. The first-line treatment consists in cleaning and flushing bulla [48]. Bacterial culture should be performed systematically even in the absence of visualisation of bacteria on cytology [41]. French guidelines also recommend the administration of systemic and topical antibiotics (among those available on the market). While awaiting the outcome of antibiograms, broad-spectrum antibiotics such as trimethoprim-sulfamethoxazole or gentamicin might be administered. Third-generation cephalosporins and fluoroquinolones remain second-line antibiotics in France: their use must be justified by isolation and antibiograms, except in emergency cases [49].

Our results support and clarify these recommendations. The present study documented staphylococcus (*S. pseudintermedius* and *S. aureus*), *P. aeruginosa*, streptococci and *P. mirabilis* as the most frequently isolated significant bacterial microorganisms from cases of otitis in dogs in France. Based on our results, if staphylococci are identified, gentamicin, fusidic acid or trimethoprim-sulfamethoxazole should be the appropriate antibiotic for therapy. Similarly, if streptococci are isolated, gentamicin and penicillin should be chosen. For *P. mirabilis*, gentamicin is appropriate as first-line treatment. Our findings also pointed out the difficulty of choosing appropriate therapy for *P. aeruginosa* without susceptibility testing. Resistance to gentamicin remains high and fluoroquinolones cannot be used as first-line antibiotics. Moreover, even though *P. aeruginosa* is uncommon as an initial pathogen, it frequently plays a major role in chronic otitis externa [38, 50], increasing therapeutic failure. To provide suitable treatment, veterinarians should also consider that the clinical presentation may influence the success of antibiotic therapy, as the presence of a purulent exudate will affect the efficacy of a particular antibiotic (gentamicin for instance [50]).

Conclusion

This study provided an overall picture of resistance in staphylococci (*S. pseudintermedius* and *S. aureus*), *P. aeruginosa*, streptococci and *P. mirabilis* isolated from canine otitis. Our results are essential to support and supplement French guidelines. According to the level of resistance, while awaiting the outcome of antibiograms, broad-spectrum antibiotics such as gentamicin might be administered if staphylococci or streptococci are identified. Since 2013, resistance to fluoroquinolones has been on the decrease in both *P. aeruginosa* and *S. pseudintermedius* isolates; these decreases overlap with the implementation of the EcoAntibio plan, which promote the responsible use of antibiotics. For *P. aeruginosa*, 19.4% of isolates were resistant to both enrofloxacin and gentamicin, which is worrying because *P. aeruginosa* is intrinsically resistant to many antibiotics. As resistance to gentamicin remains high and fluoroquinolones cannot be used as first-line antibiotics, these findings point out the difficulty of choosing appropriate therapy for *P. aeruginosa* without susceptibility testing.

Acknowledgements. The authors would like to thank all the voluntary laboratories that collected and transmitted antibiogram results over several years. The authors are particularly grateful to Christelle Philippon (RESAPATH's secretary) for her meticulous follow-up of laboratories and careful data collection, and Jean-Luc Vinard (RESAPATH's data architect) for his careful management of the database.

Author ORCIDs. E. Gay 0000-0001-5983-9263.

Funding. This work was partly supported by the French Ministry of Agriculture (http://agriculture.gouv.fr). No additional external funding was received for this study. The funders had no role in study design, data collection, data analysis, decision to publish or preparation of the manuscript.

Conflict of interest. None.

Data availability. The data used for this study were obtained from the RESAPATH network. Conditions of approval (respecting the anonymity of farms and laboratories) do not allow us to distribute or make data available directly to other parties.

Author contributions. All the authors read and approved the final manuscript.

References

1. **Guardabassi L, Loeber ME and Jacobson A** (2004) Transmission of multiple antimicrobial-resistant *Staphylococcus intermedius* between dogs affected by deep pyoderma and their owners. *Veterinary Microbiology* **98**, 23–27.
2. **So JH *et al.*** (2012) Dissemination of multidrug-resistant *Escherichia coli* in Korean veterinary hospitals. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* **73**, 195–199.
3. **Song H and Lim S** (2015) Assessing pet industry in Korea using service quality improvement gap model. *International Journal of Technology, Policy and Management* **15**, 2–20.
4. **FACCO, KANTAR TNS** (2016) *Nouvelle enquête FACCO/KANTAR TNS : Début de stabilisation pour la population canine*. France, p. 2. https://

Downloaded from https://www.cambridge.org/core. ANSES Agence nationale de sécurité sanit, on 21 Mar 2019 at 14:45:23, subject to the Cambridge Core terms of use, available at https://www.cambridge.org/core/terms. https://doi.org/10.1017/S0950268818003278

www.prodaf.org/fr/nos-outils/documents/item/download/7_486c0e220c93b21175648e1fe35210a7.
5. **Cole LK *et al.*** (1998) Microbial flora and antimicrobial susceptibility patterns of isolated pathogens from the horizontal ear canal and middle ear in dogs with otitis media. *Journal of the American Veterinary Medical Association* **212**, 534–538.
6. **AFVAC** (2016) *Guide de bonnes pratiques fiche de recommandations pour un bon usage des antibiotiques – Filière animaux de compagnie*. p. 206.
7. **Oliveira LC *et al.*** (2008) Comparative study of the microbial profile from bilateral canine otitis externa. *The Canadian Veterinary Journal=La Revue Vétérinaire Canadienne* **49**, 785–788.
8. **Dégi J *et al.*** (2013) Frequency of isolation and antibiotic resistance of staphylococcal flora from external otitis of dogs. *The Veterinary Record* **173**, 42.
9. **Dziva F *et al.*** (2015) First identification of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* strains among coagulase-positive staphylococci isolated from dogs with otitis externa in Trinidad, West Indies. *Infection Ecology & Epidemiology* **5**, 29170.
10. **Graham-Mize CA and Rosser EJ** (2004) Comparison of microbial isolates and susceptibility patterns from the external ear canal of dogs with otitis externa. *Journal of the American Animal Hospital Association* **40**, 102–108.
11. **Penna B *et al.*** (2010) Species distribution and antimicrobial susceptibility of staphylococci isolated from canine otitis externa. *Veterinary Dermatology* **21**, 292–296.
12. **Zamankhan Malayeri H, Jamshidi S and Zahraei Salehi T** (2010) Identification and antimicrobial susceptibility patterns of bacteria causing otitis externa in dogs. *Veterinary Research Communications* **34**, 435–444.
13. **Kawakami T *et al.*** (2010) Antimicrobial susceptibility and methicillin resistance in *Staphylococcus pseudintermedius* and *Staphylococcus schleiferi subsp. coagulans* isolated from dogs with pyoderma in Japan. *The Journal of Veterinary Medical Science* **72**, 1615–1619.
14. **Lin D *et al.*** (2012) Characterization of antimicrobial resistance of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from canine infections. *Journal of Applied Microbiology* **113**, 16–23.
15. **Ludwig C *et al.*** (2016) Antimicrobial susceptibility monitoring of dermatological bacterial pathogens isolated from diseased dogs and cats across Europe (ComPath results). *Journal of Applied Microbiology* **121**, 1254–1267.
16. **Rubin J *et al.*** (2008) Antimicrobial resistance and genetic characterization of fluoroquinolone resistance of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from canine infections. *Veterinary Microbiology* **131**, 164–172.
17. **Lyskova P, Vydrzalova M and Mazurova J** (2007) Identification and antimicrobial susceptibility of bacteria and yeasts isolated from healthy dogs and dogs with otitis externa. *Journal of Veterinary Medicine. A, Physiology, Pathology, Clinical Medicine* **54**, 559–563.
18. **Kroemer S *et al.*** (2014) Antibiotic susceptibility of bacteria isolated from infections in cats and dogs throughout Europe (2002–2009). *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases* **37**, 97–108.
19. **Bourély C *et al.*** (2018) Comparative epidemiology of *E. coli* resistance to third-generation cephalosporins in diseased food-producing animals. *Veterinary Microbiology* **223**, 72–78.
20. **Dominici F *et al.*** (2002) On the use of generalized additive models in time-series studies of air pollution and health. *American Journal of Epidemiology* **156**, 193–203.
21. **Barlow J** (2011) Mastitis therapy and antimicrobial susceptibility: a multispecies review with a focus on antibiotic treatment of mastitis in dairy cattle. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia* **16**, 383–407.
22. **Boireau C *et al.*** (2018) Antimicrobial resistance trends in *Escherichia coli* isolated from diseased food-producing animals in France: a 14-year period time-series study. *Zoonoses and Public Health* **65**, 86–94.
23. **Magiorakos A-P *et al.*** (2012) Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clinical Microbiology and Infection* **18**, 268–281.
24. **Leonard FC and Markey BK** (2008) Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in animals: a review. *Veterinary Journal (London, England: 1997)* **175**, 27–36.
25. **Wieler LH *et al.*** (2011) Methicillin-resistant staphylococci (MRS) and extended-spectrum beta-lactamases (ESBL)-producing *Enterobacteriaceae* in companion animals: nosocomial infections as one reason for the rising prevalence of these potential zoonotic pathogens in clinical samples. *International Journal of Medical Microbiology: IJMM* **301**, 635–641.
26. **Colombini S, Merchant SR and Hosgood G** (2000) Microbial flora and antimicrobial susceptibility patterns from dogs with otitis media. *Veterinary Dermatology* **11**, 235–239.
27. **Hariharan H *et al.*** (2006) Update on antimicrobial susceptibilities of bacterial isolates from canine and feline otitis externa. *The Canadian Veterinary Journal=La Revue Veterinaire Canadienne* **47**, 253–255.
28. **Bugden DL** (2013) Identification and antibiotic susceptibility of bacterial isolates from dogs with otitis externa in Australia. *Australian Veterinary Journal* **91**, 43–46.
29. **Bello N *et al.*** (2018) Characterization and antimicrobial susceptibility profile of bacteraemia causing pathogens isolated from febrile children with and without sickle cell disease in Kano, Nigeria. *Mediterranean Journal of Hematology and Infectious Diseases* **10**, e2018016.
30. **Schultz E *et al.*** (2015) Survey of multidrug resistance integrative mobilizable elements SGI1 and PGI1 in *Proteus mirabilis* in humans and dogs in France, 2010–13. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **70**, 2543–2546.
31. **Boireau C *et al.*** (2018) Antimicrobial resistance in bacteria isolated from mastitis in dairy cattle in France, 2006–2016. *Journal of Dairy Science* **101**, 9451–9462.
32. **Bourély C *et al.*** (2018) Why do veterinarians ask for antimicrobial susceptibility testing? A qualitative study exploring determinants and evaluating the impact of antibiotic reduction policy. *Preventive Veterinary Medicine* **159**, 123–134.
33. **Boireau C *et al.*** (2018) Représentativité et couverture du résapath, le réseau d'épidémiosurveillance de l'antibiorésistance des bactéries pathogènes animales. *Bulletin épidémiologique santé animale et alimentation* **80**, 10–14.
34. **Toutain P-L *et al.*** (2017) En route towards European clinical breakpoints for veterinary antimicrobial susceptibility testing: a position paper explaining the VetCAST approach. *Frontiers in Microbiology* **8**, 2344
35. **Kiss G, Radványi S and Szigeti G** (1997) New combination for the therapy of canine otitis externa. I. Microbiology of otitis externa. *The Journal of Small Animal Practice* **38**, 51–56.
36. **Gómez-Sanz E *et al.*** (2013) Clonal dynamics of nasal *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus pseudintermedius* in dog-owning household members. Detection of MSSA ST398. *PLoS ONE* **8**, e69337.
37. **van Duijkeren E *et al.*** (2008) Transmission of methicillin-resistant *Staphylococcus intermedius* between humans and animals. *Veterinary Microbiology* **128**, 213–215.
38. **Martín Barrasa JL *et al.*** (2000) Antibacterial susceptibility patterns of *Pseudomonas* strains isolated from chronic canine otitis externa. *Journal of Veterinary Medicine. B, Infectious Diseases and Veterinary Public Health* **47**, 191–196.
39. **Mekić S, Matanović K and Šeol B** (2011) Antimicrobial susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from dogs with otitis externa. *The Veterinary Record* **169**, 125.
40. **Wildermuth BE *et al.*** (2007) Susceptibility of *Pseudomonas* isolates from the ears and skin of dogs to enrofloxacin, marbofloxacin, and ciprofloxacin. *Journal of the American Animal Hospital Association* **43**, 337–341.
41. **Hancock RE** (1998) Resistance mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa* and other nonfermentative gram-negative bacteria. *Clinical Infectious Diseases* **27**(Suppl. 1), S93–S99.
42. **Li X-Z, Plésiat P and Nikaido H** (2015) The challenge of efflux-mediated antibiotic resistance in Gram-negative bacteria. *Clinical Microbiology Reviews* **28**, 337–418.
43. **Haenni M *et al.*** (2017) Resistance of animal strains of *Pseudomonas aeruginosa* to carbapenems. *Frontiers in Microbiology* **8**, 1847.
44. **Breidenstein EBM, de la Fuente-Núñez C and Hancock REW** (2011) *Pseudomonas aeruginosa*: all roads lead to resistance. *Trends in Microbiology* **19**, 419–426.

Downloaded from https://www.cambridge.org/core. ANSES Agence nationale de sécurité sanit, on 21 Mar 2019 at 14:45:23, subject to the Cambridge Core terms of use, available at https://www.cambridge.org/core/terms. https://doi.org/10.1017/S0950268818003278

45. **Anses-ANMV** (2017) *Suivi des ventes de médicaments vétérinaires contenant des antibiotiques en France en* 2016. Anses, https://www.anses.fr/fr/system/files/ANMV-Ra-Antibiotiques2016.pdf, p. 108.
46. **Singleton DA *et al.*** (2017) Patterns of antimicrobial agent prescription in a sentinel population of canine and feline veterinary practices in the United Kingdom., patterns of antimicrobial agent prescription in a sentinel population of canine and feline veterinary practices in the United Kingdom. *Veterinary Journal (London, England : 1997)* **18**, 18–24.
47. **Humphries RM** (2015) Susceptibility testing of the polymyxins: where are we now? *Pharmacotherapy* **35**, 22–27.
48. **Morris DO** (2004) Medical therapy of otitis externa and otitis media. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice* **34**, 541–555.
49. **Anonymous** (2016) *Décret n°2016-317 du 16 mars 2016 relatif à la prescription et à la délivrance des médicaments utilisés en médecine vétérinaire contenant une ou plusieurs substances antibiotiques d'importance critique.* Mar 18.
50. **Vaudaux P and Waldvogel FA** (1980) Gentamicin inactivation in purulent exudates: role of cell lysis. *The Journal of Infectious Diseases* **142**, 586–593.

Downloaded from https://www.cambridge.org/core. ANSES Agence nationale de sécurité sanit, on 21 Mar 2019 at 14:45:23, subject to the Cambridge Core terms of use, available at https://www.cambridge.org/core/terms. https://doi.org/10.1017/S0950268818003278

Annexe 7 : Sixième article – Antimicrobial resistance in bacteria isolated from diseased horses in France

Equine Veterinary Journal

Equine Veterinary Journal ISSN 0425-1644
DOI: 10.1111/evj.13133

Antimicrobial resistance in bacteria isolated from diseased horses in France

C. BOURÉLY[†‡§], G. CAZEAU[‡], N. JARRIGE[‡], M. HAENNI[¶], E. GAY*[‡] and A. LEBLOND[§]

[†]École Nationale des Services Vétérinaires, ENSV, VetagroSup, Marcy l'Étoile, France
[‡]Laboratoire de Lyon, Unité Épidémiologie et Appui à la Surveillance, Université de Lyon, ANSES, Lyon, France
[§]Epidémiologie des maladies Animales et zoonotiques, INRA, EPIA, UMR 0346, VetAgroSup, University of Lyon, Marcy L'Etoile, France
[¶]Laboratoire de Lyon, Unité Antibiorésistance et Virulence Bactériennes, Université de Lyon, ANSES, Lyon, France.

*Correspondence email: emilie.gay@anses.fr; Received: 07.09.18; Accepted: 18.04.19

Summary

Background: Horses are one of the potential reservoirs of antimicrobial resistance (AMR) determinants that could be transferred to human subjects.
Objective: To describe the AMR patterns of major bacteria isolated from diseased horses in France.
Study design: Retrospective observational study.
Methods: Data collected between 2012 and 2016 by RESAPATH, the French national surveillance network for AMR, were analysed. Only antimicrobials relevant in veterinary and human medicine for the isolated bacteria were considered. Mono- and multidrug resistance were calculated. The resistance proportions of major equine diseases were assessed and compared. Where data permitted, resistance trends were investigated using nonlinear analysis (generalised additive models).
Results: A total of 12,695 antibiograms were analysed. The five most frequently isolated bacteria were *Streptococcus* spp., *Escherichia coli*, *Pseudomonas* spp., *Staphylococcus aureus*, *Pantoea* spp. and *Klebsiella* spp. The highest proportions of resistance to gentamicin were found for *S. aureus* (22.1%) and *Pseudomonas* spp. (26.9%). *Klebsiella* spp. and *E. coli* had the highest proportions of resistance to trimethoprim-sulfamethoxazole (15.5 and 26.2%, respectively). Proportions of resistance to tetracycline were among the highest for all the bacteria considered. Resistance to third-generation cephalosporins was below 10% for all *Enterobacteriaceae*. The highest proportions of multidrug resistance (22.5%) were found among *S. aureus* isolates, which is worrying given their zoonotic potential. From 2012 to 2016, resistance proportions decreased in *Pseudomonas* spp. isolates, but remained the same for *S. aureus*. For *Streptococcus* spp. and *E. coli*, resistance proportions to trimethoprim-sulfamethoxazole increased.
Main limitations: Since antibiograms are not systematic analyses, any selection bias could impact the results.
Conclusions: Such studies are essential to estimate the magnitude of the potential threat of AMR to public health, to design efficient control strategies and to measure their effectiveness. These findings may also guide the initial empirical treatment of horse diseases.

Keywords: horse; antimicrobial resistance; time series; multidrug resistance; RESAPATH

Introduction

Horses are one of the potential reservoirs of antimicrobial resistance (AMR) determinants that can be shared with human subjects through direct or indirect contact [1,2]. Major attention has been paid worldwide to the detection and characterisation of equine pathogens with zoonotic potential, that is *Enterobacteriaceae* producing extended-spectrum beta-lactamases (ESBL) or methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) [3–8]. Conversely, other bacteria such as streptococci are poorly studied despite their importance as equine pathogens, and little is known about their resistances, especially in Europe [9–11].

While several studies focused on the genetic characterisation of specific mechanisms of resistance in horses' bacteria, studies on the global epidemiology of equine pathogenic bacteria and their associated resistance phenotypes are rare [3,12,13]. In addition, the differences between studies suggest that resistances can largely vary according to the geographical area and the clinical context considered, reflecting different practices of antimicrobial use [4,5,12].

Understanding the evolution of AMR over time is crucial to estimate the burden of resistance. In North America [4,6,9,10,12], several studies have demonstrated variation of resistance levels in pathogenic bacteria isolated from horses over several years. Unfortunately, the analysis of resistance over time remained limited due to the small sampling size or the basic methodology used. Time-series analysis methods, which were used to describe AMR in food-producing animals [14,15], could be relevantly applied to describe more precisely the evolution of resistance in equine bacteria over time. In Europe, there is clearly a gap of knowledge regarding AMR dynamics in equine bacteria, while regularly updated data on the prevalence and variations in AMR in different bacteria isolated from horses would be necessary to estimate the potential threat to public health, design efficient control strategies and subsequently measure their effectiveness [16,17].

In western Europe, alongside Germany and the UK, France is one of the three countries with the largest equine herds in number, estimated at 1,100,000 horses [18]. Therefore, the aim of this study was to estimate the AMR pattern of the major bacteria isolated from diseased horses in France, to explore differences in AMR according to pathogenic context and to describe variations in AMR between 2012 and 2016.

Materials and methods

Data collection

This study was based on the results from bacterial culture and susceptibility testing (antibiograms) sent by French veterinary laboratories to RESAPATH, the established French national surveillance network for AMR in pathogenic bacteria from animals [14]. RESAPATH laboratories use standard bacteriological culture and methods for bacterial isolation and identification. All the laboratories perform antibiograms by the disc diffusion method, according to the recommendations of the Antibiogram Committee of the French Society of Microbiology (CA-SFM).

From the RESAPATH database, data on the bacterial genera most frequently isolated from diseased horses from 2012 to 2016 (at least 500 isolates collected over the period) were extracted, and antimicrobials of relevance in veterinary and human medicine were selected (Supplementary Item 1). The variables extracted included horse diseases, bacterial species, date of sampling, location of sampling by administrative sector and inhibition zone diameters for each antimicrobial tested.

Data analysis

For *Streptococcus* spp. isolates, analyses were performed for the *Streptococcus* spp. genus as a whole, since the data did not strictly distinguish between species. For the other genera, the main bacterial species was used if the number of isolates collected from this bacterial species was greater than 1000 (*Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*). For the other, less frequent, bacteria, genera were used for analysis (*Pseudomonas* spp., *Pantoea* spp., *Klebsiella* spp.).

In accordance with the approved breakpoints from the veterinary section of the CA-SFM, isolates were categorised as susceptible, intermediate or resistant, using their inhibition zone diameters. Since the event of interest is the nonsusceptibility of the isolate to a particular antimicrobial, indicating that it is no longer a wild-type strain, intermediate isolates were grouped together with resistant ones.

For each combination of bacteria and antimicrobial, the AMR indicator was defined as the ratio between the number of resistant strains and the total number of strains tested over the 2012–2016 period. Associations between disease and prevalence of resistance were tested: resistance proportions were calculated for each disease and then compared two by two using Fisher's exact test. A $P \leq 0.05$ was considered statistically significant.

Time-series data were analysed for those combinations of bacteria–antimicrobial for which we had sufficient data available (at least 25 antibiograms per time step [19] [bimonthly], all diseases combined). The ratio between the bimonthly number of resistant strains and the total number of strains submitted bimonthly was modelled using binomial regression. AMR trends for each antimicrobial [20] were modelled using generalised additive models (GAM). The analysis was carried out as described in Boireau *et al.* [14], using two splines designed to control for trend and seasonality. If the splines fitted were nonsignificant, they were removed from the model before drawing the smoothed time graphs. Version 3.4.0 of R software (21-04-2017) was used for all data processing and statistical analyses (gamm4 package for GAM implementation).

Multidrug resistance (MDR) analysis was carried out according to the classical definition of MDR (isolates with acquired nonsusceptibility to at least one antimicrobial in three or more antimicrobial classes). The following proportions were estimated: those of multisusceptible isolates (susceptible to all classes of antimicrobials tested and described in Supplementary Item 1); those resistant to one or two antimicrobials from different classes; those with MDR; and those resistant to all classes of antimicrobials considered [21]. These analyses were conducted with isolates for which full records on resistance to the aforementioned antimicrobial classes (Supplementary Item 1) were available. For *Pseudomonas aeruginosa*, only two antimicrobials are commonly tested by veterinary laboratories in France (enrofloxacin and gentamicin), so the MDR analysis was limited to these two. Confidence intervals (95% CIs) for the proportions were calculated using the exact binomial method (P-values were two-sided).

Results

Between 1 January 2012 and 31 December 2016, the six most frequent bacteria isolated from diseased horses were *Streptococcus* spp., *E. coli*, *Pseudomonas* spp., *Staphylococcus aureus*, *Pantoea* spp. and *Klebsiella* spp. (Supplementary Item 2).

Resistance to antimicrobials

Over the whole period 2012–2016, resistance to penicillins was low throughout for *Streptococcus* spp. (2.2%) but higher for *E. coli* (41.1%) and *S. aureus* (42.6%) (Table 1). The proportion of resistance to third-generation cephalosporins was below 10% for all *Enterobacteriaceae*: 7.6% for *E. coli*, 5.2% for *Klebsiella* spp. and 0.7% for *Pantoea* spp. Resistance to gentamicin was very low for *Pantoea* spp. (0.1%); below 10% for *Streptococcus* spp. (1.2%), *Klebsiella* spp. (6.1%) and *E. coli* (9.0%); but higher for *S. aureus* (22.1%) and *Pseudomonas* spp. (26.9%). Proportions of resistance to tetracycline were among the highest for all bacteria considered, except *Pantoea* spp. The proportions of resistance to trimethoprim-sulfamethoxazole were very low for *Pantoea* spp. (0.3%), below 10% for *Streptococcus* spp. (9.9%) and *S. aureus* (6.0%), and higher for *Klebsiella* spp. (15.5%) and *E. coli* (26.2%). Resistances to fluoroquinolones were very low for *Pantoea* spp. (0.4%) and below 5% for *E. coli* (4.5%), *S. aureus* (2.9%) and *Klebsiella* spp. (3.1%), whereas they were much higher for *Pseudomonas* spp. (40.2%) and *Streptococcus* spp. (68.4%).

Resistance by disease

The isolates originated from three major pathological contexts: reproductive diseases, respiratory diseases and diseases of the skin and mucosa (Supplementary Item 3). Proportions of resistance were significantly different for many antimicrobials, depending on the disease (Table 2), except for *Pantoea* spp. In *Streptococcus* spp. isolates, the highest proportions of resistance were identified for reproductive diseases, except for trimethoprim-sulfamethoxazole and oxacillin. For *S. aureus*, reproductive diseases likewise presented the highest proportions of resistance. For *E. coli* and *Klebsiella* spp. isolates, on the other hand, the proportions of resistance from reproductive diseases were the lowest.

Trends in resistance

The analysis of trend in the proportions of resistance over the 2012–2016 period for *Streptococcus* spp., *E. coli*, *Pseudomonas* spp. and *S. aureus* isolates did not reveal any seasonal cycle, and the seasonal component in the model was never significant (Table 1). For *S. aureus*, all resistance trends were stationary (without significant variations) over the period.

For *Streptococcus* spp., trends in resistance to erythromycin, gentamicin and enrofloxacin were stationary. Trends in resistance to oxacillin, tetracycline and trimethoprim-sulfamethoxazole, however, were neither stationary nor linear over the period (Fig 1). The proportions of resistance to tetracycline increased from January 2012 (29.5% [19.8; 39.2]) to May 2013 (65.6% [60.7; 70.5]) and then fluctuated at very high proportions, reaching 65.1% [54.0; 76.2] in December 2016. The trend in resistance to oxacillin was initially stationary from 2012 to May 2015 and then increased from 1.8% [1.2; 2.3] up to 4.7% [2.4; 6.9] in December 2016. Similarly, though it started off stable, the proportion of resistance to trimethoprim-sulfamethoxazole then sharply increased, rising from 8.1% [6.1; 10.3] in January 2016 to 53.5% [42.8; 64.2] in December 2016.

For *E. coli*, trends in resistance to gentamicin, tetracycline, enrofloxacin and ceftiofur were stationary. The trend in resistance to amoxicillin, on the other hand, was neither stationary nor linear over the period, and proportions of resistance decreased from 53.0% [43.3; 62.6] in January 2012 to 36.4% [31.8; 40.9] in May 2015 and then stabilised (Fig 2). The proportion of resistance to trimethoprim-sulfamethoxazole increased linearly from 21.6% [17.9; 25.4] in January 2012 to 30.5% [26.4; 34.5] in December 2016.

The resistance trends for *Pseudomonas* spp. also showed significant variation. The trend in resistance to gentamicin was linear and proportions of resistance dropped from 30.0% [24.0; 36.0] in January 2012 to 16.3% [11.4; 21.2] in December 2016. The trend in resistance to enrofloxacin was nonlinear, but proportions of resistance also decreased from 51.7% [45.2; 58.3] in January 2012 to 30.0% [25.0; 34.5] in December 2016 (Fig 3).

Multidrug resistance

The analysis of MDR included 9497 isolates for which complete records on resistance to the aforementioned classes of antimicrobials were available (Table 1). The MDR proportions (Table 3) were very low for *Pantoea* spp. (0.2%), below 5% for *Klebsiella* spp. (4.0%), but higher for *Streptococcus* spp. (10.1%) and *E. coli* (16.5%). *S. aureus* isolates had the highest proportions of MDR over the whole period (22.5%). The proportion of *Pseudomonas* spp. resistant to both gentamicin and enrofloxacin reached 7.7%.

Discussion

Aims and limits

The aim of our study was to estimate the AMR pattern and variations in the six bacteria most frequently isolated from diseased horses in France on the basis of 12,695 antibiograms collected by RESAPATH from 2012 to 2016. The major strength of this study was the availability of an ongoing

TABLE 1: Proportion of resistance (in % with 95% CI) of bacteria isolated from diseased horses in France over the 2012–2016 period and identification of resistance trends

Pathogen	Antibiotic	Total number of isolates	Proportion of resistance (%)	Resistance trend
Streptococcus spp.	Oxacillin	5222	2.0 [1.6; 2.4]	Nonlinear
	Erythromycin	5557	8.3 [7.6; 9.1]	Stationary
	Gentamicin	4810	1.2 [0.9; 1.5]	Stationary
	Enrofloxacin	5523	68.4 [67.2; 69.6]	Stationary
	Tetracycline	4810	60.1 [58.7; 61.5]	Nonlinear
	SXT	5050	9.9 [9.1; 10.8]	Nonlinear
Escherichia coli	Amoxicillin	3272	41.1 [39.4; 42.8]	Nonlinear
	Ceftiofur	3311	7.6 [6.7; 8.6]	Stationary
	Gentamicin	3312	9.0 [8.0; 10.0]	Stationary
	Enrofloxacin	3306	4.5 [3.8; 5.2]	Stationary
	Tetracycline	2626	23.1 [21.5; 24.7]	Stationary
	SXT	2963	26.2 [24.6; 27.8]	Linear increasing
Pseudomonas spp.	Gentamicin	1310	23.2 [20.9; 25.6]	Linear decreasing
	Enrofloxacin	1307	40.2 [37.6; 43.0]	Nonlinear
Staphylococcus aureus	Penicillin G	1113	42.6 [39.7; 45.6]	Stationary
	Cefoxitin	1020	23.0 [20.5; 25.7]	Stationary
	Erythromycin	1106	6.3 [5.0; 7.9]	Stationary
	Gentamicin	1122	22.1 [19.7; 24.6]	Stationary
	Enrofloxacin	1098	2.9 [2.0; 4.1]	Stationary
	Tetracycline	1040	33.5 [30.2; 36.9]	Stationary
	SXT	1016	6.0 [4.6; 7.6]	–
Pantoea spp.	Ceftiofur	713	0.7 [0.2; 1.6]	–
	Gentamicin	713	0.1 [0.0; 0.1]	–
	Enrofloxacin	713	0.1 [0.0; 0.1]	–
	Tetracycline	684	0.3 [0.0; 1.2]	–
	SXT	602	0.3 [0.0; 1.2]	–
Klebsiella spp.	Ceftiofur	617	5.2 [3.6; 7.2]	–
	Gentamicin	619	6.1 [4.4; 8.3]	–
	Enrofloxacin	615	3.1 [1.9; 4.8]	–
	Tetracycline	488	18.0 [14.7; 21.7]	–
	SXT	566	15.5 [12.7; 18.8]	–

SXT, Trimethoprim-sulfamethoxazole; –, no breakdown due to the low number of isolates.

nationwide surveillance system for AMR in horses among other animals, namely the RESAPATH network. However, this study had several limitations due to potential selection biases in data, since laboratories join RESAPATH on a voluntary basis and antibiograms rely on the decisions made by veterinarians during animal health care, which could lead to a lack of representativeness. Nevertheless, an assessment of the network in 2015 concluded that RESAPATH was representative [22].

For *Pseudomonas* spp. isolates, ciprofloxacin is considered to be a better marker of fluoroquinolone resistance than enrofloxacin [23], which tends to result in an overestimation of resistance proportions. Ciprofloxacin is not routinely tested by veterinary laboratories, however, because its use is restricted to human medicine. Therefore, the proportions of resistance by *Pseudomonas* spp. to fluoroquinolones might have been overestimated in our study. Nevertheless, since fluoroquinolones are considered of critical importance in human medicine, having information on resistance to this family of molecules is important, even if the information is imperfect. It is most likely that resistance to fluoroquinolones has also been overestimated in streptococcus isolates because intermediate and resistant isolates were grouped together: due to an intrinsic resistance to quinolones, some streptococci are often classified as phenotypically intermediate without carrying any selected resistance mutation. Finally, some insignificant differences in resistance proportions between horse diseases were potentially due to a lack of statistical power, related to a low number of isolates for some diseases.

Comparison with other studies

To the authors' knowledge, this study is the first to investigate AMR in bacteria isolated from diseased horses at a national level, to compare AMR proportions between horse diseases and to apply time-series analysis methods to AMR data. In the literature, most studies have focused on MRSA and ESBL-producing *E. coli* due to limited treatment strategies and their zoonotic potential [9]. To properly compare our results to previous ones, we should take into account methodological features (for instance, sample selection and size, the bacterial population studied or the breakpoints used), which can limit data comparison.

With respect to the common genera and species of bacteria isolated from horses, our findings are consistent with previous studies [9,12,24,25]: *Streptococcus* spp. and *E. coli* were the most common bacteria isolated over the period in France. In a study carried out in the United States using data collected between 2000 and 2010 in a pathological context, the authors reported similar proportions of resistance to beta-lactam (2.0%) and erythromycin (2.4%) in streptococci isolated from horses (2,893 isolates), but they described higher proportions of resistance to gentamicin (12.5%) and trimethoprim-sulfamethoxazole (69.1%) [10]. More recently, a study in Canada based on clinical isolates collected from horses over the 2007–2010 period mentioned that trimethoprim-sulfamethoxazole resistance was high (35%), but no isolate was resistant to beta-lactam [9]. In this same study, 57 *E. coli* isolates were collected and the authors reported higher proportions of resistance to gentamicin (25%), ceftiofur (18%) and trimethoprim-sulfamethoxazole (26.2%) than in our own findings. Like our own results, Saputra *et al.* identified *S. aureus* as the most frequent coagulase-positive staphylococci isolated from diseased horses in Australia in 2013. Resistance to tetracycline (32.1%) and amoxicillin (47.1%) was close to that reported in our study, but a lower resistance to trimethoprim-sulfamethoxazole (13.2%) was reported [26]. All the differences observed may be due to differences in study design or difference in geographical distribution of different clones, but they also suggest differences in antimicrobial use between countries.

TABLE 2: Proportion of resistance (in %) of bacteria isolated from diseased horses in France over the 2012–2016 period by disease and P-value for comparisons between proportions

		Proportion of resistance (%) by disease				P-value for each comparison		
Bacteria	Antimicrobial	Reproductive	Respiratory	Skin and mucosa	Significant difference between at least 2 proportions	Reproductive vs. respiratory	Reproductive vs. skin and mucosa	Respiratory vs. skin and mucosa
Streptococcus spp.	Oxacillin	1.2	1.6	1.2	No	0.7	0.9	0.5
	Erythromycin	10.7	3.6	6.2	Yes	<0.001	<0.001	0.01
	Gentamicin	1.4	0.5	0.8	Yes	0.02	0.3	0.5
	Enrofloxacin	70.3	65.7	69.7	Yes	0.005	0.8	0.08
	Tetracycline	64.6	54.8	61.4	Yes	<0.001	0.1	0.008
	SXT	7.8	10.5	6.2	Yes	0.01	0.2	0.004
Escherichia coli	Amoxicillin	37.5	52.0	48.7	Yes	<0.001	<0.001	0.4
	Ceftiofur	4.5	10.3	15.4	Yes	<0.001	<0.001	0.05
	Gentamicin	5.3	11.2	22.1	Yes	<0.001	<0.001	<0.001
	Enrofloxacin	1.7	5.1	14.8	Yes	<0.001	<0.001	<0.001
	Tetracycline	18.4	23.2	35.6	Yes	0.03	<0.001	<0.001
	SXT	21.0	28.6	45.0	Yes	0.002	<0.001	<0.001
Staphylococcus aureus	Penicillin G	57.1	42.4	36.5	Yes	0.02	<0.001	0.3
	Cefoxitin	29.6	18.1	19.3	Yes	0.04	0.001	0.9
	Erythromycin	6.0	5.4	6.1	No	1	1	1
	Gentamicin	37.6	14.1	16.4	Yes	<0.001	<0.001	0.6
	Enrofloxacin	1.5	4.5	2.7	No	0.1	0.3	0.3
	Tetracycline	45.1	15.1	18.8	Yes	<0.001	<0.001	0.5
	SXT	5.8	4.9	4.8	No	1	0.6	1
Pseudomonas spp.	Gentamicin	12.9	31.3	14.5	Yes	<0.001	0.05	<0.001
	Enrofloxacin	50.1	33.6	63.3	Yes	<0.001	0.01	<0.001
Pantoea spp.	Ceftiofur	0.0	0.4	0.0	No	1	1	1
	Gentamicin	0.0	0.0	0.0	No	1	1	1
	Enrofloxacin	0.0	0.0	0.0	No	1	1	1
	Tetracycline	0.0	0.0	0.0	No	1	1	1
	SXT	0.0	0.0	0.0	No	1	1	1
Klebsiella spp.	Ceftiofur	3.7	6.0	8.7	No	0.3	0.1	0.5
	Gentamicin	3.4	7.5	17.4	Yes	0.05	<0.001	0.08
	Enrofloxacin	0.8	5.3	11.1	Yes	0.004	<0.001	0.2
	Tetracycline	14.5	18.8	35.0	Yes	0.3	0.003	0.05
	SXT	11.2	19.8	35.7	Yes	0.02	<0.001	0.06

SXT, trimethoprim-sulfamethoxazole.

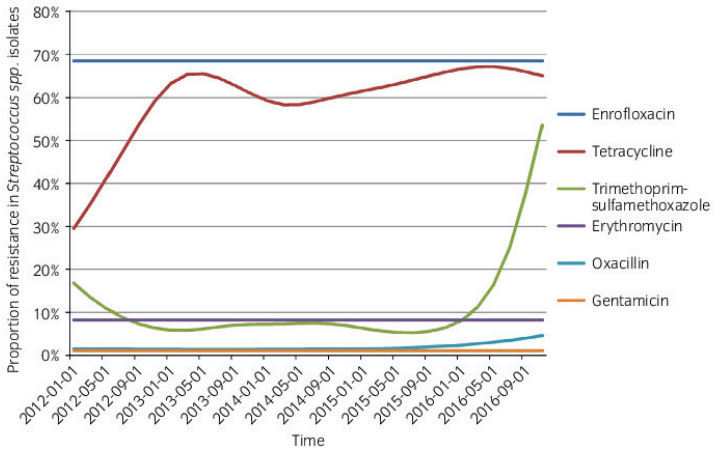


Fig 1: Trends of antimicrobial resistance (proportions in %) in *Streptococcus* spp. isolates from diseased horses during the 2012–2016 period, using a bimonthly time step.

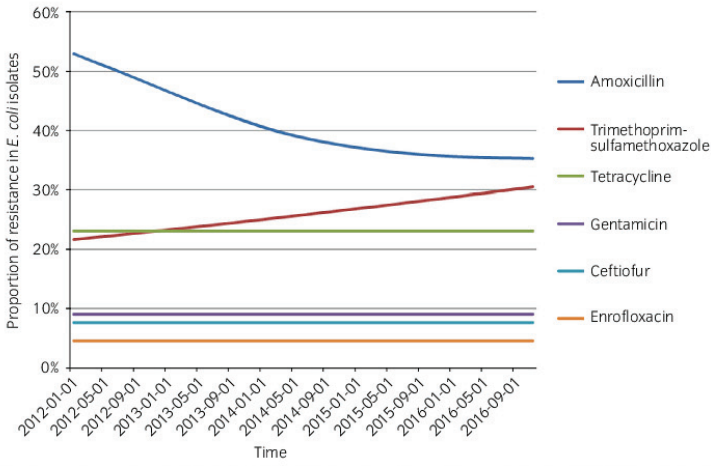


Fig 2: Trends of antimicrobial resistance (proportions in %) in *Escherichia coli* isolates from diseased horses during the 2012–2016 period, using a bimonthly time step.

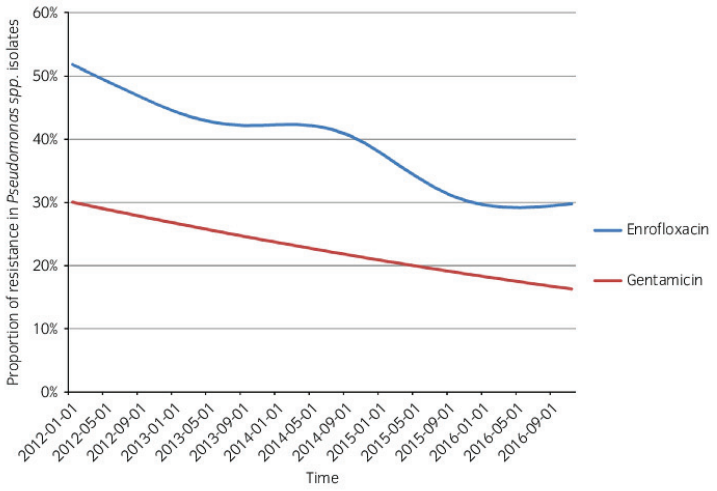


Fig 3: Trends of antimicrobial resistance (proportions in %) in *Pseudomonas* spp. isolates from diseased horses during the 2012–2016 period, using a bimonthly time step.

Few studies have so far investigated resistance trends in bacterial isolates from horses: there has been one in France [17], one in the UK [27], two in Canada [9,12], three in the United States [4,6,10] and one in South Africa [13]. Except for Davis *et al.*, these authors analysed annual proportions or proportions grouped together over several years in order to detect linear trends, and thus, they were not able to identify nonlinear variations in trends over time. Davis *et al.* focused on uterine samples from mares undergoing a routine breeding examination or examined because of a reproductive disorder. They used the generalised linear model to investigate AMR trends between 2003 and 2008, but their sample sizes per time step were very low (less than 10 isolates, whereas at least 25 are recommended) [19]. Given that in our study, we applied GAM to larger samples, and we were able to more accurately describe the trends and changes; econometric methods such as time-series analysis offer a valuable approach for understanding the epidemiology of AMR.

Finally, this is the first study to explore resistance in *Pantoea* spp. isolates from horses. *Pantoea* spp. was the third most frequently isolated bacteria from reproductive diseases in France, and its resistance over the period was very low, unlike that of other *Enterobacteriaceae* studied.

Public health concern

AMR pathogens in domestic animals such as dogs, cats and horses can be cross-transmitted to human subjects, and close contact can foster the dissemination of AMR determinants [28]. The study of resistance in pathogenic strains carried by these animals is therefore of major interest.

TABLE 3: Proportions (in % with 95% CI) of isolates that were multisusceptible, resistant to one or two classes of antimicrobials, multidrug-resistant or resistant to all classes of antimicrobials selected for analysis over the 2012–2016 period

Bacteria (total number of isolates)	Susceptibility patterns of isolates	Number of isolates	Proportion (% [CI])
Streptococcus spp. (3788)	Multisusceptible	594	15.7 [14.5; 16.9]
	Resistant to one or two classes	2812	74.2 [72.8; 75.6]
	Multidrug-resistant	382	10.1 [9.1; 11.1]
	Resistant to all classes of antimicrobials selected	2	0.1 [0.0; 0.2]
Escherichia coli (2230)	Multisusceptible	1048	47.0 [44.9; 49.1]
	Resistant to one or two classes	815	36.5 [34.5; 38.6]
	Multidrug-resistant	367	16.5 [14.9; 18.1]
	Resistant to all classes of antimicrobials selected	42	1.9 [1.4; 2.5]
Pseudomonas spp. (1304)	Multisusceptible	577	44.2 [41.5;47.0]
	Resistant to enrofloxacin and gentamicin	101	7.7 [6.4; 9.3]
Staphylococcus aureus (859)	Multisusceptible	452	52.6 [49.2; 56.0]
	Resistant to one or two classes	214	24.9 [22.1; 27.9]
	Multidrug-resistant	193	22.5 [19.7; 25.4]
	Resistant to all classes of antimicrobials selected	2	0.2 [0.0; 0.8]
Pantoea spp. (577)	Multisusceptible	570	98.8 [97.5; 99.5]
	Resistant to one or two classes	6	1.0 [0.4; 2.2]
	Multidrug-resistant	1	0.2 [0.0; 1.0]
	Resistant to all classes of antimicrobials selected	0	0.0 [0.0; 0.6]
Klebsiella spp. (429)	Multisusceptible	325	75.8 [71.4; 79.7]
	Resistant to one or two classes	87	20.3 [16.6; 24.4]
	Multidrug-resistant	17	4.0 [2.3; 6.3]
	Resistant to all classes of antimicrobials selected	3	0.7 [0.1; 2.0]

In Gram-negative bacteria, resistance to fluoroquinolones and last-generation cephalosporins is the most challenging issue. *Pseudomonas* infections are of particular concern because *Pseudomonas aeruginosa* is intrinsically resistant to many antimicrobials including beta-lactams, tetracycline, chloramphenicol, trimethoprim, kanamycin and quinolones [29], and it is also known for its capacity to rapidly acquire additional resistance determinants [30]. Data on the epidemiology of resistance in *Pseudomonas* spp. isolates have been limited in veterinary medicine, however, and have been mostly documented in dogs and cats [31,32]. Our study has shown that *Pseudomonas* spp. has frequently been isolated from horses, thereby stressing its importance as an equine pathogen. *Pseudomonas* resistance has previously been investigated in France [33] and in Brazil [11] but using a limited number of isolates, or mixing isolates from different species [33]. Our study therefore constitutes a major contribution to knowledge about *Pseudomonas* resistance in horses.

Currently, among Gram-positive bacteria, MRSA is of particular concern due to the limited treatment options (resistance to beta-lactamases), its zoonotic potential [34] and the importance of this pathogen in nosocomial infections in both human and veterinary medicine [35,36]. MRSA prevalence in horses reportedly ranges between 0 and 7% [7,37], and hospitalised horses are more at risk. In our study, despite a lack of further genetic investigations, the proportion of phenotypically methicillin-resistant *S. aureus* was high (23.0%) and stable over the period studied. Even if this approximation is clearly an overestimation of the real proportion of MRSA, our results indicated that it is not as rare to isolate MRSA from infected horses in France as previously thought, a fact that is of particular concern. These findings are in accordance with a previous French study estimating the proportion of MRSA isolates at 6.1% (confirmed by genetic investigation) in horse infections from 2007 to 2013 [5].

Streptococcus spp. bacteria are commensal, opportunistic pathogens for human subjects and animals, and constitute the clinical bacteria most frequently isolated from horses. Even if streptococcus resistance is not a major public health concern (zoonotic pathogens being rare), our findings pointed out that streptococcus resistance can sharply increase over a short period. The current trend for resistance to trimethoprim-sulfamethoxazole can probably be explained by its wide use to treat horses in France. Indeed, this is preferentially prescribed in the case of prolonged therapy since it can be administered orally by owners. Considering the clear increase in trimethoprim-sulfamethoxazole resistance both for streptococci and for *E. coli* isolates, bacterial identification and susceptibility testing should be recommended as soon as clinical deterioration occurs.

Conclusion

This study provides new knowledge about the AMR pattern of the major causative agents of horse diseases isolated in France. Such knowledge of AMR prevalence and trends enables the judicious and prudent use of antimicrobials in animals: our findings provide veterinarians with comprehensive data to guide their initial empirical therapy. Our results emphasise the necessity to conduct further monitoring studies to estimate the proportion of AMR in horses and provide important recommendations regarding the use of some frequently used antimicrobials to treat common diseases. In the future, it will be necessary to collect accurate data on antimicrobial use in the equine sector to enable comparison with AMR trends. Ultimately, these results contribute to risk assessment and constitute objective evidence on which to evaluate the efficacy of control measures implemented to limit AMR.

Authors' declaration of interests

The authors declare no potential conflicts of interest with respect to the research, authorship and/or publication of this article.

Ethical animal research

Research ethics committee oversight not currently required by this journal: procedures were performed as part of clinical investigations.

Owner informed consent

Explicit owner informed consent for participation in this study was not stated.

Source of funding

This work was partially funded by the French Ministry of Agriculture (http://agriculture.gouv.fr).

Acknowledgements

The authors would like to thank all the laboratories that voluntarily collected and transmitted antibiogram results over several years. The

authors are particularly grateful to Christelle Philippon (RESAPATH's secretary) for her meticulous follow-up of laboratories and careful data collection and Jean-Luc Vinard (RESAPATH's data architect) for his careful management of the database.

Author contributions

C. Bourély, G. Cazeau, E. Gay and A. Leblond have designed the study. C. Bourély, G. Cazeau and A. Leblond have executed the study. All the authors have contributed to the data analysis and interpretation. All the authors have contributed to the preparation of the manuscript. All the authors have read and approved the final manuscript.

References

1. Schmiedel, J., Falgenhauer, L., Domann, E., Bauerfeind, R., Prenger-Berninghoff, E., Imirzalioglu, C. and Chakraborty, T. (2014) Multiresistant extended-spectrum β-lactamase-producing Enterobacteriaceae from humans, companion animals and horses in central Hesse, Germany. *BMC Microbiol.* **14**, 187.
2. EMA (2015) *Reflection Paper on the Risk of Antimicrobial Resistance Transfer from Companion Animals*, European Medicine Agency, London.
3. Maddox, T.W., Clegg, P.D., Williams, N.J. and Pinchbeck, G.L. (2015) Antimicrobial resistance in bacteria from horses: epidemiology of antimicrobial resistance. *Equine Vet. J.* **47**, 756-765.
4. Davis, H.A., Stanton, M.B., Thungrat, K. and Boothe, D.M. (2013) Uterine bacterial isolates from mares and their resistance to antimicrobials: 8,296 cases (2003-2008). *J. Am. Vet. Med. Ass.* **242**, 977-983.
5. Guérin, F., Fines-Guyon, M., Meignen, P., Delente, G., Fondrinier, C., Bourdon, N., Cattoir, V. and Léon, A. (2017) Nationwide molecular epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* responsible for horse infections in France. *BMC Microbiol.* **17**, 104. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5415774/ (Accessed 2 August 2017).
6. Theelen, M.J.P., Wilson, W.D., Edman, J.M., Magdesian, K.G. and Kass, P.H. (2014) Temporal trends in in vitro antimicrobial susceptibility patterns of bacteria isolated from foals with sepsis: 1979-2010. *Equine Vet. J.* **46**, 161-168.
7. Maddox, T.W., Pinchbeck, G.L., Clegg, P.D., Wedley, A.L., Dawson, S. and Williams, N.J. (2012) Cross-sectional study of antimicrobial-resistant bacteria in horses. Part 2: risk factors for faecal carriage of antimicrobial-resistant *Escherichia coli* in horses. *Equine Vet. J.* **44**, 297-303.
8. Weese, J.S., Archambault, M., Dick, H., Hearn, P., Kreiswirth, B.N., Said-Salim, B., McGeer, A., Likhoshvay, Y., Prescott, J.F. and Low, D.E. (2005) Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in horses and horse personnel, 2000–2002. *Emerg. Infect. Dis.* **11**, 430-435.
9. Malo, A., Cluzel, C., Labrecque, O., Beauchamp, G., Lavoie, J.-P. and Leclere, M. (2016) Evolution of in vitro antimicrobial resistance in an equine hospital over 3 decades. *Can. Vet. J.* **57**, 747-751.
10. Erol, E., Locke, S.J., Donahoe, J.K., Mackin, M.A. and Carter, C.N. (2012) Beta-hemolytic Streptococcus spp. from horses: a retrospective study (2000-2010). *J. Vet. Diagn. Invest.* **24**, 142-147.
11. Leigue, L., Montiani-Ferreira, F. and Moore, B.A. (2016) Antimicrobial susceptibility and minimal inhibitory concentration of Pseudomonas aeruginosa isolated from septic ocular surface disease in different animal species. *Open Vet. J.* **6**, 215-222.
12. Clark, C., Greenwood, S., Boison, J.O., Chirino-Trejo, M. and Dowling, P.M. (2008) Bacterial isolates from equine infections in western Canada (1998-2003). *Can. Vet. J.* **49**, 153-160.
13. Chipangura, J.K., Chetty, T., Kgoete, M. and Naidoo, V. (2017) Prevalence of antimicrobial resistance from bacterial culture and susceptibility records from horse samples in South Africa. *Prev. Vet. Med.* **148**, 37-43.
14. Boireau, C., Morignat, É., Cazeau, G., Jarrige, N., Jouy, É., Haenni, M., Madec, J.-Y., Leblond, A. and Gay, É. (2018) Antimicrobial resistance trends in *Escherichia coli* isolated from diseased food-producing animals in France: a 14-year period time-series study. *Zoonoses Public Health* **65**, 86-94.
15. Boireau, C., Cazeau, G., Jarrige, N., Calavas, D., Madec, J.-Y., Leblond, A., Haenni, M. and Gay, É. (2018) Antimicrobial resistance in bacteria isolated from mastitis in dairy cattle in France, 2006–2016. *J. Dairy Sci.* **101**, 9451-9462.
16. Bowen, M. (2013) Antimicrobial stewardship: time for change. *Equine Vet. J.* **45**, 127-129.
17. Robinson, T.P., Bu, D.P., Carrique-Mas, J., Fèvre, E.M., Gilbert, M., Grace, D., Hay, S.I., Jiwakanon, J., Kakkar, M., Kariuki, S., Laxminarayan, R., Lubroth, J., Magnusson, U., Thi Ngoc, P., Van Boeckel, T.P. and Woolhouse, M.E.J. (2017) Antibiotic resistance: mitigation opportunities in livestock sector development. *Animal* **11**, 1-3.
18. IFCE. (2017). Filière équine française : chiffres clés 2017.
19. Barlow, J. (2011) Mastitis therapy and antimicrobial susceptibility: a multispecies review with a focus on antibiotic treatment of mastitis in dairy cattle. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* **16**, 383-407.
20. Wood, S.N. (2008) Fast stable direct fitting and smoothness selection for generalized additive models. *J. R. Stat. Soc. Series B Stat. Methodol.* **70**, 495-518.
21. Magiorakos, A.-P., Srinivasan, A., Carey, R.B., Carmeli, Y., Falagas, M.E., Giske, C.G., Harbarth, S., Hindler, J.F., Kahlmeter, G., Olsson-Liljequist, B., Paterson, D.L., Rice, L.B., Stelling, J., Struelens, M.J., Vatopoulos, A., Weber, J.T. and Monnet, D.L. (2012) Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin. Microbiol. Infect.* **18**, 268-281.
22. Boireau, C., Jarrige, N., Cazeau, G., Jouy, É., Haenni, M., Philippon, C., Calavas, D., Madec, J.-Y., Leblond, A. and Gay, E. (2018) Représentativité et couverture du résapath, le réseau d'épidémiosurveillance de l'antibiorésistance des bactéries pathogènes animales. *Bull. Epidemiol. Sante Anim. Aliment.* **80**, 10-14.
23. Wildermuth, B.E., Griffin, C.E., Rosenkrantz, W.S. and Boord, M.J. (2007) Susceptibility of Pseudomonas isolates from the ears and skin of dogs to enrofloxacin, marbofloxacin, and ciprofloxacin. *J. Am. Anim. Hosp. Ass.* **43**, 337-341.
24. Davies, S.C., Fowler, T., Watson, J., Livermore, D.M. and Walker, D. (2013) Annual Report of the Chief Medical Officer: infection and the rise of antimicrobial resistance. *Lancet* **381**, 1606-1609.
25. Frontoso, R., De Carlo, E., Pasolini, M.P., van der Meulen, K., Pagnini, U., Iovane, G. and De Martino, L. (2008) Retrospective study of bacterial isolates and their antimicrobial susceptibilities in equine uteri during fertility problems. *Res. Vet. Sci.* **84**, 1-6.
26. Saputra, S., Jordan, D., Worthing, K.A., Norris, J.M., Wong, H.S., Abraham, R., Trott, D.J. and Abraham, S. (2017) Antimicrobial resistance in coagulase-positive staphylococci isolated from companion animals in Australia: a one year study. *PLoS One* **12**, e0176379.
27. Johns, I.C. and Adams, E.-L. (2015) Trends in antimicrobial resistance in equine bacterial isolates: 1999–2012. *Vet. Rec.* **176**, 334-334.
28. Pomba, C., Rantala, M., Greko, C., Baptiste, K.E., Catry, B., van Duijkeren, E., Mateus, A., Moreno, M.A., Pyörälä, S., Ružauskas, M., Sanders, P., Teale, C., Threlfall, E.J., Kunsagi, Z., Torren-Edo, J., Jukes, H. and Törneke, K. (2017) Public health risk of antimicrobial resistance transfer from companion animals. *J. Antimicrob. Chemother.* **72**, 957-968.
29. Li, X.-Z., Plésiat, P. and Nikaido, H. (2015) The challenge of efflux-mediated antibiotic resistance in Gram-negative bacteria. *Clin. Microbiol. Rev.* **28**, 337-418.
30. Breidenstein, E.B.M., de la Fuente-Núñez, C. and Hancock, R.E.W. (2011) Pseudomonas aeruginosa: all roads lead to resistance. *Trends Microbiol.* **19**, 419-426.
31. Hariharan, H., Coles, M., Poole, D., Lund, L. and Page, R. (2006) Update on antimicrobial susceptibilities of bacterial isolates from canine and feline otitis externa. *Can. Vet. J.* **47**, 253-255.
32. Mekić, S., Matanović, K. and Šeol, B. (2011) Antimicrobial susceptibility of Pseudomonas aeruginosa isolates from dogs with otitis externa. *Vet. Rec.* **169**, 125.
33. Haenni, M., Hocquet, D., Ponsin, C., Cholley, P., Guyeux, C., Madec, J.-Y. and Bertrand, X. (2015) Population structure and antimicrobial susceptibility of Pseudomonas aeruginosa from animal infections in France. *BMC Vet. Res.* **11**, 9.
34. Islam, M.Z., Espinosa-Gongora, C., Damborg, P., Sieber, R.N., Munk, R., Husted, L., Moodley, A., Skov, R., Larsen, J. and Guardabassi, L. (2017) Horses in denmark are a reservoir of diverse clones of methicillin-

resistant and -susceptible *Staphylococcus aureus*. *Front. Microbiol.* **8**, 543.
35. Leonard, F.C. and Markey, B.K. (2008) Meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* in animals: a review. *Vet. J.* **175**, 27-36.
36. Wieler, L.H., Ewers, C., Guenther, S., Walther, B. and Lübke-Becker, A. (2011) Methicillin-resistant staphylococci (MRS) and extended-spectrum beta-lactamases (ESBL)-producing Enterobacteriaceae in companion animals: nosocomial infections as one reason for the rising prevalence of these potential zoonotic pathogens in clinical samples. *Int. J. Med. Microbiol.* **301**, 635-641.
37. Tirosh-Levy, S., Steinman, A., Carmeli, Y., Klement, E. and Navon-Venezia, S. (2015) Prevalence and risk factors for colonization with methicillin resistant *Staphylococcus aureus* and other Staphylococci species in hospitalized and farm horses in Israel. *Prev. Vet. Med.* **122**, 135-144.

Supporting Information

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article at the publisher's website:

Supplementary Item 1: Selected antimicrobials, the corresponding antimicrobial classes and the potency of antimicrobial disc used according to the CA-SFM.

Supplementary Item 2: Number of isolates collected from horses between 2012 and 2016 per genera and bacterial species identified.

Supplementary Item 3: Number of isolates from horses collected by RESAPATH during the 2012–2016 period by pathology.

Annexe 8 : Septième article – Antimicrobial resistance of *Pasteurella multocida* isolated from diseased food-producing animals and pets

Veterinary Microbiology 235 (2019) 280–284

Contents lists available at ScienceDirect

Veterinary Microbiology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/vetmic

Short communication

Antimicrobial resistance of *Pasteurella multocida* isolated from diseased food-producing animals and pets

Clémence Bourély[a,b,c], Géraldine Cazeau[b], Eric Jouy[d], Marisa Haenni[e], Jean-Yves Madec[e], Nathalie Jarrige[b], Agnès Leblond[c], Emilie Gay[b,*]

[a] École Nationale des Services Vétérinaires, VetAgro Sup, 69280 Marcy l'Étoile, France
[b] Université de Lyon, ANSES, Laboratoire de Lyon, Unité Épidémiologie et appui à la surveillance, 31 avenue Tony Garnier, 69007 Lyon, France
[c] EPIA, UMR Epidémiologie des Maladies Animales et Zoonotiques, INRA, VetAgro Sup, Université de Lyon, 69280, Marcy L'Etoile, France
[d] ANSES, Laboratoire de Ploufragan-Plouzané-Niort, Unité Mycoplasmologie, Bactériologie et Antibiorésistance, Université Bretagne Loire, Technopôle Saint-Brieuc Armor, 22440 Ploufragan, France
[e] Université de Lyon, ANSES, Laboratoire de Lyon, Unité Antibiorésistance et Virulence Bactériennes, 31 avenue Tony Garnier, Lyon 69007, France

ARTICLE INFO

Keywords:
Pasteurella multocida
Antimicrobial resistance
Food-Producing animal
Dog
Cat
Time series
RESAPATH

ABSTRACT

Surveillance of *Pasteurella multocida* resistance in food-producing animals is essential to guide the first-line treatment of respiratory diseases and to limit economic losses. Since *Pasteurella* are the most common bacteria isolated from dog and cat bites, this surveillance is also needed to guide treatment in humans in case of bites. The aim of this study was to characterize the phenotypic resistance of *P. multocida* strains isolated from respiratory infections in animals, including both food-producing animals and pets. Data collected between 2012 and 2017 by the French national surveillance network for antimicrobial resistance referred to as RESAPATH were analyzed. The proportions of resistance to antimicrobials of relevance in veterinary and human medicines were estimated for each animal species. For cattle, resistance trends over the period were investigated using non-linear analysis applied to time-series. In total, 5356 *P. multocida* isolates were analyzed. Proportions of resistance of *P. multocida* were almost all below 20% over the period, and, more precisely, all resistance proportions were below 10% for rabbits, sheep and dogs. The highest resistance proportions to enrofloxacin were identified for cattle (4.5%) and dogs (5.2%). Despite its frequent use in livestock, resistance to florfenicol was less than 1% in *P. multocida* strains, regardless of the animal species considered. Time series analyses revealed continuous increases in resistance to tetracycline, tilmicosin, flumequine and fluoroquinolones in *P. multocida* strains isolated from cattle. These trends contrast with the decrease in use of antibiotics in cattle in France and with the decrease in resistance observed in *E. coli* isolated from diseased cattle.

1. Introduction

Pasteurella multocida is a zoonotic bacterium that can infect a wide range of species, such as mammals and poultry. Humans are mainly contaminated by contact with animals, most often by bites, scratches or licking of abraded skin. They develop local inflammation of the soft tissues that can lead to bacteremia in severe cases (Wilson and Ho, 2013). In animals, *P. multocida* can cause primarily respiratory or systemic diseases (Harper and Boyce, 2017). Particularly in production animals such as cattle, swine and rabbits, *P. multocida* is a major cause of morbidity, leading to significant economic losses all over the world (Davies et al., 2003).

Antibiotics are the most used veterinary products for the management of *P. multocida* infections in animals. The main antibiotic classes approved for treatment of respiratory diseases include first-generation antibiotics, but also critically important antibiotics such as fluoroquinolones (Evira, 2018), which are also used in humans. Despite the frequent use of antibiotics to treat respiratory infections caused by *P. multocida* in animals, data on the epidemiology of its resistance are still rare. Studies have mainly focused to date on the genetic characterization of this bacterium, its phylogenetics, and its virulence (García-Alvarez et al., 2017; Massacci et al., 2018). In the past, *Pasteurella* resistances in animals have mainly been the subject of point-in-time research (Kaspar et al., 2007) or multiple year studies for example in Australia (Dayao et al., 2014), in China (Tang et al., 2009), or in Europe within the framework of European projects such as Vetpath (El Garch et al., 2016) and Compath (Morrissey et al., 2016).

However, regular monitoring of resistance levels of *P. multocida*

* Corresponding author.
E-mail address: emilie.gay@anses.fr (E. Gay).

https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2019.07.017
Received 18 April 2019; Received in revised form 11 July 2019; Accepted 19 July 2019
0378-1135/ © 2019 Elsevier B.V. All rights reserved.

strains isolated from animals is essential. Public health issues are to: *(i)* guide first-line treatment in animals and limit economic losses, *(ii)* guide treatment in humans in case of infection following exposure to an animal (before antibiogram results), and finally *(iii)* determine the scale of the phenomenon in order to guide control measures. The aim of this study was thus to characterize the epidemiology of phenotypic resistance of *P. multocida* strains isolated from respiratory infections in animals, including both food-producing animals and pets.

2. Materials and methods

2.1. Source of data

This study was performed using the dataset from RESAPATH, the well-established French national surveillance network for antimicrobial resistance (AMR) in pathogenic bacteria from animals. RESAPATH collects antibiogram results, through its member laboratories (74 out of 112 in the country in 2015 (Boireau et al., 2018a)) that are located in all the administrative regions of France. All the antibiogram results collected by the RESAPATH are initially requested by veterinarians in a context of disease for diagnostic purposes. Even if each laboratory has its own strategy for bacterial identification, API galleries are often used and the biggest ones use Maldi-TOF. All laboratories perform antibiograms by the disk diffusion method following the veterinary recommendations of the Antibiogram Committee of the French Society of Microbiology (CA-SFM, https://www.sfm-microbiologie.org/). Results are then compiled in the RESAPATH database and duplicates are systematically traced and deleted.

From this database, data concerning *P. multocida* were extracted from 2012 to 2017. For each animal species, in view of antibiotic use and practices depending on the pathological context (Bourély et al., 2018), we specifically extracted data regarding respiratory disease, which is the major disease caused by *P. multocida*. For duck isolates, septicemia was also considered because extremely acute cases in ducks can include non-specific lesions of sepsis. Samples transmitted initially to laboratories included nasal, tracheal or bronchial swabs, trans-tracheal aspirations and lung tissues. Appropriate antibiotics of relevance in veterinary and human medicine were selected for analysis, according to their spectrum of activity, their use to treat animals, and their public health interest (Table 1).

2.2. Data analysis

Analyses were performed for animal species for which at least one hundred isolates of *P. multocida* were collected over the period 2012–2017 (Supplementary Data). The first step in the analysis was to categorize isolates as susceptible, intermediate or resistant, using their inhibition zone diameters compared with the breakpoints recommended by the veterinary section of the CA-SFM. From an epidemiological point of view, the event of interest is the non-susceptibility to a particular antibiotic, indicating that the isolate is no longer a wild-type strain. Therefore, intermediate isolates were grouped together with resistant isolates in the non-susceptible population, referred to as resistant in this study. For each animal species and antibiotic combination, the indicator of resistance was defined as the ratio between the number of resistant strains and the total number of strains collected. The resistance proportions were calculated over the whole period and their confidence intervals (CIs) were calculated using the exact binomial method. Proportions were then compared using Fisher's exact test.

Table 1
Selected antibiotics and the corresponding antibiotic classes.

Antibiotic classes	Antibiotics
Beta-lactams	Amoxicillin
Aminoglycosides	Gentamicin
Tetracyclines	Tetracycline
Folate pathway inhibitors	Trimethoprim-sulfamethoxazole
Phenicols	Florfenicol
Macrolides	Tilmicosin
Quinolones	Nalidixic acid/Flumequine
Fluoroquinolones	Enrofloxacin

Secondly, to detect variations in proportions over time, time-series analyses were performed for animal species/antibiotic combinations for which we had sufficient data, i.e. at least 25 antibiograms per time step (Barlow, 2011). To capture trends, we used generalized additive models (GAM), which are flexible and effective techniques for conducting nonlinear regression analysis in time-series studies. The proportion between the number of resistant strains and the total number of strains collected on a three-monthly time step was modelled using binomial regression. The analysis was carried out as described in Boireau et al. (2018b). R, version 3.5.0 was used for all statistical analyses (gamm4 package for GAM implementation). We considered a p-value of ≤ 0.05 as a statistically significant difference. If trend variations were not significant, the trend was stationary.

3. Results

In total, 5356 *P. multocida* isolates collected between January 2012 and December 2017 were analyzed (Table 2). The proportions of resistance of *P. multocida* isolated from animals were almost all below 20% over the period, and, more precisely, all resistance proportions were below 10% for rabbits, sheep, and dogs.

The proportions of resistance to amoxicillin of *P. multocida* isolated from animals were all below 5% over the whole period. *P. multocida* isolates from rabbits presented the lower proportion of resistance to gentamicin (1.8% [1.0; 3.0]) compared with isolates from other animal species ($p < 0.001$), except with isolates from swine ($p = 0.1$). The proportion of resistance to tetracycline varied greatly according to animal species and isolates from cattle presented the highest proportion of resistance (23.4% [21.4; 25.5], $p < 0.001$), followed by ducks (13.0% [10.1; 16.5], $p < 0.01$), whereas all other animal species presented resistance below 7%. Similarly, isolates from cattle presented higher proportion of resistance to tilmicosin (17.2% [15.3; 19.2]) compared with isolates from other animal species ($p < 0.002$), except with isolates from cats ($p = 0.1$) and resistance proportions for other animal species were below 10%. By contrast, resistance proportions to trimethoprim-sulfamethoxazole were below 10% for the majority of animal species including cattle (6.2% [5.1; 7.4]). Resistance proportions to quinolones were above 10% only for isolates from cattle (14.3% [12.2; 16.6]) and ducks (26.1% [22.1; 30.4]), and ducks presented the highest resistance proportion ($p < 0.001$). Resistance proportions to enrofloxacin were very low for swine (0.5% [0.1; 1.3]) and rabbits (0.2% [0.0; 0.8]); though low, they were higher ($p < 0.01$) for cats (2.6% [1.6; 4.1]), ducks (3.7% [2.1; 5.8]), cattle (4.5% [3.5; 5.6]) and dogs (5.2% [3.1; 8.1]). Resistance to florfenicol was close to zero for all animal species, without differences among them ($p = 0.6$).

From 2012 to 2017, most resistance trends of *P. multocida* isolated from cattle presented significant variations over time. However, resistance trends to trimethoprim-sulfamethoxazole ($p = 0.9$), amoxicillin ($p = 0.08$), and florfenicol ($p = 0.9$) were stationary (Fig. 1). Resistance trends to tetracycline ($p > 0.001$), tilmicosin ($p > 0.001$), flumequine ($p = 0.003$), and enrofloxacin ($p = 0.008$) increased continuously over the period. More specifically, resistance proportions to tetracycline, tilmicosin and flumequine varied greatly from 2012 to 2017: they were below 15% at the beginning of the period and reached 33.8% [27.0; 40.5], 26.5% [22.2; 30.8] and 21.0% [15.6; 26.4] in December 2017, respectively. Resistance proportions to enrofloxacin increased from 2.0% [0.7; 3.4] in January 2012 up to 7.3% [4.6; 10.0] in December 2017.

Table 2
Antimicrobial resistance (in % with 95% CI) in *P. multocida* isolated from diseased food-producing animals and pets in a context of respiratory disease in France over the 2012–2017 period.

Antibiotic		Cat	Dog	Cattle	Duck[2]	Sheep	Swine	Rabbit
Amoxicillin	Number of isolates	657	325	1,635	464	302	796	224
	Proportion	4.1 [2.7; 5.9]	4.9 [2.8; 7.9]	2.3 [1.6; 3.1]	0.9 [0.2; 2.2]	2.3 [0.9; 4.7]	0.3 [0.0; 0.9]	1.3 [0.3; 3.9]
Gentamicin	Number of isolates	690	352	1,511	Not-tested	300	458	789
	Proportion	9.3 [7.2; 11.7]	6.0 [3.7; 9.0]	4.6 [3.6; 5.8]		6.7 [4.1; 10.1]	3.5 [2.0; 5.6]	1.8 [1.0; 3.0]
Tetracycline	Number of isolates	440	192	1,702	460	311	784	935
	Proportion	4.1 [2.4; 6.4]	4.2 [1.8; 8.0]	23.4 [21.4; 25.5]	13.0 [10.1; 16.5]	4.5 [2.5; 7.4]	6.7 [5.1; 8.7]	3.5 [2.4; 4.9]
Trimethoprim-sulfamethoxazole	Number of isolates	679	345	1,705	465	311	839	935
	Proportion	13.0 [10.5; 15.7]	7.5 [5.0; 10.8]	6.2 [5.1; 7.4]	11.4 [8.7; 14.6]	7.1 [4.5; 10.5]	15.4 [13.0; 18.0]	3.2 [2.2; 4.5]
Florfenicol	Number of isolates	206	85	1,695	371	298	811	327
	Proportion	0.5 [0.0; 2.7]	0.0 [0.0; 4.2]	0.4 [0.2; 0.8]	0.3 [0.0; 1.5]	0.0 [0.0; 1.2]	0.8 [0.3; 1.6]	0.0 [0.0; 1.1]
Tilmicosin	Number of isolates	54	Not-tested	1470	447	193	795	876
	Proportion	7.4 [2.1; 17.9]		17.2 [15.3; 19.2]	0.9 [0.2; 2.3]	7.3 [4.0; 11.9]	2.1 [1.3; 3.4]	5.1 [3.8; 6.8]
Nalidixic acid / Flumequine [1]	Number of isolates	531	253	1,014	449	257	522	494
	Proportion	3.6 [2.2; 5.5]	8.7 [5.5; 12.9]	14.3 [12.2; 16.6]	26.1 [22.1; 30.4]	2.7 [1.1; 5.5]	2.7 [1.5; 4.5]	6.9 [4.8; 9.5]
Enrofloxacin	Number of isolates	685	347	1,672	465	294	780	906
	Proportion	2.6 [1.6; 4.1]	5.2 [3.1; 8.1]	4.5 [3.5; 5.6]	3.7 [2.1; 5.8]	1.4 [0.4; 3.4]	0.5 [0.1; 1.3]	0.2 [0.0; 0.8]

[1] Nalidixic acid for dog, cat and sheep, flumequine otherwise.
[2] In a context of respiratory disease and septicemia.

4. Discussion

Data on the epidemiology of resistance of *P. multocida* isolates are rare. In these studies, the samples size is very often low and/or the isolates of several animal species are grouped together (Schwarz et al., 2007; Cucco et al., 2017), limiting interpretation by animal species. In Germany, a study on 1111 *P. multocida* isolated from swine reported similar resistance proportions to ours for enrofloxacin and florfenicol (below 1%), for resistance to trimethoprim-sulfamethoxazole (between 4% and 10%) and to tetracycline (between 11.5% and 19.2%) (Kaspar et al., 2007). In Australia, a more recent study on 51 *P. multocida* isolated from swine reported very low levels of resistance, except for tetracycline (28%) (Dayao et al., 2014). Two studies in swine, one in China on 233 isolates and the other on 454 isolates collected in South Korea also identified high levels of tetracycline resistance (58.0% and 66.5% respectively) (Tang et al., 2009; Oh et al., 2018), higher than those reported in Europe (El Garch et al., 2016), North America (Sweeney, 2017), Australia (Dayao et al., 2014) and in our study (6.7%). Similarly, resistance to florfenicol reached 18.5% in South Korea, whereas it appeared to be very limited in Europe. These differences are likely the result of differing in practices since antibiotic use is considered higher in Korea (Oh et al., 2018).

For rabbits, our results are consistent with a previous study conducted in Brazil on 45 commensal *P. multocida* isolates, which reported low or no resistance to beta-lactam, fluoroquinolones, florfenicol, and tetracyclines (Ferreira et al., 2016).

A study in Europe on 134 *P. multocida* isolated from cattle between 2009 and 2012 already reported that resistance to tetracycline (11.2%) was above other resistance (El Garch et al., 2016). This estimate aligns with the resistance proportion calculated in our study in January 2012

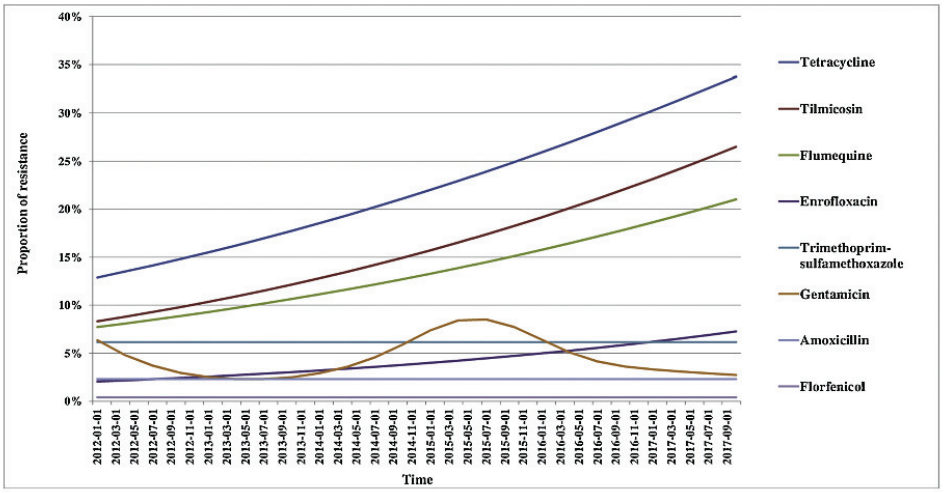


Fig. 1. Trends for antimicrobial resistance in *P. multocida* isolates from cattle with respiratory diseases over the period 2012–2017, on a three-monthly time scale (at least 25 isolates per time step).

from cattle isolates (12.9% [8.1; 17.8]). The parallel increases of resistance proportions to different antibiotics in *P. multocida* isolated from cattle suggest the joint spread of resistance determinants. *P. multocida* can carry plasmids conferring resistance to different antibiotics: most commonly beta-lactams, tetracycline, streptomycin and sulfonamides (Kadlec et al., 2011). Molecular investigations are needed to confirm this hypothesis. Finally, these increasing resistance trends in *P. multocida* isolates from cattle contrast with the stationary or decreasing resistance trends of *Escherichia coli* isolated from cattle in recent years (Boireau et al., 2018b).

4.1. Analysis in relation to antibiotic use

The differences observed between resistance proportions among animal species were probably due to differences in antibiotic use. For example, gentamicin is generally not used in rabbits due to its nephrotoxicity and the resistance to gentamicin was lower for this species. Besides, some insignificant differences between proportions were likely due to a lack of statistical power, related to a low number of isolates collected for some animals.

Due to a lack of specific data regarding antibiotic use in animals to treat *P. multocida* infections, resistance trends could not be directly analyzed in terms of antibiotic use in the models. Based on antibiotic sales for use in cattle (all diseases combined), exposure to antibiotics has decreased overall between 2011 and 2017 (-23%, all antibiotics considered) and exposure to fluoroquinolones has been decreasing since 2013 (-93%) (Anses-ANMV, 2018). However, several resistance trends in *P. multocida* isolates, including resistance trend to fluoroquinolones, increased from 2012 to 2017 in our study. These differences emphasize the importance of monitoring antibiotic use by animal species and by disease, to better document the use-resistance pattern.

Despite the frequent use of florfenicol in food-producing animals since its first usage in 1995 in France, resistance of *P. multocida* to florfenicol was below 1%, regardless of the animal species considered. However, a recent study reported that gastro-intestinal exposure of the microbiota to florfenicol leads to resistance selection in commensal *E. coli* (De Smet et al., 2018). These results underscore the importance of always using antibiotics prudently, and of continued monitoring of changes in resistance in bacteria, whether commensal or pathogenic.

4.2. Limitations

The major strength of our study was the availability of data regarding the susceptibility of *P. multocida* from an ongoing nationwide surveillance system for AMR in animals. Nevertheless, this study had several limitations due to potential selection bias, because laboratories join the RESAPATH on a voluntary basis and antibiograms rely on decisions taken by veterinarians during their veterinary practice. Because RESAPATH laboratories performed antibiograms by disk diffusion, which is a qualitative method, no information regarding the minimal inhibitory concentrations is collected. Despite a good standardization, isolates could be misclassified because this method remains manual. Nevertheless, the annual participation of laboratories to quality assurance proficiency tests contributes to control data and limit such misclassifications. The proportions of samples from previously untreated compared to treated animals were unknown and could potentially impact the resistance results. In addition, it was not possible to differentiate first and subsequent sample submissions and we simply assumed that multiple sampling from the same animal did not occur frequently considering the cost of the analysis. All these biases can lead to a lack of representativeness and a misestimation of resistance levels. However if biases do not vary over time, the observed resistance trends remain meaningful. A recent assessment of the RESAPATH network concluded that the antibiograms collected were representative of the antibiograms performed in animals in France (Boireau et al., 2018a).

4.3. Public health issues

P. multocida is the main bacterial species responsible for pasteurellosis in humans, especially in cases of severe infections. In almost all reported cases, evidence of upstream contact with an animal was mentioned (Wilson and Ho, 2013). Zoonotic transmission to humans usually occurs through domestic animal bites, which can lead to significant morbidity and often require specialized care and specific antibiotic treatments (Bula-Rudas and Olcott, 2018). Although bites are often polymicrobial, *Pasteurellae*, and particularly *P. multocida*, are the most commonly isolated bacteria from dog and cat bites (Freshwater, 2008). Since the 1950s, penicillins have generally been used as empirical treatments of cat and dog bites, before antibiogram results are obtained (Freshwater, 2008). According to the results of our study, given the low resistance of *P. multocida* isolates from dogs and cats to penicillins, the use of these antibiotics is still a valid therapeutic option.

5. Conclusion

This study provides an overall view of the antimicrobial resistance epidemiology of *Pasteurella multocida* strains isolated from food-producing animals and pets in a context of respiratory disease in France. It highlighted that resistance to florfenicol was very low for all species. Time series analyses revealed continuous increases in resistance to tetracycline, tilmicosin, and flumequine in *P. multocida* strains isolated from cattle, whereas the overall use of antibiotics in cattle decreased over this same period in France. Furthermore, these trends contrast with decreasing resistance trends of *E. coli* strains isolated from cattle in recent years. These differences likely reflect differing practices according to the pathological contexts, stressing the importance of monitoring bacteria other than *E. coli*, which is commonly monitored. Since *Pasteurellae* are the most common bacteria isolated from dog and cat bites in humans, these results are also useful in guiding the therapeutic choices of physicians in case of bite wounds or scratches.

Declaration of competing interest

The authors declare no potential conflicts of interest with respect to the research, authorship, and/or publication of this article.

Funding

This work was partly supported by the French Ministry of Agriculture (http://agriculture.gouv.fr). No additional external funding was received for this study. The funders had no role in study design, data collection, and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Data availability

The data used for this study was obtained from the RESAPATH network and the access to data is controlled by the French Agency for Food, Environmental and Occupational Health & Safety (ANSES). Conditions of approval (respecting the anonymity of farms and laboratories) do not allow us to distribute or make available data directly to other parties.

Author contributions

All the authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

The authors would like to thank all the voluntary laboratories that collected and transmitted antibiogram results to RESAPATH over several years. The authors are particularly grateful to Christelle Philippon

(RESAPATH's secretary) for her meticulous follow-up of laboratories and careful data collection, and Jean-Luc Vinard (RESAPATH's data architect) for his careful management of the database.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary material related to this article can be found, in the online version, at doi:https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2019.07.017.

References

Anses-ANMV, 2018. Suivi des ventes de médicaments vétérinaires contenant des antibiotiques en France en 2017 (Rapport annuel). Anses.

Barlow, J., 2011. Mastitis therapy and antimicrobial susceptibility: a multispecies review with a focus on antibiotic treatment of mastitis in dairy cattle. J. Mammary Gland Biol. Neoplasia 16, 383–407. https://doi.org/10.1007/s10911-011-9235-z.

Boireau, C., Jarrige, N., Cazeau, G., Jouy, É., Haenni, M., Philippon, C., Calavas, D., Madec, J.-Y., Leblond, A., Gay, E., 2018a. Représentativité et couverture du résapath, le réseau d'épidémiosurveillance de l'antibiorésistance des bactéries pathogènes animales. Bull. Épidémiologique Santé Anim. Aliment. 80, 10–14.

Boireau, C., Morignat, É., Cazeau, G., Jarrige, N., Jouy, É., Haenni, M., Madec, J.-Y., Leblond, A., Gay, É., 2018b. Antimicrobial resistance trends in *Escherichia coli* isolated from diseased food-producing animals in France: a 14-year period time-series study. Zoonoses Public Health 65, 86–94. https://doi.org/10.1111/zph.12412.

Bourély, C., Fortané, N., Calavas, D., Leblond, A., Gay, É., 2018. Why do veterinarians ask for antimicrobial susceptibility testing? A qualitative study exploring determinants and evaluating the impact of antibiotic reduction policy. Prev. Vet. Med. 159, 123–134. https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2018.09.009.

Bula-Rudas, F.J., Olcott, J.L., 2018. Human and animal bites. Pediatr. Rev. 39, 490–500. https://doi.org/10.1542/pir.2017-0212.

Cucco, L., Massacci, F.R., Sebastiani, C., Mangili, P., Bano, L., Cocchi, M., Luppi, A., Ortenzi, R., Pezzotti, G., Magistrali, C.F., 2017. Molecular characterization and antimicrobial susceptibility of *Pasteurella multocida* strains isolated from hosts affected by various diseases in Italy. Vet. Ital. 53, 21–27. https://doi.org/10.12834/VetIt.661.3256.2.

Davies, R.L., Mac Corquodale, R., Baillie, S., Caffrey, B., 2003. Characterization and comparison of *Pasteurella multocida* strains associated with porcine pneumonia and atrophic rhinitis. J. Med. Microbiol. 52, 59–67. https://doi.org/10.1099/jmm.0.05019-0.

Dayao, D.A.E., Gibson, J.S., Blackall, P.J., Turni, C., 2014. Antimicrobial resistance in bacteria associated with porcine respiratory disease in Australia. Vet. Microbiol. 171, 232–235. https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2014.03.014.

De Smet, J., Boyen, F., Croubels, S., Rasschaert, G., Haesebrouck, F., De Backer, P., Devreese, M., 2018. Similar gastro-intestinal exposure to florfenicol after oral or intramuscular administration in pigs, leading to resistance selection in commensal Escherichia coli. Front. Pharmacol. 9, 1265. https://doi.org/10.3389/fphar.2018.01265.

El Garch, F., de Jong, A., Simjee, S., Moyaert, H., Klein, U., Ludwig, C., Marion, H., Haag-Diergarten, S., Richard-Mazet, A., Thomas, V., Siegwart, E., 2016. Monitoring of antimicrobial susceptibility of respiratory tract pathogens isolated from diseased cattle and pigs across Europe, 2009-2012: VetPath results. Vet. Microbiol. 194, 11–22. https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2016.04.009.

Evira, 2018. Recommendations for the Use of Antimicrobials in the Treatment of the Most Significant Infectious and Contagious Diseases in Animals. University of Helsinki Faculty of veterinary medicine.

Ferreira, T.S.P., Moreno, L.Z., Felizardo, M.R., de Gobbi, D.D.S., Filsner, P.H., de, L.N., de Moura Gomes, V.T., Moreno, M., Moreno, A.M., 2016. Pheno- and genotypic characterization of *Pasteurella multocida* isolated from cats, dogs and rabbits from Brazil. Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis. 45, 48–52. https://doi.org/10.1016/j.cimid.2016.02.004.

Freshwater, A., 2008. Why your housecat's trite little bite could cause you quite a fright: a study of domestic felines on the occurrence and antibiotic susceptibility of Pasteurella multocida. Zoonoses Public Health 55, 507–513. https://doi.org/10.1111/j.1863-2378.2008.01152.x.

García-Alvarez, A., Vela, A.I., San Martín, E., Chaves, F., Fernández-Garayzábal, J.F., Lucas, D., Cid, D., 2017. Characterization of *Pasteurella multocida* associated with ovine pneumonia using multi-locus sequence typing (MLST) and virulence-associated gene profile analysis and comparison with porcine isolates. Vet. Microbiol. 204, 180–187. https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2017.04.015.

Harper, M., Boyce, J.D., 2017. The myriad properties of *Pasteurella multocida* lipopolysaccharide. Toxins 9. https://doi.org/10.3390/toxins9080254.

Kadlec, K., Brenner Michael, G., Sweeney, M.T., Brzuszkiewicz, E., Liesegang, H., Daniel, R., Watts, J.L., Schwarz, S., 2011. Molecular basis of macrolide, triamilide, and lincosamide resistance in *Pasteurella multocida* from bovine respiratory disease. Antimicrob. Agents Chemother. 55, 2475–2477. https://doi.org/10.1128/AAC.00092-11.

Kaspar, H., Schröer, U., Wallmann, J., 2007. Quantitative resistance level (MIC) of *Pasteurella multocida* isolated from pigs between 2004 and 2006: national resistance monitoring by the BVL. Berl. Munch. Tierarztl. Wochenschr. 120, 442–451.

Massacci, F.R., Magistrali, C.F., Cucco, L., Curcio, L., Bano, L., Mangili, P., Scoccia, E., Bisgaard, M., Aalbæk, B., Christensen, H., 2018. Characterization of *Pasteurella multocida* involved in rabbit infections. Vet. Microbiol. 213, 66–72. https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2017.11.023.

Morrissey, I., Moyaert, H., de Jong, A., El Garch, F., Klein, U., Ludwig, C., Thiry, J., Youala, M., 2016. Antimicrobial susceptibility monitoring of bacterial pathogens isolated from respiratory tract infections in dogs and cats across Europe: ComPath results. Vet. Microbiol. 191, 44–51. https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2016.05.020.

Oh, Y.-H., Moon, D.-C., Lee, Y.J., Hyun, B.-H., Lim, S.-K., 2018. Antimicrobial resistance of *Pasteurella multocida* strains isolated from pigs between 2010 and 2016. Vet. Rec. Open 5, e000293. https://doi.org/10.1136/vetreco-2018-000293.

Schwarz, S., Alesík, E., Grobbel, M., Lübke-Becker, A., Werckenthin, C., Wieler, L.H., Wallmann, J., 2007. Antimicrobial susceptibility of *Pasteurella multocida* and *Bordetella bronchiseptica* from dogs and cats as determined in the BfT-GermVet monitoring program 2004-2006. Berl. Munch. Tierarztl. Wochenschr. 120, 423–430.

Sweeney, M.T., 2017. Antimicrobial susceptibility of *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Pasteurella multocida*, *Streptococcus suis*, and *Bordetella bronchiseptica* isolated from pigs in the United States and Canada, 2011 to 2015. J. Swine Health Prod. 25, 106–120.

Tang, X., Zhao, Z., Hu, J., Wu, B., Cai, X., He, Q., Chen, H., 2009. Isolation, antimicrobial resistance, and virulence genes of *Pasteurella multocida* strains from swine in China. J. Clin. Microbiol. 47, 951–958. https://doi.org/10.1128/JCM.02029-08.

Wilson, B.A., Ho, M., 2013. *Pasteurella multocida*: from zoonosis to cellular microbiology. Clin. Microbiol. Rev. 26, 631–655. https://doi.org/10.1128/CMR.00024-13.