Final PhD Thesis Report

PhD 02- LIN-RES

Investigation of the molecular basis, origin, transferability, and risk factors associated with linezolid-resistance emergence in Gram-positive bacteria of human and animal origin

Responsible OHEJP Partner: Sciensano

Contributing OHEJP partners: BfR and ANSES

Contributing external partners: Université Libre de Bruxelles

GENERAL INFORMATION

European Joint Programme full title	Promoting One Health in Europe through joint actions on foodborne zoonoses, antimicrobial resistance and emerging microbiological hazards.
European Joint Programme acronym	One Health EJP
Funding	This project has received funding from the European Union's Horizon 2020 research and innovation programme under Grant Agreement No 773830.
Grant Agreement	Grant agreement n° 773830
Starting Date	01/01/2018
Duration	60 Months

DOCUMENT MANAGEMENT

PhD Report	Final PhD Thesis Report Y5 (2022)
PhD Reference	PhD02-AMR2/3/6-PhD LIN-RES
PhD candidate	Michaël Timmermans
PhD Lead Supervisor	Dr Cécile Boland (Sciensano)
PhD second supervisor	Not applicable
Other supervisor (s)	Pr Olivier Denis (ULB; thesis promotor)
Due month of the deliverable	M66
Actual submission month	M54
Type *R: Document, report* *DEC: Websites, patent filings, videos, etc.; OTHER*	R
Dissemination level *PU: Public (default)* *CO: confidential, only for members of the consortium (including the Commission Services).*	**PU** *PU is the default setting. This report will be entirely copied into One Health EJP Work Package 6 Deliverable D6.18 - Thesis Reports of up to 17 PhD studentships.*
Dissemination *Author's suggestion to inform the following possible interested parties.*	OHEJP WP 1 ☐ OHEJP WP 2 ☐ OHEJP WP 3 ☐ OHEJP WP 4 ☐ OHEJP WP 5 ☐ OHEJP WP 6 ☐ OHEJP WP 7 ☐ Project Management Team ☒ Communication Team ☐ Scientific Steering Board ☐ National Stakeholders / Program Owners Committee ☐ EFSA ☐ ECDC ☐ EEA ☐ EMA ☐ FAO ☐ WHO ☐ OIE ☐ Other international stakeholder(s): …… Social Media: …… **Other recipient(s):** ……

INTRODUCTION

The final thesis or thesis report will be included in Deliverable 6.18 and the deadline to submit this deliverable to the European Commission is 30th June 2023. The deliverable will be a **public report** by default. **In the cases where the final thesis report or final thesis contains information that must remain confidential under an embargoed period until the publications or outputs have been generated,** then a redacted version suitable for the public must be submitted.

A confidentiality clause should be included at the start of the redacted report or thesis clearly explaining any redactions, so the reader is aware. The embargo period should also be clearly stated.

- **PhDs that finish by 31 December 2022** are required to produce a drafted or final thesis as a final output. Once the PhD thesis is complete, PhD students should either submit an electronic version (PDF) of the thesis, or a DOI so that it can easily be linked (most theses are kept in a repository with open access unless by exception). The final thesis must be submitted to the WP6 team (wp6.onehealthejp@surrey.ac.uk) and uploaded to Zenodo by the PhD supervisor.

  In addition, the content covered in sections 1, 2, 7-16 of the thesis reporting template must also be completed and submitted to WP6 with the thesis and uploaded to Zenodo. Please ensure you upload the files to one Zenodo upload, so they have the same link.

- **PhD students that have not finished by December 2022** are required to produce a Final Thesis Report by completing the final thesis reporting template.

- **In all cases,** PhD supervisors must submit the final (public) pdf(s) to the WP6 team (wp6.onehealthejp@surrey.ac.uk) and **upload them to Zenodo by 15.06.23.**

CONFIDENTIALITY

In the cases where the final thesis report or final thesis contains information that must remain confidential under an embargoed period until the publications or outputs have been generated, then a redacted version suitable for the public must be submitted. The non-redacted final thesis (or a link to this document) must be emailed to the WP6 team when it is available.

A confidentiality clause should be included at the start of the report or thesis clearly explaining any redactions, so the reader is aware. The embargo period should also be clearly stated.

1. PhD Project team composition

PhD student: *Timmermans Michaël*

University at which the PhD is registered: *Université Libre de Bruxelles (ULB), Belgium*

Lead PhD Supervisor: *Boland Cécile, Sciensano, Belgium. Role for the ULB : co-promotor*

Other Supervisors: *Denis Olivier, ULB, Belgium. Role for the ULB : promotor*

2. Abstract

500 words, 1 page. Please summarise the main scientific results and pay particular attention to the impact the project may have for the One Health EJP and its stakeholders (ECDC, EFSA, EMA, EEA, FAO, OIE, WHO), and national ministries. This abstract may be used as a standalone communication piece, and therefore should be clear so it can be read as a separate entity if needed.

English

The One Health vision agrees that humans, animals and the environment are intimately linked in terms of health. This particularly involves antibiotic resistance, which today represents one of the greatest threats to public health according to the World Health Organization (WHO) and the World Organization for Animal Health (OIE). One of the pillars of the fight against antimicrobial resistance (AMR) is AMR monitoring organized regularly and at different scales by and in different countries. The aim of this thesis is to develop molecular tests and to show their added value for AMR monitoring. To do this, a tool for detecting antibiotic resistance determinants has been developed, the AMR-ARRAY. This molecular biology tool, which targets a large number of resistance genes and point mutations, is competitive in terms of time and cost compared to various existing techniques. This technology is quickly and easily adaptable and easy to use. Finally, it offers very good performance with selectivity and specificity of 99.3% and 100%. In parallel, a retrospective study was carried out on colistin-resistant Escherichia coli strains isolated from food-producing animals (PDA) in Belgium between 2012 and 2016, integrating phenotypic and genotypic analyses. This study showed that colistin resistance was related to the presence of one or more *mcr* genes and revealed the first observation, to our knowledge, of an isolate carrying three different *mcr* genes. Finally, linezolid resistance surveillance (LIN-RES) was carried out in Belgium in 2019. This revealed a large reservoir of enterococci carrying linezolid resistance genes in food producing animals as well as a large genetic variability. These various studies have

revealed a reservoir of antibiotic resistance genes of critical importance in human medicine. The development of the AMR-ARRAY and the LIN-RES project are part of a One Health perspective, integrating bacteria isolated from different origins: animal, food intended for humans or human samples.

The contribution of monitoring dedicated to certain antibiotics and of a genetic component in the monitoring of AMR from a One Health perspective would be significant assets for better use of antibiotics and in the fight against AMR.

My research work highlights the importance of monitoring antibiotic resistance in farm animals, particularly for critical antibiotics in human medicine from a One Health perspective. Molecular diagnostic tools make it possible, at a lower cost, to determine important resistance mechanisms whose prevalence could be monitored as already established in human surveillance.

Français

La vision « *One Health* » ou « une seule santé », est une vision qui s'accorde à dire que l'humain, les animaux et l'environnement sont intimement liés concernant la santé. Cela implique notamment la résistance aux antibiotiques qui représente aujourd'hui une des plus grandes menaces pour la santé publique selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) et l'Organisation mondiale de la santé animale (OIE). Un des piliers de la lutte contre la résistance aux antimicrobiens (RAM) est la surveillance de la RAM organisée régulièrement et à différentes échelles par et dans différents pays. Le but de cette thèse est d'élaborer des tests moléculaires et d'en montrer les plus-values pour la surveillance de la RAM. Pour ce faire, un outil de détection de déterminants de résistance aux antibiotiques a été développé, l'AMR-ARRAY. Cet outil de biologie moléculaire qui cible un grand nombre de gènes de resistance et de mutations ponctuelles, est compétitif en termes de temps et de coûts comparé à différentes techniques existantes. Cette technologie est rapidement et facilement adaptable et d'utilisation facile. Enfin, elle offre de très bonnes performances avec une sélectivité et une spécificité de 99,3% et 100%. En parallèle, une étude rétrospective a été réalisée sur des souches *Escherichia coli* résistantes à la colistine isolées d'animaux producteurs de denrées alimentaires (PDA) en Belgique entre 2012 et 2016, intégrant des analyses phénotypiques et génotypiques. Cette étude a montré que

la résistance à la colistine était liée à la présence d'un ou plusieurs gènes *mcr* et a révélé la première observation, à notre connaissance, d'un isolat portant trois gènes *mcr* différents. Enfin, une surveillance de la résistance au linézolide (LIN-RES) a été effectuée en Belgique en 2019. Celle-ci a révélé un réservoir important d'entérocoques porteuses de gènes de résistance au linézolide chez les animaux PDA de même qu'une grande variabilité génétique. Ces différentes études ont mis en évidence un réservoir de gènes de résistance à des antibiotiques d'importance critique en médecine humaine. Le développement de l'AMR-ARRAY et le projet LIN-RES s'inscrivent dans une optique *One Health*, intégrant des bactéries isolées depuis différentes origines : animales, nourriture destinée à l'humain ou échantillons humains.

L'apport de surveillances dédiées à certains antibiotiques et d'un volet génétique dans la surveillance de la RAM dans une perspective One Health seraient des atouts non négligeables pour une meilleure utilisation des antibiotiques et dans la lutte contre la RAM.

Mon travail de recherche souligne l'importance des surveillances de la résistance aux antibiotiques chez les animaux d'élevage en particulier pour des antibiotiques critiques en médecine humaine dans une perspective One Health. Des outils de diagnostic moléculaire permettent à moindre coût de déterminer des mécanismes de résistance d'importance dont la prévalence pourrait être suivie comme déjà établi dans les surveillances chez l'homme.

FACULTÉ
DE MÉDECINE

UNIVERSITÉ LIBRE DE BRUXELLES

Etude de la résistance aux antibiotiques : développement d'une technique multiplexée de détection de gènes de résistance chez les bactéries Gram-négatives (AMR-ARRAY) et étude de la résistance au linézolide chez les bactéries Gram-positives (LIN-RES)

Thèse présentée par Michaël Timmermans
en vue de l'obtention du grade académique de docteur en Sciences biomédicales et pharmaceutiques

Manuscrit confidentiel jusqu'à la fin de l'embargo imposé sur les publications

Année académique 2020-2021

Sous la direction du Professeur Olivier Denis, promoteur

Faculté de Médecine, Université Libre de Bruxelles

Et du docteur Cécile Boland, co-promotrice

Service de Bactériologie Vétérinaire, Sciensano

Membres du jury

Pr. Jean-Paul Sculier (président)
Pr. Olivier Denis (secrétaire)
Dr. Cécile Boland
Dr. Carine Truyens
Dr. Nicolas Dauby
Dr. Pierre Smeesters
Dr. Damien Thiry
Dr. Isabelle Kempf

service public fédéral
SANTE PUBLIQUE,
SECURITE DE LA CHAINE ALIMENTAIRE
ET ENVIRONNEMENT

federale overheidsdienst
VOLKSGEZONDHEID,
VEILIGHEID VAN DE VOEDSELKETEN
EN LEEFMILIEU

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier les personnes qui m'ont confié qu'elles pensaient que je n'étais pas fait pour mener à bien un doctorat. Merci à vous de m'avoir donné un élan pour commencer ce doctorat. C'est avec ce message, la motivation de vouloir me dépasser et le soutien de mes proches que j'ai entamé ce périple.

Tout a commencé avec la rencontre de Cécile qui m'a accueilli dans son bureau pour le début de cette histoire. Depuis lors, tu as été présente pour chacune de mes questions, pour chacune de mes remarques. Tu m'as encouragé à chaque étape et m'a poussé à aller à chaque fois plus loin. Merci pour tout ça, merci de m'avoir amené aussi loin ! Merci également à mon promoteur Olivier qui a guidé mes recherches et m'a également aidé à pousser mes réflexions plus loin.

Merci à la recherche contractuelle et au *One Health European Joint Programme* d'avoir financé les projets qui alimentent cette thèse et merci à Sciensano de m'avoir accueilli dans ses infrastructures.

Je tiens à remercier Alex et Débo qui m'ont aidé pour les diverses manipulations en laboratoire. Merci de m'avoir montré vos astuces, vos techniques et d'avoir partagé vos connaissances avec moi. Merci Carole pour les discussions à propos de l'AMR-ARRAY et les aides que tu m'as données, notamment en période de rush. Merci Damien et Débo encore pour avoir été là quand j'avais besoin de commander du matériel. Je tiens également à remercier mes deux stagiaires, Fadime et Guillaume qui ont participé aux recherches, qui ont partagé un peu de cette passion avec moi et qui m'ont montré que je pouvais également transmettre savoir et motivation.

Merci aux différents collègues de Sciensano, Pieter-Jan, Cristina, Kevin, Bert, Sigrid d'avoir répondu à mes diverses questions lors de l'écriture de mes articles et de ma thèse. Merci d'avoir accepté de fournir de votre temps pour me conseiller et m'orienter pour certaines de mes questions.

Merci également aux différentes personnes qui ont fourni des souches afin de pouvoir avoir les contrôles nécessaires à certaines manipulations ou pour étoffer les collections de la recherche.

Merci également aux personnes qui ont partagé leurs séquences et/ou articles qui ont permis l'écriture de cette thèse

Merci à toute l'équipe présente au Batiment A durant toute la période de cette thèse, que vous soyez encore là ou pas : Cécile, Carole, Alex, Débo, Tiziano, Sylvie et Sylvie, Marcella, David, Pierre, Damien, Martine, Phillipe, Patrick, Christel, Raïssa, Marwa, Adriano, Maurad, Virginie, Fanny, Sarah, Charlotte, Chris, Hugo. Que nos échanges aient été brefs ou plus réguliers, j'ai passé des moments que je n'oublierai pas. Un merci en particulier aux joueurs de cartes avec qui on a passé des midis à rire et à jouer pour se détendre. Merci à Carole, Fanny et Débo, encore, oui, je remercie plusieurs fois, pour toutes ces pauses cafés durant lesquelles on discutait de ce qui se passait dans nos vies. Vous avez été présentes aux pires moments de ma thèse et m'avez aidé à surmonter cela avec vos paroles. Tant de petits moments passés avec ces différentes personnes que je ne pourrais toutes les citer ici mais dont l'importance est bien réelle. Désolé de ne pas pouvoir tout énumérer ici mais sachez que je n'oublie pas.

Un tout grand merci également à mes parents, Claire et Dan, qui ont TOUJOURS cru en moi et qui m'ont montré à quel point ils étaient fiers de moi. Merci également à mes amis qui ont été là eux-aussi tout du long et qui ont supporté mes moments de frustrations.

Marion, je voudrais te dire un merci spécial car, m'ayant trouvé perdu durant ce parcours, tu m'as permis de m'accrocher alors que j'avais l'impression que la vie me lâchait durant cette aventure. Merci de m'avoir toujours soutenu, de m'avoir toujours poussé et de m'avoir aidé à y arriver ! Merci, merci, MERCI. Je voudrais dire un dernier petit merci pour ma future fille que j'attends avec impatience !

Résumé

La vision « *One Health* » ou « une seule santé », est une vision qui s'accorde à dire que l'humain, les animaux et l'environnement sont intimement liés concernant la santé. Cela implique notamment la résistance aux antibiotiques qui représente aujourd'hui une des plus grandes menaces pour la santé publique selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) et l'Organisation mondiale de la santé animale (OIE). Un des piliers de la lutte contre la résistance aux antimicrobiens (RAM) est la surveillance de la RAM organisée régulièrement et à différentes échelles par et dans différents pays. Le but de cette thèse est d'élaborer des tests moléculaires et d'en montrer les plus-values pour la surveillance de la RAM. Pour ce faire, un outil de détection de déterminants de résistance aux antibiotiques a été développé, l'AMR-ARRAY. Cet outil de biologie moléculaire qui cible un grand nombre de gènes de resistance et de mutations ponctuelles, est compétitif en termes de temps et de coûts comparé à différentes techniques existantes. Cette technologie est rapidement et facilement adaptable et d'utilisation facile. Enfin, elle offre de très bonnes performances avec une sélectivité et une spécificité de 99,3% et 100%. En parallèle, une étude rétrospective a été réalisée sur des souches *Escherichia coli* résistantes à la colistine isolées d'animaux producteurs de denrées alimentaires (PDA) en Belgique entre 2012 et 2016, intégrant des analyses phénotypiques et génotypiques. Cette étude a montré que la résistance à la colistine était liée à la présence d'un ou plusieurs gènes *mcr* et a révélé la première observation, à notre connaissance, d'un isolat portant trois gènes *mcr* différents. Enfin, une surveillance de la résistance au linézolide (LIN-RES) a été effectuée en Belgique en 2019. Celle-ci a révélé un réservoir important d'entérocoques porteuses de gènes de résistance au linézolide chez les animaux PDA de même qu'une grande variabilité génétique. Ces différentes études ont mis en évidence un réservoir de gènes de résistance à des antibiotiques d'importance critique en médecine humaine. Le développement de l'AMR-ARRAY et le projet LIN-RES s'inscrivent dans une optique *One Health*, intégrant des bactéries isolées depuis différentes origines : animales, nourriture destinée à l'humain ou échantillons humains.

L'apport de surveillances dédiées à certains antibiotiques et d'un volet génétique dans la surveillance de la RAM dans une perspective One Health seraient des atouts non négligeables pour une meilleure utilisation des antibiotiques et dans la lutte contre la RAM.

Mon travail de recherche souligne l'importance des surveillances de la résistance aux antibiotiques chez les animaux d'élevage en particulier pour des antibiotiques critiques en médecine humaine dans une perspective One Health. Des outils de diagnostic moléculaire permettent à moindre coût de déterminer des mécanismes de résistance d'importance dont la prévalence pourrait être suivie comme déjà établi dans les surveillances chez l'homme.

Liste des abréviations

AFMPS	Agence Fédérale des Médicaments et des Produits de Santé
AFSCA/FASFC	Agence Fédérale pour la Sécurité de la Chaine Alimentaire/Federal Agency for the Safety of the Food Chain
AMCRA	Antimicrobial Consumption and Resistance in Animals
ARG	Antimicrobial resistance genes
ARNP	ARN polymérase
ARSIA	Association Régionale de Santé et d'Identification Animales
AST	Antimicrobial susceptibility testing
AZM	Azithromycin
BAPCOC	Belgian Antibiotic Policy Coordination Committee
BelVet-SAC	Belgian Veterinary Surveillance of Antibiotic Consumption
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
BLSE/ESBL	β-lactamase à spectre étendu/extended spectrum β-lactamase
BMD	Broth microdilution
BSA	Bovine serum albumin
CAT	Chloramphénicol acétyltransférases
CAZ	Ceftazidime
CERVA	Centre d'Étude et de Recherches Vétérinaires et Agrochimiques
cgMLST	core genome Multilocus sequence typing
CHL	Chloramphenicol
CIP	Ciprofloxacin
CMI/MIC	Concentration minimale inhibitrice/minimum inhibitory concentration
CSB-LZD	Columbia Sheep Blood supplemented with linezolid
CST	Colistin
CTX	Cefotaxime
cUR	Universal reverse complement
CVMP	Committee for Medicinal Products for Veterinary Use
DGZ	Dierengezondheidszorg
EARS-net	European Antimicrobial Resistance Surveillance Network
EARS-vet	European Antimicrobial Resistance Surveillance network in veterinary medicine
ECDC	European Centre for Disease Prevention and Control
ECOFF	Seuils épidémiologiques (Epidemiological Cut-OFF en anglais)
EFSA	European Food Safety Autority
EMA	European Medicine Agency
EMAg	Enzymes modifiant les aminoglycosides
EPEC	Enteropathogenic *Escherichia coli*
EQAS	External Quality Assurance System
ESAC-net	European Surveillance of Antimicrobial Consumption Network
EUCAST	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing

EURL-AR	European Union Reference Laboratory-Antimicrobial Resistance
FAO	Organisation des Nations unies pour l'alimentation et l'agriculture
FDA	Food and Drug Administration
FWD-net	Food and Waterborne Diseases and Zoonoses Network
GEN	Gentamicin
GLASS	Global Antimicrobial Resistance and Use Surveillance System
INAMI	Institut National d'Assurance Maladie-Invalidité
INRAP	inhibiteur de l'ARN polymérase
ISP	Institut scientifique de Santé publique
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
JAC	Journal of Antimicrobial Chemotherapy
LCR	Ligase Chain Reaction
LNR/NRL	Laboratoire National de Référence/National Reference Laboratory
LPS	Lipopolysaccharides
LR	Linezolid-resistant
MCR	mobile colistin resistance
MDR-GNB	Multidrug-resistant Gram-negative bacilli
MEM	Meropenem
MFI	Median Fluorescence Intensities
MLST	Multilocus sequence typing
MRG	Macrolide Resistance Genes
MRSA	staphylocoques dorés résistant à la méthicilline (methicillin resistant Staphylococcus aureus en anglais)
MST	Minimum spanning trees
NAL	Nalidixic acid
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NGS	Next Generation Sequencing
nMFI	Normalized Median Fluorescence Intensities
NRCS	National Reference Center for Salmonella
NTP	Nucléoside triphosphate
OCDE	Organisation de coopération et de développement économiques
OHEJP	One Health European Joint Program
OIE	Organisation mondiale de la santé animale
OM	Official monitoring
OMS	Organisation mondiale de la santé
OWOH	One world, One Health
PBP	Protéines de liaison à la pénicilline (penicilline binding protein en anglais)
PDA	producteur de denrée alimentaire
PLP	Padlock shaped Probe
PTC	Centre Peptidile Transférase
RAM/AMR	Résistance aux antimicrobiens/Antimicrobial resistance

rMLST	Ribosomal Multilocus sequence typing
S&B	Slanetz and Bartley
SM	Selective monitoring
SNP	Single nucleotide polymorphism
SPF	Service Public Fédéral
SPSCAE	Santé publique, Sécurité de la Chaîne Alimentaire et Environnement
ST	Sequence type
SXT	Sulfamethoxazole
TET	Tetracycline
TGC	Tigecycline
TMP	Trimethoprim
TMP	Melting temperature
UE/EU	Union Européenne/European Union
UF	Universal forward
UGent	Université de Gand
UR	Universal reverse
VRE	entérocoques résistantes à la vancomycine
WGS	Séquençage de génome complet (Whole Genome Sequencing en anglais)
WT	Wild type

Table des matières

Remerciements iv
Résumé vi
Liste des abréviations viii
Table des matières xi
Introduction 1
« *One Health* » 1
La résistance aux antibiotiques : concepts clés 2
Limitation de l'entrée de l'antibiotique 3
Augmentation de l'efflux de l'antibiotique 3
Modification du site ciblé par l'antibiotique 3
Inactivation de l'antibiotique 4
La résistance croisée 4
La résistance croisée étendue ou cross-résistance 4
La co-résistance 4
Les résistances additive et coopérative 5
Les antibiotiques 5
Les différentes familles d'antibiotiques, leurs mécanismes d'action et les résistances. 6
Les β-lactames 6
Les pénicillines 7
Monobactam 7
Les céphalosporines 7
Les carbapénèmes 9
Les inhibiteurs de β-lactamases 9
Résistance aux β-lactames 10
Modification de la cible des β-lactames 10
Augmentation de l'efflux ou diminution de l'entrée de l'antibiotique 10
Les β-lactamases 10
La colistine, une polymyxine 12
La résistance à la colistine 14
Les quinolones 15
La résistance aux quinolones 16
Les macrolides 17

La résistance aux macrolides 17
Les aminoglycosides 18
La résistance aux aminoglycosides 19
Les phénicols 19
La résistance aux phénicols 20
Le linézolide, un oxazolidinone 21
La résistance au linézolide 21
Surveillance de la résistance aux antibiotiques 22
Chez les animaux PDA et dans les denrées alimentaires 22
Chez les humains 26
Techniques utilisées pour la détection de la résistance aux antibiotiques 27
Analyses phénotypiques 27
Les disques de diffusion 28
La microdilution 28
Avantages et inconvénients des analyses phénotypiques 28
Analyses génotypiques 29
La détection de la présence de gènes 29
Le séquençage de génome complet 30
Avantages et inconvénients 30
Les bactéries utilisées pour la surveillance et dans le cadre de cette thèse 31
Escherichia coli 32
Shigella spp. 32
Salmonella spp. 33
Staphylococcus aureus 33
Enterococci 33
L'antibiorésistance : un plan d'action national belge pour continuer la lutte contre la RAM 34
Objectifs 36
Chapitre 1 : Un micro-array, l'AMR-ARRAY, pour le dépistage génétique rapide de déterminants de résistance aux antibiotiques : développement et valorisation dans une perspective « One Health » 37
The AMR-ARRAY : a modular bead array detecting β-lactam, (fluoro) quinolone, colistin, aminoglycoside and macrolide resistance determinants in Gram-negative bacteria. 38
Abstract 38
Introduction 39
Material and methods 40

Isolates collection 40
Antimicrobial susceptibility testing 40
DNA extraction 41
Padlock shaped Probes (PLPs) design 41
Ligase Chain Reaction assay 54
Detection of the LCR products on a bead-array platform 54
Data analysis 55
Whole genome sequencing analysis 56
Data comparison 56
Results 56
AMR-ARRAY development 56
Comparison of susceptibility profiles vs. AMR-ARRAY results 57
Comparison of genetic resistance profiles vs. AMR-ARRAY results 58
Comparison of WGS data vs. AMR-ARRAY results 59
Discussion 61
AMR-ARRAY scope and performance 62
The AMR-ARRAY: a modular screening tool 63
Acknowledgments 64
Chapitre 2 : Etude des gènes de résistance à la colistine dans des souches d'*E. coli* isolées d'animaux PDA (porcs, bovins et volailles) sains entre 2012 et 2016 en Belgique 66
Chapitre 3 : étude de la résistance au linézolide : découverte d'une grande diversité de souches résistantes au linézolide chez les animaux PDA suite à une surveillance sélective en Belgique en 2019 .. 76
Discussion générale 86
L'AMR-ARRAY : un outil multiplexé, modulable et facile d'utilisation pour détecter des déterminants de résistance 87
Aspect modulable de l'AMR-ARRAY 87
L'AMR-ARRAY, un outil facile d'utilisation 88
L'AMR-ARRAY comparé aux autres méthodes de détection de gènes 88
Champs d'application de l'AMR-ARRAY 89
Anomalies rencontrées 91
La surveillance et la résistance aux antibiotiques d'importance critique pour la médecine humaine. 92
La surveillance, un outil d'importance capitale 93
Vers une évolution de la surveillance de la RAM et une meilleure utilisation des antibiotiques ? 99
Mise en place de surveillances dédiées, ciblées ? 100

La surveillance dans une optique One Health 103
Conclusion et perspectives 106
Bibliographie 114
Annexes 126
Annexe 1 : Matériel supplémentaire pour le chapitre 1 126
Annexe 2 : Matériel supplémentaire pour le chapitre 2 152
Annexe 3 : Matériel supplémentaire pour le chapitre 3 152

Introduction

« *One Health* »

L'idée de "*One health*" ou "Une Seule Santé », en français n'est pas née du jour au lendemain. Comme cela est expliqué dans l'ouvrage « *One Health*, une seule santé » (Tanner et al., 2020), le concept a une histoire qui remonte à l'Antiquité. Il n'est pas question ici de retracer l'historique qui a mené à ce concept mais bien d'exposer comment il a évolué ces dernières années pour permettre à ce travail de voir le jour. Le *One Health* que l'on connait aujourd'hui a émergé durant les années 2000 par la fusion progressive de deux visions : le « *One Medicine, One Health* » qui consistait entre autres à réunir les recherches en médecines humaine et vétérinaire et le « *One World, One Health* » (OWOH) qui avait une vision plus large et qui intégrait également l'aspect environnemental. L'Organisation mondiale de la santé (OMS), l'Organisation des Nations unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO) et l'Organisation mondiale de la santé animale (OIE) ont adhéré aux idées de l'OWOH et ont formé une tripartite en 2010 pour mener à bien cette vision.

Le *One Health* lie donc trois éléments interdépendants que sont la santé animale, la santé humaine et l'environnement afin de prévenir des problèmes tels que des maladies zoonotiques, l'antibiorésistance, des maladies d'origine alimentaire ou encore les conditions environnementales (Humboldt-Dachroeden et al., 2020). Cette vision est devenue internationale et a vu différents partenariats et organisations naître afin de développer des projets, des recherches scientifiques, des collaborations pour contrer ces différents problèmes ou leurs émergences.

L'OHEJP, le « *One Health European Joint Program*" est un des partenariats nés pour mettre en avant l'idée du *One Health* et la mettre en pratique. Il s'agit d'un regroupement de plusieurs instituts (44 en 2021) de santé publique, animale et d'alimentation, rassemblant ainsi 22 pays de l'Union européenne (UE) en 2021. Un des principaux objectifs de l'OHEJP est d'améliorer l'échange et la collaboration entre les différents instituts engagés dans le partenariat. Pour ce faire, des projets de recherche et des formations sont notamment mis sur pied dans les domaines

des menaces émergentes, des zoonoses et de la résistance aux antimicrobiens (RAM) (Anonymous, 2021a).

La résistance aux antibiotiques : concepts clés

La résistance aux antibiotiques a été reconnue par l'OMS comme l'une des menaces principales de la santé publique (Matamoros-Recio et al., 2021). Cette résistance est la capacité d'une bactérie à survivre à l'action d'un antibiotique qui vise à la tuer ou l'empêcher de proliférer. La résistance aux antibiotiques peut être soit intrinsèque, soit acquise. La résistance intrinsèque, ou naturelle, est caractérisée par sa présence chez toutes les bactéries d'une même espèce ou d'un même genre. La résistance acquise, au contraire, ne se retrouve pas systématiquement chez toutes les souches d'une même espèce ou d'un même genre mais chez certaines d'entre elles suite, par exemple, à des transferts génétiques (Courvalin, 2008). Ce type de résistance peut en effet être acquise soit par l'apparition d'une mutation génétique qui pourra se transmettre aux cellules filles suite à la division cellulaire, on parle alors de transmission verticale, soit via l'acquisition de matériel génétique provenant d'autres bactéries et on parle alors de transfert horizontal entre bactéries (via des plasmides, des transposons, ou d'autres éléments génétiques mobiles qui portent des gènes de résistance).

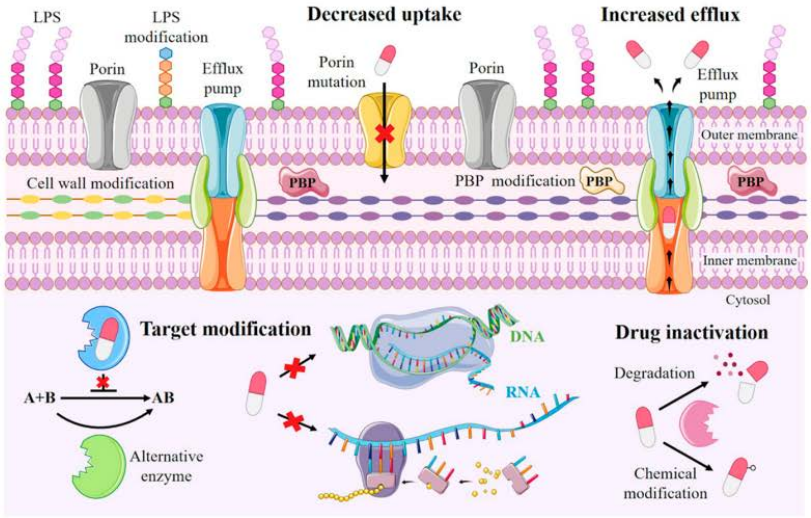


Figure 1: Représentation schématique des différents mécanismes de résistance aux antibiotiques. Limitation de l'entrée de l'antibiotique, augmentation de l'efflux de l'antibiotique, modfication du sité ciblé par l'antibiotique, inactivation de l'antibiotique. Illustration adaptée de Matamoros-Recio et al., 2021.

Les bactéries ont développé différents mécanismes pour échapper à l'action des antibiotiques. Ces mécanismes sont classés en 4 catégories principales : (i) limitation de l'entrée de l'antibiotique, (ii) augmentation de l'évacuation, de l'efflux de l'antibiotique, (iii) modification du site ciblé par l'antibiotique et (iv) inactivation de l'antibiotique (Matamoros-Recio et al., 2021) (Figure 1).

Limitation de l'entrée de l'antibiotique

La limitation de l'entrée de l'antibiotique consiste à bloquer l'antibiotique à l'extérieur de la cellule. Chez les bactéries à Gram-négatif, une membrane externe hydrophobe limite déjà l'entrée des molécules de petite taille. Les antibiotiques hydrophiles peuvent cependant traverser cette membrane via des porines qui sont des protéines intégrées à cette membrane et la traversant (Ghai and Ghai, 2018). La perméabilité de la membrane externe peut être modifiée en diminuant l'expression des porines, suite à des mutations dans les gènes codant pour ces protéines, ou suite à la formation de biofilms qui protègent les bactéries s'y trouvant (Matamoros-Recio et al., 2021).

Augmentation de l'efflux de l'antibiotique

Les antibiotiques peuvent être expulsés vers l'extérieur en augmentant l'expression des pompes à efflux, des complexes protéiques qui permettent d'évacuer des éléments vers l'extérieur de la cellule (Matamoros-Recio et al., 2021).

Modification du site ciblé par l'antibiotique

Certains gènes codent pour des protéines qui ont pour rôle de modifier les sites que ciblent les antibiotiques. Il existe un grand nombre de ces gènes permettant aux bactéries de résister à bon nombre d'antibiotiques (Matamoros-Recio et al., 2021). Il existe également des mutations pouvant confeérer des résistances à un ou plusieurs antibiotiques. La cible de l'antibiotique peut également être changée par la production d'une autre protéine qui offre moins d'affinité pour l'antibiotique comme c'est le cas par exemple pour les gènes *mec*. Enfin, il existe aussi un mécanisme qui permet de contourner la voie métabolique inhibée par l'antibiotique par exemple en produisant la cible en excès.

Inactivation de l'antibiotique

L'inactivation/dégradation de l'antibiotique est l'un des mécanismes les plus communs chez les bactéries. Ce processus est réalisé par des enzymes qui hydrolysent ou modifient les antibiotiques rendant ainsi les bactéries insensibles à ces molécules (Matamoros-Recio et al., 2021).

En parallèle de ces différents mécanismes de résistance, il existe plusieurs types de résistance : (i) la résistance croisée, (ii) la résistance croisée étendue (ou cross-résistance), (iii) la co-résistance et (iv) les résistances additive et coopérative (Courvalin, 2008).

La résistance croisée

La résistance croisée est le fait qu'un seul mécanisme confère une résistance à l'ensemble des antibiotiques d'une même classe. Par exemple, les mutations au niveau de la gyrase ou de la topoisomérase IV qui confèrent une résistance aux quinolones.

La résistance croisée étendue ou cross-résistance

La cross-résistance est le fait qu'un mécanisme confère une résistance à plusieurs classes d'antibiotiques simultanément. Un exemple est le gène *cfr* qui confère une résistance à pas moins de 5 classes d'antibiotiques : les phénicols, les lincosamides, le linézolide (un oxazolidinone), les pleuromutilines, et la streptogramine A (Long et al., 2006). Dans ce cas de figure, l'utilisation d'un antibiotique, comme dans le cas de la co-résistance, va entraîner la sélection d'autres résistances, à la différence qu'elles seront toujours liées car conférées par le même facteur (*cfr* dans l'exemple cité).

La co-résistance

La co-résistance est l'association de différents mécanismes de résistance à différentes classes d'antibiotiques au sein d'une même bactérie comme par exemple la présence de plusieurs gènes de résistance portés par un plasmide (ou tout autre élément génétique mobile). Ceci est le cas par exemple chez les bactéries dites multi-résistantes qui présentent un profil phénotypique de résistance très étendu. Ce cas de figure est problématique car la résistance à un antibiotique

permet de sélectionner également les autres résistances que possède la bactérie, permettant de ce fait le maintien et la propagation des résistances portées par la bactérie.

Les résistances additive et coopérative

Ces deux types de résistance sont regroupés ici en un paragraphe car les mécanismes associés sont similaires. Dans les deux cas il s'agit d'une accumulation de mécanismes de résistance mais pour une même classe d'antibiotiques. Dans le cas de la résistance additive, les deux mécanismes vont s'additionner en terme d'efficacité tandis que dans le cas de la résistance coopérative, il va y avoir un phénomène de synergie qui amènera à un niveau plus élevé que la résistance additive (addition<synergie).

Les antibiotiques

Les antibiotiques sont des molécules naturelles, dérivées ou synthétiques ayant une action bactéricide ou bactériostatique, c'est-à-dire qu'elles tuent les bactéries ou inhibent leur multiplication respectivement. Les antibiotiques tels que nous les connaissons et utilisons aujourd'hui ont pour origine la découverte de la pénicilline par Alexander Fleming dans les années 1920 (Alexander Fleming, 1929; Hutchings et al., 2019). Entre les années 1940 et 1960-1970, ce fut l'âge d'or des antibiotiques, avec la découverte de la majorité des différentes familles connues actuellement. Cependant, de moins en moins de molécules ont été découvertes dernièrement et, avec l'usage intensif des antibiotiques s'en est suivi l'apparition et la propagation de résistance à ceux-ci. Depuis quelque temps, les sociétés pharmaceutiques ferment peu à peu leurs départements de recherche de nouvelles molécules naturelles faute de moyens et de découvertes (rentables). La fabrication de nouvelles molécules synthétiques ne donne pas non plus de bonnes alternatives ou molécules efficaces comme GlaxoSmithKline ou AstraZeneca ont pu l'expérimenter (Hutchings et al., 2019). Depuis quelques années néanmoins, la recherche de nouveaux antibiotiques naturels retrouve de l'intérêt suite à la découverte de nouvelles molécules diverses produites par des micro-organismes présents dans des environnements encore inexplorés (Hutchings et al., 2019; Maffioli et al., 2019). Parmi ces molécules naturelles, on peut retrouver des antifongiques, des antiviraux, anticancéreux variés

(Newman and Cragg, 2016). On peut également citer la découverte d'un nouvel antibiotique, la pseudouridimycin, inhibiteur de l'ARN polymérase (IARNP) bactérienne isolée à partir d'une bactérie du genre *Streptomyces*. Cette molécule inhibe l'ARNP bactérienne via un site de liaison (site d'addition de nucléoside triphosphate (NTP)) et un mécanisme différents des autres IARNP utilisés dans le domaine médical (concurrence avec l'uridine triphosphate pour l'occupation du site d'ajout du NTP) (Maffioli et al., 2017, 2019). Afin de lutter contre la résistance aux antibiotiques, l'OMS a établi une hiérarchie des différents antibiotiques : important, hautement important et d'importance critique pour la médecine humaine. Dans la même optique, l'OIE a également établi un classement des familles d'antibiotiques pour ceux utilisés dans le domaine vétérinaire (OIE, 2021). Ceci dans le but d'aider et de formuler les stratégies d'évaluation et de gestion des risques pour contenir la résistance aux antibiotiques (WHO, 2018). Un classement basé sur ceux de l'OMS et de l'OIE (pour l'OIE, une version antérieure à celle de 2021 et qui n'est plus disponible en ligne a été utilisée (AMCRA and UGent, 2020)) a été réalisé en Belgique pour le domaine vétérinaire afin d'adopter une meilleure utilisation des antibiotiques chez les animaux. Les antibiotiques sont donc regroupés en 3 catégories selon un code couleur allant de l'importance la plus basse (jaune) à haute importance (orange) et enfin de la plus haute importance (rouge) pour la santé humaine et animale (AMCRA and UGent, 2020).

Les différentes familles d'antibiotiques, leurs mécanismes d'action et les résistances.

Dans cette partie, les différentes familles d'antibiotiques (voire un antibiotique par famille) étudiées pour réaliser les travaux de cette thèse seront abordées, à savoir : β-lactames, colistine (polymyxine), quinolones, macrolides, aminoglycosides, phénicols et linézolide (un oxazolidinone).

Les β-lactames

Les β-lactames représentent aujourd'hui une des classes d'antibiotiques les plus utilisées en médecine humaine et animale. On y retrouve notamment les pénicillines, monobactam, céphalosporines, carbapénèmes et les inhibiteurs de β -lactamases (les β-lactamases sont des enzymes qui inhibent les β-lactames). Les β -lactames ont un effet antimicrobien en interagissant

avec la synthèse de la paroi bactérienne en inactivant les protéines de liaison à la pénicilline (PBP pour *Penicilline Binding Protein* en anglais) qui catalysent la formation du peptidoglycane. La formation de la paroi bactérienne est un processus dynamique faisant intervenir la formation et l'autolyse du peptidoglycane en même temps. La paroie cellulaire est en fait recyclée et le peptydoglycane est clivé, renvoyé dans le périplasme pour y être recyclé. Si la formation de celui-ci est inhibée, seuls le clivage se poursuit, la paroi bactérienne est détruite et la cellule éclate à cause de la pression osmotique (Papp-Wallace et al., 2011).

Les pénicillines

La pénicilline a été mise en évidence et utilisée dans le domaine médical durant le premier tiers du 20ème siècle par Alexander Fleming (White R.J., 2012). La pénicilline possède une action pour soigner des infections causées par exemple par des coques à Gram-positif ou -négatif. Cependant, certaines bactéries Gram-négatives présentent une résistance à la pénicilline due à une perméabilité réduite de la membrane externe à cet antibiotique (Spratt and Cromie, 1988). Il existe 4 types de pénicillines : les pénicillines naturelles, les aminopénicillines (p. ex. ampicilline et amoxicilline), les carboxypénicillines (p. ex. carbenicilline et ticarcilline) et ureidopénicillines (p. ex. piperacilline) (Wright, 1999). Les amino- , carboxy- et uréidopénicillines ont un spectre d'action plus large que les pénicillines naturelles (Wright, 1999).

Monobactam

L'aztreonam est le seul monobactam actuellement disponible. Cet antibiotique offre un large spectre d'action contre les bactéries Gram-négatives aérobies mais est inefficace contre les bactéries Gram-positives ou anaérobies (Ramsey and MacGowan, 2016).

Les céphalosporines

La découverte des céphalosporines remonte aux années 1940 avec la céphalosporine C (Page M.G.P., 2012). Les céphalosporines se divisent actuellement en 5 générations définies par leur ordre de découverte et leur spectre d'action.

Les céphalosporines de première génération sont essentiellement actives contre des bactéries à coque à Gram-positif comme les *Staphylococci* spp. ou les *Streptococci* spp. et ont une action

relativement modeste contre les bactéries Gram-négatives. Elles ont tout de même une action contre les *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, et *Shigella* spp. entre autres (Page M.G.P., 2012). La deuxième génération de céphalosporines a une action moins efficace contre les Gram-positives à coque que la première génération mais une meilleure action face aux Gram-négatives de type bacille. Cette meilleure action est due au fait que cette seconde génération est plus stable face aux β-lactamases produites par les bactéries Gram-négatives (Tartaglione and Polk, 1985). La troisième génération possède un spectre d'action plus large que les deux premières générations ou que les autres β-lactames sur les bactéries à Gram-négatif et la plupart des entérobactériacées y sont sensibles (Bui and Preuss, 2021; Klein and Cunha, 1995). La troisième génération a cependant une moins bonne activité contre les Gram-positives que la première génération (Page M.G.P., 2012). Ce spectre plus étendu est lié au fait qu'elles ont une plus grande affinité pour les PBP et une meilleure résistance aux β-lactamases (Bui and Preuss, 2021; Klein and Cunha, 1995). Les céphalosporines de quatrième génération résistent non seulement aux β-lactamases naturelles présentes chez certaines entérobactéries mais également à une céphalosporinase chromosomique de type ampC (*ampC* est un gène codant pour des enzymes appelées céphalosporinases qui dégradent les céphalosporines) dont le gène est sur-exprimé. De plus, certains antibiotiques de cette génération (e.g. cefpirome) présentent une activité contre des bactéries Gram-positives comme les staphylocoques sensibles à la méticilline par exemple (Garau et al., 1997). Enfin, la cinquième génération est notamment caractérisée par son action contre les *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline (MRSA pour « *methicillin resistant Staphylococcus aureus* » en anglais) (Terreni et al., 2021). Elles sont aussi connues sous le nom de céphalosporines anti-MRSA. En Belgique, les céphalosporines de première et deuxième génération sont considérées comme des molécules de faible importance pour la médecine humaine en terme de sélection de résistance et transfert. Leur utilisation dans le domaine vétérinaire est donc dictée par le cadre légal (nécessité de prescriptions vétérinaires, respect des posologies) sans recommandation supplémentaire (AMCRA and UGent, 2020). Au contraire, les céphalosporines de troisième et quatrième génération sont considérées comme molécules de haute importance pour la médecine humaine et leur utilisation dans le domaine vétérinaire doit donc être évitée au maximum (AMCRA and UGent, 2020). En Belgique, si ces antibiotiques

devaient être utilisés pour des animaux PDA, le vétérinaire concerné doit alors respecter les restrictions reprises dans l'arrêté royal du 21 juillet 2016 : « Arrêté royal relatif aux conditions d'utilisation des médicaments par les médecins vétérinaires et par les responsables des animaux » mis à jour le 9/12/2020 (Anonymous, 2020a). Au niveau de l'OMS, les céphalosporines sont considérées comme hautement importantes pour les première et deuxième générations et d'importance critique pour les troisième, quatrième et cinquième générations pour la médecine humaine (WHO, 2018).

Les carbapénèmes

Les carbapénèmes ont été découverts alors que l'émergence des β-lactamases menaçait l'utilisation de certains antibiotiques de la famille des β-lactames (e.g. pénicillines, aminopénicillines, céphalosporines). Dans les années 1970, l'acide olivanic a été isolé chez *Streptomyces clavuligerus* (Gram-positif), et possédait en son sein un squelette carbapénème et agissait comme un β-lactame à large spectre (Papp-Wallace et al., 2011). Différents carbapénèmes ont ensuite été découverts durant les décennies suivantes. Comme les autres β-lactames, les carbapénèmes empêchent la formation du peptidoglycane en interagissant avec les PBP et peuvent se lier à plusieurs de ces protéines (Papp-Wallace et al., 2011). Le spectre d'action des carbapénèmes est large, certains ont une action contre les bactéries à Gram-positif (e.g. imipénème) quand d'autres ont une meilleure action contre les bactéries à Gram-négatif (e.g. méropénème). Ces molécules ne sont pas utilisées dans la médecine vétérinaire en Belgique dû à leur importance en médecine humaine. L'OMS a classé les carbapénèmes comme étant d'importance critique pour la médecine humaine (WHO, 2018).

Les inhibiteurs de β-lactamases

Les inhibiteurs de β-lactamases sont des molécules qui vont inhiber l'action des enzymes responsables de l'inactivation de certains β-lactames. La découverte de ces inhibiteurs remonte à 1977 avec la découverte de l'acide clavulanique (Reading and Cole, 1977). Celui-ci inhibe la majorité des β-lactamases de classe A (TEM, SHV et CTX-M). En combinaison avec des antibiotiques du type pénicilline (antibiotique-inhibiteur : amoxicilline-clavulanate, ampicilline-sulbactam, piperacilline-tazobactam), cela a représenté une bonne stratégie thérapeutique face

aux bactéries produisant des β-lactamases. Cependant, l'émergence de β-lactamases insensibles aux effets de ces inhibiteurs nécessite de trouver de nouvelles alternatives pour les traitements des infections causées par des bactéries productrices de telles enzymes (Tooke et al., 2019). Fort heureusement, de nouveaux inhibiteurs et de nouvelles combinaisons (β-lactame-inhibiteur) sont en développement (imipénème-relebactam) voire déjà utilisés dans le domaine médical (ceftazidime-avibactam) (Tooke et al., 2019). Cependant, il existe peu de solutions au niveau clinique pour contrer les metallo- β-lactamases (classe B) et leur occurrence pourrait dès lors augmenter dans les prochaines années.

Résistance aux β-lactames

Modification de la cible des β-lactames

Un des mécanismes de résistance aux β-lactames est la production d'une PBP de faible affinité pour les antibiotiques de cette famille. Cette protéine, la PBP2a est produite par les gènes *mec* que l'on retrouve chez les MRSA par exemple (Wright, 1999).

Augmentation de l'efflux ou diminution de l'entrée de l'antibiotique

Un autre mécanisme de résistance aux β-lactames consiste à augmenter l'efflux de ces antibiotiques ou de diminuer la perméabilité de la membrane externe. L'augmentation de l'efflux peut se faire par la surexpression de pompes, ce qui va entraîner l'expulsion de l'antibiotique à l'extérieur de la bactérie. La diminution de la perméabilité de la membrane externe peut avoir lieu suite à la perte de porines qui permettent l'entrée de molécules dans la bactérie (Wilke et al., 2005).

Les β-lactamases

Les antibiotiques β-lactames sont rendus inefficaces par des enzymes que l'on appelle des β-lactamases. Il existe actuellement plus d'un millier de β-lactamases dont certaines sont capables d'inactiver des céphalosporines ou des carbapénèmes (Bush, 2013a). Les β-lactamases sont des enzymes périplasmiques qui hydrolysent les β-lactames, empêchant ces derniers d'atteindre les PBPs. Ces enzymes sont divisées en 4 différentes classes (A, B, C et D) en fonction de leurs

similitudes structurelles ou en 4 groupes (1 à 4) selon leurs profils hydrolytiques et inhibiteurs (Figure 2). Cependant, d'un point de vue clinique, la classification la plus utile est la classification fonctionnelle car c'est elle qui détermine quel antibiotique sera ciblé par l'enzyme et lequel ne le sera pas (Bush, 2018, 2013b).

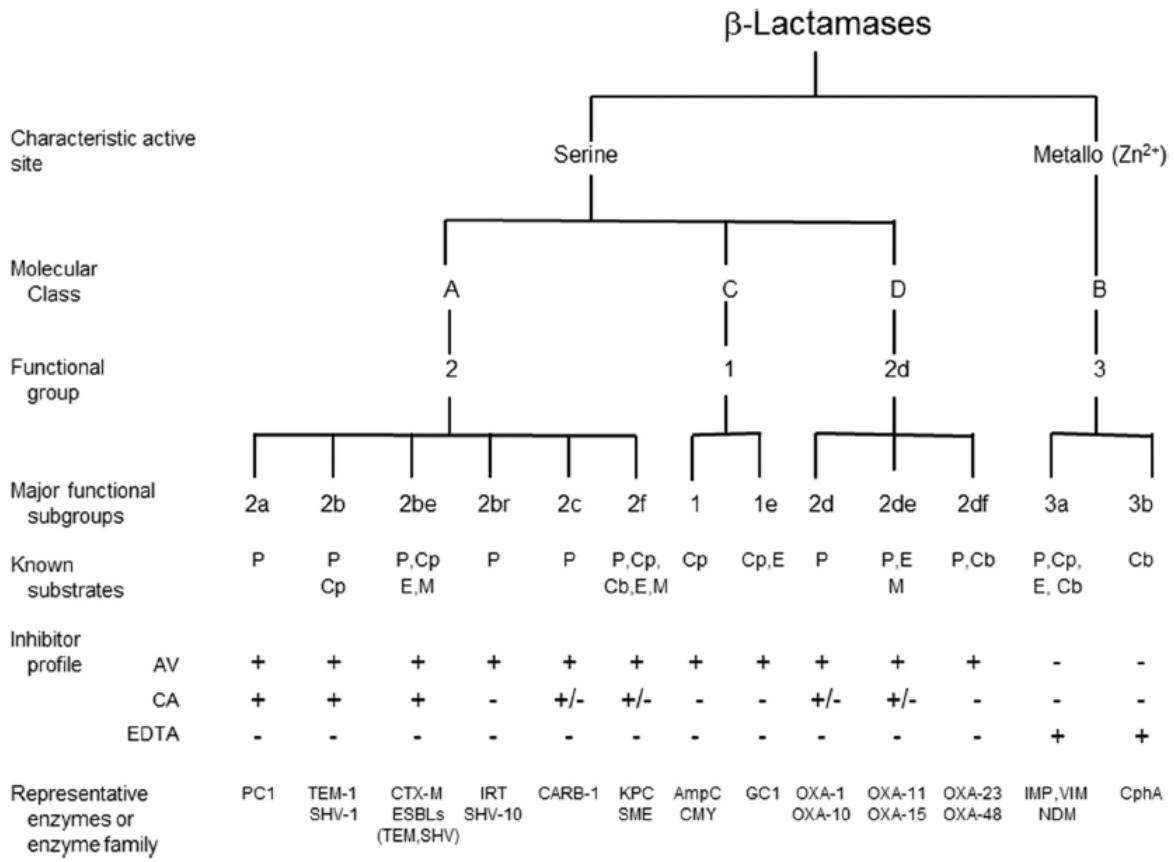


Figure 2: classifications des β-lactamases. AV, avibactam ; CA, acide clavulanique ; Cb, carbapénème ; Cp, céphalosporine ; E, céphalosporine à spectre étendu ; M, monobactam ; P, pénicilline. Illustration adaptée de Bush, 2018

Les β-lactamases se retrouvent aussi bien dans les bactéries à Gram-positif que négatif bien que plus souvent rapportées chez les bactéries à Gram-négatif (Fröhlich et al., 2021). Cependant, chez certaines espèces bactériennes comme *S. aureus*, des pénicillinases auraient émergé comme premier mécanisme de résistance; observation faite dans les années 1940 (Rammelkamp and Maxon, 1942; Bush, 2018). Ceci serait lié à l'utilisation intensive de pénicillines pour traiter des infections nosocomiales qui, au fil du temps, a fait se développer des staphylocoques résistants aux pénicillines alors qu'ils y étaient complètement sensibles. La même situation s'est présentée

avec les MRSA qui sont apparues dans les hôpitaux dans les années 1960 et dont l'occurrence a rapidement augmenté suite à l'utilisation de la méthicilline (Enright et al., 2002). La situation s'est toutefois améliorée depuis comme l'ont montré différentes études et rapports dans lesquels les taux de MRSA étaient moins importants (Bush, 2018; Smith et al., 2021; ECDC, EFSA and EMA, 2021). Au sein des enterobactériacées, ce sont les β-lactamases qui ont servi de principal mécanisme de défense contre les β-lactames, devenant ainsi une menace importante pour les traitements thérapeutiques utilisant ces antibiotiques. Les gènes codant pour des β-lactamases, les gènes *bla*, ont très vite été disséminés au sein de la plupart des entérobactéries. On sait aujourd'hui que ces gènes peuvent être acquis par transfert horizontal de gènes et surtout via l'acquisition de plasmides (Bush, 2018). Avec le temps, des enzymes avec des spectres plus larges ont été observées, capables d'hydrolyser par exemple les céphalosporines de troisième génération. Ces enzymes, appelées β-lactamases à spectre étendu (BLSE ou ESBL pour *extended spectrum β-lactamases* en anglais) sont des dérivés des gènes codant pour des β-lactamases comme bla_{TEM-1} ou bla_{SHV-1} et diffèrent de ceux-ci par seulement 2 ou 3 mutations. Durant les dernières années, les variants les plus communs (TEM, SHV) ont diminué. Cependant, ils ont été remplacés par la famille CTX-M des BLSE (Bush, 2018). En plus de ces gènes BLSE, des gènes codant pour des céphalosporinases ont émergé. Les premières observations ont été la production d'enzymes AmpC liées à une surexpression d'un gène chromosomique (*ampC*). Des gènes codant pour de telles enzymes (CMY, ACC) ont ensuite été observés sur des plasmides, mettant dès lors en évidence leur capacité à se propager (Bush, 2018). Face à ces résistances, les carbapénèmes ont commencé à être utilisés plus fréquemment avec comme conséquence logique, l'apparition de résistances à ces différents antibiotiques via la production de carbapénémases par des gènes chromosomiques et plasmidiques (bla_{KPC}, bla_{NDM}, bla_{VIM}, bla_{IMP}, bla_{OXA-48} like). Actuellement, un même isolat bactérien peut porter plusieurs gènes BLSE différents mais également des gènes produisant des enzymes d'autres classes (Bush, 2018).

La colistine, une polymyxine

La colistine ou polymyxine E a été isolée à partir d'une bactérie du sol, *Paenibacillus polymyxa* sbsp. *colistinus* durant les années 1940 (Wright and Welch, 1959). Elle est utilisée pour traiter les infections causées par les bactéries à Gram-négatif. En effet, elle a pour action d'interagir avec

les lipopolysaccharides (LPS) présents à la surface de la membrane externe des bactéries Gram-négatives. Elle se lie avec le lipide A du LPS, ce qui mène à la dégradation de celui-ci, une augmentation de la perméabilité de la membrane et à terme, à la mort de la cellule (Velkov et al., 2010). En 1970 cependant, suite à des effets secondaires néphrotoxiques et neurotoxiques importants (Koch-Weser et al., 1970), la colistine été remplacée par l'utilisation d'autres antibiotiques avec moins d'effets secondaires et son utilisation a été fortement limitée (Poirel et al., 2017). La colistine a cependant continué d'être utilisée massivement dans le domaine vétérinaire pour prévenir les infections chez les animaux PDA (Poirel et al., 2017). Avec la diminution des options thérapeutiques suite à l'augmentation des (multi-) résistances aux antibiotiques, la colistine est aujourd'hui utilisée comme antibiotique de dernier recours pour traiter les infections humaines causées par certaines bactéries Gram-négatives extrêmement résistantes aux antibiotiques (El-Sayed Ahmed et al., 2020). En Belgique, la colistine est considérée comme molécule de haute importance pour la médecine humaine et doit être utilisée dans le domaine vétérinaire selon certaines restrictions et après un diagnostic permettant d'établir le moyen thérapeutique à utiliser. Ces restrictions sont des recommandations émises par l'AMCRA (Antimicrobial Consumption and Resistance in Animals) dont le rôle est décrit plus bas (AMCRA and UGent, 2020). L'OMS quant à elle a classé la colistine comme étant un antibiotique d'importance critique pour la médecine humaine (WHO, 2018).

La résistance à la colistine

Durant de nombreuses années, il était admis que la résistance à la colistine était majoritairement causée par des mutations chromosomiques. Ces mutations se retrouvent dans des gènes codant pour des enzymes impliquées dans la régulation de l'expression d'autres gènes responsables de modifications des LPS. Il s'agit des gènes *pmrA*, *pmrB*, *phoP*, *phoQ* and *mgrB*, *crrA*, *crrB,* tous impliqués dans la modification des LPS. Ces modifications diminuent l'activité de la colistine et mènent donc à une résistance (Figure 3) (Poirel et al., 2017). Cependant, en 2015, un gène

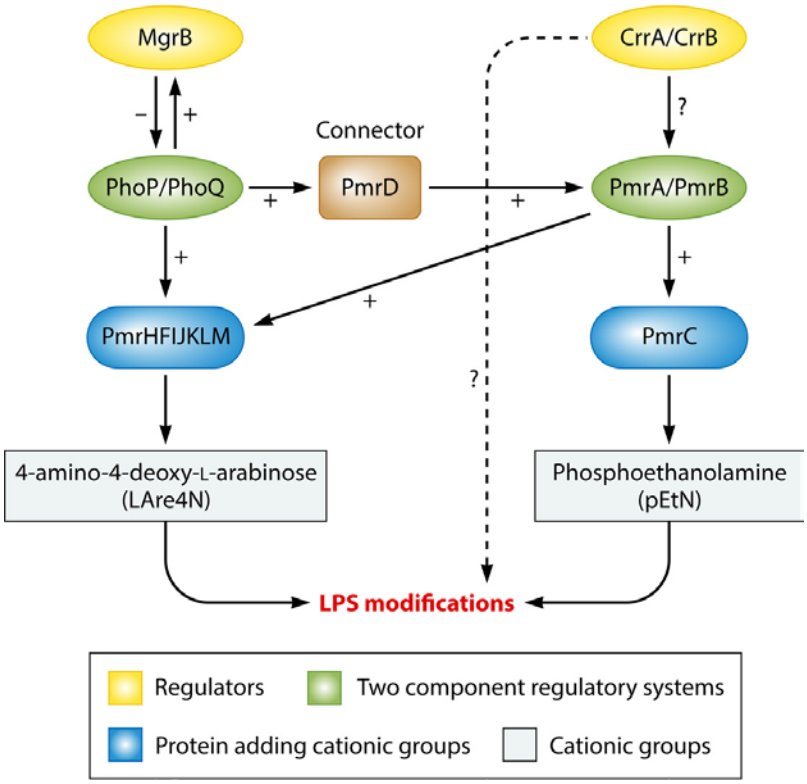


Figure 3: Voies de régulation des modifications du LPS chez K. pneumoniae. Figure adaptée de Poirel et al., 2017.

transférable (*mcr-1* (mobile colistin resistance en anglais)) conférant une résistance à la colistine a été découvert (Liu et al., 2016). Ce gène code pour une phosphoéthanolamine transférase qui catalyse l'ajout d'une phosphoéthanolamine sur le LPS, diminuant ainsi son affinité pour la colistine (modification de la cible de l'antibiotique) (Liu et al., 2016). Depuis, plusieurs autres gènes *mcr* ont été découverts (*mcr-2* jusque *mcr-10*) (Xavier et al., 2016; Yin et al., 2017a; Carattoli et al., 2017; Borowiak et al., 2017; AbuOun et al., 2017; Yang et al., 2018; Wang et al., 2018; Carroll et al., 2019; C. Wang et al., 2020). Les gènes *mcr* se retrouvent dans différents types

de plasmides, dans différentes espèces bactériennes présentes chez différents hôtes et cela dans le monde entier, menaçant donc l'efficacité thérapeutique de la colistine.

Les quinolones

L'acide nalidixique, la première quinolone synthétique à avoir été mise en évidence, a été découvert en 1962 et a commencé à être utilisée dans le domaine clinique en 1967 (White R.J., 2012). L'utilisation de cet antibiotique a cependant été négligée jusqu'au développement des fluoroquinolones dans le début des années 1980 (Aldred et al., 2014). Les quinolones ont un effet bactéricide et sont généralement actives contre les bactéries Gram-négatives. Les fluoroquinolones, des quinolones auxquelles un groupement fluor a été ajouté, offrent un plus large spectre, y compris sur les bactéries Gram-positives (Aldred et al., 2014). Les quinolones agissent en inhibant les topoisomerases de type II : l'ADN gyrase et la topoisomerase IV. L'ADN gyrase permet le super-enroulement négatif de l'ADN et également de diminuer les tensions dans l'ADN qui s'accumulent au niveau des fourches de réplication et des complexes de transcription. La topoisomerase IV quant à elle a pour rôle de décaténer les chromosomes filles après la réplication et de défaire les nœuds dans l'ADN accumulés par les différents processus cellulaires (Aldred et al., 2014). Pour ce faire, ces enzymes causent des cassures double-brins dans l'ADN. Les quinolones interagissent avec ces enzymes, empêchant notamment le processus de ligation qui mène à une accumulation des cassures doubles brins qui finissent par tuer la cellule. Les fluoroquinolones sont aujourd'hui classées en Belgique comme molécules de très haute importance pour la médecine humaine et leur utilisation dans le domaine vétérinaire doit donc être évitée au maximum (AMCRA and UGent, 2020). Ces molécules sont, comme les céphalosporines de troisième et quatrième générations, soumises à l'arrêté royal du 21 juillet 2016 susmentionné (Anonymous, 2020a). Cette classification correspond au rang « d'importance critique pour la médecine humaine » du classement de l'OMS (WHO, 2018).

La résistance aux quinolones

Les mécanismes de résistance aux quinolones sont divers. En effet, la résistance peut venir de mutations au niveau des gènes codant pour la gyrase (*gyrA* et *gyrB*) et/ou pour la topoisomérase IV (*parC* et *parE*) qui diminuent ou inhibent l'activité des quinolones. Les enzymes peuvent alors fonctionner correctement et remplir leurs rôles cellulaires (Aldred et al., 2014). Un autre mécanisme de résistance est l'acquisition de gènes plasmidiques conférant une résistance aux quinolones. Il existe trois familles de gènes associées avec la résistance aux quinolones : les gènes *qnr*, le gène *aac(6')-Ib-cr* et des gènes codant pour des pompes à efflux (OqxAB, QepA1, QepA2). Enfin, au niveau chromosomique, la résistance peut être due à la surexpression de pompes à efflux ou la perte de porines (Figure 4) (Aldred et al., 2014).

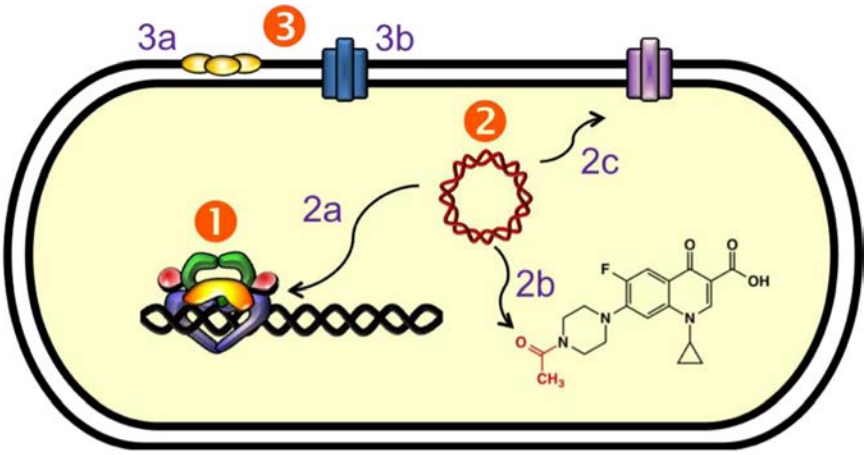


Figure 4: mécanismes de résistance aux quinolones. (1) La résistance est causée par des mutations dans la gyrase et la topoisomérase IV diminuant l'interaction entre les enzymes et l'antibiotique. (2) La résistance est causée par des gènes plasmidiques. (2a) Les protéines Qnr (en jaune) diminuent l'interaction topoisomerase-ADN et protège le complexe formé par l'ADN et l'enzyme de l'action des quinolones. (2b) La protéine Aac(6')-Ib-cr est une acétyletransférase qui modifie la ciprofloxacine et la norfloxacine, diminuant leur efficacité. (2c) Des gènes plasmidiques codent pour des pompes à efflux qui diminuent la concentration des quinolones dans la cellule. (3) La sous expression de porines (3a) peut diminuer l'entrée de l'antibiotique ou la surexpression de pompes à efflux (3b) peut diminuer la concentration d'antibiotique intracellulaire. Adaptée de Aldred et al. 2014

Contrairement aux mutations dans les gènes *gyrA/B* et *parC/E*, qui sont transmises verticalement de génération en génération de bactéries, les gènes plasmidiques sont eux transférables horizontalement et verticalement (Aldred et al., 2014). Bien que des gènes plasmidiques existent et sont transférables entre bactéries, les résistances aux quinolones sont encore aujourd'hui majoritairement liées aux mutations dans les gènes *gyr* et *par*. La ciprofloxacine, une fluoroquinolone développée en 1981, est un antibiotique encore fort utilisé de nos jours dans le domaine médical et la propagation de la résistance à cet antibiotique pourrait augmenter les

échecs thérapeutiques de cet antibiotique. Il faut donc surveiller l'évolution de la propagation des gènes plasmidiques et également se focaliser sur les mutations impliquées dans cette résistance.

Les macrolides

Les macrolides ont été découverts en 1949 avec l'érythromycine isolée à partir de *Saccharopolyspora erythraea* et commercialisée dès 1952 (Xu et al., 2012). Les macrolides inhibent la synthèse des protéines en ciblant l'ARNr 23S de la sous-unité 50S du ribosome bactérien et en bloquant le canal de sortie du polypeptide naissant (Vázquez-Laslop and Mankin, 2018). C'est ce qui était en tout cas admis traditionnellement car les macrolides sont en réalité capables d'inhiber sélectivement la synthèse de protéines et agissent comme modulateurs de la traduction (Vázquez-Laslop and Mankin, 2018). L'arrêt de la traduction de la protéine dépendrait en fait de la séquence d'acides aminés et de la présence d'un motif spécifique qui permettrait à l'antibiotique de mettre fin à l'élongation du peptide naissant. Les macrolides ont un effet bactériostatique mais à haute dose peuvent avoir un effet bactéricide. En Belgique, les macrolides sont considérés comme molécules de haute importance pour la médecine humaine et l'AMCRA recommande qu'ils soient utilisés dans le domaine vétérinaire selon certaines restrictions et après un diagnostic permettant d'établir le moyen thérapeutique à utiliser (AMCRA and UGent, 2020). L'OMS a classé les macrolides comme antibiotiques d'importance critique pour la médecine humaine (WHO, 2018).

La résistance aux macrolides

Il existe plusieurs mécanismes qui peuvent donner une résistance aux macrolides : la modification de la cible de l'antibiotique suite à des mutations dans l'ARNr 23S ou dans des protéines ribosomiques (L4 et L22), la méthylation de l'ARNr, un efflux de l'antibiotique, et l'inactivation de l'antibiotique (Gomes et al., 2017; Xu et al., 2012). La méthylation de l'ARNr est réalisée par une méthyltransférase codée par la famille des gènes *erm* (*Erythromycin Resistance Methylase* en anglais). Cette famille semble être séparée en au moins deux classes de protéines qui ajoutent un ou deux groupements méthyles au centre peptidyltransférase de l'ARNr 23s au niveau d'un résidu adénine (Weisblum, 1995). Cet ajout modifie la conformation de la sous-unité

50S et empêche l'accès de l'antibiotique à son site de liaison. L'ajout d'un ou deux groupements méthyles mène à un faible ou haut niveau de résistance respectivement (Xu et al., 2012). L'efflux des macrolides est dû notamment aux gènes *mef* (macrolide efflux) qui codent pour des pompes à efflux associées à la membrane, qui se lient aux macrolides et les éjectent en dehors de la cellule (Clancy et al., 1996). Enfin, les mutations au niveau du ribosome (dans l'ARNr 23S par exemple) empêchent l'antibiotique de former les liens nécessaires à son action ou modifient la conformation proche de la zone de liaison de l'antibiotique, l'empêchant d'accéder à sa cible (Chisholm et al., 2010; Xu et al., 2012). L'inactivation des macrolides est réalisée par des phosphotransférases codées par les gènes *mph* ou des estérases codées par les gènes *ere* (Gomes et al., 2017).

Les aminoglycosides

Les aminoglycosides ont été découverts pour la première fois en 1944 avec la streptomycine, isolée de *Streptomyces griseus* (Armstrong et al., 2012; Waters and Tadi, 2021). Les aminoglycosides ont une activité à large spectre contre la plupart des bactéries Gram-négatives (dont toutes les enterobactériacées) et quelques Gram-positives (*Bacillus* spp., *Staphylococcus* spp. et quelques streptocoques). La découverte de la streptomycine a été suivie par celle de nombreux autres aminoglycosides les 30 années suivantes. Chaque découverte d'un aminoglycoside a été suivie par le rapportage de résistances à ces antibiotiques. Les aminoglycosides tuent les bactéries en se liant au ribosome bactérien et en inhibant la synthèse normale de protéine. Plus précisément, ils se lient fortement au site A de l'ARNr 16S (très conservé) de la sous unité 30S du ribosome bactérien. Ce faisant, ils perturbent la synthèse des protéines et induisent l'incorporation aléatoire d'acides aminés. De plus, il semblerait que l'activité prolongée des aminoglycosides, même après un arrêt de traitement, est due à la production de ces protéines mal traduites ou au temps nécessaire pour que la molécule se détache de sa cible (Armstrong et al., 2012). Cette action prolongée permet notamment de diminuer les doses d'antibiotiques données (Cars and Odenholt-Tornqvist, 1993). En Belgique, les aminoglycosides sont considérés comme molécules de haute importance pour la médecine humaine et l'AMCRA recommande qu'ils soient utilisés dans le domaine vétérinaire selon certaines restrictions et après un diagnostic permettant d'établir le moyen thérapeutique à

utiliser (AMCRA and UGent, 2020). L'OMS a classé les aminoglycosides comme étant d'importance critique pour la médecine humaine (WHO, 2018).

La résistance aux aminoglycosides

Les enzymes modifiant les aminoglycosides (EMAg) sont les causes principales de résistance à ces antibiotiques (Armstrong et al., 2012). Les EMAg inactivent les aminoglycosides par N-acétylation, (les enzymes AAC), par O-adénylation (enzymes ANT) et par O-phosphorylation (enzymes APH) diminuant l'affinité de l'antibiotique pour le ribosome. Ces enzymes se retrouvent dans de nombreuses bactéries Gram-négatives et positives. Les gènes codant pour les EMAg sont souvent plasmidiques, se trouvant sur des transposons en association avec d'autres gènes de résistance envers d'autres antibiotiques. De plus, les gènes *rmtA*, *rmtB* et *armA*, qui codent pour des méthyltransférases, confèrent eux aussi une résistance aux aminoglycosides en ajoutant un groupement méthyle à l'ARN 16S (Jana and Deb, 2006). Les aminoglycosides sont encore aujourd'hui utilisés pour traiter des infections graves, voire mortelles. Il est dès lors important d'essayer d'éviter la propagation de la résistance à ces antibiotiques.

Les phénicols

Le chloramphénicol a été isolé pour la première fois à partir de *Streptomyces venezuelae* en 1947 et appartient à la famille des phénicols. Le chloramphénicol et le florfénicol sont des antibiotiques bactériostatiques qui agissent en inhibant la synthèse des protéines bactériennes. Ils se fixent de manière réversible au niveau du centre peptidyltransférase (situé dans l'ARN 23S) de la sous-unité 50S du ribosome 70S, bloquant ainsi la production des protéines (Schlünzen et al., 2001; Roberts and Schwarz, 2016). Plus précisément, ils bloquent l'élongation de la chaîne peptidique et ciblent les bactéries Gram-positives et -négatives (Roberts and Schwarz, 2016). Le chloramphénicol était considéré comme un antibiotique à large spectre prometteur. Il a cependant déclenché des effets secondaires problématiques, voire mortels comme l'anémie aplasique et son usage a donc été interdit dans la médecine humaine. En 1994, l'utilisation du chloramphénicol a été bannie pour les animaux PDA dans l'UE afin de protéger les consommateurs des résidus qui pourraient encore être présents dans la nourriture et qui peuvent causer de l'anémie aplasique (effet secondaire de l'antibiotique qui n'est pas dose

dépendant) mais reste cependant utilisable pour les animaux de compagnie et ceux qui ne sont pas destinés à entrer dans la chaîne alimentaire humaine (Schwarz et al., 2004). Même si les phénicols ne sont plus utilisés aujourd'hui chez l'humain à cause de leurs effets secondaires, ils sont encore utilisés chez les animaux, notamment le florfénicol dont l'utilisation dans le domaine vétérinaire belge a augmenté chaque année entre 2011 et 2018 (Anonymous, 2020b). En Belgique, les phénicols sont considérés comme des molécules de faible importance pour la médecine humaine en terme de sélection de résistance et de transfert. Leur utilisation dans le domaine vétérinaire est donc dictée par le cadre légal (nécessité de prescriptions vétérinaires, respect des posologies) sans recommandation supplémentaire (AMCRA and UGent, 2020). Les phénicols sont classés comme antibiotiques de haute importance pour la médecine humaine selon l'OMS (WHO, 2018).

La résistance aux phénicols

Le plus souvent, la résistance au chloramphénicol est due à la présence d'enzymes, des chloramphénicols acétyltransférases (CATs) qui sont des enzymes (O-acetyltransférases) qui vont inactiver l'antibiotique en lui donnant un groupement acétyle. Les CATs ne sont pas capables d'inactiver le florfénicol. L'expression de ces gènes peut être induite par le chloramphénicol (Roberts and Schwarz, 2016). Il peut également y avoir des transporteurs (exporteurs) spécifiques, associés à la membrane, qui vont permettre l'évacuation de la molécule. Les gènes *fexA* et *fexB*, qui codent pour deux de ces exporteurs sont eux aussi inductibles non seulement par le chloramphénicol mais aussi par le florfénicol contre lesquels ils donnent aussi une résistance (Roberts and Schwarz, 2016). En plus de ces mécanismes, d'autres apportent également des résistances aux phénicols comme des mutations diminuant l'expression des protéines OmpF (un type de porine) de la membrane externe empêchant l'entrée de l'antibiotique, des mutations dans l'ARNr 23S qui modifient sa conformation (Ettayebi et al., 1985), la protection du ribosome par la production de protéine comme OptrA ou PoxtA qui empêchent l'antibiotique de se fixer à sa cible (Wang et al., 2015; Antonelli et al., 2018; Sharkey et al., 2016), l'inactivation de l'antibiotique par des phosphotransférases ou encore la modification du site cible de l'antibiotique dans l'ARNr 23s par des méthylases comme Cfr (Roberts and Schwarz, 2016). Les gènes codant pour ces différents éléments sont souvent

présents sur des éléments génétiques mobiles qui vont permettre leur dissémination au sein des bactéries.

Le linézolide, un oxazolidinone

Le linézolide est un antibiotique synthétique de la famille des oxazolidinones. Les oxazolidinones représentent une des familles d'antibiotiques synthétiques les plus récentes. Le linézolide, le premier antibiotique de la famille des oxazolidinones, a été mis en évidence à la fin des années 1970 mais ce n'est qu'en 2000 que la FDA (*Food and Drug Administration*) a approuvé le linézolide pour l'utilisation humaine comme antibiotique (Bi et al., 2018) et c'est en 2001 qu'il a été approuvé au Royaume Uni (Perry and Jarvis, 2001). Les oxazolidinones (linézolide, tédizolide) sont des antibiotiques utilisés pour traiter des infections causées par des bactéries Gram-positives comme des entérocoques résistantes à la vancomycine (VRE) et des MRSA (Phillips and Sharaf, 2016; Argudín et al., 2019). Le linézolide empêche la synthèse protéique en se liant à l'ARN 23s de la sous-unité 50S du ribosome bactérien. Il rend ainsi impossible la formation du complexe d'initiation 70S. Cela a pour effet d'inhiber la synthèse de protéines et de stopper la croissance bactérienne (Diekema and Jones, 2000). Il agit comme antibiotique bactériostatique contre les staphylocoques et les entérocoques (Azzouz and Preuss, 2021). Étant un antibiotique critique, le linézolide et les oxazolidinones ne sont pas autorisés à être utilisés chez les animaux PDA en Europe (EFSA, 2008) et dans le monde (Wang et al., 2015). Le linézolide est classé comme un antibiotique d'importance critique en médecine humaine par l'OMS (WHO, 2018).

La résistance au linézolide

La résistance au linézolide peut être provoquée soit par des mutations chromosomiques au niveau du gène codant pour l'ARNr 23S (Prystowsky et al., 2001), soit par l'acquisition de gènes transférables : *cfr* et ses différents variants, *optrA* ou *poxtA* (Long et al., 2006; Deshpande et al., 2015; Tang et al., 2017; Guerin et al., 2020; Stojković et al., 2019; Wang et al., 2015; Antonelli et al., 2018). Bien que le linézolide ait été autorisé à être utilisé comme antibiotique en 2000 aux Etat-Unis, des cas d'infections liés à des souches résistantes au linézolide ont été signalés dès 2001 aux Etats-Unis et 2002 au Royaume-Uni et en Autriche (Gonzales et al., 2001; Auckland et al., 2002; A.P. Johnson et al., 2002). Il est à noter toutefois que les infections liées à des bactéries

résistantes au linézolide restent rares. Les gènes *cfr* codent pour une méthyltransférase qui cible l'ARNr 23S et le protège ainsi de l'action de plusieurs antibiotiques. En effet, *cfr* et certains de ses variants (*cfrC*, *cfrD*, *cfrE*) mènent à une résistance croisée étendue aux phénicols, lincosamides, linézolide (oxazolidinone), pleuromutilines et streptogramines A (appelé le phénotype $PhLOPS_A$) (Long et al., 2006; Deshpande et al., 2015; Tang et al., 2017; Stojković et al., 2019; Guerin et al., 2020). *cfrB*, bien que conférant une résistance au linézolide, semble ne pas mener au phénotype $PHLOPS_A$ dans certaines circonstances qui doivent encore être élucidées, l'environnement génétique y jouant probablement un rôle (Deshpande et al., 2015; Stojković et al., 2019). Le gène *optrA* code lui pour une protéine ARE ABC-F (*antimicrobial resistance, ATP binding cassette*) qui protège le ribosome des oxazolidinones (linézolide et tédizolide) et des phénicols (Kerr, 2004; Sharkey et al., 2016; Wang et al., 2015). *poxtA* code également pour une protéine ARE ABC-F qui protège le ribosome, comme *optrA*. *poxtA* confère une résistance aux oxazolidinones et phénicols mais également aux tétracyclines (Antonelli et al., 2018). Ces gènes ont tous été rapportés sur des plasmides et peuvent donc être transférés entre les bactéries. De plus, ils confèrent tous des résistances croisées étendues à différents antibiotiques, ce qui augmente la pression de sélection exercée sur ceux-ci. Leur circulation au sein de diverses populations bactériennes représente un risque pour la réussite de traitements (thérapeutiques), notamment contre les infections causées par les MRSA ou les VRE.

Surveillance de la résistance aux antibiotiques

La surveillance de la RAM permet de mettre en évidence la circulation et l'évolution des résistances aux antibiotiques au sein de populations bactériennes des différents pays. En parallèle des surveillances de la RAM, des surveillances de la consommation des antibiotiques sont également effectuées.

Chez les animaux PDA et dans les denrées alimentaires

L'ensemble des 28 pays membres de l'UE donnent les résultats de leurs surveillances à l'EFSA (*European Food Safety Autority*) et l'ECDC (*European Centre for Disease Prevention and Control*) afin d'établir un rapport public sur l'état des résistances en Europe (EFSA and ECDC, 2021).

En Belgique, des rapports de la surveillance de la RAM, rédigés par le Laboratoire National de Référence (LNR) résistance antimicrobienne (basé à Sciensano et précédemment au Centre d'Étude et de Recherches Vétérinaires et Agrochimiques (CERVA) et à l'Institut scientifique de Santé publique (ISP)) et publiés sur le site de l'Agence Fédérale pour la Sécurité de la Chaine Alimentaire (AFSCA) sont disponibles depuis 2011 pour les bactéries isolées d'animaux PDA et depuis 2013 pour les bactéries isolées de denrées alimentaires (Anonymous, 2020c). La surveillance est réalisée sur différentes bactéries dont *E. coli, Salmonella* spp*.,* MRSA, *Enterococcus faecalis* et *Enterococcus faecium* (entres autres et en fonction des campagnes de surveillance). Il est à noter que depuis 2004, la Commission Européenne impose à tous ses états membres d'effectuer des campagnes de surveillance de résistance aux antibiotiques chez les animaux et dans les denrées alimentaires afin de tenir à l'œil l'évolution de la situation en Europe (European Union, 2003). Depuis 2014, cette surveillance se doit d'être harmonisée entre les états membres (European Union, 2013). Depuis le début de l'année 2021, la directive imposant la surveillance harmonisée de 2014 (2013/652/EU) a été remplacée par la directive 2020/1729 (European Union, 2020). Différents instituts et organismes sont donc impliqués en Belgique dans ces programmes de surveillance chez les animaux et dans les denrées alimentaires pour permettre la réalisation de ce travail de grande envergure (Figure 5). En effet, les divers échantillons sont prélevés sur les animaux ou au sol ou dans les denrées alimentaires par des inspecteurs ou contrôleurs de l'AFSCA, elle-même suivant les directives et décisions des institutions européennes (EFSA, EURL-AR (EU *Reference Laboratory for Antimicrobial Resistance*), commission européenne). Les bactéries à surveiller sont ensuite isolées par différents laboratoires agréés par l'AFSCA dont les laboratoires de l'AFSCA à Gembloux et à Melle, le LNR Sciensano, les laboratoires des associations de santé animale DGZ (*Dierengezondheidszorg*) et

Arsia (Association Régionale de Santé et d'Identification Animales) ou d'autres laboratoires externes agréés pour isoler les bactéries qui font l'objet de la surveillance. Le LNR Sciensano réalise ensuite les tests de sensibilité aux antibiotiques. Ces analyses permettent de déterminer les occurrences des résistances pour toute une série d'antibiotiques au sein d'une population bactérienne issue d'origines variées comme des volailles, des bovins, des porcs (production primaire) mais aussi d'aliments destinés à l'alimentation humaine.

Une fois les résultats de surveillance obtenus pour l'année écoulée, le LNR Sciensano communique les données à l'AFSCA sous forme de rapport et à l'EFSA pour le rapportage au

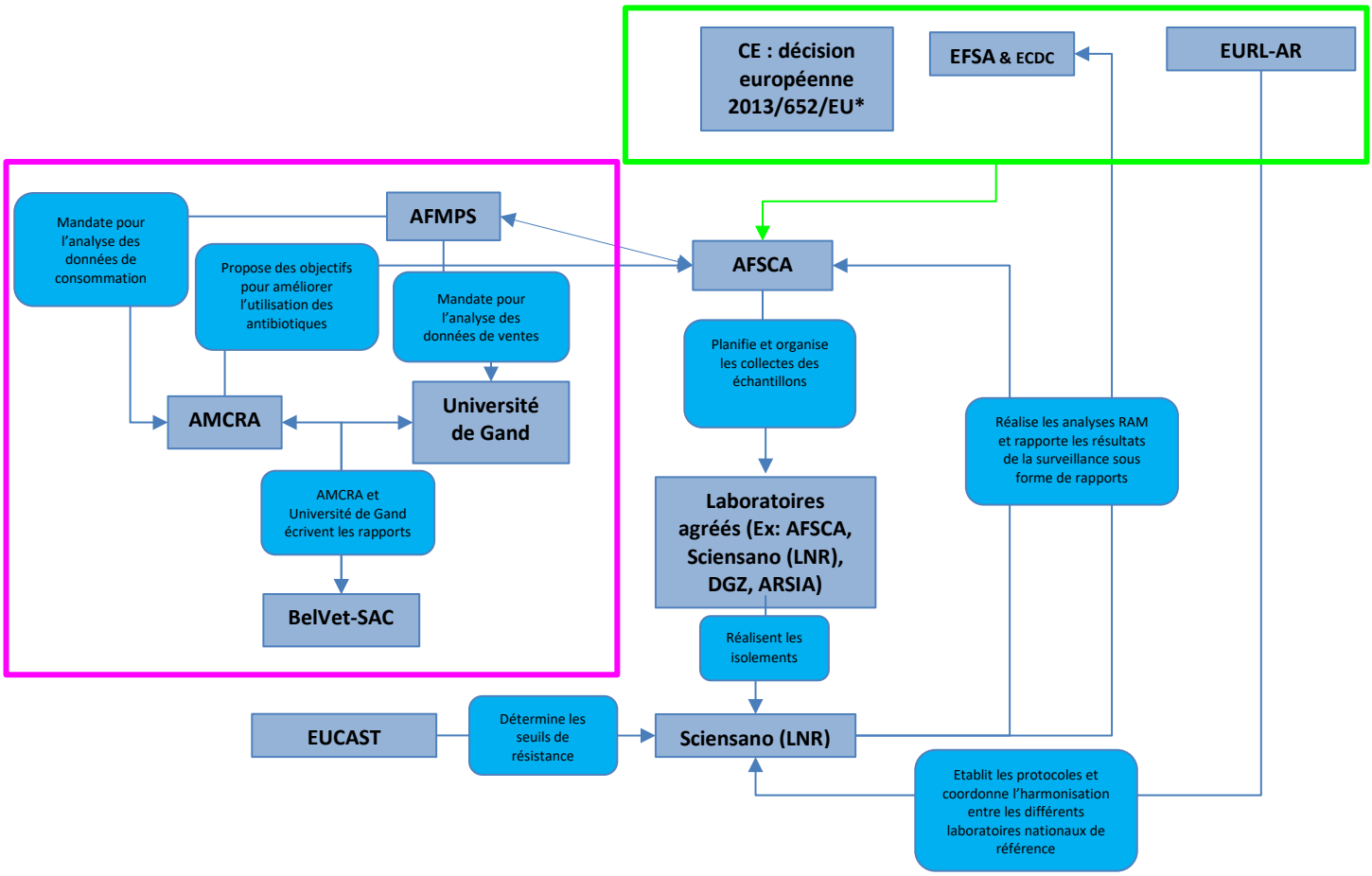


Figure 5: Organigramme expliquant les principaux rôles des intervenants de la surveillance de l'utilisation des antibiotiques et de la résistance aux antibiotiques chez les animaux PDA et dans les denrées alimentaires en Belgique. Abréviation : AMCRA=Antimicrobial Consumption and Resistance in Animals, AFMPS= Agence Fédérale des Médicaments et des Produits de Santé, AFSCA= Agence Fédérale pour la Sécurité de la Chaine Alimentaire, EURL-AR= EU Reference Laboratory for Antimicrobial Resistance, EUCAST = European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, EFSA= European Food Safety Autority, ECDC= European Centre for Disease Prevention and Control, BelVet-SAC = Belgian Veterinary Surveillance of Antimicrobial Consumption, DGZ= Dierengezondheidszorg, ARSIA= Association Régionale de Santé et d'Identification Animales. CE=Commission Européenne. Une nouvelle décision est en vigueur depuis 2021 : la décision 2020/1729. Le cadre vert représente la surveillance de la RAM harmonisée et le cadre violet la surveillance de l'utilisation des antibiotiques.*

niveau européen. Un rapport commun des données communiquées à l'EFSA et à l'ECDC est ensuite établi par l'EFSA et L'ECDC (EFSA and ECDC, 2021).

En parallèle à la surveillance de la résistance aux antibiotiques, une surveillance de l'utilisation et la consommation de ceux-ci est également effectuée. Celle-ci est organisée par l'AFMPS (Agence Fédérale des Médicaments et des Produits de Santé) qui assure aussi la qualité, la sécurité et l'efficacité des antibiotiques. D'autres organismes comme l'université de Gand et l'AMCRA sont respectivement impliqués dans l'analyse des données de vente et de consommation des antibiotiques dans les fermes (Figure 5). L'AMCRA qui est une ASBL soutenue et co-financée entre autres par l'AFSCA et l'AFMPS, a notamment développé une « Vision 2020 », un plan qui vise à diminuer fortement l'utilisation des antibiotiques chez les animaux PDA pour 2020 (en prenant 2011 comme année de référence) (Anonymous, 2021b). Les buts évoqués sont portés et suivis par les Autorités belges, ils consistent à diminuer la consommation globale des antibiotiques de 50% et de 75% en ce qui concerne les antibiotiques dit « critiques », dans le domaine vétérinaire. L'AMCRA a aujourd'hui établi un autre plan, le plan « AMCRA Vision 2024 » afin de diminuer encore l'utilisation d'antibiotiques (Anonymous, 2021c). L'université de Gand et l'AMCRA rédigent ensemble les rapports BelVet-SAC (*Belgian Veterinary Surveillance of Antibiotic Consumption*).

La surveillance lors de ces campagnes (chez les animaux ou dans les denrées alimentaires) se concentre sur des antibiotiques importants dans le domaine de la santé humaine et vétérinaire (OIE, 2021; WHO, 2018). Les données générées par ces différentes surveillances sont d'une grande utilité car elles permettent de déterminer quels sont les antibiotiques qui rencontrent le plus de résistance et quelles sont les adaptations d'utilisation à apporter. En mettant en corélation les données des surveillances de la RAM et de la consommation des antibiotiques, il est possible de déterminer des éventuels paternes entre utilisation et résistance aux antibiotiques. Est-ce qu'un antibiotique qui est moins utilisé se voit dans la surveillance de la RAM avec la résistance associée qui diminue ? Au fil des années, les programmes de surveillance évoluent, sur base des résultats des années précédentes, afin d'adapter entre autres les antibiotiques et résistances associées à surveiller ou la quantité d'échantillons à analyser. Tous

ces différents paramètres sont évalués grâce aux différents rapports émis chaque année, dans le but d'avoir une surveillance de la meilleure qualité possible afin de fournir les informations utiles et nécessaires pour essayer d'optimiser l'usage des antibiotiques et les politiques régulant cet usage. Par exemple, le développement d'un programme européen de surveillance des résistances observées chez des pathogènes isolés chez des animaux (EARS-vet pour « European Antimicrobial Resistance Surveillance network in veterinary medicine » en anglais), avec un panel d'antibiotiques composés de molécules utilisées pour les animaux est actuellement en cours de discussion (Mader et al., 2021).

Les plans d'actions proposés par l'AMCRA donnent de bons résultats car des diminutions d'utilisation d'antibiotiques ont été observées en médecine vétérinaire. En effet, une diminution globale de 40,2% entre 2011 et 2020 a été réalisée, tandis que l'utilisation des antibiotiques critiques a diminué de 70,1 % depuis 2011 (Anonymous, 2021d).

Chez les humains

Au niveau mondial, l'OMS a lancé le programme GLASS (*Global Antimicrobial Resistance and Use Surveillance System*) en 2015. Ce programme a pour but d'intégrer les données des différentes surveillances liées aux antibiotiques : la RAM chez l'homme, l'utilisation des antibiotiques mais également la RAM dans la chaîne alimentaire et dans l'environnement. Au niveau européen, la surveillance de la RAM chez l'humain se fait via deux grands réseaux, le *Food and Waterborne Diseases and Zoonoses Network* (FWD-Net) qui surveille des maladies que les humains contractent via la consommation de nourriture, d'eau ou suite au contact avec des animaux et le *European Antimicrobial Resistance Surveillance Network* (EARS-Net) qui surveille la RAM chez des bactéries isolées en clinique à partir de sang et de fluide cérébrospinal d'humains. Il y a également un réseau chargé de la surveillance de la consommation des antibiotiques chez l'humain, il s'agit du *European Surveillance of Antimicrobial Consumption Network* ou ESAC-net (ECDC, EFSA and EMA, 2021).

En Belgique, plusieurs acteurs sont également impliqués dans la surveillance de la RAM : la BAPCOC (*Belgian Antibiotic Policy Coordination Committee*) qui a pour but d'améliorer la consommation des antibiotiques et de limiter l'augmentation de la RAM, Sciensano qui surveille

la RAM dans les établissement de soins et dans les échantillons cliniques (programme NSIH), l'Institut National d'Assurance Maladie-Invalidité (INAMI) qui collecte les données sur les prescriptions des antibiotiques et des rapports de « retour d'expérience antibiotique » pour les médecins généralistes, l'AFMPS dont les rôles ont déjà été évoqués plus haut, les centres nationaux de référence qui ont entre autre comme mission de rassembler des informations relatives à la santé publique comme la RAM, ainsi que les Communautés et Régions du pays qui mettent en place des activités pour sensibiliser les habitants aux problèmes de la RAM (Anonymous, 2019a).

Techniques utilisées pour la détection de la résistance aux antibiotiques

Analyses phénotypiques

Les analyses se font actuellement majoritairement au niveau phénotypique pour déterminer la sensibilité ou la résistance d'une bactérie à différents antibiotiques. Cette détermination se fait selon des normes établies par l'EUCAST (*European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*). Deux types de seuils sont établis, les seuils épidémiologiques appelés ECOFF (pour *Epidemiological Cut-OFF* en anglais) qui qualifient une bactérie de sauvage, c'est-à-dire qui n'a pas de résistance acquise à un antibiotique ou de non-sauvage (qui possède une résistance acquise à un antibiotique) et les seuils dits cliniques ou « *clinical breakpoint* » en anglais, qui déterminent le succès qu'un traitement thérapeutique devrait avoir. Ces différents seuils sont établis pour toute une série de différentes espèces bactériennes et antibiotiques (Anonymous, 2021e). Les seuils ECOFF et cliniques ne sont pas nécessairement les mêmes, ils diffèrent parfois selon la technique utilisée mais également en fonction des espèces bactériennes étudiées. Il est dès lors important de bien contextualiser l'étude/analyse, de choisir les bons seuils et de définir correctement la résistance (quel seuil est utilisé, quelle technique et quelle bactérie).

Comme évoqué ci-dessus, plusieurs méthodes sont utilisées dans la surveillance pour déterminer si une bactérie résiste à un antibiotique ou non. Les méthodes reprises par l'EUCAST sont les disques de diffusion et la méthode de microdilution.

Les disques de diffusion

La méthode des disques de diffusion consiste à placer une ou plusieurs pastilles contenant une certaine quantité du ou des antibiotiques sur la boîte de Pétri inoculée. Les bactéries vont croître autour de ce disque, à l'exception d'une zone l'entourant. Le diamètre de cette zone déterminera le caractère résistant ou non de la bactérie testée pour le ou les antibiotiques présents dans le disque. Cette mesure est le seuil déterminé de cette méthode pour l'antibiotique testé par rapport à la bactérie étudiée (Anonymous, 2021e).

La microdilution

La technique de microdilution se fait en milieu liquide. Les milieux de culture dans lesquels les antibiotiques sont dilués à des concentrations données sont inoculés avec la bactérie d'intérêt. Pour un antibiotique, il y a plusieurs concentrations différentes pour former une gamme de concentrations. Ces gammes de concentrations sont déterminées pour chaque antibiotique et en fonction des espèces bactériennes étudiées. Après incubation, la première concentration à partir de laquelle la bactérie ne pousse plus (en partant de la plus faible concentration de la gamme), est appelée la concentration minimale inhibitrice ou CMI. Au-delà d'une certaine CMI, les bactéries sont considérées comme résistantes.

Avantages et inconvénients des analyses phénotypiques

Les analyses phénotypiques permettent de déterminer si une bactérie est résistante dans un laps de temps relativement court, dépendant de l'espèce bactérienne étudiée. Une large gamme d'antibiotiques peut être testée simultanément, surtout grâce à l'existence de techniques semi-automatisées, ce qui représente un gain de temps. Cependant, les facteurs responsables du phénotype ne sont pas identifiés et il est dès lors impossible de déterminer la ou les causes de la ou des résistances. Si un nombre suffisamment grand d'échantillons est analysé, on peut donc estimer l'occurrence d'une résistance mais pas déterminer sa capacité à se propager.

En Belgique, la détermination des résistances pour la surveillance de la RAM chez les animaux PDA et dans la nourriture destinée à l'alimentation humaine se fait via la technique de micro dilution décrite ci-dessus et plus présicément par Sensititre (technique semi-automatisée). La

surveillance chez l'humain utilise principalement des disques de diffusion et des techniques de déterminations de CMI.

Analyses génotypiques

Actuellement, de plus en plus d'analyses se font également au niveau génotypique afin de déterminer quels mécanismes sont impliqués dans la résistance, quelles sont leurs fréquences dans les souches bactériennes et s'ils sont transférables entre les différentes bactéries ou non. Encore une fois, plusieurs techniques existent afin de déterminer le génotype.

La détection de la présence de gènes

Plusieurs méthodes ont été ou sont mises au point par différents laboratoires, certaines sont faites maison, d'autres sont commerciales et enfin d'autres sont validées par des études et mises à disposition via des articles scientifiques. Parmi les techniques faites maison, on peut citer notamment les PCRs multiplexées qui permettent la détection simultanée de plusieurs gènes en une seule expérience. On peut également citer le séquençage Sanger qui permet non seulement l'identification des gènes mais également de déterminer leurs séquences nucléotidiques et donc les mutations présentes au sein de celles-ci. Les techniques commerciales sont diverses et permettent également de mettre en évidence la présence de gènes, comme des PCRs ou des micro-arrays. Cela se présente sous la forme de kits regroupant tous les éléments nécessaires à l'analyse et les tests se réalisent en suivant un protocole établi par le fabricant. Les détails de la méthode de ces techniques et la composition des produits utilisés sont secrets afin que les produits continuent à se vendre. Enfin, certains laboratoires développent et valident des techniques diverses, dont des micro-arrays, permettant de mettre en évidence les gènes ainsi que les mutations responsables de résistance aux antibiotiques. Ces techniques sont ensuite publiées dans des articles scientifiques afin d'en faire profiter d'autres laboratoires. Une telle technique a été développée durant ce doctorat, l'AMR-ARRAY, et est présentée dans le chapitre 1 de ce travail.

Le séquençage de génome complet

Le séquençage de génome complet (*Whole Genome Sequencing* en anglais, WGS) permet d'avoir à disposition toute l'information concernant les gènes et mutations que la bactérie étudiée porte (si tant est que les déterminants soient connus et repris dans les bases de données). De fait, cette technique permet d'avoir une vue d'ensemble sur le génome. A l'heure actuelle, le séquençage de génome est une technique de plus en plus utilisée et d'une grande puissance mais qui reste cependant assez coûteuse. L'Europe a d'ailleurs émis une nouvelle décision en 2020 qui permet au pays le désirant d'effectuer des étapes des surveillances de la RAM via des analyses de séquençage de génome complet pour une partie des analyses (spécifiées dans la décision européenne) (European Union, 2020). Cela n'est cependant pas rendu obligatoire car tous les pays membres de l'UE ne sont pas encore en mesure de pouvoir effectuer ces analyses de manière routinière (European Union, 2020).

Avantages et inconvénients

L'ensemble des techniques génotypiques permet donc d'identifier les facteurs potentiellement responsables des résistances. Ces techniques apportent donc des précisions que les études phénotypiques n'apportent pas. Cependant, l'information nécessaire pour savoir si un gène est actif ou non n'est pas facilement disponible et demande des analyses plus poussées pour l'obtenir (en laboratoire ou bioinformatiques). Les PCRs multiplexées et le WGS sont des techniques qui demandent du temps (1 ou 2 jours pour les PCRs multiplexées en fonction du nombre de PCRs et d'échantillons et plusieurs jours pour le WGS) et le WGS est une méthode encore coûteuse, surtout si beaucoup d'échantillons doivent être analysés. Les PCRs seules ne permettent pas de déterminer la présence de mutation, il est alors nécessaire de coupler cette technique avec un séquençage Sanger, ce qui augmente le coût et le temps nécessaire à l'obtention des résultats. Concernant les méthodes commerciales, les kits vendus par les firmes les développant sont relativement coûteux et tous les laboratoires n'ont pas les moyens de pouvoir les utiliser, surtout si beaucoup d'échantillons doivent être analysés. De plus, ces kits ne ciblent pas tous des mutations conférant des résistances. Les autres techniques développées par les laboratoires visent souvent à être compétitives en terme de temps et d'argent comparé aux PCR et au WGS et sont destinées à cibler un set particulier de gènes et/ou de mutations

(multiplexing) responsables d'une ou plusieurs résistances particulières (Ceyssens et al., 2016). Ces techniques multiplexées permettent d'augmenter la gamme de facteurs ciblés au-delà de ce que permettent les PCR multiplexées tout en ayant un coût avantageux par rapport au WGS ou aux kits commerciaux.

Les bactéries utilisées pour la surveillance et dans le cadre de cette thèse

La surveillance de la résistance aux antibiotiques inclut notamment des bactéries comme *E. coli* et les entérocoques (*E. faecium* et *E. faecalis*), de même que des bactéries pathogènes comme les salmonelles et les shigelles (surveillées que chez les humains) et des pathogènes opportunistes comme les MRSA. Ces différentes bactéries ont été utilisées dans le cadre de ce travail; cette partie se limitera donc à celles-ci.

Les genres *Escherichia, Shigella* et *Salmonella* appartiennent à la famille des *Enterobacteriaceae* et sont caractérisées comme étant des bactéries à Gram-négatif (Figure 6). Les genres *Staphylococcus* et *Enterococcus* appartiennent quant à eux aux familles des *Staphylococcaceae* et *Enterococcaceae* respectivement et sont caractérisées comme étant des bactéries à Gram-positif (Figure 6). Contrairement à la classification en règne, embranchement, classe etc, la classification en Gram-négative ou -positive n'est pas une classification taxonomique. La caractérisation Gram dépend en réalité d'une coloration qui diffère selon la composition de la paroi cellulaire des bactéries. Cette caractéristique est une donnée importante car certains antibiotiques vont agir sur les bactéries Gram-négatives et d'autres sur les Gram-positives.

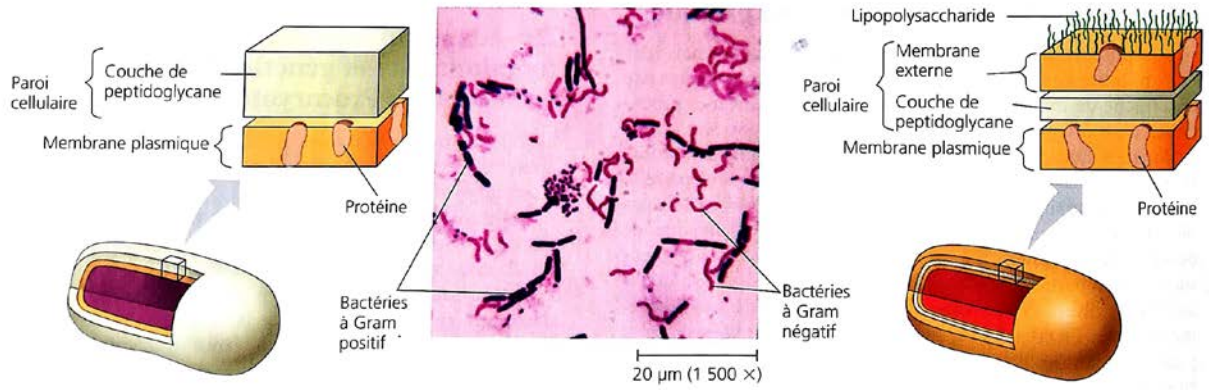


Figure 6: illustration de la composition externe des bactéries à Gram-négatif (à droite) et positif (à gauche) ainsi que de la coloration Gram. Image tirée du livre Biologie 7è édition de Neil Campbell et Jane Reece.

Escherichia coli

Le genre *Escherichia* appartient à la famille des *Enterobacteriaceae* et à l'ordre des *Enterobacteriales*. *E. coli* est une bactérie communément rencontrée dans le microbiote intestinal chez l'homme mais aussi chez de nombreux animaux (Chaudhuri and Henderson, 2012). C'est une bactérie commensale mais qui peut également être pathogène et provoquer des infections intra- et extra-intestinales (Chaudhuri and Henderson, 2012). De par son caractère commensal et parce qu'elle est constamment présente dans son hôte, cette bactérie est qualifiée de bactérie indicatrice, elle reflète l'exposition aux antibiotiques et peut servir de réservoir aux gènes de résistance, elle est donc utilisée pour la surveillance de la résistance aux antibiotiques. De plus, elle peut également servir de signalement en cas d'émergence de nouvelle résistance (Sciensano, 2019). Elle est capable d'échanger très facilement du matériel génétique par transfert horizontal (Braz et al., 2020) et est donc un candidat qui permet d'avoir une représentation de l'importance de la résistance aux antibiotiques au sein de la population bactérienne à Gram-négatif. Au contraire, des bactéries pathogènes disparaissent généralement après l'infection et ne peuvent donc pas être utilisées comme des bactéries indicatrices dans le cadre d'une surveillance continue. La surveillance de la RAM chez *E. coli* est conduite depuis 2011 chez les animaux PDA (volaille, bovin et porcin) à partir de matière fécale et depuis 2013 dans les denrées alimentaires (Anonymous, 2021f).

Shigella spp.

Les shigelles appartiennent au genre *Shigella*, à la famille des *Enterobacteriaceae* et à l'ordre des *Enterobacteriales*. Sur le plan taxonomique, les Shigella sont très proches d'*E. coli* et appartiennent au même groupe génomique. Il s'agit d'un pathogène strict communément rencontré dans les pays en voie de développement et qui est responsable de la shigellose, une infection intestinale, qui s'attrape suite à l'ingestion de nourriture contaminée, en cas de mauvaise hygiène ou par contact direct entre individus (Aslam and Okafor, 2021). La shigellose est considérée comme une menace pour la santé publique et la surveillance des shigelles est donc importante. Les rapports de surveillance des shigelles isolées de patients en Belgique sont publiés par le Centre National de Référence de *Salmonella* et *Shigella* (Sciensano) et sont disponibles depuis 2011 (Anonymous, 2021g).

Salmonella spp.

Le genre *Salmonella* appartient à la famille des *Enterobacteriaceae* et à l'ordre des *Enterobacteriales*. On la retrouve notamment dans le tractus intestinal des vertébrés à sang chaud (Pucciarelli and García-Del Portillo, 2017). La salmonelle est une bactérie qui est responsable de maladies chez l'homme (salmonellose) et peut se retrouver dans des aliments contaminés comme des œufs crus ou du poulet pas suffisamment cuit par exemple (Besser, 2018). La surveillance des salmonelles est donc d'un intérêt de santé publique afin de détecter les aliments potentiellement contaminés (et les animaux porteurs) mais également pour détecter les déterminants de résistance qui circulent dans cette population. La surveillance des salmonelles est faite depuis 2011 chez les animaux PDA (volaille, bovin et porcin) et depuis 2013 dans les denrées alimentaires (Anonymous, 2021f).

Staphylococcus aureus

Le genre *Staphylococcus* appartient à la famille des *Staphylococcaceae* et à l'ordre des *Bacillales*. Les *staphylocoques* se retrouvent dans l'environnement et aussi sur les épithéliums humains et animaux, considérés alors comme commensaux mais peuvent également être pathogènes (ce sont des pathogènes dits opportunistes) (Coates et al., 2014). Parmi les espèces de staphylocoques, *S. aureus* est une des principales causes d'infections tant chez l'homme que chez l'animal. Plusieurs études réalisées entre 2008 et 2013 en Belgique ont montré une présence non négligeable des MRSA dans les exploitations animales et en particulier chez les porcs (Denis et al., 2009; Crombé et al., 2012; Vandendriessche et al., 2013). Une initiative a donc été prise par la Belgique pour surveiller ces MRSA également chez les poules pondeuses et poulets de chair et les bovins en 2011 et 2012 respectivement (Anonymous, 2021f). Depuis lors, une surveillance en alternance entre les porcins, les volailles et les bovins est effectuée chaque année sur des cycles de 3 ans (une année volailles, une année bovins et une année porcins) (Anonymous, 2021f).

Enterococci

Le genre *Enterococcus* appartient à la famille des *Enterococcaceae* et à l'ordre des *Lactobacillales*. Les entérocoques sont des bactéries commensales que l'on retrouve dans le tractus digestif notamment. Ce sont également des pathogènes opportunistes qui peuvent causer des infections

qui sont souvent liées à des infections nosocomiales (Ben Braïek and Smaoui, 2019). Les deux espèces les plus fréquemment rencontrées dans le cas d'infection chez les humains sont *E. faecalis* et *E. faecium*. Comme *E. coli*, étant des bactéries commensales, les entérocoques sont des bons candidats pour être des indicateurs de ce qui circule en termes d'antibiorésistance chez les bactéries à Gram-positif. La résistance aux antibiotiques chez les entérocoques est surveillée chez les volailles, bovins et porcins depuis 2011. Cette surveillance a été interrompue entre 2014 et 2018 inclus.

L'antibiorésistance : un plan d'action national belge pour continuer la lutte contre la RAM

Il est reconnu aujourd'hui que la résistance aux antibiotiques est un problème de santé humaine au niveau mondial; l'OMS a déclaré que la RAM était l'une des plus grandes « menaces pour la santé publique » à l'heure actuelle et dans un avenir proche (Anonymous, 2019a). La FAO, l'OMS et l'OIE exhortent les états membres de l'UE à adopter des mesures contre la RAM et ce dans une optique *One Health* étant donné que l'environnement, l'humain et les animaux sont intimement liés (Anonymous, 2019a). La Belgique et plus particulièrement le Service Public Fédéral (SPF) Santé publique, Sécurité de la Chaîne alimentaire et Environnement (SPSCAE), élabore actuellement un plan d'action en collaboration avec Sciensano, l'AFMPS, l'AFSCA, l'AMCRA, INAMI et la BAPCOC. Ce plan d'action, qui est national, s'inscrit dans une approche « *One World One Health* ». Ce plan devait se dérouler sur une période de 5 ans, de 2020 à 2024, cependant, la situation liée au COVID-19 a vraisemblablement modifié le calendrier. Une consultation publique est actuellement en cours afin de récolter les avis concernant le projet (Anonymous, 2019a). Le plan d'action national sera validé en septembre 2021 par les ministres et sera financé pour la période 2022-2025. Ce genre de plan de lutte contre la RAM doit devenir une des priorités des Autorités des différents pays. En effet, l'utilisation abusive des antibiotiques dans les différents domaines a mené à l'apparition mais surtout à la sélection et la propagation des résistances. De plus, des études ont démontré que certains plasmides conjugatifs (plasmides pouvant être échangés entre bactéries de manière autonome) portant des gènes de résistance aux antibiotiques peuvent rester de manière stable dans de multiples espèces, sur des longues

périodes même en l'absence de pression de sélection par ces mêmes antibiotiques (Bush, 2018). En 2016, un rapport sur l'antibiorésistance estimait le nombre de décès liés à la résistance aux antibiotiques à 700 000/an dans le monde. Ce même rapport précisait que cette estimation était très certainement sous-estimée et que le nombre de morts liés à la RAM augmenterait drastiquement ($10^{\wedge 7}$ morts/an dans le monde) d'ici à 2050 si aucune action n'était entreprise, sans parler des conséquences économiques (Jim O'Niel, 2016). En Belgique, le nombre de décès lié à la RAM est estimé à 530/an et pourrait atteindre 22.500 d'ici à 2050 et coûter plusieurs centaines de millions d'euros (Anonymous, 2021h). C'est pour contrer ces estimations que les plans de lutte contre la RAM doivent être mis sur pied, comme le plan d'action national belge « *One Health* » qui est actuellement sur les rails (Anonymous, 2021h). Et heureusement, différentes études ont souligné que la diminution de l'utilisation d'antibiotiques pouvait mener à une diminution de l'occurrence de la résistance à ceux-ci (van den Bogaard et al., 2000; Roberts and Schwarz, 2016; Tang et al., 2019; Y. Wang et al., 2020; Hamel et al., 2021).

Objectifs

Le but de cette thèse est d'apporter des outils supplémentaires et des connaissances, principalement génotypiques, pour compléter les données phénotypiques de la/des surveillances de la RAM dans une optique *One Health*.

Parmi ces outils, le premier objectif de cette thèse consistera à développer une méthode multiplexée, l'AMR-ARRAY, pour détecter les déterminants de résistance aux principaux antibiotiques importants/critiques pour la médecine humaine contre les bactéries Gram-négatives, les plus fréquemment rencontrés chez les animaux PDA et d'apporter ainsi un volet génétique à la surveillance de la RAM. Cet AMR-ARRAY aura pour but de cibler principalement des gènes transférables, d'obtenir des résultats en un court laps de temps et pour un prix attractif. Cet outil permettra d'apporter des explications génétiques aux observations des phénotypes de résistance. De plus, l'AMR-ARRAY aura pour vocation d'être disponible en libre accès et d'être adaptable facilement en fonction des demandes et des nécessités.

Le deuxième objectif sera d'étudier génétiquement, de manière rétrospective, la résistance à la colistine chez des bactéries *E. coli*, isolées d'animaux PDA entre 2012 et 2016 (inclus). Ce genre d'étude tire son importance du fait que la colistine est un antibiotique d'importance critique pour la médecine humaine et que les gènes *mcr* ont récemment été découverts (le dernier datant de 2020) (Liu et al., 2016; C. Wang et al., 2020). Les déterminants génétiques responsables de la résistance à la colistine seront identifiés par WGS de même que les autres déterminants de résistance portés par les bactéries étudiées, l'environnement génétique et les réplicons associés aux gènes *mcr* trouvés, ainsi que les relations génétiques entre les isolats.

Le troisième objectif sera d'explorer l'occurrence, les mécanismes de résistance et les relations génétiques de bactéries résistantes au linézolide isolées à partir d'animaux PDA et d'échantillons humains dans le cadre du projet LIN-RES cofinancé par l'EJP et Sciensano. Le projet LIN-RES a été mis sur pied suite à la découverte en Belgique de MRSA résistantes au linézolide chez des porcins en 2013 et 2016 alors que l'utilisation de cet antibiotique d'importance critique pour la médecine humaine n'est pas autorisée dans le domaine vétérinaire. Un protocole dédié pour l'isolement et l'étude de bactéries résistantes au linézolide sera développé.

Chapitre 1 : Un micro-array, l'AMR-ARRAY, pour le dépistage génétique rapide de déterminants de résistance aux antibiotiques : développement et valorisation dans une perspective « One Health »

Le but de ce chapitre était de développer une nouvelle méthode pour détecter génétiquement des déterminants de résistance aux antibiotiques, basée sur une technique pré-existante : la LCR ou *Ligase Chain Reaction* et couplée à une détection sur une plateforme Luminex®. Ce micro-array consiste en un ensemble de 53 sondes, 50 qui ciblent des déterminants de résistance à certaines (familles) d'antibiotiques (β-lactames, (fluoro)quinolones, colistine, macrolides et aminoglycosides) chez les entérobacteries (*E. coli*, *Shigella* spp. et *Salmonella* spp.) et 3 qui servent de contrôles internes. Ce travail s'inscrit dans l'optique de mieux caractériser les résistances observées non seulement chez les bactéries isolées d'animaux PDA mais également à partir de la nourriture destinée à l'alimentation humaine et à partir d'échantillons humains, tout ceci dans une optique *One Health*. Un total de 251 isolats isolés d'animaux PDA, 236 de nourriture destinée à l'alimentation humaine et 161 d'échantillons humains ont été analysés avec l'AMR-ARRAY. Les résultats obtenus avec l'AMR-ARRAY ont été comparés aux résultats obtenus par analyses phénotypiques, et/ou génotypiques afin d'évaluer l'exactitude de l'AMR-ARRAY et la corrélation entre phénotype et génotype. Comme expliqué plus haut, la caractérisation génétique de la résistance aux antibiotiques est un atout pour les campagnes de surveillance car elle permet de voir quels déterminants génétiques sont présents dans chaque réservoir étudié et leurs occurrences, s'ils sont potentiellement transmissibles et si plusieurs déterminants sont présents au sein d'une même bactérie. De plus, le WGS étant une technique encore coûteuse, l'AMR-ARRAY offre une alternative en termes de coût mais aussi de temps pour obtenir les résultats. Ceci est d'autant plus important lorsqu'on s'intéresse à une large collection de souches, telle que celle collectée dans le cadre de la surveillance.

Cette étude a été soumise[1].

1. Michaël Timmermans, Samuel Latour, Pieter-Jan Ceyssens, Cristina Garcia-Graells, Carole Kowalewicz, David Fretin, Olivier Denis, Pierre Wattiau, Cécile Boland. The AMR-ARRAY : a modular bead array detecting β-lactam, (fluoro) quinolone, colistin, aminoglycoside and macrolide resistance determinants in Gram-negative bacteria. Etude soumise

The AMR-ARRAY : a modular bead array detecting β-lactam, (fluoro) quinolone, colistin, aminoglycoside and macrolide resistance determinants in Gram-negative bacteria.

Abstract

The aim of this study was to develop a highly multiplexed bead array to detect genes and/or mutations frequently associated with resistance to antimicrobials of the β-lactam, (fluoro)quinolone, colistin, macrolide and aminoglycoside families in Enterobacteriaceae such as *Escherichia coli*, *Shigella* spp. and *Salmonella* spp. Ligase Chain Reaction and the Luminex® technology were combined in a 53-plex assay designed to target selected genetic markers with 3 internal controls. The AMR-ARRAY consistently detected resistance determinants as compared to phenotypically expressed resistance for 94.7% (856/904) of the assessed resistances. When compared to resistance profiles inferred from whole genome sequencing results, the AMR-ARRAY showed a selectivity and specificity of 99.3% and 100%, respectively. The strong features of the AMR-ARRAY are (i) its competitive cost, currently 18€/sample (ii) its wide analytical scope, currently 50 markers covering 5 antimicrobial families, (iii) its robust and user-friendly design consisting in a single-tube assay conducted in 4 successive steps (iv) its relatively short turnaround time, less than 8h (v) its ability to detect allelic variability at critical SNPs (vi) its open access and easily upgradable design, with probes sequences, procedure and software source code freely available. The use of the AMR-ARRAY as a screening tool in official antimicrobial resistance monitoring could improve the granularity of the collected data and pinpoint remarkable isolates harbouring unusual resistance determinants thereby enabling fit-for-purpose selection of isolates for Whole Genome analysis.

Keywords: antimicrobial resistance, AMR, array, multiplexing, luminex, screening tool

Introduction

Antimicrobial resistance (AMR) is a major animal and public health problem. Monitoring AMR is one of the important pillars of national action plans against AMR (Anonymous, 2019a; WHO, 2021).

Currently, these monitorings are still mainly based on phenotypic analysis by standardised methods like disk diffusion or broth micro-dilution (EUCAST, 2020). However, molecular characterisation of resistance is valuable to identify the genetic mechanisms underlying resistance and thereby assess its transferability potential. Genetic testing allows to identify the co- and cross-selection mechanisms of resistance, and there is little doubt that future monitorings will more and more incorporate the genetic dimension (European Union, 2020). Standardisation and harmonisation of the genetic characterisation of AMR is still under implementation and different approaches are still used depending on the countries and on the sector (ECDC, 2016; EFSA and ECDC, 2021). Using homemade PCR to detect AMR resistance determinants is an option but requires to conduct several different assays to detect a large number of genes as well as Sanger sequencing to identify alleles (if needed). This approach is neither time- nor cost-effective. Different commercial kits allowing the detection of resistance genes are available but they are often limited in terms of target range and are expensive (a.o. Check-points, STRECK, GENESIG, vitro ("Check-Points," 2021; "GENESIG - Antibiotic Resistance: blaGES," 2021; "STRECK - Antibiotic Resistance Kits," 2021; "vitro - master diagnostica: AMR direct flow chip," 2021)). The gold standard methodology for identifying resistance determinants is whole genome sequencing (WGS). However, for the screening of large collections of bacteria, as in a monitoring context, fast and cheap alternative methods targeting the most circulating resistance genes can still provide added value.

Here, we describe a home-made liquid bead array based on the Ligase Chain Reaction (LCR) targeting 53 markers and allowing the simultaneous detection of the most frequent genes and/or mutations associated with resistance to the β-lactam, (fluoro)quinolone, colistin, macrolide (focus on azithromycin) and aminoglycoside families of antimicrobials in *Enterobacteriaceae* (*Escherichia coli, Shigella* spp., and *Salmonella* spp.). The performance of the AMR-ARRAY was

evaluated on bacterial collections characterized phenotypically and genetically with reference methods.

Material and methods

Isolates collection

Indicator *E. coli* isolates from food-producing animals (n=251) and from food (n=236) were selected among isolates gathered through the Belgian monitoring programs conducted annually following the EU decisions 2003/99/EC and 2013/652/UE (European Union, 2003, 2013). Animal and food isolates were collected by laboratories approved by the Federal Agency for the Safety of the Food Chain (FASFC) and antimicrobial susceptibility testing's (AST) were performed by the National Reference Laboratory (NRL) AMR, Sciensano. Isolates were collected as described in the different reports available on the FASFC website (FASFC, 2020) during official AMR monitoring. Clinical isolates of *Salmonella* (n=64) and *Shigella* spp. (n=97) were retrieved from the collection of the Belgian National Reference Center of *Salmonella* and *Shigella*. Nine isolates from the External Quality Assurance System organised by the European Union Reference Laboratory for Antimicrobial Resistance (EURL-AR) were also assayed. Isolates (n=648) were selected as to representatively cover AMR diversity observed in Enterobacteriaceae of Belgian origin and were used to assess the analytical scope of the AMR-ARRAY.

Control isolates originated from the EURL-AR, from Sciensano bacterial collection or from other sources as listed in Table S1. The AMR genetic determinants of these control isolates were characterized beforehand by Sanger or whole genome sequencing (Table S1).

Antimicrobial susceptibility testing

Antimicrobial Minimum inhibitory concentrations (MICs) were determined by broth microdilution with EUVSEC and EUVSEC2 plates (Sensititre™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) on food-producing animal and food isolates, interpreted according to the EUCAST

epidemiological cut-offs of the related year (EUCAST, 2021) as explained in ad hoc reports (FASFC, 2020) and used to assign reference R/S phenotypes (Table S2). ESBL and AmpC phenotypes were assigned as recommended by the European Food Safety Authority (EFSA) (EFSA and ECDC, 2017).

DNA extraction

Genomic DNA was extracted using the DNeasy® Blood and Tissue kit according to the manufacturer instructions for Gram-negative bacteria (Qiagen, Hilden, Germany). DNA purity and concentration was assessed with the nanodrop 1000 (Isogen Life Science, Utrecht, The Netherlands).

Alternatively, few colonies were suspended in 400 µl of sterile milli-Q water and vortexed. Bacterial concentration was adjusted to reach an absorbance at 600 nm between 1 and 2 and a final volume of 400 µl was kept. Samples were incubated at 100°C for 15min and centrifuged at room temperature for 5 min at 10,000 g. The supernatant was collected and stored at -20°C.

Padlock shaped Probes (PLPs) design

DNA sequence targets were selected according to the most often encountered resistance genes, alleles and/or mutations to the aforementioned antimicrobial families in Belgium, neighbouring countries and Europe. Probes were designed using sequences available in different publications or on GenBank with Bionumerics 6.6 (bioMérieux SA, Marcy-l'Étoile, France) similarly to previously described (Table 1) (Boland et al., 2018; Wattiau et al., 2011). Left and right arms were trimmed to reach a melting temperature (TM) around 55°C and 60°C, respectively, with a ΔTM around 5°C. The free energy (ΔG) score of intramolecular folding of the resulting sequence was selected to never exceed -10 kcal.mol^{-1} as assessed with the MFOLD algorithm (Zuker, 2003). The resulting sequence was BLASTed to rule out non-specific annealing reactions (Altschul et al., 1990) Sequences of the universal primers "reverse" (cUR) and "forward" (UF, see Table 1) were merged as well as an anti-TAG sequence matching a given TAG sequence of the MagPlex-TAG™ microspheres (Luminex, Austin, Texas). Probes are schematically represented in linear form as follows: **right 5'arm** – **cUR** – **AA** – **UF** – **anti-TAG** – **3'arm** where "AA" is a di-deoxyadenosine linker).

105 *Table 1: Probes and primers used for the LCR assay and identification of the corresponding Luminex® MagPlex-TAG™ microspheres.*

Antibiotic family	Probe/primer name	Sequence[a]	MagPlex-TAG™ microspheres	PLP concentration (pM)	Aim	Source[b]
β-lactams	TEM-ABL104E	**AGTACTCACCAGTCACAGAAAAGCATC**-cUR-AA-UF-TACTTCTTTACTACAATTTACAAC**TACACTATTCTCAGAATGACTTGGTTG**	MTAG-A015	400	Identification of wild type nucleotide at the ABL104 position in *bla*$_{TEM}$ (nucl=G, aa=E)	(Cohen Stuart et al., 2010)
	TEM-ABL104K	**AGTACTCACCAGTCACAGAAAAGCATC**-cUR-AA-UF-ACAAATATCTAACTACTATCACAA**TACACTATTCTCAGAATGACTTGGTTA**	MTAG-A039	200	Identification of the mutated SNP at the ABL104 position in *bla*$_{TEM}$ (nucl=A, aa=K)	(Cohen Stuart et al., 2010)
	TEM-ABL238G	**GTGAGCGTGGATCTCGCGG**-cUR-AA-UF-ATTCAATACTATCTAACACTTACT**TTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCG**	MTAG-A038	400	Identification of wild type nucleotide of the ABL238 position in *bla*$_{TEM}$ (nucl=G, aa=G)	(Cohen Stuart et al., 2010)
	TEM-ABL238S	**GTGAGCGTGGATCTCGCG**-cUR-AA-UF-ACATCAAATTCTTTCAATATCTTC**TTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCA**	MTAG-A055	200	Identification of mutated SNP of the ABL238 position in *bla*$_{TEM}$ (nucl=A, aa=S)	(Cohen Stuart et al., 2010)
	TEM-all	**RGCAACAATTAATAGACTGGATGGAGG**-cUR-AA-UF-TTTATCAAATTCTAATTCTCAA**CGAACTACTTACTCTAGCTTCCC**[d]	MTAG-A073	400	Detection of *bla*$_{TEM}$ family genes	(Huehn and Malorny, 2009)

Antibiotic family	Probe/primer name	Sequence[a]	MagPlex-TAG™ microspheres	PLP concentration (pM)	Aim	Source[b]
	SHV-ABL238S	**GCRAGCGGGGTGCG**-cUR-AA-UF-CTTAACATTTAACTTCTATAACAC**CCGATAAGACCGGAGCTA**[d]	MTAG-A030	400	Identification of the mutated SNP of the ABL238 position in *bla*$_{SHV}$ (nucl=A, aa=S)	(Cohen Stuart et al., 2010)
	SVH-ABL240K	**AGCGGGGTGCGCG**-cUR-AA-UF-TCTCTTTAAACACATTCAACAATA**GATAAGACCGGAGCTRGCA**[d]	MTAG-A047	400	Identification of the mutated SNP of the ABL240 position in *bla*$_{SHV}$ (nucl=A, aa=K)	(Cohen Stuart et al., 2010)
	SHV-all	**GCCGRCAGCACGGA**-cUR-AA-UF-AATCTCTACAATTTCTCTCTAATA**GGCGATAAACCAGCCC**[d]	MTAG-A061	800	Detection of *bla*$_{SHV}$ family genes	Multiple alignment of sequences available in GenBank
	CTX-M1 group	**TYCGGCAAGTTTTTGCTGTACGT**-cUR-AA-UF-TTAACAACTTATACAAACACAAA**CCCGACTGCGGCTCTAA**[d]	MTAG-A053	400	Detection of *bla*$_{CTX-M-1}$ group	Multiple alignment of sequences available in GenBank
	CTX-M2 group	**GCGAAAATCGTAACCCACGGTTTC**-cUR-AA-UF-TTCTTCATTAACTTCTAATCTTACT**TTCTGGCTGCGGCR**[d]	MTAG-A052	200	Detection of *bla*$_{CTX-M2}$ group (*bla*$_{CTX-M74}$ and *bla*$_{CTX-M75}$ will not be detected)	(Park et al., 2006)

Antibiotic family	Probe/primer name	Sequence[a]	MagPlex-TAG™ microspheres	PLP concentration (pM)	Aim	Source[b]
	CTX-M8-25 groups	**ACATCGTGGGTTGTCGGGGATA**-cUR-AA-UF-ACTTATTTCTTCACTACTATATCA**CAGGCWGGGCTACCC**[d]	MTAG-A034	200	Detection of *bla*$_{CTX-M8}$ and *bla*$_{CTX-M25}$ groups	Multiple alignment of sequences available in GenBank
	CTX-M9 group	**GCGGCGAGAATCATCGCC**-cUR-AA-UF-TTAATACAATTCTCTCTTTCTCTAT**RCGATGTGCTGGCTTCA**[d]	MTAG-A054	600	Detection of *bla*$_{CTX-M9}$ group (*bla*$_{CTX-M137}$ will not be detected)	(Briñas et al., 2005)
	OXA-1 like	**CAGAAGCATGGCTCGAAAGTAGCT**-cUR-AA-UF-ACACTTATCTTTCAATTCAATTACTA**GGAGATAAAGAAAGAAACAACGGATTAA**	MTAG-A018	200	Detection of *bla*$_{oxa-1}$ like ESBLs	(Huehn and Malorny, 2009)
	OXA-10 like	**CACCAGTTTCTAGGCCGATAATTGC**-cUR-AA-UF-CAAATACATAATCTTACATTCAC**TGAAAAYCTGATGCTCATTCTTTATGA**[d]	MTAG-A013	200	Detection of *bla*$_{OXA-10}$ like	(Batchelor et al., 2008)
	OXA-2 like	**CACAACTATCGTRCCTTTGGCTTGA**-cUR-AA-UF-CATAATCAATTTCAACTTTCTACTTTAACTCTATA**TTGGCGTTCGTCTGC**[d]	MTAG-A012	200	Detection of *bla*$_{OXA-2}$ like	(Batchelor et al., 2008)

Antibiotic family	Probe/primer name	Sequence[a]	MagPlex-TAG™ microspheres	PLP concentration (pM)	Aim	Source[b]
	ACC-1	**GCAGTGACCGTCAACGGT**-cUR-AA-UF-CATCTTCATATCAATTCTCTTATTTT**TATTCCCGGTATGTCGGTC**	MTAG-A035	200	Detection of *bla*$_{ACC-1}$, *bla*$_{ACC-4}$ and *bla*$_{ACC-5}$, but not *bla*$_{ACC-2}$ and *bla*$_{ACC-3}$	(van Hoek et al., 2005)
	CMY-1 group	**CTGTGGGGGGCCGTG**-cUR-AA-UF-ATCTCAATTACAATAACACACAAATACATA**ATGCAACAACGACAATCCWTC**[d]	MTAG-A067	200	Detection of *bla*$_{CMY-1}$ group	(Pai et al., 1999)
	CMY-2 group	**ACGCGTCCTGCARCCATTAAAACT**-cUR-AA-UF-TTTACAAATCTAATCACACTATACAA**ACGAAGAGGCAATGACCAG**[d]	MTAG-A078	200	Detection of *bla*$_{CMY-2}$ group (*bla*$_{CMY98}$, *bla*$_{CMY-101}$, *bla*$_{CMY-100}$, *bla*$_{CMY-74}$, *bla*$_{CMY-93}$, *bla*$_{CMY-82}$, *bla*$_{CMY-83}$, *bla*$_{CMY-70}$ will not be detected)	(Batchelor et al., 2008)
	AMPC-chr-M18A[c]	**TCGTTACAATCTAACGCATCGCCAA**-cUR-AA-UF-ACACTCATTTAACACTATTTCATT**AGTTGTCACGCTGATTGGTA**	MTAG-A074	400	Identification of the mutated SNP at position -18 in the *E. coli* chromosomal *bla*$_{ampC}$ gene	(Peter-Getzlaff et al., 2011)
	AMPC-chr-M42T[c]	**GATAGCAGCCAGACCGTAGAAAACCC**-cUR-AA-UF-CATAAATCTTCTCATTCTAACAAA**CAATCAGCGTGACAACTGTCAA**	MTAG-A075	200	Identification of the SNP at position -42 in the *E. coli* chromosomal *bla*$_{ampC}$ gene	(Peter-Getzlaff et al., 2011)

Antibiotic family	Probe/primer name	Sequence[a]	MagPlex-TAG™ microspheres	PLP concentration (pM)	Aim	Source[b]
	KPC-all	**CCCGGGTGTAGACGGC**-cUR-AA-UF-TACACAATATTCATCATAACTAAC**CTTGTCATCCTTGTTAGGCG**	MTAG-A045	200	Detection of bla_{KPC} family	(Poirel et al., 2011)
	NDM-all	**TCTGGTTTTCCGCCAGCTCG**-cUR-AA-UF-TTTCTTAATACATTACAACAT**ACCAACGGTTTGGCGA**	MTAG-A025	200	Detection of bla_{NDM} family	(Poirel et al., 2011)
	OXA-48 like	**ACCACGCCCAAATCGAGGG**-cUR-AA-UF-CTATCATTTATCTCTTTCTCAATTAT**CACTTAAAGACTTGGTGTTCATCCTTA**	MTAG-A072	200	Detection of bla_{OXA-48} and its variants and $bla_{OXA-199}$ (bla_{OXA-54} will not be detected)	(Poirel et al., 2011)
	VIM-general	**CATCACGGACAATGAGACCATTGGA**-cUR-AA-UF-AATTTCTTCTCTTTCTTTCACAATTAA**TGTATCAATCAAAAGCAACTCATCRC**[d]	MTAG-A014	200	Detection of bla_{VIM} family (bla_{VIM-7} will not be detected)	Multiple alignment of sequences available in GenBank
(Fluoro)quinolones	GYRA-83-LEU[c]	**GGCGGTYTATGACACGATCGTC**-cUR-AA-UF-AATCAACACACAATAACATTCATA**CATCCCCATGGTGACTT**[d]	MTAG-A048	200	Identification of the mutated SNP in the aa 83 in the *gyrA* gene *(nucl=T, aa=L).*	Multiple alignment of sequences available in GenBank
	GYRA-83-WT[c]	**GGCGGTYTATGACACGATCGTC**-cUR-AA-UF-CAATTTACATTTCACTTTCTTAT**CCATCCCCATGGTGACTC**[d]	MTAG-A051	200	Identification of the WT SNP in the aa 83 in the *gyrA* gene *(nucl=C, aa=S)*	Multiple alignment of sequences available in GenBank

Antibiotic family	Probe/primer name	Sequence[a]	MagPlex-TAG™ microspheres	PLP concentration (pM)	Aim	Source[b]
	PARC-80-ILE[c]	**TATCGCCGTGCGGATGGTATTTAC**-cUR-AA-UF-TTCAATTCAAATCAAACACATCAT**TCGCTTCATAACAGGCGA**	MTAG-A064	200	Identification of the mutated SNP in the aa 80 in the *parC* gene *(nucl=A, aa=I)*	Multiple alignment of sequences available in GenBank
	PARC-80-WT[c]	**TATCGCCGTGCGGATGGTATTTACC**-cUR-AA-UF-TTAAACAATCTACTATTCAATCAC**TCGCTTCATAACAGGCGC**	MTAG-A046	200	Identification of the WT SNP in the aa 80 in the *parC* gene *(nucl=C, aa=S)*	Multiple alignment of sequences available in GenBank
	QNRA-all	**ATGAAACTGCAATCCTCGAAACTGGC**-cUR-AA-UF-ACTTACAATAACTACTAATACTCT**GGCGCCGCTTTCA**	MTAG-A057	200	Detection of plasmid borne genes *qnrA*	Multiple alignment of sequences available in GenBank
	QNRB**	**ATGGCATCTCTCAGCATTGCGC**-cUR-AA-UF-ATACTTTACAAACAAATAACACAC**CTGCCATTGATAAATCACAGCTTTTRAAA**[d]	MTAG-A019	200	Detection of plasmid borne genes *qnrB***	Multiple alignment of sequences available in GenBank
	QNRS all	**CAGGGTGATATCGAAGGTTGCCATTTT**-cUR-AA-UF-TCATCACTTTCTTTACTTTACATT**GACATTTATTAACTGCAAGTTCATTGAA**	MTAG-A044	200	Detection of plasmid borne genes *qnrS*	Multiple alignment of sequences available in GenBank

Antibiotic family	Probe/primer name	Sequence[a]	MagPlex-TAG™ microspheres	PLP concentration (pM)	Aim	Source[b]
Colistin	MCR-1	**GTGGTGGCGTTCAGCAGTCATT**-cUR-AA-UF-TAACTTACACTTAACTATCATCTT**CTTGCGCTGATTTTACTGCCT**	MTAG-A027	200	Detection of *mcr-1* gene	Multiple alignment of sequences available in GenBank
	MCR-2	**ATTGGACTATTTAGCAGTCAGTATGCGAG**-cUR-AA-UF-CTTAAACTCTACTTACTTCTAATT**TGCTGTTGCTTGTGCCG**	MTAG-A056	200	Detection of *mcr-2* gene	Multiple alignment of sequences available in GenBank
	MCR-3	**AGCCATGGCCCAACCTACTACAAG**-cUR-AA-UF-CACTTAATTCATTCTAAATCTATC**GTTGGCTTCCACCTGATAGGT**	MTAG-A028	200	Detection of *mcr-3* gene	Multiple alignment of sequences available in GenBank
	MCR-4	**AGCTCATGCGGCACGGCC**-cUR-AA-UF-ACTACTTATTCTCAAACTCTAATA**GGCTGATTGCGTTTAACGATACT**	MTAG-A033	200	Detection of *mcr-4* gene	Multiple alignment of sequences available in GenBank
	MCR-5	**GTCGGGCTGTAAAGGCGTCTGT**-cUR-AA-UF-TACATTCAACACTCTTAAATCAAA**ATTCTCTGGCGCGATAACCA**	MTAG-A026	200	Detection of *mcr-5* gene	Multiple alignment of sequences available in GenBank

Antibiotic family	Probe/primer name	Sequence[a]	MagPlex-TAG™ microspheres	PLP concentration (pM)	Aim	Source[b]
	MCR-6	**GTCTGATTCAGCGTGCGATGACT**-cUR-AA-UF-ACTTCTTCATTCTCTTATCAAATA**GGATTATCCGACATTGGGTAAGA**	MTAG-B068	200	Detection of *mcr-6* gene	Multiple alignment of sequences available in GenBank
	MCR-7	**CTAGGGGCGCCACTGC**-cUR-AA-UF-CAATAAACATTCTTTACATTCTCA**AGTAAGGTGAGGGCCGA**	MTAG-B058	200	Detection of *mcr-7** gene	Multiple alignment of sequences available in GenBank
	MCR-8	**CTGCGGAAGACAGTGGTGTGT**-cUR-AA-UF-CACATTTCTTACTTTAAACTTA**CATTCCCATCTGTTTTCTCTCTTACAA**	MTAG-B049	200	Detection of *mcr-8** gene	Multiple alignment of sequences available in GenBank
Macrolides	23SrRNA-2059-WT	**AGACCCCGTGAACCTTTACTATAGCTT**-cUR-AA-UF-CTTATCTCTACACTTTACTTAAAT**CGCGGCAAGACGGAA**	MTAG-B059	200	Identification of wild-type nucleotide 2059 of the *23SrRNA* gene (loci rrl a,b,c,d,e,g,h)	Multiple alignment of sequences available in GenBank
	23SrRNA-A2059G	**AGACCCCGTGAACCTTTACTATAGCT**-cUR-AA-UF-AAATAACTCACTATTTCACTTACA**GCGGCAAGACGGAG**	MTAG-B008	200	Identification of mutated nucleotide A2059G of the *23SrRNA* gene (loci rrl a,b,c,d,e,g,h)*	Multiple alignment of sequences available in GenBank

Antibiotic family	Probe/primer name	Sequence[a]	MagPlex-TAG™ microspheres	PLP concentration (pM)	Aim	Source[b]
	ERMB	**TATTCACCGAACACTAGGGTTGCTCT**-cUR-AA-UF-TACACAAACAATCTTTCACAATTT**GATTCTACAAGCGTACCTTGGA**	MTAG-B007	200	Detection of *ermB* gene	Multiple alignment of sequences available in GenBank
	MPHA	**CTTGCAGCCCGACATGGG**-cUR-AA-UF-CACATCTAATACTTTATACAATTC**CCTCCCAACTGTACGCA**	MTAG-B009	200	Detection of *mph(A)* gene	Multiple alignment of sequences available in GenBank
Aminoglycosides	AAC(3)-II	**GCTCGGTCGCCATCGAGAA**-cUR-AA-UF-CTAAATCACATACTTAACAACAAA**GAAACTATAGCAAATGCTTACGTGAA**	MTAG-A063	200	Detection of *aac(3)-IIa,c,d,e,f* genes	Multiple alignment of sequences available in GenBank
	AAC(3)-IV	**GTGTCTCGGCACCCCATAGG**-cUR-AA-UF-TCAAACTCTCAATTCTTACTTAAT**CCATCCTGAAGAATGGTGCA**	MTAG-A021	200	Detection of *aac(3)-Iva* gene	Multiple alignment of sequences available in GenBank
	AAC(3)-VI	**CCTATCCGGGGTGTCGGC**-cUR-AA-UF-ATTAAACAACTCTTAACTACACAA**CGCGATCAACGAATTTATCCGAA**	MTAG-A036	600	Detection of *aac(3)-VIa* gene	Multiple alignment of sequences available in GenBank

Antibiotic family	Probe/primer name	Sequence[a]	MagPlex-TAG™ microspheres	PLP concentration (pM)	Aim	Source[b]
	AAC(6')-Ib all	**CTGGGCAAAGGCTTGGGAAC**-cUR-AA-UF-TACAACATCTCATTAACATATACA**ACTGGCGAATGCATCACAA**	MTAG-A037	200	Detection of *aac(6')-Ib, Ib-cr* group	Multiple alignment of sequences available in GenBank
	ANT(2'')-Ia	**GCTGTTACAACGGACTGGCC**-cUR-AA-UF-TACTACTTCTATAACTCACTTAAA**CAGATGATCGCCTCCCA**	MTAG-A029	200	Detection of *ant(2'')-Ia* gene	Multiple alignment of sequences available in GenBank
	APH(3')-VIa	**GGATGCMTCGGAGGAAACTGC**-cUR-AA-UF-AACTTTCTCTCTCTATTCTTATTT**TTTGTTGAACGTTGCCTAAGAGA**[d]	MTAG-A043	200	Detection of *aph(3')-VIa* gene	Multiple alignment of sequences available in GenBank
	RMTB	**AAATACCGCGCCCTTTGCC**-cUR-AA-UF-TCTCATCTATCATACTAATTCTTT**CTCCATCCTGGCCTCAAAA**	MTAG-A076	200	Detection of *rmtB1,2,3,4* genes	Multiple alignment of sequences available in GenBank
Control PLPs	ENTERO	**ATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACG**-cUR-AA-UF-CAAACAAACATTCAAATATCAATC**CGTCAGCTCGTGTTGTGAA**	MTAG-A022	20	internal positive control for *Enterobacteriaceae* (control of LCR and Luminex reactions, used for normalisation of Luminex results)	Multiple alignment of sequences available in GenBank

Antibiotic family	Probe/primer name	Sequence[a]	MagPlex-TAG™ microspheres	PLP concentration (pM)	Aim	Source[b]
	INVA_1437	**TCAAGCGCGTTCCGCAACACATAG**-cUR-AA-UF-TAAACATACAAATACACATTTCA**GCCAGACAGTGGTAAAGCTCA**	MTAG-A062	200	Internal positive control for *Salmonella* spp.	(Lauri et al., 2011)
	UIDA_563	**CGTGGTGACGCATGTYGC**-cUR-AA-UF-TTTCTCATACTTTCAACTAATTT**CCTGGGTGGACGATATCAC**[d]	MTAG-A020	200	Internal positive control for *Escherichia coli*/*Shigella* spp.	Multiple alignment of sequences available in GenBank
-	Background control bead	**No sequences**	MTAG-A077	-	Background control bead	-
Primers for LCR step 3	Universal Forward primer (UF)	GTAGACTGCGTACCAATTC	N/A	N/A	PLP PCR amplifcation	(Boland et al., 2018)
	Universal Reverse primer (UR)	GACGATGAGTCCTGAGTAA	N/A	N/A	PLP PCR amplifcation	(Wattiau et al., 2011)
	cUR	TTACTCAGGACTCATCGTC	N/A	N/A	N/A	(Wattiau et al., 2011)

106 [a]*Nucleotide sequence of primers and probes (from 5' to 3'). Bold characters highlight the sequence targeted on the template DNA, underlined characters indicate the anti-TAG*

107 *sequence complementary to the Luminex® MagPlex-TAG™microspheres with the bead ID indicated in the fourth column; normal characters indicate nucleotides added to reach a*

108 *final set of probes with evenly distributed sizes ranging from 95 to 120 nucleotides. N/A means Not Applicable.*

109 [b]*« Source » refers either to the selected marker reference or to the nucleotide sequences source.*

110 [c]*PLPs dedicated to E. coli and Shigella* spp.

111 [d]*IUPAC code was used for a nucleotide of these sequences.*

112 ** means that no control was available to test the PLP.*

113 ***QNRB PLP is not able to detect the following alleles: qnrB4, 11, 12, 22, 31, 34, 36, 37, 52, 54, 63, 67, 73.*

114 *Abbreviations: aa= amino acid, ABL=Ambler, nucl=nucleotide, PLP= Padlock shaped Probe, SNP= Single Nucleotide Polymorphism.*

Ligase Chain Reaction assay

The molecular method developed for the detection of AMR determinants is a multiplex assay based on the ligation of PLPs annealed to a matching target followed by a common PCR amplification as described in Boland *et al.* 2018 (Boland et al., 2018) with minor modifications. Primers and probes used in this study are listed in Table 1. The LCR assay was conducted in three successive steps: the first step (ligation) was conducted in a 10 µl mixture containing 1 µl DNA (≥10ng.µl^{-1}) extracted as described above, 2 U of *Pfu* DNA ligase (#600191-51, Agilent, Santa Clara, CA), 1µl of *Pfu* DNA ligase buffer 10X (#600191-52, Agilent, Santa Clare, CA), and a specific final concentration of each PLP detailed in Table 1. Ligation was conducted in a thermal cycler. After 3 min at 95°C, 25 cycles of 30 s at 95°C followed by 5 min at 65°C were performed, followed by a 2-min final denaturation at 98°C. The second step (exonuclease treatment) started with the addition of 15 µl of exonuclease mixture consisting of 67 mM glycine-KOH, pH 9.4, 2.5mM MgCl2, 50 µg.ml^{-1} bovine serum albumin (BSA) (#B0262S, New England BioLabs, Ipswich, Massachusetts, USA) and 0.0015 U λ exonuclease (#M262S, New England BioLabs, Ipswich, Massachusetts, USA). The resulting 25-µl sample was incubated at 37°C for 45 min, followed by inactivation at 95°C for 10 min. The third step, PCR amplification, started with the addition of 50 µl of 2x ABsolute qPCR Mix (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA), 2µl of universal reverse (UR) primer concentrated at 2.5µM and 2µl 5'Cy3-labeled universal forward (UF) primer concentrated at 20µM to each sample. After 10 min at 95°C, 30 cycles of 45 s at 95°C, 45 s at 55°C, and 1 min at 72°C were performed, followed by a 15-min final elongation at 72°C and denaturation at 98°C for 2 min. LCR products (amplicons issuing from the PCR amplification of ligated PLPs) were then stored at -20°C.

Detection of the LCR products on a bead-array platform

LCR products were thawed and hybridised with a mix of 54 microspheres (including one microsphere used as negative hybridisation control) coated with capture probes whose nucleotide sequences are listed in Table 1. Before hybridisation, the bead mix was pelleted on a

magnet and homogenised in a hybridisation buffer (0.4 M NaCl, 0.2 M Tris, 0.16% Triton X-100, pH 8.0) at a concentration of 50 beads of each type per µl. The hybridisation mixture consisted of 25 µl of this bead mix and 37.5 µl of the final LCR product. After denaturation at 96°C for 90 s, hybridisation was conducted at 37°C for 30 min, immediately followed by three washes performed by pelleting the beads on a magnetic bead separation system (V&P Scientific, San Diego, CA) for 1 min, removing the supernatant by forceful inversion, suspending the beads in 75 µl of a second hybridisation buffer (0.2 M NaCl, 0.1 M Tris, 0.08% Triton X-100, pH 8.0) and pipetting up and down. The plate was then incubated at 37°C for 15 min in the Luminex® 200™ instrument and 50 µl of the final solution were analysed at this temperature. Fluorescence signals were measured on at least 100 beads of each bead type and Median Fluorescence Intensities (MFI) were automatically generated.

Data analysis

The fluorescence signal of the *Enterobacteriaceae* positive control probe "ENTERO" was used as an internal reference to normalise the minimum fluorescence intensity (MFI) signals observed for each sample according to the formula (MFI probe/MFI ENTERO) X 100. Results expressed in normalised MFI (nMFI) were evaluated against positive and negative thresholds. These thresholds were determined as to ensure a minimal ratio of 2 between positive and negative nMFI values. Probes were validated with reference strains used as positive and negative controls (Table S1). For single nucleotide polymorphism (SNP) targets, positive controls were derived from strains displaying the exact sequence targeted by the probe at the polymorphic nucleotide position and negative controls were derived from strains displaying another nucleotide at this position. Three control isolates were used in each experiment: one *E. coli NDM-1* as a positive control of the LCR and bead-array steps, one *Staphylococcus aureus* as a negative control of the "ENTERO" probe and *E. coli* ATCC25922 as a negative control of all probes targeting resistance genes. Each probe was verified with corresponding reference strains used as positive controls on each new batch of probe mix (Table S1).

Whole genome sequencing analysis

Next Generation Sequencing (NGS) was performed on a selection of isolates (n=139) from the 251 *E. coli* isolates from food-producing animals. This selection was made to cover a variety of resistance profiles and to resolve some discrepancies observed during the AMR-ARRAY development. NGS was performed with a MiSeq sequencing platform (Illumina, San Diego, CA). The Illumina Nextera XT DNA library preparation kit was used to prepare the sequencing libraries, followed by sequencing with a 250-nt paired-end protocol (MiSeq v3 chemistry) according to the manufacturer's instructions. Raw sequenced reads were trimmed with Trimmomatic v0.38.0 with default settings. SPAdes v3.12.0 was used for read assembly using default settings (Bankevich et al., 2012). AMR genes occurrence was investigated using ResFinder 4.0 for *E. coli* with default settings (Bortolaia et al., 2020). Chromosomal mutations were analysed with PointFinder with default settings (Zankari et al., 2017). All sequencing data were submitted to SRA under BioProject PRJNA746728 and PRJNA670414. The latter is part of a colistin resistance study and the same isolates were used in the current study (Timmermans et al., 2021b). Reads were mapped with BWA-MEM using default settings and visualised with Tablet (version 1-21.02.08)(Milne et al., 2013).

Data comparison

Each susceptibility profile and each resistance-associated genetic sequence determined experimentally on the isolates in scope of the present study were compared to the AMR-ARRAY results. For each resistance in scope, if one or several PLPs tested positive for the associated marker, results were considered concordant.

Results

AMR-ARRAY development

The AMR-ARRAY is composed of a set of 53 PLPs (Table1) all present in a single mix. It is able to detect resistance determinants to the following antibiotic families: β-lactams,

(fluoro)quinolones, colistin, macrolides and aminoglycosides. bla_{TEM} and bla_{SHV} ESBLs are discriminated from non-ESBL *bla* genes by targeting mutations involved in amino acids modification at Ambler positions 104 and 238 for bla_{TEM} and 238 and 240 for bla_{SHV} (Table 1). bla_{CTX-M} genes from groups 1, 2, 9 and 8/25 are differentially identified as well as the bla_{OXA-1}, bla_{OXA-2} and bla_{OXA-10} like genes (Table 1). Specific mutations were targeted in the promotor region of the chromosomic *ampC* gene at position -42 and -18 (Table 1). These mutations are responsible for the overexpression of the AmpC cephalosporinase (Caroff et al., 2000; Peter-Getzlaff et al., 2011; Guérin et al., 2021; Jacoby, 2009; Tracz et al., 2007). Additional probes were designed to identify the AmpC phenotype-causing variants bla_{CMY-1}, bla_{CMY-2} and bla_{ACC} (Table 1). Targeted genes and mutations involved in (fluoro)quinolones or macrolides resistance and genes conferring resistance to carbapenems, colistin and aminoglycosides are listed in Table 1. The AMR-ARRAY probe set is adaptable and probes can be removed or added depending on the purpose of the analysis. The all-inclusive reagent cost per sample is currently 18€ for 94 samples for the full set of 53 PLPs. All steps and turn-around time of the AMR-ARRAY are illustrated in Figure S1.

Comparison of susceptibility profiles vs. AMR-ARRAY results

Two hundred fifty-one food-producing animal *E. coli* isolates expressing antimicrobial resistance phenotypically documented in preliminary studies were analysed with the AMR-ARRAY (Table S2). ESBL and AmpC phenotypes but also resistance to quinolones, colistin, gentamicin and azithromycin were independently compared with AMR-ARRAY results. The aim of this comparison was to assess whether the AMR-ARRAY detected genetic resistance determinants in most of the isolates expressing a resistance profile for the corresponding antibiotics. AmpC phenotype comparison with AMR-ARRAY results showed the weakest concordance of 58.5% (24/41) while concordance with azithromycin resistance was higher (88.2%, 90/102). All other concordances were above 95% with 96.2% (178/185) of concordance for quinolones resistance and 98.2% (111/113) for gentamicin resistance. Finally, the highest scores were observed for colistin resistance (n=41) and for the ESBL phenotype (n=171) with 100% concordance for both (Table S2).

One hundred twenty-four food indicator *E. coli* isolates with antibiotic resistance demonstrated phenotypically (Table S3) were also analysed with the AMR-ARRAY. The isolates were analysed for their ESBL phenotype, quinolones resistance and/or colistin resistance. Resistance to quinolones showed a concordance of 93.3% (111/119) and a concordance of 98.3% (117/119) was observed for the ESBL profile while 100% of concordance was obtained for colistin resistance (5/5).

Finally, 9 isolates resistant to meropenem provided by the European Union Reference Laboratory (EURL) were also analysed with the AMR-ARRAY. For each isolate, the AMR-ARRAY detected a carbapenemase-encoding gene (Table S3).

Considered globally, AMR-ARRAY results were 94.7% concordant (856/904) with susceptibility profiles irrespective of the origin of the isolates.

Comparison of genetic resistance profiles vs. AMR-ARRAY results

One hundred twelve food *E. coli* isolates (Table S4), 64 clinical *Salmonella* isolates (Table S5) and 97 clinical *Shigella* isolates (Table S6) were analysed with the AMR-ARRAY to assess genetic results obtained through PCR and Sanger sequencing (Table S4) or other validated Luminex® xTAG® assays (Table S5 and S6). The AMR-ARRAY detected correctly all genes/SNPs responsible for ESBL or BL phenotypes and all but one SNPs involved in resistance to quinolones (Table S4-S5-S6). For all isolates taken together, 351/352 (99.7%) expected determinants were correctly identified by the AMR-ARRAY (Table S4-S5-S6). The discrepant quinolone resistance result was probably due to a mutation causing an amino acid modification in the *parC* gene at codon position 80 (*Ser* to *Ile*) as described in the "comparison of WGS data vs. AMR-ARRAY results" section. This results in a variant *parC* allele unable to anneal with the AMR-ARRAY probes PARC-80-WT and PARC-80-ILE. As a result, for this discrepant isolate, the two *parC* PLPs tested negatively.

Comparison of WGS data vs. AMR-ARRAY results

A subset (n=139) of the 251 animal *E. coli* isolate collection was sequenced through WGS (identified by prefix "VAR" in Table S2). Selection was made to cover a various panel of susceptibility profiles and included isolates displaying discrepant profiles (experimentally demonstrated resistance not detected with the AMR-ARRAY and vice versa). Resfinder and Pointfinder algorithms (Bortolaia et al., 2020; Zankari et al., 2017) were used to map antimicrobial resistance genes / mutations in WGS sequence data and to infer predictive resistance profiles. When assessed with the AMR-ARRAY, 697/702 determinants (SNPs and genes) expected from WGS analysis were detected by the AMR-ARRAY (Table 2). Failure to detect the expected determinants was limited to 5 quinolone-resistant isolates harbouring a *parC* variant characterised by an identical point mutation in the *parC* gene sequence at codon position 80 (Ser to Ile), resulting in a variant *parC* allele unable to anneal with the AMR-ARRAY probes PARC-80-WT and PARC-80-ILE. The *parC* allelic variant in scope was neither detected by the WT nor by the mutant PLP probe. These AMR-ARRAY results do not allow to draw any conclusion with regards to fluoroquinolone resistance.

Table 2: Genes and mutations observed in 139 isolates detected by WGS and AMR-ARRAY.

Antibiotics	Resistance genes	Detected number by WGS	Detected number by AMR-ARRAY
Beta-lactams	bla_{TEM-1}	80	80
	bla_{TEM-52}	6	6
	$bla_{TEM-199}$	1	1
	$bla_{TEM-135}$	1	1
	bla_{TEM}*	7	7
	bla_{SHV-12}	10	10
	bla_{SHV-2}	1	1

Antibiotics	Resistance genes	Detected number by WGS	Detected number by AMR-ARRAY
	bla$_{CTX-M-1}$	19	19
	bla$_{CTX-M-2}$	6	6
	bla$_{CTX-M-3}$	2	2
	bla$_{CTX-M-14}$	11	11
	bla$_{CTX-M-15}$	12	12
	bla$_{CTX-M-27}$	1	1
	bla$_{CTX-M-32}$	5	5
	bla$_{CTX-M-55}$	4	4
	bla$_{OXA-1}$	8	8
	bla$_{OXA-10}$	2	2
	bla$_{CMY-2}$	3	3
FQs	*qnrB19*	7	7
	qnrS1	18	18
Colistin	*mcr-1*	29	29
	mcr-2	1	1
	mcr-3	1	1
	mcr-4	8	8
	mcr-5	1	1
Aminoglycosides	*aac(3)-II*	34	34
	aac(3)-IV	12	12
	aac(3)-VI	6	6

Antibiotics	Resistance genes	Detected number by WGS	Detected number by AMR-ARRAY
	aac(6')-Ib all	13	13
	ant(2'')-Ia	6	6
Macrolides	*ermB*	8	8
	Mph(A)	37	37
SNPs	*parC*** and *gyrA***	278	273[A]
	ampC n-18	49	49
	ampC n-42	15	15
Total		702	697
Percentage detected		99.3%	

*Abbreviations: FQs=fluoroquinolones *Unidentified allele through WGS. **targeted SNPs, both WT and mutated.*

[A] Discrepancies are caused by an untargeted mutation next to the targeted one (see text for details).

Finally, WGS analysis resolved discrepant results noticed when assessing AMR-ARRAY performance on isolates susceptible to azithromycin. *mph(A)*, known to confer azithromycin resistance (Gomes et al., 2017), was found through both WGS and AMR-ARRAY analysis in such isolates considered susceptible according to current epidemiological cut-off (>16 $mg.L^{-1}$).

Discussion

The AMR-ARRAY is a user-friendly tool with a cost per sample ranging, from 24.50€ for up to 12 samples, 20€ for up 30 samples and 18€ for 94 samples. It has a turnaround time of 8h (Figure S1). The tool is able to detect nucleotide polymorphism at critical positions (SNPs) which is an advantage as compared to classical PCR and to the majority of the available commercial kits. Moreover, the assay consists in 53 detection probes that are pooled in a single tube which is, to

the best of our knowledge, the largest multiplexed assay available for antimicrobial resistance characterisation.

AMR-ARRAY scope and performance

Compared to WGS results, the AMR-ARRAY showed a selectivity and specificity of 99.3% and 100%, respectively. In some rare instances, WGS results showed that mutations next to the targeted SNP were responsible for false negative AMR-ARRAY results (e.g. *parC* PLPs). The undetected *parC* allele was not included in the scope of the array because this was not described at the time the assay was designed. The nucleotide mutation in *parC* causing false-negative results was limited to 5/139 sequenced isolates. It accounted for all instances where no resistance marker was detected by the AMR-ARRAY while resistance to fluoroquinolones was experimentally demonstrated. Expanding the AMR –ARRAY scope to better accommodate *parC* allelic diversity would relieve such false negative results. Incidentally, discordant AMR-ARRAY results and susceptibility profiles should trigger resolution by WGS and possible discovery of new *parC* variants causing fluoroquinolone resistance.

When compared to antibiotic susceptibility profiles, the AMR-ARRAY provided highly concordant results (concordance with 94.7% of the phenotypes (856/904)). The lowest concordance was observed for isolates expressing the AmpC phenotype (58.5%, 24/41) and could be associated with several genetic backgrounds untargeted by the array: expression of the *DHA* gene (although never identified by WGS in this study in spite of 34 AmpC isolates sequenced), expression of efflux pumps or porin inhibition. Finally, the few azithromycin-resistant isolates not associated with known resistance genes (n=12, 11.8%) could carry other untargeted resistance determinants including mutations or overexpression of efflux pumps (Gomes et al., 2017). Among these 12 isolates, 10 were sequenced by WGS and results confirmed the absence of *mph(A)*, *ermB* or mutation in the *23S rRNA* gene targeted by the AMR-ARRAY. Besides, the AMR-ARRAY detected the Mph(A) phospho-transferase gene in azithromycin-susceptible isolates (n=14). Nine of these 14 isolates were sequenced and WGS confirmed the presence of *mph(A)*. Different studies reported that microorganisms carrying only *mph(A)* with no other macrolides resistance gene

may display very different resistance levels (Gomes et al., 2017). In our study, 3/9 azithromycin-susceptible isolates harboured *mph(A)* only. The genetic determinants causing azithromycin resistance in these 10 isolates remains however unidentified. Such observations illustrate the usefulness of the AMR-ARRAY as a screening tool to select atypical and/or unusual profiles that deserve whole-genome sequencing for further investigation.

The ability of this array to target SNPs allows to distinguish a range of ESBL alleles from non-ESBL alleles of some families of β-lactamases like bla_{TEM} and bla_{SHV} and to detect resistance-causing mutations in e.g. bla_{ampC}, *parC* or *gyrA*. This is an advantage of the AMR-ARRAY as compared to the majority of commercial kits and to PCR assays. Another advantage is that different types of DNA extraction methods are compatible with the system, although boiled DNA extracts lead to higher background noise. PLP design, LCR, detection on LUMINEX®200™ and data analysis are easy-to-apply methods making the AMR-ARRAY a user-friendly tool. As it relies on common reagents and devices and as data analysis does not require any specific software, this tool can be easily adapted to different laboratory configurations. Moreover, the availability of highly multiplexed xTAG® Luminex® bead sets allows to detect simultaneously a large range of AMR determinants in a single tube/sample. The AMR-ARRAY can target 53 different markers (internal controls included) in a single mix of probes. This high level of multiplexing is quite unique to our knowledge and could still be extended since a total of 80 xTAG® beads are available for Luminex®bead-array hybridisation platforms (Luminex, Austin, Texas). However, all beads are not compatible with all xMAP instruments ("Luminex - MagPlex-TAG™ Microspheres," 2021). Except for the MCR-6, MCR-7 and MCR-8 PLPs and the macrolides PLPs which are not compatible with the MAGPIX® instrument, all other PLPs described here can be also detected on Lx200 and FLEXMAP 3D instruments.

The AMR-ARRAY: a modular screening tool

One other advantage of the AMR-ARRAY is its modular nature. Indeed, only part of a probe set can be incorporated in the assay (e.g. MCR probes) to answer specific epidemiological questions. The AMR-ARRAY can be used as a screening tool to monitor the presence of critical resistance determinants in bacterial isolates, to detect specific genetic profiles or to select the most

interesting isolates to sequence. Furthermore, as new resistance determinants emerge and genetic variability increases, new PLPs can be designed and incorporated to an existing probe set without having to re-validate the whole assay. In our experience, adding new PLPs to an existing probe set does not generally alter assay performance in terms of sensitivity, specificity or reproducibility. AMR-ARRAY adaptations or updates can hence be engineered rapidly if the epidemiological situation or monitoring scope evolves over time.

In conclusion, the AMR-ARRAY is a tool that can be used (i) to document susceptibility profiles by providing information on the genetic nature of the resistance, (ii) to study multiple resistance determinants (including mutations) at once (multiplexing of 53 different probes in a single mix) in a large collection of isolates and (iii) as a screening tool to detect the most frequent resistance determinants and select which isolates should be sequenced in priority (e.g. isolates for which no AMR determinants are found with the array while resistance is demonstrated). In this regard, the usefulness of the array was demonstrated for 10 azithromycin-resistant and 15 AmpC isolates in which no known resistance marker could be identified neither by array screening nor with ResFinder or PointFinder. The genetic determinants causing azithromycin resistance in the 10 isolates are unknown so far but may be investigated in future work. The tool is freely accessible (probes sequences, procedure, software for results interpretation) and is a cost-effective alternative to WGS for the detection of several antibiotic resistance genes when studying large collections of isolates, e.g. in a nation-wide monitoring context.

Acknowledgments

We thank the FASFC for organising the sampling and isolation of the microorganisms used in this study. We also thank the EURL who provide isolates for controls and analysis. Technical support from A. Radu was highly appreciated. We thank also the service Transversal Activities in Applied Genomics from Sciensano for the paired-end sequencing reactions and for the development and maintenance of the in-house instance of the Galaxy workflow management system. Many thanks to Henrik Hasman from the Statens Serum Institut (SSI), Denmark, the Ruhr Universität Bochum, Germany, Manal AbuOun from the Department of Bacteriology, Animal and Plant Health Agency,

Weybridge, Surrey KT153NB, UK and National Institute for Health Research Health Protection Research Unit, University of Oxford in partnership with PHE, Oxford, UK who provided us with strains to control some of our PLPs.

Chapitre 2 : Etude des gènes de résistance à la colistine dans des souches d'*E. coli* isolées d'animaux PDA (porcs, bovins et volailles) sains entre 2012 et 2016 en Belgique

Cette étude a été initiée suite à la découverte, peu de temps avant le début de cette thèse, du caractère transférable de la résistance à la colistine via la découverte du gène *mcr-1* (Liu et al., 2016). En moins de 5 ans, une dizaine de gènes transférables conférant une résistance à la colistine ont été découverts, révélant ainsi une menace envers un antibiotique d'importance critique pour la médecine humaine.

Durant le développement de l'AMR-ARRAY, des sondes ont donc été mises au point pour détecter les gènes *mcr* connus à ce moment. Afin de tester ces sondes, en plus des contrôles positifs, des *E. coli* résistants à la colistine de la collection de Sciensano ont été analysées. Il s'est alors avéré que l'ensemble des isolats alors analysés portaient un gène *mcr*, dont une souche en particulier qui en portait 3, ce qui n'avait alors encore jamais été observé d'après ce que l'on sait. Il a donc été décidé d'analyser l'ensemble des souches d'*E. coli* cultivables isolées lors des surveillances de 2012 à 2016 et de les analyser avec l'AMR-ARRAY et par WGS. L'article qui suit reprend les données obtenues grâce au WGS uniquement afin de ne pas déflorer l'AMR-ARRAY pour lequel le papier n'était alors pas encore commencé et afin d'étudier l'environnement génétique des gènes *mcr*, les réplicons associés et les lignées génétiques d'*E. coli* portant ces gènes.

Ce travail a été publié dans « International Journal of Antimicrobial Agents » (Timmermans et al., 2021b)[1].

1. Timmermans M, Wattiau P, Denis O, Boland C. Colistin resistance genes mcr-1 to mcr-5, including a case of triple occurrence (mcr-1, -3 and -5), in Escherichia coli isolates from faeces of healthy pigs, cattle and poultry in Belgium, 2012–2016. International Journal of Antimicrobial Agents. 2021, Volume 57, Issue 6, 106350.

International Journal of Antimicrobial Agents 57 (2021) 106350

Contents lists available at ScienceDirect

International Journal of Antimicrobial Agents

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ijantimicag

Colistin resistance genes *mcr-1* to *mcr-5*, including a case of triple occurrence (*mcr-1*, *-3* and -5), in *Escherichia coli* isolates from faeces of healthy pigs, cattle and poultry in Belgium, 2012–2016

Michaël Timmermans[a,b], Pierre Wattiau[a], Olivier Denis[c,d], Cécile Boland[a,*]

[a] Veterinary Bacteriology, Sciensano, Ixelles, Belgium
[b] Faculté de médecine, Université Libre de Bruxelles, Brussels, Belgium
[c] Ecole de Santé Publique, Université Libre de Bruxelles, Brussels, Belgium
[d] Laboratory of Clinical Microbiology, National Reference Center for Monitoring Antimicrobial Resistance in Gram-Negative Bacteria, CHU UCL Namur, Yvoir, Belgium

ARTICLE INFO

Article history:
Received 1 December 2020
Accepted 17 April 2021

Editor: Dr AO Olaitan

Keywords:
mcr
Colistin
Antimicrobial resistance
Multiple occurrence

ABSTRACT

Colistin is a last-resort antimicrobial used to treat infections caused by multidrug-resistant Gram-negative bacilli (MDR-GNB). The emergence of colistin resistance, particularly linked to mobile genetic elements including the *mcr* genes, is a major threat to the management of MDR-GNB infections. The aim of this study was to assess the presence of *mcr* genes in a collection of 40 colistin-resistant commensal *Escherichia coli* isolated from healthy pigs, cattle and poultry in Belgium between 2012 and 2016. All isolates carried at least one *mcr* gene. The genes *mcr-1* to -5 were observed in this collection. Different replicons associated with *mcr* genes were identified, including IncHI2/IncHI2A associated with *mcr-1*, IncX4 associated with *mcr-1* and *mcr-2*, and ColE10 associated with *mcr-4*. While the occurrence of multiple *mcr* genes in a single isolate has rarely been reported elsewhere, a triple occurrence (*mcr-1*, *-3* and -5) was found in this study. All isolates were MDR and carried between one and nine different replicons. Seventeen different sequence types were observed among the 40 *E. coli* isolates. In conclusion, this study revealed the presence of a reservoir of mobile colistin resistance genes (*mcr-1* to -5) observed during at least 5 years (2012–2016) in the commensal gut flora of pigs, cattle and poultry in Belgium.

© 2021 Elsevier Ltd and International Society of Antimicrobial Chemotherapy. All rights reserved.

1. Introduction

Antimicrobial resistance is a major problem in human and animal health. Surveillance and control of antimicrobial use are important priorities for many health authorities worldwide. Currently, few last-resort antimicrobials are available to treat bacterial infections caused by multidrug-resistant micro-organisms [1]. Among them, colistin is a cationic polypeptide belonging to the polymyxin family that displays broad-spectrum activity against Gram-negative bacteria [2]. This antimicrobial agent interacts by binding the lipid A of lipopolysaccharides (LPS) in the outer membrane of Gram-negative bacteria [3].

Discovered in 1947, colistin was first used in the 1950s to treat infections caused by Gram-negative bacteria in humans. However, because of its nephrotoxicity and neurotoxicity, colistin was abandoned during the 1970s. With the emergence of multidrug-resistant bacteria, colistin was re-used as a last-resort antibiotic in the mid-1990s [4]. Until recently, resistance to colistin was thought to be merely caused by point mutations in the chromosome, among others mutations in the *pmrABCE* genes encoding LPS biosynthetic enzymes [5]. However, in 2015, transferability of the plasmid-borne polymyxin resistance gene *mcr-1* was demonstrated for the first time in an *Escherichia coli* isolate in China [6]. Before 2015, colistin was classified by the European Medicines Agency (EMA) as a low-risk antibiotic for resistance gene transfer [7]. Since the discovery of the plasmid-borne *mcr* genes, the EMA has ranked the resistance transferability risk as high [7]. Today, colistin is classified by the World Health Organization (WHO) as a 'highest priority critically important antimicrobial for human medicine'[1] .

In the veterinary field, colistin has been used intensively mainly to prevent or treat intestinal infections in food-producing animal [5]. To maintain the therapeutic efficacy of colistin, in 2016 the Committee for Medicinal Products for Veterinary Use (CVMP) established some recommendations for EU member states to limit the use of colistin at 1.0 mg/kg biomass for countries with moderate consumption (e.g. Belgium) [7]. With this goal in mind, the

* Corresponding author. Tel.: + 32 2 379 04 38.
E-mail address: cecile.boland@sciensano.be (C. Boland).

https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2021.106350
0924-8579/© 2021 Elsevier Ltd and International Society of Antimicrobial Chemotherapy. All rights reserved.

use of colistin (in mg of colistin per kg of biomass) in the Belgian veterinary sector constantly decreased between 2012 and 2018 [8]. Currently in Belgium, the veterinary guidelines established by the Antimicrobial Consumption and Resistance in Animals Organisation (AMCRA) recommend the use of colistin as a second (instead of first) choice antibiotic for the treatment of the following indications: (i) poultry with colibacillosis; (ii) cattle with diarrhoea and septicaemia; and (iii) pigs with diarrhoea (including weaning diarrhoea) and salmonellosis. The occurrence of colistin resistance in commensal *E. coli* isolated from food-producing animals in Belgium remained low (<6.5%) between 2012 and 2016 [9] (Supplementary Fig. S1).

The first mobile colistin resistance gene, *mcr-1*, was discovered in *E. coli* isolates of animal and human origin [6] and encodes a phosphoethanolamine transferase enzyme. Retrospective studies demonstrated that this transferable gene was circulating for more than 30 years as attested to by its finding in *E. coli* isolates dating back to the 1980s [10].

Since the discovery of *mcr-1*, nine other *mcr* genes have been reported in various species of Enterobacteriaceae including *E. coli*, *Salmonella enterica* serovar Typhimurium and *Klebsiella pneumoniae* [11–19] in pigs, bovines and poultry.

Plasmid-borne *mcr* genes are an international problem as they can be horizontally transferred between bacteria and can rapidly spread globally [4]. It is therefore important to assess whether colistin-resistant bacteria carry *mcr* genes and could therefore transfer their colistin resistance. This study investigated the presence of *mcr* genes as well as the associated resistance profiles and plasmid replicons in a Belgian collection of colistin-resistant *E. coli* isolated from 2012–2016 from healthy food-producing animals. The genetic background, i.e. sequence type (ST), of the investigated isolates was also characterised to assess the genetic relatedness of the *mcr*-carrying isolates.

2. Materials and methods

2.1. Strain collection

All culturable *E. coli* isolates resistant to colistin ($n = 40$) [minimum inhibitory concentration (MIC) >2 mg/L according to the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing epidemiological cut-off (EUCAST ECOFF) from 2019] collected from faecal material of healthy food-producing animals [broiler chickens ($n = 1$), fattening pigs ($n = 4$), meat cattle younger than 7 months ($n = 3$) and veal calves ($n = 32$)] between 2012 and 2016 in Belgium during the nationwide antimicrobial resistance surveillance programme of commensal indicator bacteria of the Federal Agency for the Safety of the Food Chain (FASFC) were analysed. Sampling was performed by inspectors from the FASFC [9]. Faecal material was inoculated on MacConkey agar medium without antibiotics until 2014 and on MacConkey agar with or without 1 mg/L cefotaxime in 2015 and 2016 [9]. Resistance to colistin and to other antibiotics was assessed by the broth microdilution method. All isolates were stored at −80 °C for further analysis.

2.2. Antimicrobial susceptibility testing

MICs for 14 antimicrobials (Supplementary Table S1), including colistin (concentration range tested 1–16 mg/L), were determined by the broth microdilution method with EUVSEC plates (Sensititre™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) [9]. After 18–24 h of incubation, plates were read with a Sensititre™ Vizion™ instrument (Thermo Fisher Scientific) using Sensivision software (MCS Diagnostics BV, Swalmen, The Netherlands). MICs were interpreted according to EUCAST ECOFFs (June 2019 release).

2.3. Definitions

Isolates with an MIC strictly higher than the EUCAST ECOFF are referred to as 'resistant' rather than 'microbiologically antimicrobial-resistant' organisms for brevity. Extended-spectrum β-lactamase (ESBL) and AmpC phenotypes were assigned as recommended by the European Food Safety Authority (EFSA) (Supplementary Fig. S2) [20]. Multidrug resistance was defined as non-susceptibility to at least three different antimicrobial classes [21].

2.4. Whole-genome sequencing analysis

Genomic DNA was extracted using a DNeasy® Blood and Tissue Kit (QIAGEN, Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions for Gram-negative bacteria. DNA purity and concentration were assessed with a NanoDrop™ 1000 spectrophotometer (Isogen Life Science, Utrecht, The Netherlands).

Next-generation sequencing was performed with a MiSeq sequencing platform (Illumina Inc., San Diego, CA, USA). An Illumina Nextera XT DNA Library Preparation Kit (Illumina Inc.) was used to prepare the sequencing libraries, followed by sequencing with a 250-bp paired-end protocol (MiSeq v3 chemistry) according to the manufacturer's instructions. Raw sequenced reads were trimmed with Trimmomatic v.0.38.0 with default settings [22]. SPAdes v.3.12.0 was used to proceed to the assembly with default settings [23]. The occurrence of antimicrobial resistance genes was investigated using ResFinder 4.0 for *E. coli* with default settings [24]. Chromosomal mutations were analysed using PointFinder with default settings [25]. The presence of plasmid replicons was determined using PlasmidFinder v.2.1 with default settings [26]. The decision tree from Barbau-Piednoir et al. [27] was used as reference to determine the pathotype of the isolates. Virulence genes were determined using VirulenceFinder 2.0 for *E. coli* with default settings [28]. Multilocus sequence typing (MLST) was performed using the Institut Pasteur *E. coli* MLST database and online tool [29,30] (genomes have been submitted under BioProject no. **PRJNA670414**). The minimum spanning tree was generated using BioNumerics 8.0 (bioMérieux SA, Marcy-l'Étoile, France). MLST profiles were uploaded into BioNumerics, an MLST comparison was performed, and settings were adapted to show STs and branch distances.

2.5. Identification of plasmids

Contigs carrying the *mcr* genes were BLASTed to look for sequences with 100% coverage and >99% identity. For any results matching these criteria, the corresponding GenBank accession numbers were BLASTed against all contigs of the investigated isolates. If the complete sequence of a plasmid was found in the contigs of an isolate, we considered that this plasmid was present in the isolate.

3. Results

3.1. Phenotypic characterisation of the isolates

Colistin resistance of all 40 *E. coli* isolates originating from healthy food-producing animals investigated in this study was re-tested and confirmed upon strain cultivation. Besides, resistance to other antibiotics was also observed in these isolates, as follows: ampicillin (40/40, 100%); tetracycline (39/40, 97.5%); sulfamethoxazole (39/40, 97.5%); trimethoprim (35/40, 87.5%); ciprofloxacin (31/40, 77.5%); nalidixic acid (29/40, 72.5%); chloramphenicol (25/40, 62.5%); gentamicin (19/40, 47.5%); cefotaxime (13/40, 32.5%); ceftazidime (12/40, 30.0%); azithromycin (5/40, 12.5%); and tigecycline (2/40, 5.0%) (Fig. 1). No resistance to

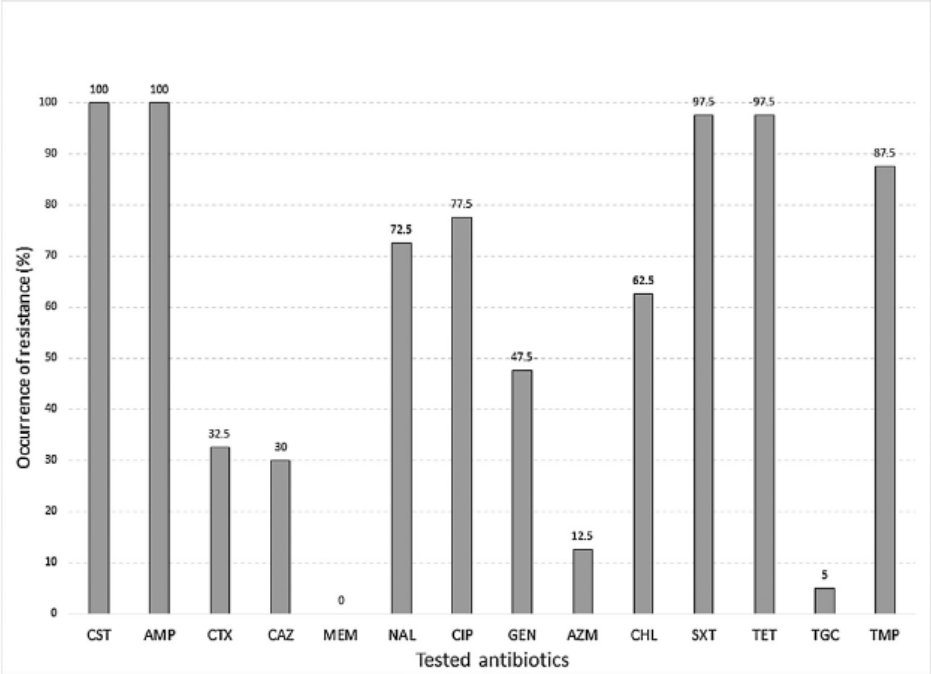


Fig. 1. Occurrence of resistance to the tested antibiotics among the 40 studied colistin-resistant commensal *Escherichia coli* isolates. AMP, ampicillin; AZM, azithromycin; CAZ, ceftazidime; CHL, chloramphenicol; CIP, ciprofloxacin; CST, colistin; CTX, cefotaxime; GEN, gentamicin; MEM, meropenem; NAL, nalidixic acid; SXT, sulfamethoxazole; TET, tetracycline; TGC, tigecycline; TMP, trimethoprim.

meropenem was observed. MICs of all tested antibiotics for the 40 tested isolates are presented in Supplementary Table S1.

Among the 40 colistin-resistant isolates, 9 (22.5%) had an ESBL phenotype and 3 (7.5%) had an ESBL+AmpC phenotype (data not shown). All isolates showed a multidrug-resistant profile, with 33 isolates (82.5%) being resistant to at least six different classes of antibiotics (including colistin) (Supplementary Table S1). Furthermore, among 13 isolates resistant to third-generation cephalosporins, 11 were resistant to fluoroquinolones and to either gentamicin (4 isolates) or azithromycin (1 isolate) or both gentamicin and azithromycin (2 isolates) (Supplementary Table S1).

3.2. Genotypic characterisation of the isolates

All *E. coli* isolates carried at least one *mcr* gene. The *mcr-1* gene was found in 31 isolates (*mcr-1.1* variant only), *mcr-4* was found in 8 isolates (*mcr-4.6* variant only), and *mcr-2* (*mcr-2.1* variant), *mcr-3* (*mcr-3.2* variant) and *mcr-5* (*mcr-5.1* variant) were each observed in one isolate. Among the 31 *mcr-1*-positive isolates, 1 was isolated from a broiler chicken, 3 from fattening pigs and 27 from cattle (24 samples from veal calves and 3 from meat cattle younger than 7 months). BLAST analysis allowed the identification of four different known plasmids carrying *mcr-1* in 5 isolates [KY075652.1 (n = 1), KY075653.1 (n = 2), KY075660.1 (n = 1) and MK574666.1 (n = 1)] (Table 1) and to determine that one *mcr-1* was integrated into the chromosome of another isolate (1511425 1STR1). For the remaining 25 *mcr-1* genes, no known plasmid could be identified. However, all of the *mcr-1* genes showed the same genetic surrounding (Fig. 2a), even the *mcr-1* integrated into the chromosome (Fig. 2b). The *mcr-2* gene was observed in an isolate from a fattening pig. This gene was carried on the same IncX4 plasmid discovered previously in Belgium (GenBank LT598652.1) [11]. The *mcr-4* gene occurred in isolates isolated from veal calves (n = 8). Overall, this latter gene was observed in 22.9% (8/35) of the colistin-resistant *E. coli* isolates collected from cattle. According to BLAST results, all *mcr-4* genes in this study were found on the same ColE10 plasmid discovered by Carattoli et al. in 2017 (GenBank MF543359.1) [13]. No mutations known to confer colistin resistance were found in the *pmr* genes.

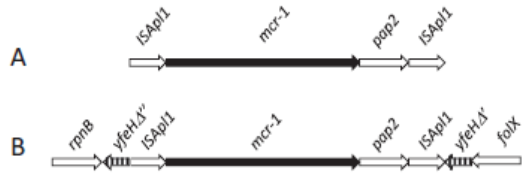


Fig. 2. Genetic map of the *mcr-1* genes. Antimicrobial resistance genes are represented by black arrows and other genes by white arrows. (A) Genetic context of all *mcr-1* genes of this study. (B) Genetic map showing the *mcr-1* gene inserted into the chromosome. The *yfeH* gene is drawn with black vertically hatched arrows, indicating that it is cut in two parts; the Δ′ and Δ′′ represent the 5′ and 3′ element of the gene, respectively.

Although samples were collected from healthy animals, virulence genes were investigated to determine the pathogenic group of isolates, if any. No pathogenic isolates were found except one (1203686 1STR1) belonging to the enteropathogenic *E. coli* (EPEC) group.

PlasmidFinder analysis identified 36 different replicons among the 40 *E. coli* isolates [Col(BS512), Col(MG828), Col(pHAD28), Col(Ye4449), Col156, Col440II, ColE10, IncFIA, IncFIA(HI1), IncFIB, IncFIB(AP001918), IncFIB(H89-PhagePlasmid), IncFIB(K), IncFIC(FII), IncFII, IncFII(29), IncFII(pAMA1167-NDM-5), IncFII(pCoo), IncFII(pHN7A8), IncFII(pRSB107), IncFII(Yp), IncHI1A, IncHI1B(R27), IncHI2, IncHI2A, IncI1-I(Gamma), IncI2, IncN, IncN3, IncQ1, IncR,

Table 1
mcr profile, sequence type (ST), plasmid replicons and antimicrobial resistance genes (ARGs) of the 40 colistin-resistant *Escherichia coli* isolates

Year	Strain no.	*mcr* profile	Animal origin	ST [a]	Identified *mcr*-carrying plasmid [b]	Plasmid replicons [c]	Other ARGs/mutations [d]
2012	1203686 1STR1	*mcr-1.1*	Broiler chicken	367	ND	IncFII(29), IncI1-I(Gamma), IncI2, IncX4, p0111	*aadA1, aadA2b, aph(3′)-Ia, bla*$_{TEM-1B}$, *cmlA1, lnu(F), mdf(A), sul3, tet(A), gyrA* p.S83L
2012	1211226	*mcr-1.1*	Veal calf	2[A]	ND	IncFIB(AP001918), IncFII, IncHI2, IncHI2A	*aadA1, aph(3′′)-Ib, aph(6)-Id, bla*$_{TEM-1B}$, *dfrA1, mdf(A), mph(B), sul1, sul3, tet(M)*
2012	1217177	*mcr-1.1*	Veal calf	471	ND	Col440II, IncFIA, IncFIB(AP001918), IncFII, IncQ1, IncX1, p0111	*aac(3)-IIa, aadA1, aadA2b, aph(3′)-Ia, aph(3′′)-Ib, aph(6)-Id, bla*$_{TEM-1A}$, *cmlA1, dfrA1, mdf(A), sul1, sul2, sul3, tet(B), gyrA* p.S83L, *gyrA* p.D87N, *parC* p.S80I, *parE* p.S458A
2012	1217795	*mcr-4.6*	Veal calf	960	**MF543359.1**	ColE10, IncX5, p0111	*bla*$_{TEM-1A}$, *mdf(A)*
2012	1220582	*mcr-1.1*	Veal calf	716	ND	IncFIA, IncFIB(AP001918), IncFII(pRSB107), IncQ1, IncX1, IncX4	*aadA1, aph(3′)-Ia, aph(3′′)-Ib, aph(6)-Id, bla*$_{TEM-1B}$, *catA1, dfrA1, mdf(A), sul2, tet(B), gyrA* p.S83L, *gyrA* p.D87N, *parC* p.E84K
2012	1223744	*mcr-4.6*	Veal calf	88	MF543359.1	ColE10, Col(Ye4449), IncFII, IncHI2, IncHI2A, IncI1-I(Gamma), IncQ1, IncX1	*aac(3)-IV, aadA1, aadA2b, aadA5, aph(3′)-Ia, aph(3′′)-Ib, aph(4)-Ia, aph(6)-Id, bla*$_{TEM-1B}$, *catA1, cmlA1, dfrA17, floR, mdf(A), sul1, sul2, sul3, tet(A), tet(C), tet(M), gyrA* p.S83L, *gyrA* p.D87N, *parC* p.S80I
2013	1303300 STR1	*mcr-1.1*	Meat cattle aged <7 months	471	ND	Col440II, IncFIA(HI1), IncFII, IncHI1A, IncHI1B(R27), IncQ1, IncX1, IncX4, p0111	*aadA1, aph(3′)-Ia, aph(3′′)-Ib, aph(6)-Id, bla*$_{TEM-1B}$, *catA1, dfrA1, lnu(G), mdf(A), sul1, sul2, sul3, tet(B), tet(M), gyrA* p.S83L, *gyrA* p.D87N, *parC* p.S80I, *parE* p.S458A
2013	1311456 STR1	*mcr-1.1*	Meat cattle aged <7 months	310[A]	ND	IncFIA, IncFIB(AP001918), IncFII(pAMA1167-NDM-5), IncHI2, IncHI2A, IncQ1, IncX4	*aadA1, aph(3′)-Ia, aph(3′′)-Ib, aph(6)-Id, bla*$_{OXA-1}$, *bla*$_{TEM-1B}$, *catA1, dfrA1, mdf(A), sul1, sul2, sul3,* ***tet(A)****, tet(B), gyrA* p.S83L, *gyrA* p.D87N, *parC* p.S80I
2013	1301649 STR1	*mcr-4.6*	Veal calf	132[A]	**MF543359.1**	ColE10, Col(Ye4449), IncFIA, IncFIB, IncFII, IncN, IncX5	*aadA1, aph(3′′)-Ib, aph(6)-Id, bla*$_{TEM-1B}$, *dfrA1, mdf(A), mph(B), sul1, tet(A), tet(M)*
2013	1302187 STR1	*mcr-1.1*	Veal calf	471	**KY075652.1**	Col440II, IncFIB(AP001918), IncN, IncQ1, IncX1, IncX4	*aadA1, aph(3′)-Ia, aph(3′′)-Ib, aph(6)-Id, bla*$_{TEM-1B}$, *dfrA1, floR, lnu(G), mdf(A), mph(B), sul1, sul2, tet(A), tet(M), gyrA* p.S83L, *gyrA* p.D87N, *parC* p.S80I, *parE* p.S458A
2013	1307926 STR1	*mcr-1.1*	Veal calf	471	ND	IncFIA, IncFIB(AP001918), IncFII, IncQ1, IncX1, p0111	*aac(3)-IIa, aadA1, aadA2b, aph(3′)-Ia, aph(3′′)-Ib, aph(6)-Id, bla*$_{TEM-1A}$, *cmlA1, dfrA1, mdf(A), sul2, sul3, tet(B), gyrA* p.S83L, *gyrA* p.D87N, *parC* p.S80I, *parE* p.S458A
2013	1309946 STR1	*mcr-1.1*	Veal calf	87	ND	IncX1	*aac(3)-IIa, aadA1, aph(3′)-Ia, aph(3′′)-Ib, aph(6)-Id, bla*$_{TEM-1A}$, *catA1, dfrA1, mdf(A), mph(B), sul1, tet(A), tet(M), gyrA* p.S83L, *gyrA* p.D87N, *parC* p.S80I
2013	1309964 STR1	*mcr-4.6*	Veal calf	960	**MF543359.1**	Col440II, ColE10, IncFIA(HI1), IncFIB(AP001918), IncFIB(K), IncFII, IncI1-I(Gamma)	*aadA1, aph(3′)-Ia, bla*$_{TEM-1A}$, *dfrA1, mdf(A), sul1, sul3, tet(A), tet(M), gyrA* p.S83L
2013	1309979 STR1	*mcr-1.1*	Veal calf	960	ND	Col(MG828), IncHI2, IncHI2A, IncQ1, IncX5	*aac(3)-IV, aadA1, aph(3′)-Ia, aph(3′′)-Ib, aph(4)-Ia, aph(6)-Id, bla*$_{TEM-1B}$, *catB3, dfrA1, dfrB1, floR, mdf(A), sul1, sul2, tet(A)*
2013	1311787 STR1	*mcr-1.1*	Veal calf	471	**KY075653.1**	Col440II, IncFIB(AP001918), IncQ1, IncX4	*aadA1, aph(3′)-Ia, aph(3′′)-Ib, aph(6)-Id, bla*$_{TEM-1A}$, *dfrA1, lnu(G), mdf(A), mph(B), sul1, sul2, tet(A), tet(M), gyrA* p.S83L, *gyrA* p.D87N, *parC* p.S80I, *parE* p.S458A

(continued on next page)

Table 1 (*continued*)

Year	Strain no.	*mcr* profile	Animal origin	ST [a]	Identified *mcr*-carrying plasmid [b]	Plasmid replicons [c]	Other ARGs/mutations [d]
2013	1314414 STR1	*mcr-1.1*	Veal calf	471	ND	IncFIB(AP001918), IncFII, IncHI2, IncHI2A, p0111	*aac(3)-IIa, aadA1, aadA2b, aph(3'')-Ib, aph(6)-Id, bla*$_{TEM-1A}$, *cmlA1, dfrA1, dfrA12, mdf(A), mph(B), sul1, sul3, tet(B), tet(M), gyrA* p.S83L, *gyrA* p.D87N, *parC* p.S80I, *parE* p.S458A
2013	1316991 STR1	*mcr-4.6*	Veal calf	960	**MF543359.1**	Col440II, ColE10, IncFIB(AP001918), IncI1-I(Gamma), IncR	*aadA1, aph(3')-Ia, bla*$_{TEM-1A}$, *dfrA1, mdf(A), sul1, sul3, tet(A), tet(M), gyrA* p.S83L
2014	1402931 1STR1	*mcr-4.6*	Veal calf	132[A]	**MF543359.1**	Col440II, ColE10, IncFIA, IncFIB(AP001918), IncX1	*aadA1, aph(3'')-Ib, aph(6)-Id, bla*$_{TEM-1B}$, *dfrA1, mdf(A), mph(B), sul1, tet(M)*
2014	1403964 1STR1	*mcr-1.1*	Veal calf	471	ND	IncFIA, IncFIB(AP001918), IncFII, IncHI2, IncHI2A, IncQ1, IncX1, p0111	*aac(3)-IIa, aadA1, aph(3')-Ia, aph(3'')-Ib, aph(6)-Id, bla*$_{TEM-1A}$, *dfrA1, mdf(A), sul1, sul2, tet(B), gyrA* p.S83L, *gyrA* p.D87N, *parC* p.S80I, *parE* p.S458A
2014	1405327 1STR1	*mcr-1.1*	Veal calf	471	ND	IncFIA, IncFIB(AP001918), IncN3, IncQ1, IncX1, p0111	*aac(3)-IIa, aadA1, aadA2b, aph(3')-Ia, aph(3'')-Ib, aph(6)-Id, bla*$_{TEM-1A}$, *cmlA1, dfrA1, mdf(A), sul1, sul2, sul3, tet(B), gyrA* p.S83L, *gyrA* p.D87N, *parC* p.S80I, *parE* p.S458A
2014	1411979 1STR1	*mcr-4.6*	Veal calf	960	**MF543359.1**	Col(BS512), ColE10, IncFIA(HI1), IncFIB(K), IncFII(Yp), IncHI1A, IncHI1B(R27), p0111	*aadA1, aadA2b, aph(3')-Ia, bla*$_{TEM-1A}$, *catA1, cmlA1, dfrA1, mdf(A), sul1, sul3, tet(B), tet(M)*
2015	1509795 1STR1	*mcr-1.1*	Fattening pig	342[A]	**KY075660.1**	Col440II, Col(BS512), IncN, IncR, IncX1, IncX4	*aadA24, bla*$_{CTX-M-1}$, *lnu(G), mdf(A), mph(A), qnrS1, tet(B)*
2015	1506551 1STR1	*mcr-1.1, -3.2, -5.1*	Veal calf	2	**MK574666.1** (*mcr-1*), **MF461273.1**[e] (*mcr-3*), ND (*mcr-5*)	Col156, IncFIB(AP001918), IncHI2, IncHI2A (*mcr-1*), IncQ1, IncX1, IncY	*aac(3)-IId*, ***aac(3)-IV***, *aadA2, aadA22, aadA5, aph(3')-Ia, aph(3'')-Ib*, ***aph(4)-Ia***, *aph(6)-Id, bla*$_{CTX-M-55}$, *bla*$_{TEM-1B}$, *catA1, catA2, dfrA12, dfrA17, floR, mdf(A), mph(A), mph(B), sul1, sul2, sul3, tet(B), tet(M), gyrA* p.S83L, *gyrA* p.D87N, *parC* p.A56T, *parC* p.S80I
2015	1506932 1STR1	*mcr-1.1*	Veal calf	2[A]	ND	Col440II, IncFIB(AP001918), IncHI2, IncHI2A, IncI1-I(Gamma), IncX5	*aadA1, aph(3')-Ia, aph(3'')-Ib, aph(6)-Id, bla*$_{TEM-1}$, *dfrA1, mdf(A), sul1, sul3*, ***tet(A)***, *gyrA* p.S83L
2015	1506934 1STR1	*mcr-1.1*	Veal calf	471	ND	Col(pHAD28), IncFIA, IncFIB(AP001918), IncFII, IncX1, IncX4, p0111	*aac(3)-II, aadA1, aadA2b, aph(3')-Ia, aph(3'')-Ib, aph(6)-Id, bla*$_{TEM-1A}$, *cmlA1, dfrA1, mdf(A), sul2, sul3, tet(B), gyrA* p.S83L, *gyrA* p.D87N, *parC* p.S80I
2015	1508479 1STR2	*mcr-1.1*	Veal calf	66	ND	IncFIB(AP001918), IncFII, IncHI2, IncHI2A, IncI1-I(Gamma), IncQ1	*aac(3)-IIa, aac(3)-IV, aadA1, aph(3')-Ia, aph(3'')-Ib, aph(4)-Ia, aph(6)-Id, bla*$_{CTX-M-1}$, *bla*$_{TEM-1A}$, *catA1, dfrA1, mdf(A), sul1, sul2, sul3, tet(31), tet(A), gyrA* p.S83L, *gyrA* p.D87N, *parC* p.S80I, *ampC* n.−42C>T
2015	1508900 1STR1	*mcr-1.1*	Veal calf	741	ND	IncFIB(AP001918), IncFIB(K), IncHI2, IncHI2A, IncQ1	*aac(3)-IV, aph(3')-Ia, aph(3'')-Ib, aph(4)-Ia, aph(6)-Id, bla*$_{CTX-M-15}$, *bla*$_{TEM-1A}$, *dfrA14, floR, mdf(A), qnrS1, sul2, tet(A), gyrA* p.S83L, *gyrA* p.D87N, *parC* p.S80I
2015	1508900 2STR1	*mcr-4.6*	Veal calf	88	**MF543359.1**	ColE10, IncFIB(H89-PhagePlasmid), IncFII, IncI1-I(Gamma), IncX1	*aac(3)-IIa, aadA1, aadA2b, aph(3')-Ia, aph(3'')-Ib, aph(6)-Id, bla*$_{SHV-2}$, *bla*$_{TEM-1A}$, *catA1, cmlA1, dfrA1, dfrA7, erm(B), mdf(A), mph(B), qnrB19, qnrB5, qnrB81, sul1, sul3, tet(A), tet(M), gyrA* p.S83L, *gyrA* p.D87N, *parC* p.S80I

(continued on next page)

Table 1 (*continued*)

Year	Strain no.	*mcr* profile	Animal origin	ST [a]	Identified *mcr*-carrying plasmid [b]	Plasmid replicons [c]	Other ARGs/mutations [d]
2015	1511425 1STR1	*mcr-1.1*	Veal calf	58	ND	Col(MG828), IncFIB(AP001918), IncFIC(FII), IncI1-I(Gamma)	*aac(3)-IIa*, *aadA1*, $bla_{CTX-M-55}$, *dfrA14*, *floR*, *mdf(A)*, *sul3*, *tet(A)*, *gyrA* p.S83L, *gyrA* p.D87N, *parC* p.S80I, *parE* p.S458T
2015	1511914 2STR1	*mcr-1.1*	Veal calf	66	ND	IncFIB(AP001918), IncFIC(FII), IncHI2, IncHI2A, IncI1-I(Gamma), IncQ1	*aac(3)-IIa*, *aac(3)-IV*, *aadA1*, *aph(3')-Ia*, *aph(3'')-Ib*, *aph(4)-Ia*, *aph(6)-Id*, $bla_{CTX-M-1}$, bla_{TEM-1A}, *catA1*, *dfrA1*, *mdf(A)*, *sul1*, *sul2*, *sul3*, *tet(31)*, *tet(A)*, *gyrA* p.S83L, *gyrA* p.D87N, *parC* p.S80I, *ampC* n.−42C>T
2016	U1603383 001	*mcr-2.1*	Fattening pig	638[A]	**LT598652.1**	IncI1-I(Gamma), IncX4, p0111	*aadA1*, *aadA2b*, bla_{SHV-12}, bla_{TEM-1B}, *cmlA1*, *dfrA10*, *mdf(A)*, *sul1*, *sul3*, *tet(A)*
2016	U1603544 001	*mcr-1.1*	Fattening pig	86[A]	**KY075653.1**	IncFIB(AP001918), IncFII, IncI1-I(Gamma), IncQ1, IncX1, IncX4	*aph(3'')-Ib*, *aph(6)-Id*, $bla_{TEM-52C}$, *dfrA5*, *mdf(A)*, *sul2*, *tet(A)*
2016	U1605318 001	*mcr-1.1*	Fattening pig	88	ND	IncFIB(AP001918), IncFII(29), IncHI2, IncHI2A, IncQ1	*aac(3)-IIa*, *aadA1*, *aph(3')-Ia*, *aph(3'')-Ib*, *aph(6)-Id*, bla_{TEM-1A}, *dfrA1*, *mdf(A)*, *sul1*, *sul2*, *sul3*, *tet(A)*
2016	U1603296 001	*mcr-1.1*	Meat cattle aged <7 months	2	ND	IncFIA, IncFIB(AP001918), IncFII(pCoo), IncHI2, IncHI2A, IncQ1	*aadA1*, *ant(2'')-Ia*, *aph(3')-Ia*, *aph(3'')-Ib*, *aph(6)-Id*, bla_{TEM-1B}, *dfrA1*, *dfrA36*, *floR*, *mdf(A)*, *sul1*, *sul2*, *sul3*, ***tet(A)***, *tet(B)*, *gyrA* p.S83L, *gyrA* p.D87N, *parC* p.S80I
2016	U1601509 001	*mcr-1.1*	Veal calf	471	ND	IncFII, IncHI1A, IncHI1B(R27), IncI1-I(Gamma), IncN3, IncX1, p0111	*aadA1*, *ant(2'')-Ia*, *aph(3')-Ia*, *aph(3'')-Ib*, *aph(6)-Id*, bla_{TEM-1B}, *catA1*, *dfrA1*, *mdf(A)*, *sul1*, *sul3*, *tet(A)*, *tet(B)*, *gyrA* p.S83L, *gyrA* p.D87N, *parC* p.S80I
2016	U1602624 001	*mcr-1.1*	Veal calf	31	ND	IncFIA, IncFIB(AP001918), IncFII(pCoo), IncHI2, IncHI2A, IncQ1	*aac(3)-IIa*, *aac(3)-IId*, *aadA1*, *aadA2b*, *aph(3')-Ia*, *aph(3'')-Ib*, *aph(6)-Id*, bla_{TEM-1B}, *catA1*, *cmlA1*, *dfrA1*, *dfrA12*, *mdf(A)*, *mph(A)*, *sul1*, *sul2*, *sul3*, *tet(A)*, *gyrA* p.S83L, *gyrA* p.D87N, *parC* p.S80I
2016	U1602935 001	*mcr-1.1*	Veal calf	471	ND	IncFIA, IncFIB(AP001918), IncFII, IncHI2, IncHI2A, IncX1, p0111	*aadA1*, *aadA2b*, *aph(3'')-Ib*, *aph(6)-Id*, bla_{TEM-1A}, *cmlA1*, *dfrA1*, *mdf(A)*, *mph(B)*, *sul1*, *sul3*, *tet(A)*, *tet(B)*, *tet(M)*, *gyrA* p.S83L, *gyrA* p.D87N, *parC* p.S80I, *parE* p.S458A
2016	U1605233 001	*mcr-1.1*	Veal calf	731[A]	ND	IncFII(pHN7A8), IncHI2, IncHI2A, IncI1-I(Gamma), IncQ1	*aph(3')-Ia*, *aph(3'')-Ib*, *aph(6)-Id*, bla_{TEM-1B}, *mdf(A)*, *sul2*, *tet(A)*, *tet(B)*, *gyrA* p.S83L, *gyrA* p.D87N, *parC* p.S80I
2016	U1605255 001	*mcr-1.1*	Veal calf	731[A]	ND	Col(MG828), IncHI2, IncHI2A, IncI1-I(Gamma), IncQ1	*aph(3')-Ia*, *aph(3'')-Ib*, *aph(6)-Id*, $bla_{TEM-52C}$, *mdf(A)*, *sul2*, *tet(A)*, *tet(B)*, *gyrA* p.S83L, *gyrA* p.D87N, *parC* p.S80I
2016	U1607591 001	*mcr-1.1*	Veal calf	2	ND	IncFIB(AP001918), IncFII(pCoo), IncHI2, IncHI2A, IncR	*aadA1*, *aph(3'')-Ib*, *aph(6)-Id*, $bla_{CTX-M-1}$, bla_{TEM-1B}, *cmlA1*, *dfrA1*, *dfrA15*, *mdf(A)*, *mph(A)*, *qnrS1*, *sul1*, *sul3*, *tet(A)*

ND, not determined.
[a] Sequence types (STs) with 'A' at the end indicate the nearest ST.
[b] See Section 2.5, 'Identification of plasmids'.
[c] Underlined replicons are associated with the identified plasmids and/or the contig carrying the *mcr* gene.
[d] ARGs in bold were found on the same contig as the *mcr* gene (for the triple occurrence case, ARGs are on the same contig as the *mcr-5* gene).
[*] Indicates that the GenBank accession number does not refer to a complete plasmid sequence.

IncX1, IncX4, IncX5, IncY and p0111]. The isolates carried between one and nine of these replicons (Table 1).

Apart from *mcr* genes, antimicrobial resistance gene analysis revealed the presence of resistance genes/mutations against aminoglycosides, β-lactams, lincosamides, macrolides, phenicols, quinolones, sulphonamides, tetracyclines and trimethoprim in the genomes of this collection of isolates (Table 1).

MLST analysis showed various sequence types or close variants thereof: ST471 ($n = 11$); ST2 ($n = 5$); ST960 ($n = 5$); ST88 ($n = 3$); ST66 ($n = 2$); ST132 ($n = 2$); ST731 ($n = 2$); and ST31, ST58, ST86,

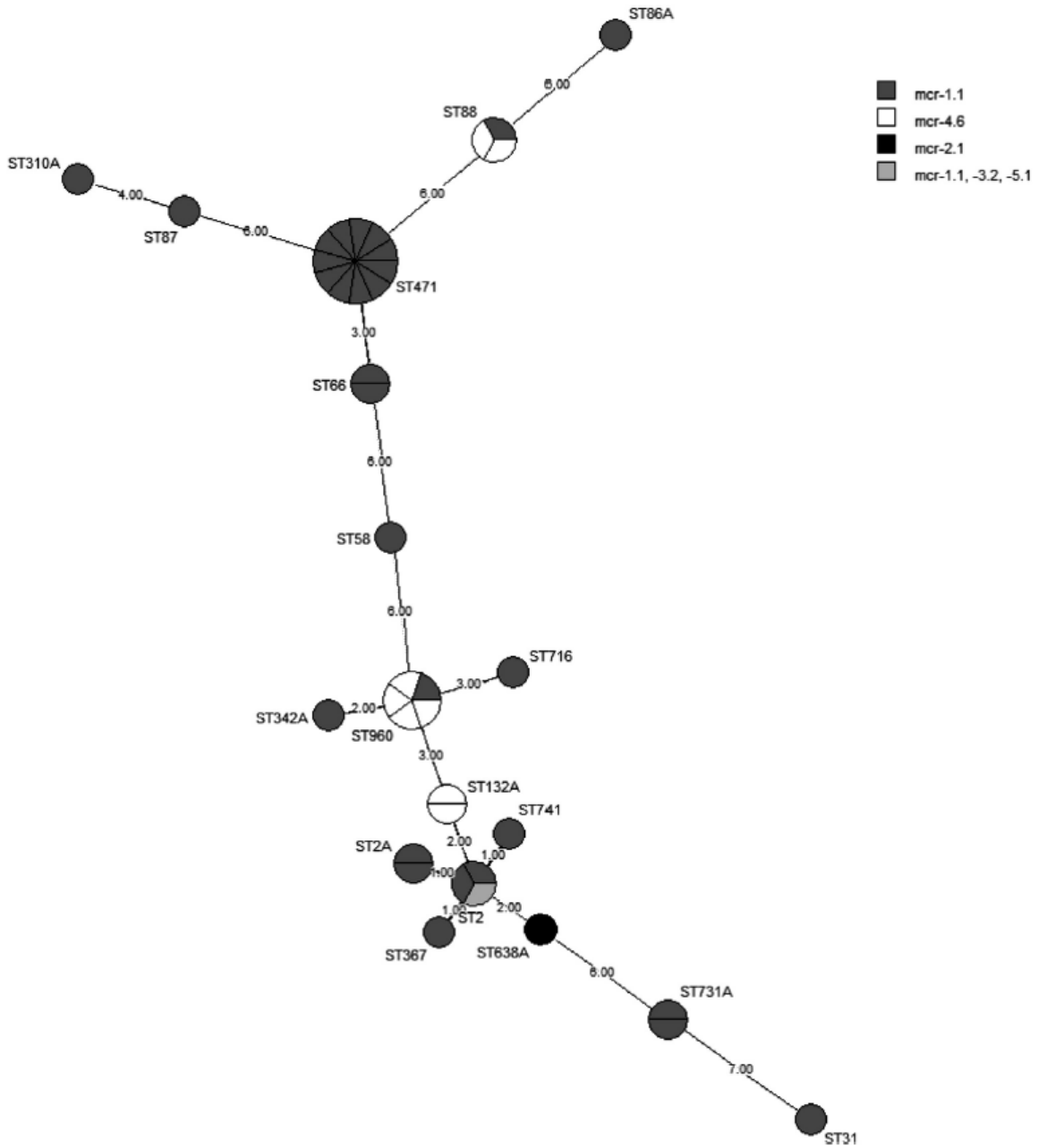


Fig. 3. Minimum spanning tree based on multilocus sequence typing (MLST) results. Branch lengths are indicated by the number of allele differences out of the eight loci. Sequence types (STs) are written close to the nodes. *mcr* profiles are represented by different filling patterns. Sequence types with 'A' at the end indicate the nearest ST.

ST87, ST310, ST342, ST367, ST638, ST716 and ST741 ($n = 1$ isolate each) (Fig. 3; Table 1).

3.3. Identification of a triple occurrence of mcr genes

Interestingly, *mcr-3* and *mcr-5* were observed together with *mcr-1* in one isolate collected from a bovine animal (veal calf) in 2015 (Supplementary Table S1). The isolate was resistant to 12 of the 14 tested antimicrobials (Table 1; Supplementary Table S1), as follows: colistin (*mcr-1.1, mcr-3.2, mcr-5.1*); ampicillin ($bla_{CTX-M-55}$, bla_{TEM-1B}); cefotaxime ($bla_{CTX-M-55}$); ceftazidime ($bla_{CTX-M-55}$); nalidixic acid [*gyrA* (p.D87N), *gyrA* (p.S83L), *parC* (p.A56T)]; ciprofloxacin [*parC* (p.A56T), *gyrA* (p.S83L)]; gentamicin [*aac(3)-IId, aac(3)-IV*]; azithromycin [*mph(A)*]; chloramphenicol (*catA1, catA2, floR*); sulfamethoxazole (*sul1, sul2, sul3*); tetracycline [*tet(B), tet(M)*]; and trimethoprim (*dfrA12, dfrA17*) (susceptible to tigecycline and meropenem). The isolate carried a total of 27 resistance genes (Table 1) and seven different replicons [Col156, IncFIB(AP001918), IncHI2, IncHI2A, IncQ1, IncX1 and IncY] (Table 1).

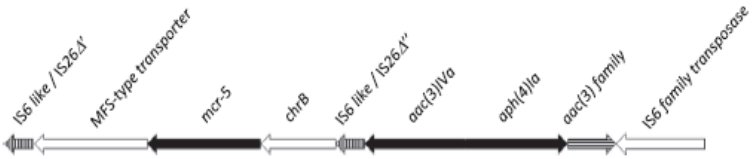


Fig. 4. Genetic map of the *mcr-5* locus (7354 pb). The IS6-like/IS26 element are drawn with black vertically hatched arrows; the Δ′ and Δ″ represent the 5′ and 3′ element of the IS6-like element, respectively. The grey horizontally hatched arrow represents a gene with the missing C-terminus. Antimicrobial resistance genes are represented by black arrows and other genes by white arrows.

The three *mcr* genes in this isolate were identified on three different contigs. BLAST analysis showed that *mcr-1* was carried on an IncHI2/IncHI2A plasmid identified as pDJB-3 (GenBank accession no. **MK574666.1**). The contig carrying *mcr-3* did not hit any known plasmid from the NCBI database but did so for a cluster (together with other contigs from the isolate) containing *mcr-3* (GenBank **MF461273**) with >99% homology. This cluster is part of the unpublished plasmid pZR10 from a Chinese *E. coli*. Finally, the contig carrying *mcr-5* also did not hit any known plasmid. This contig appears to result from a recombination in the IS6-like element disrupted by the fragment containing the MFS-type transporter, *mcr-5* and *chrB* genes (Fig. 4).

4. Discussion

This retrospective study conducted on 40 colistin-resistant commensal *E. coli* isolates of animal origin from 2012–2016 demonstrated the presence of *mcr-1* to -5 in Belgium. In this study, 100% of the isolates carried at least one mobilisable *mcr* gene. Among the *mcr* genes observed, *mcr-1* was the most frequent and was observed in all of the investigated animal species. The same *mcr-1* variant was already reported in Belgium in previous studies [2,31–34]. Our study suggests that this gene was circulating during each year of the 5-year period (2012–2016). The *mcr-2* gene was already reported in Belgium on the same IncX4 plasmid in a previous study on *E. coli* isolates from piglets and calves with diarrhoea [11] and appears to be mostly confined to Belgium [31] and rarely reported elsewhere [35–37]. All occurrences of the *mcr-4* gene were from veal calf isolates and it was the second most frequent *mcr* gene observed in this study. This gene was found 4 years in a row (2012–2015), indicating that it was not associated with a unique event but circulated for several years. To the best of our knowledge, this is the first time that *mcr-4* was detected in bovine isolates and this gene has been rarely reported elsewhere [38]. Noteworthy, all *mcr-4* found in bovine isolates from our study were carried on the same ColE10 pMCR plasmid found in *E. coli* from piglets with post-weaning diarrhoea in Belgium and Spain in 2015 and 2016 [13], indicating that strains carrying this plasmid circulated in different animal hosts (cattle and pigs). To our knowledge, this is also the first time that *mcr-3* and *mcr-5* have been reported in bacteria isolated in Belgium, indicating that each *mcr-1* to -5 were observed at least once in Belgium. Moreover, the isolates were collected from different geographical areas across the country (data not shown) and were characterised by various STs. Most of these STs were distantly linked (Fig. 3) and, among the closer STs (ST2, ST2A, ST132A, ST367, ST741 and ST638A), four different *mcr* profiles were observed, indicating that *mcr* genes were not linked to a single clonal lineage of *E. coli*. Our results showed that the *mcr* genes are present in different lineages of *E. coli*, mostly (39/40) in non-pathogenic isolates, in different plasmids (for *mcr-1*) hosted by isolates carrying various antimicrobial resistance genes. These numerous and various antimicrobial resistance genes highlighted the high potential of colistin resistance to be co-selected by several other antibiotics. Indeed, all of the isolates were multidrug-resistant and 33 were resistant to at least six different classes of antibiotics.

Multiple occurrences of *mcr* genes was detected in one isolate from a veal calf, which harboured three *mcr* genes (*mcr-1*, *-3* and *-5*). Multiple *mcr* gene occurrences have been rarely reported so far [39,40]. Moreover, this isolate was resistant to 12 of the 14 antibiotics tested in this study (susceptible to meropenem and tigecycline), including resistance to several antibiotics ranked critical for human health according to current policies (cephalosporins and quinolones). No transferable quinolone resistance genes were detected in this isolate. However, if such a multidrug-resistant profile occurred in a human pathogenic strain, it would represent a potential healthcare issue as the therapeutic options would be limited. No resistance against carbapenems was observed, although such co-resistance (carbapenem + colistin) was reported in an Italian isolate carrying $bla_{OXA-181}$ and *mcr-1* [41].

In conclusion, the search for *mcr* genes in this collection highlighted that *mcr-1* to -5 were present in *E. coli* strains from Belgian food-producing animals between 2012 and 2016. Considering that all of the investigated Belgian isolates carried the *mcr* gene(s), this study revealed the presence of a reservoir of mobile resistance colistin genes observed during at least 5 years (2012–2016) in the commensal gut flora of pigs, cattle and poultry. Our results show the importance to add screening for *mcr* genes and other antimicrobial resistance genes to antimicrobial resistance monitoring to monitor the presence and potential spread of plasmid-borne colistin resistance genes. Such genetic screening has already been recommended several times [6,11–14,16,18,19]. Surveillance and awareness programmes, together with ad hoc policies restricting antibiotics use, are crucial to prevent the emergence and spread of such antimicrobial resistance genes.

Acknowledgements

The authors thank the FASFC for collecting the isolates used in this study. Technical support from A. Radu, D. Petrone and C. Kowalewicz is highly appreciated. The authors also thank the service Transversal Activities in Applied Genomics from Sciensano for the paired-end sequencing reactions and for the development and maintenance of the in-house instance of the Galaxy workflow management system, as well as Bert Bogaerts and Kevin Vanneste from the Transversal activities in Applied Genomics (TAG) from Sciensano for their help with sequence submission to NCBI.

Funding: The research that yielded these results was funded by the Belgian Federal Public Service of Health, Food Chain Safety and Environment through the contract RF16/6302 AMR-ARRAY.

Competing interests: None declared.

Ethical approval: Not required.

Supplementary materials

Supplementary material associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.ijantimicag.2021.106350.

References

[1] World Health Organization (WHO) Critically important antimicrobials for human medicine. 6th revision 2018. Geneva, Switzerland: WHO; 2018. [accessed 27 April 2021]. https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/312266/9789241515528-eng.pdf?ua=1 .

[2] Poirel L, Jayol A, Nordmann P. Polymyxins: antibacterial activity, susceptibility testing, and resistance mechanisms encoded by plasmids or chromosomes. Clin Microbiol Rev 2017;30:557–96. doi:10.1128/CMR.00064-16.

[3] Velkov T, Thompson PE, Nation RL, Li J. Structure–activity relationships of polymyxin antibiotics. J Med Chem 2010;53:1898–916. doi:10.1021/jm900999h.

[4] Abd El-Gawad El-Sayed Ahmed M, Zhong L-L, Shen C, Yang Y, Doi Y, Tian G-B. Colistin and its role in the era of antibiotic resistance: an extended review (2000–2019). Emerg Microbes Infect 2020;9:868–85. doi:10.1080/22221751.2020.1754133.

[5] Poirel L, Madec J-Y, Lupo A, Schink A-K, Kieffer N, Nordmann P, et al. Antimicrobial resistance in *Escherichia coli*. Microbiol Spectr 2018;6. doi:10.1128/microbiolspec.ARBA-0026-2017.

[6] Liu Y-Y, Wang Y, Walsh TR, Yi L-X, Zhang R, Spencer J, et al. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. Lancet Infect Dis 2016;16:161–8. doi:10.1016/S1473-3099(15)00424-7.

[7] European Medicines Agency (EMA) Updated advice on the use of colistin products in animals within the European Union: development of resistance and possible impact on human and animal health. London, UK: EMA; 2016. https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/updated-advice-use-colistin-products-animals-within-european-union-development-resistance-possible_en-0.pdf .

[8] BelVet-SAC. Belgian Veterinary Surveillance of Antibacterial Consumption national consumption report 2018. https://belvetsac.ugent.be/BelvetSAC_report_2018.pdf [accessed 27 April 2021].

[9] Federal Agency for the Safety of the Food Chain (FASFC). http://www.favv.be/productionanimale/antibioresistance/resultats/#sciensano [accessed 27 April 2021].

[10] Shen Z, Wang Y, Shen Y, Shen J, Wu C. Early emergence of *mcr-1* in *Escherichia coli* from food-producing animals. Lancet Infect Dis 2016;16:293. doi:10.1016/S1473-3099(16)00061-X.

[11] Xavier BB, Lammens C, Ruhal R, Kumar-Singh S, Butaye P, Goossens H, et al. Identification of a novel plasmid-mediated colistin-resistance gene, *mcr-2*, in *Escherichia coli*, Belgium, June 2016. Euro Surveill 2016;21:30280. doi:10.2807/1560-7917.ES.2016.21.27.30280.

[12] Yin W, Li H, Shen Y, Liu Z, Wang S, Shen Z, et al. Novel plasmid-mediated colistin resistance gene *mcr-3* in *Escherichia coli*. mBio 2017;8:e00543 - 17Erratum in: mBio 2017;8:e01166-17. doi: 10.1128/mBio.01166-17. doi:10.1128/mBio.00543-17.

[13] Carattoli A, Villa L, Feudi C, Curcio L, Orsini S, Luppi A, et al. Novel plasmid-mediated colistin resistance *mcr-4* gene in *Salmonella* and *Escherichia coli*, Italy 2013, Spain and Belgium, 2015 to 2016. Euro Surveill 2017;22:30589. doi:10.2807/1560-7917.ES.2017.22.31.30589.

[14] Borowiak M, Fischer J, Hammerl JA, Hendriksen RS, Szabo I, Malorny B. Identification of a novel transposon-associated phosphoethanolamine transferase gene, *mcr-5*, conferring colistin resistance in D-tartrate fermenting *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Paratyphi B. J Antimicrob Chemother 2017;72:3317–24. doi:10.1093/jac/dkx327.

[15] AbuOun M, Stubberfield EJ, Duggett NA, Kirchner M, Dormer L, Nunez-Garcia J, et al. *mcr-1* and *mcr-2* (*mcr-6.1*) variant genes identified in *Moraxella* species isolated from pigs in Great Britain from 2014 to 2015. J Antimicrob Chemother 2017;72:2745–9. doi:10.1093/jac/dkx286.

[16] Yang Y-Q, Li Y-X, Lei C-W, Zhang A-Y, Wang H-N. Novel plasmid-mediated colistin resistance gene *mcr-7.1* in *Klebsiella pneumoniae*. J Antimicrob Chemother 2018;73:1791–5. doi:10.1093/jac/dky111.

[17] Wang X, Wang Y, Zhou Y, Li J, Yin W, Wang S, et al. Emergence of a novel mobile colistin resistance gene, *mcr-8*, in NDM-producing *Klebsiella pneumoniae*. Emerg Microbes Infect 2018;7:122. doi:10.1038/s41426-018-0124-z.

[18] Carroll LM, Gaballa A, Guldimann C, Sullivan G, Henderson LO, Wiedmann M. Identification of novel mobilized colistin resistance gene *mcr-9* in a multidrug-resistant, colistin-susceptible *Salmonella enterica* serotype Typhimurium isolate. mBio 2019;10:e00853 -19. doi:10.1128/mBio.00853-19.

[19] Wang C, Feng Y, Liu L, Wei L, Kang M, Zong Z. Identification of novel mobile colistin resistance gene *mcr-10*. Emerg Microbes Infect 2020;9:508–16. doi:10.1080/22221751.2020.1732231.

[20] European Food Safety Authority; European Centre for Disease Prevention and Control. The European Union summary report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2015. EFSA J 2017;15:e04694. doi:10.2903/j.efsa.2017.4694.

[21] European Food Safety Authority (EFSA); European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC)EU summary report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2013. EFSA J 2015;13:4036. doi:10.2903/j.efsa.2015.4036.

[22] Bolger AM, Lohse M, Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. Bioinformatics 2014;30:2114–20. doi:10.1093/bioinformatics/btu170.

[23] Bankevich A, Nurk S, Antipov D, Gurevich AA, Dvorkin M, Kulikov AS, et al. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. J Comput Biol 2012;19:455–77. doi:10.1089/cmb.2012.0021.

[24] Bortolaia V, Kaas RS, Ruppe E, Roberts MC, Schwarz S, Cattoir V, et al. ResFinder 4.0 for predictions of phenotypes from genotypes. J Antimicrob Chemother 2020;75:3491–500. doi:10.1093/jac/dkaa345.

[25] Zankari E, Allesøe R, Joensen KG, Cavaco LM, Lund O, Aarestrup FM. PointFinder: a novel web tool for WGS-based detection of antimicrobial resistance associated with chromosomal point mutations in bacterial pathogens. J Antimicrob Chemother 2017;72:2764–8. doi:10.1093/jac/dkx217.

[26] Carattoli A, Zankari E, García-Fernández A, Voldby Larsen M, Lund O, Villa L, et al. In silico detection and typing of plasmids using PlasmidFinder and plasmid multilocus sequence typing. Antimicrob Agents Chemother 2014;58:3895–903. doi:10.1128/AAC.02412-14.

[27] Barbau-Piednoir E, Denayer S, Botteldoorn N, Dierick K, De Keersmaecker SCJ, Roosens NH. Detection and discrimination of five *E. coli* pathotypes using a combinatory SYBR® Green qPCR screening system. Appl Microbiol Biotechnol 2018;102:3267–85. doi:10.1007/s00253-018-8820-0.

[28] Joensen KG, Scheutz F, Lund O, Hasman H, Kaas RS, Nielsen EM, et al. Real-time whole-genome sequencing for routine typing, surveillance, and outbreak detection of verotoxigenic *Escherichia coli*. J Clin Microbiol 2014;52:1501–10. doi:10.1128/JCM.03617-13.

[29] Institut Pasteur. *Escherichia coli MLST database*. https://bigsdb.pasteur.fr/cgi-bin/bigsdb/bigsdb.pl?db=pubmlst_ecoli_seqdef [accessed 27 April 2021].

[30] Larsen MV, Cosentino S, Rasmussen S, Friis C, Hasman H, Marvig RL, et al. Multilocus sequence typing of total-genome-sequenced bacteria. J Clin Microbiol 2012;50:1355–61. doi:10.1128/JCM.06094-11.

[31] Garcia-Graells C, De Keersmaecker SCJ, Vanneste K, Pochet B, Vermeersch K, Roosens N, et al. Detection of plasmid-mediated colistin resistance, *mcr-1* and *mcr-2* genes, in *Salmonella* spp. isolated from food at retail in Belgium from 2012 to 2015. Foodborne Pathog Dis 2018;15:114–17. doi:10.1089/fpd.2017.2329.

[32] Huang TD, Bogaerts P, Berhin C, Hoebeke M, Bauraing C, Glupczynski Y, et al. Increasing proportion of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae and emergence of a MCR-1 producer through a multicentric study among hospital-based and private laboratories in Belgium from September to November 2015. Euro Surveill 2017;22:30530. doi:10.2807/1560-7917.ES.2017.22.19.30530.

[33] Xavier BB, Lammens C, Butaye P, Goossens H, Malhotra-Kumar S. Complete sequence of an IncFII plasmid harbouring the colistin resistance gene *mcr-1* isolated from Belgian pig farms. J Antimicrob Chemother 2016;71:2342–4. doi:10.1093/jac/dkw191.

[34] Malhotra-Kumar S, Xavier BB, Das AJ, Lammens C, Butaye P, Goossens H. Colistin resistance gene *mcr-1* harboured on a multidrug resistant plasmid. Lancet Infect Dis 2016;16:283–4. doi:10.1016/S1473-3099(16)00012-8.

[35] Zhang J, Chen L, Wang J, Butaye P, Huang K, Qiu H, et al. Molecular detection of colistin resistance genes (*mcr-1* to *mcr-5*) in human vaginal swabs. BMC Res Notes 2018;11:143. doi:10.1186/s13104-018-3255-3.

[36] Zhang J, Chen L, Wang J, Yassin AK, Butaye P, Kelly P, et al. Molecular detection of colistin resistance genes (*mcr-1*, *mcr-2* and *mcr-3*) in nasal/oropharyngeal and anal/cloacal swabs from pigs and poultry. Sci Rep 2018;8:3705. doi:10.1038/s41598-018-22084-4.

[37] Rhouma M, Thériault W, Rabhi N, Duchaine C, Quessy S, Fravalo P. First identification of *mcr-1*/*mcr-2* genes in the fecal microbiota of Canadian commercial pigs during the growing and finishing period. Vet Med (Auckl) 2019;10:65–7. doi:10.2147/VMRR.S202331.

[38] Zhang H, Hou M, Xu Y, Srinivas S, Huang M, Liu L, et al. Action and mechanism of the colistin resistance enzyme MCR-4. Commun Biol 2019;2:36. doi:10.1038/s42003-018-0278-1.

[39] García V, García-Meniño I, Mora A, Flament-Simon SC, Diaz-Jiménez D, Blanco JE, et al. Co-occurrence of *mcr-1*, *mcr-4* and *mcr-5* genes in multidrug-resistant ST10 enterotoxigenic and Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in Spain (2006–2017). Int J Antimicrob Agents 2018;52:104–8. doi:10.1016/j.ijantimicag.2018.03.022.

[40] Hadjadj L, Baron SA, Olaitan AO, Morand S, Rolain J-M. Co-occurrence of variants of *mcr-3* and *mcr-8* genes in a *Klebsiella pneumoniae* isolate from Laos. Front Microbiol 2019;10:2720. doi:10.3389/fmicb.2019.02720.

[41] Pulss S, Semmler T, Prenger-Berninghoff E, Bauerfeind R, Ewers C. First report of an *Escherichia coli* strain from swine carrying an OXA-181 carbapenemase and the colistin resistance determinant MCR-1. Int J Antimicrob Agents 2017;50:232–6. doi:10.1016/j.ijantimicag.2017.03.014.

Chapitre 3 : étude de la résistance au linézolide : découverte d'une grande diversité de souches résistantes au linézolide chez les animaux PDA suite à une surveillance sélective en Belgique en 2019.

Entre 2011 et 2013, en Belgique, des entérocoques isolées d'animaux PDA sains ont été rapportées comme résistantes au linézolide (CODA-CERVA, 2011, 2012, 2013a), antibiotique classé comme étant d'importance critique pour la médecine humaine par l'OMS (WHO, 2018) et dont l'usage est interdit en Europe chez les animaux PDA. En 2013 et en 2016, des MRSA résistants au linézolide isolés à partir de porcins sains ont également été rapportés (CODA-CERVA, 2013b, 2016). Des analyses par WGS des MRSA isolés en 2016 ont révélé la présence du gène *cfr* conférant une résistance au linézolide et à d'autres classes d'antibiotiques. Suite à ces observations, il a été décidé d'investiguer plus en profondeur l'émergence de la résistance au linézolide. Pour ce faire, une surveillance sélective en présence de linézolide a été réalisée, dans le cadre du projet de recherche LIN-RES de l'EJP, sur les mêmes échantillons que ceux utilisés pour la surveillance RAM officielle des entérocoques et des MRSA en 2019 en utilisant un protocole dédié, développé pour cette étude. Cette surveillance a été réalisée pour estimer l'occurrence de la résistance au linézolide dans différentes matrices animales et pour isoler des bactéries résistantes au linézolide à partir de ces échantillons.

Ce chapitre présente les résultats de cette surveillance sélective ainsi que les résultats des analyses WGS qui ont été réalisées pour déterminer les facteurs de résistance présents dans les isolats, les organisations génétiques entourant les gènes de résistance au linézolide et les relations phylogénétiques entre les isolats de l'étude et ceux présents dans les bases de données de NCBI.

Cette étude a été publiée dans « *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* » (JAC) (Timmermans et al., 2021a).[1]

1. Timmermans, M., Bogaerts, B., Vanneste, K., De Keersmaecker, S.C.J., Roosens, N.H.C., Kowalewicz, C., Simon, G., Argudín, M.A., Deplano, A., Hallin, M., Wattiau, P., Fretin, D., Denis, O., Boland, C., 2021a. Large diversity of linezolid-resistant isolates discovered in food-producing animals through linezolid selective monitoring in Belgium in 2019. J Antimicrob Chemother 77, 49–57. https://doi.org/10.1093/jac/dkab376.

J Antimicrob Chemother
https://doi.org/10.1093/jac/dkab376

Journal of Antimicrobial Chemotherapy

Large diversity of linezolid-resistant isolates discovered in food-producing animals through linezolid selective monitoring in Belgium in 2019

Michaël Timmermans[1,2], Bert Bogaerts[3], Kevin Vanneste[3], Sigrid C. J. De Keersmaecker[3], Nancy H. C. Roosens[3], Carole Kowalewicz[1], Guillaume Simon[1], Maria A. Argudín[4]†, Ariane Deplano[4,5], Marie Hallin[4,5,6], Pierre Wattiau[1], David Fretin[1], Olivier Denis[6,7] and Cécile Boland[1]*

[1]Veterinary Bacteriology, Sciensano, Ixelles, Belgium; [2]Faculté de Médecine, Université Libre de Bruxelles, Brussels, Belgium; [3]Transversal Activities in Applied Genomics, Sciensano, Ixelles, Belgium; [4]National Reference Centre-Staphylococcus aureus, Department of Microbiology, Hôpital Erasme, Université Libre de Bruxelles, Brussels, Belgium; [5]Department of Microbiology, LHUB-ULB, Université Libre de Bruxelles, Brussels, Belgium; [6]Ecole de Santé Publique, Université Libre de Bruxelles, Brussels, Belgium; [7]Laboratory of Clinical Microbiology, National Reference Center for Monitoring Antimicrobial Resistance in Gram-Negative Bacteria, CHU UCL Namur, Yvoir, Belgium

*Corresponding author. E-mail: cecile.boland@sciensano.be
†Present address: Molecular Biology Laboratory, Tour R. Franklin, Cliniques Universitaires Saint Luc UCL, Brussels, Belgium.

Received 20 April 2021; accepted 20 September 2021

Background: Linezolid is a critically important antibiotic used to treat human infections caused by MRSA and VRE. While linezolid is not licensed for food-producing animals, linezolid-resistant (LR) isolates have been reported in European countries, including Belgium.

Objectives: To: (i) assess LR occurrence in staphylococci and enterococci isolated from different Belgian food-producing animals in 2019 through selective monitoring; and (ii) investigate the genomes and relatedness of these isolates.

Methods: Faecal samples ($n = 1325$) and nasal swab samples ($n = 148$) were analysed with a protocol designed to select LR bacteria, including a 44–48 h incubation period. The presence of LR chromosomal mutations, transferable LR genes and their genetic organizations and other resistance genes, as well as LR isolate relatedness (from this study and the NCBI database) were assessed through WGS.

Results: The LR rate differed widely between animal host species, with the highest rates occurring in nasal samples from pigs and sows (25.7% and 20.5%, respectively) and faecal samples from veal calves (16.4%). WGS results showed that LR determinants are present in a large diversity of isolates circulating in the agricultural sector, with some isolates closely related to human isolates, posing a human health risk.

Conclusions: LR dedicated monitoring with WGS analysis could help to better understand the spread of LR. Cross-selection of LR transferable genes through other antibiotic use should be considered in future action plans aimed at combatting antimicrobial resistance and in future objectives for the rational use of antibiotics in a One Health perspective.

Introduction

Linezolid is an antibiotic of the oxazolidinone family used as a critically important antibiotic to treat MRSA and VRE infections in humans.[1] Linezolid resistance (LR) can be caused by point mutations in the 23S rRNA gene (mainly G2576T and G2505A) or through acquisition of *cfr*, *optrA* or *poxtA*, often located on plasmids.[2–5] *cfr* was discovered in 2000 in a *Staphylococcus sciuri* calf isolate[6] and confers cross-resistance to phenicols, lincosamides, linezolid, pleuromutilins and streptogramin A, referred to as a $PhLOPS_A$ phenotype.[3] *cfr* codes for a methyltransferase that modifies position A2503 of the 23S rRNA.[3] *optrA* codes for an ARE ABC-F protein and was first described in China in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* isolates of human and animal

© The Author(s) 2021. Published by Oxford University Press on behalf of the British Society for Antimicrobial Chemotherapy.
This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial License (https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/), which permits non-commercial re-use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited. For commercial re-use, please contact journals.permissions@oup.com

origins.[4,7] *optrA* confers resistance to oxazolidinones and phenicols.[4] *poxtA* codes for an ARE ABC-F protein and was discovered in Italy in 2018 in an MRSA of clinical origin from 2015.[5] It confers reduced susceptibility to oxazolidinones, phenicols and tetracyclines.[5] All three genes give cross-resistance to linezolid and phenicols and have already been found with phenicol resistance genes like *fexA* and *fexB*.[4,8]

Worldwide emergence of LR bacteria like MRSA and VRE has been described in recent studies. In Belgium, the first clinical case associated with *cfr* was reported in 2017,[9] while a study from 2019 reported the presence of *optrA* in clinical isolates collected in 2014.[10] In food-producing animals, LR isolates were reported in various European countries,[11] including Belgium through its antimicrobial resistance (AMR) official monitoring (OM),[12] despite linezolid not being licensed for this sector,[13] highlighting the importance of monitoring LR with a One Health approach.

This study aims to: (i) assess LR occurrence in staphylococci and enterococci isolated from food-producing animals through dedicated selective monitoring conducted for the first time in Belgium; and (ii) investigate the genomes and relatedness of LR isolates.

Materials and methods

Isolate collection and identification

A total of 1325 faecal samples (broilers $n=295$, turkeys $n=86$, laying hens $n=205$, breeding hens $n=163$, veal calves $n=293$ and pigs $n=283$) and 148 nasal swab samples (sows $n=78$ and fattening pigs $n=70$) were collected in 2019 from healthy animals and analysed at the Belgian National Reference Laboratory for AMR in MRSA and enterococci from animals. After OM analysis[12] of these samples, phenotypic LR selection was performed by collecting all bacteria grown on Petri dishes from the OM and spreading them on Columbia Sheep Blood (CSB) supplemented with linezolid (4 mg/L) (CSB-LZD). CSB-LZD plates were incubated at 37°C for 44–48 h as recommended by other studies.[14,15] Growth on CSB-LZD plates was considered positive for LR occurrence assessment. For each positive sample, two colonies were isolated and incubated on a second CSB-LZD plate for 44–48 h at 37°C and isolates were identified using MALDI-TOF MS. Only one of the two isolates was kept for each sample except if two different species were identified. Isolates were conserved at −80°C as glycerol (50%, v/v) stocks derived from overnight cultures in brain heart infusion. Samples for which two different bacterial species were found were considered as one positive case for the occurrence assessment. The collection was extended with three *Staphylococcus aureus* pig isolates from earlier OM and all isolates collected from previous studies[9,10] from human infections with a linezolid MIC_{24h} (MIC after 18–24 h of incubation) >4 mg/L, namely *E. faecalis* ($n=3$), *E. faecium* ($n=1$) and *S. aureus* ($n=1$), for WGS analysis.

Antimicrobial susceptibility testing

MICs of linezolid and chloramphenicol were determined using broth microdilution (BMD) on EUVENC plates for all isolates (Sensititre™, ThermoFisher SCIENTIFIC, Waltham, USA).[12] The plates were read with the VIZION TREK instrument (ThermoFisher SCIENTIFIC) after 18–24 h of incubation (MIC_{24h}) using sensivision software (MCS diagnostics, Swalmen, Netherlands). MICs were interpreted according to the clinical breakpoints from 2020[16] (for linezolid) or EUCAST epidemiological cut-offs[17] if no clinical breakpoints were available (for chloramphenicol). MIC_{24h}s were compared with measures after 24 h of additional incubation (MIC_{48h}) to assess whether any differences would be observed (taking account of *cfr* inducibility and recommendations of previous studies).[6,15]

WGS analysis

Genomic DNA was extracted using the DNeasy® Blood and Tissue kit according to the manufacturer's instructions (Qiagen, Hilden, Germany). DNA purity and concentration were assessed with the Nanodrop 1000 (Isogen LifeScience, Utrecht, Netherlands). Isolate sequencing libraries were created using Nextera XT DNA library preparation (Illumina, San Diego, CA, USA) according to the manufacturer's instructions and subsequently sequenced using MiSeq V3 chemistry (Illumina) for the production of 2 × 250 bp paired-end reads. All sequencing data have been submitted to SRA under BioProject PRJNA670413.[18] Reads were trimmed and *de novo* assembled as described by Bogaerts *et al.*[19] Ribosomal MLST (rMLST) was used to confirm the species of each isolate using a threshold of >75% matching loci,[20] using the methodology for sequence typing as described previously.[19] Detection of LR genes was performed as described for gene detection by Bogaerts *et al.*[19] using the sequences from the LRE-Finder database.[21] Hits with ≤90% sequence identity or ≤90% target coverage were removed. The same methodology was used to detect other AMR genes using the ResFinder database.[22] A local installation of the LRE-Finder tool (checked out from BitBucket on 8 August 2020), was used with default settings to detect 23S rRNA mutations. *E. faecium*, *E. faecalis* and *S. aureus* isolates were typed via core-genome MLST (cgMLST) as described previously.[19] Read mapping was executed with BWA-MEM with default settings and visualized with Tablet (version 1– 19.09.03).[23] Genetic organizations were determined using Blast analysis. Classic MLST schemes were retrieved from PubMLST.org,[24] while cgMLST schemes were retrieved from cgMLST.org for *E. faecalis* and *E. faecium*[25,26] and from PubMLST.org for *S. aureus*. Novel alleles and STs for classic MLST were submitted to PubMLST.org and novel cgMLST alleles were assigned an internal identifier before starting the phylogenomic analysis.

Phylogenomic analysis

Relatedness between isolates was determined by constructing phylogenies based on cgMLST results for *E. faecium*, *E. faecalis* and *S. aureus*. Allele matrices were filtered by removing isolates with ≤90% of loci detected and afterwards removing loci detected in ≤90% of isolates. Minimum spanning trees (MSTs) were constructed from the filtered allele matrices using GrapeTree 1.5.0 with the 'method' option set to 'MSTreeV2'.[27] Phylogenies were visualized and annotated in IToL.[28] The wider phylogenomic context of isolates was investigated as follows. Classic MLST was performed on all available genomes in the NCBI Assembly database that were also present in RefSeq for *E. faecalis* ($n=1423$), *E. faecium* ($n=1972$) and *S. aureus* ($n=11\,945$) (retrieved in October 2020) using the methodology described above. Isolates were then grouped by ST and separate MSTs were constructed for each group containing at least one isolate from this study and five isolates in total. SNP phylogenies were constructed to zoom in on certain groups. Read data for NCBI samples were retrieved through the ENA portal API, only retaining isolates with paired-end Illumina data and at least 20 000 reads available. The CFSAN SNP pipeline 2.0.2 was used with default parameters to construct SNP matrices.[29] MEGA-Computing Core 10.0.4 was then used to detect the best evolutionary model and construct maximum-likelihood phylogenetic trees based on the preserved SNP matrices,[30] as described previously.[31] The least fragmented genome within an ST cluster was selected as the reference genome for read mapping. SNP addresses were determined using SnapperDB 1.0.6[32] and PHEnix v1.4.1 for all isolates included in the SNP phylogenies using the same reference genome as for the SNP matrices, as described previously.[33] This SNP address is a strain-level 7-digit nomenclature based on the number of pair-wise SNP differences. Each digit represents the cluster membership for the given number of SNP differences, starting (right to left) with 0 (e.g. no SNP differences) to 5, 10, 25, 50, 100 and 250. Isolates sharing the same cluster digit differ by fewer than the corresponding number of SNPs.

Table 1. LR gene profiles observed in this study

LR gene profile	Bacterial species (host origin and number of isolates) of isolates
cfr	*S. aureus* (pig $n=5$, human $n=1$), *S. sciuri* (pig $n=1$)
optrA	*E. faecalis* (poultry $n=9$, pig $n=22$, cattle $n=39$, human $n=3$), *E. faecium* (poultry $n=3$, pig $n=8$, cattle $n=3$, human $n=1$), *E. hirae* (pig $n=7$), *E. casseliflavus* (pig $n=4$), *E. gallinarum* (pig $n=2$, cattle $n=1$), *E. asini* (pig $n=1$), *E. saccharolyticus* (pig $n=1$), *E. durans* (cattle $n=1$)
poxtA	*E. faecium* (poultry $n=8$, pig $n=11$), *P. pentosaceus* (pig $n=1$)
cfr, *optrA*	*E. gallinarum* (poultry $n=1$, pig $n=1$)
optrA, *poxtA*	*E. faecium* (poultry $n=3$, pig $n=4$, cattle $n=6$), *E. faecalis* (pig $n=3$)
cfr, *optrA*, *poxtA*	*E. faecalis* (pig $n=1$)

Geographical clustering

K-means clustering using the 'kmeans' function in R 3.6.1 with the 'centers' parameter set to six was performed on the coordinates of the samples to divide locations into six geographically related groups. The raw coordinates could not be shared due to privacy considerations, but each unique set of coordinates was randomly assigned a number. Location and geographical cluster numbers are provided as annotations in the phylogenetic trees.

Results

Linezolid selective monitoring and collection of isolates

A total of 105/1325 (7.9%) faecal samples [0/86 from turkeys (0%), 2/205 from laying hens (1.0%), 14/295 from broilers (4.7%), 10/163 from breeding hens (6.1%), 31/283 from pigs (11.0%) and 48/293 from veal calves (16.4%)] and 34/148 (23.0%) nasal samples [16/78 from sows (20.5%) and 18/70 from fattening pigs (25.7%)] exhibited growing bacteria on CSB-LZD plates after 48 h of incubation. Among these 139 samples, 147 isolates were collected and stored: 77 *E. faecalis*, 47 *E. faecium*, 7 *Enterococcus hirae*, 5 *Enterococcus gallinarum*, 4 *Enterococcus casseliflavus*, 1 *Enterococcus asini*, 1 *Enterococcus durans*, 1 *Enterococcus saccharolyticus*, 2 *S. aureus*, 1 *S. sciuri* and 1 *Pediococcus pentosaceus* (kept for this study) (MALDI-TOF MS identification; Table S1, available as Supplementary data at *JAC* Online).

Incubation comparison of BMD plates after 24 and 48 h

After 24 h, 118/147 isolates (80.3%) were above the linezolid breakpoint, while all 147 isolates were above the breakpoint after 48 h. Chloramphenicol susceptibility testing showed that 50 isolates were susceptible to this antibiotic after 24 h, of which 13 remained under the thresholds after 48 h (Table S1).

Genetic characterization

Among the 147 isolates from 2019 and the 8 added isolates (3 *E. faecalis*, 1 *E. faecium* and 4 *S. aureus*), all but 4 harboured *cfr* ($n=7$, 1 *S. sciuri* and 6 *S. aureus*), *optrA* ($n=105$, 1 *E. asini*, 1 *E. saccharolyticus*, 1 *E. durans*, 3 *E. gallinarum*, 4 *E. casseliflavus*, 7 *E. hirae*, 15 *E. faecium* and 73 *E. faecalis*), *poxtA* ($n=20$, 1 *P. pentosaceus* and 19 *E. faecium*), *cfr* and *optrA* ($n=2$, 2 *E. gallinarum*), *optrA* and *poxtA* ($n=16$, 3 *E. faecalis* and 13 *E. faecium*) or all three ($n=1$, 1 *E. faecalis*) (Table 1). When multiple LR genes were present, they were located on different contigs except for the co-occurrences of *cfr* and *optrA*. The four isolates lacking LR genes contained 23sRNA mutations: G2505A ($n=1$, 1 *E. faecalis*) and G2576T ($n=3$, 1 *E. faecium* and 2 *E. faecalis*). Detected alleles for *cfr*, *optrA* and *poxtA* and mutations in 23sRNA are listed in Table S2.

Of the 37 isolates carrying *poxtA*, 36 also carried *fexB*, but never on the same contig. A read mapping of these 36 isolates on plasmid pE1077-23 (GenBank: MT074684, isolated from an *E. faecium* strain from swine in China and carrying both *poxtA* and *fexB*) mapped the region shown in Figure S1 in all cases, suggesting that the isolates could carry this genetic organization.

Out of the 10 isolates carrying *cfr*, 8 also carried *fexA* on the same contig (Table S2 and Figure S2). Four genetic organizations were observed, called here *cfr*-ORG-1 ($n=7$), *cfr*-ORG-2 ($n=1$), *cfr*-ORG-3 ($n=1$) and *cfr*-ORG-4 ($n=1$) (Figure S2). In each organization, *cfr* was associated with different resistance genes: *fexA* (*cfr*-ORG-1), *lnuE* (*cfr*-ORG-2), *aad-D-2*, *aph(2")-Ic*, *ble* and *optrA* (*cfr*-ORG-3) and *aad-D-2*, *aph(2")-Ic*, *ble*, *erm(B)*, *optrA* and *fexA* (*cfr*-ORG-4).

For *optrA*, 20 genetic organizations were observed (Figure S3), excluding *cfr* organizations also carrying *optrA* ($n=2$). Contigs carrying *optrA* also contained *fexA* in 104/124 isolates and/or *erm(A)* in 47/124, *ant(9)-Ia* in 38/124, *erm(B)* in 6/124, *tetL*, *tetM*, *aph(2")* and/or *aadD* in 2/124 and/or *aac(6')-aph(2')*, *ant(6)-Ia*, *lnu(B)* and/or *lsa(E)* in 1/124.

Species identification with rMLST succeeded for 151/155 isolates and was consistent with MALDI-TOF MS identifications. Three isolates could only be identified up to the *Enterococcus* genus (VAR314, VAR522 and VAR530) and VAR572 (*E. asini*) was not identified through rMLST. Since these four isolates were classified by MALDI-TOF MS as species for which only a very limited number of rMLST profiles were available in the rMLST database, we hypothesize that the detection failed due to the presence of novel rMLST alleles not yet present in the underlying rMLST database.

Phylogenomic analysis

Except for the *E. faecalis* VAR492 isolate, more than 90% of cgMLST loci were detected in all *E. faecalis*, *E. faecium* and *S. aureus* isolates from this study. This resulted in phylogenetic trees with 79, 48 and 6 isolates, respectively (Figures 1–3). For both *Enterococcus* species, very large phylogenetic differences were observed, along with some smaller clades containing more closely related isolates. In total, 28 (including 3 new) and 32 (including 8

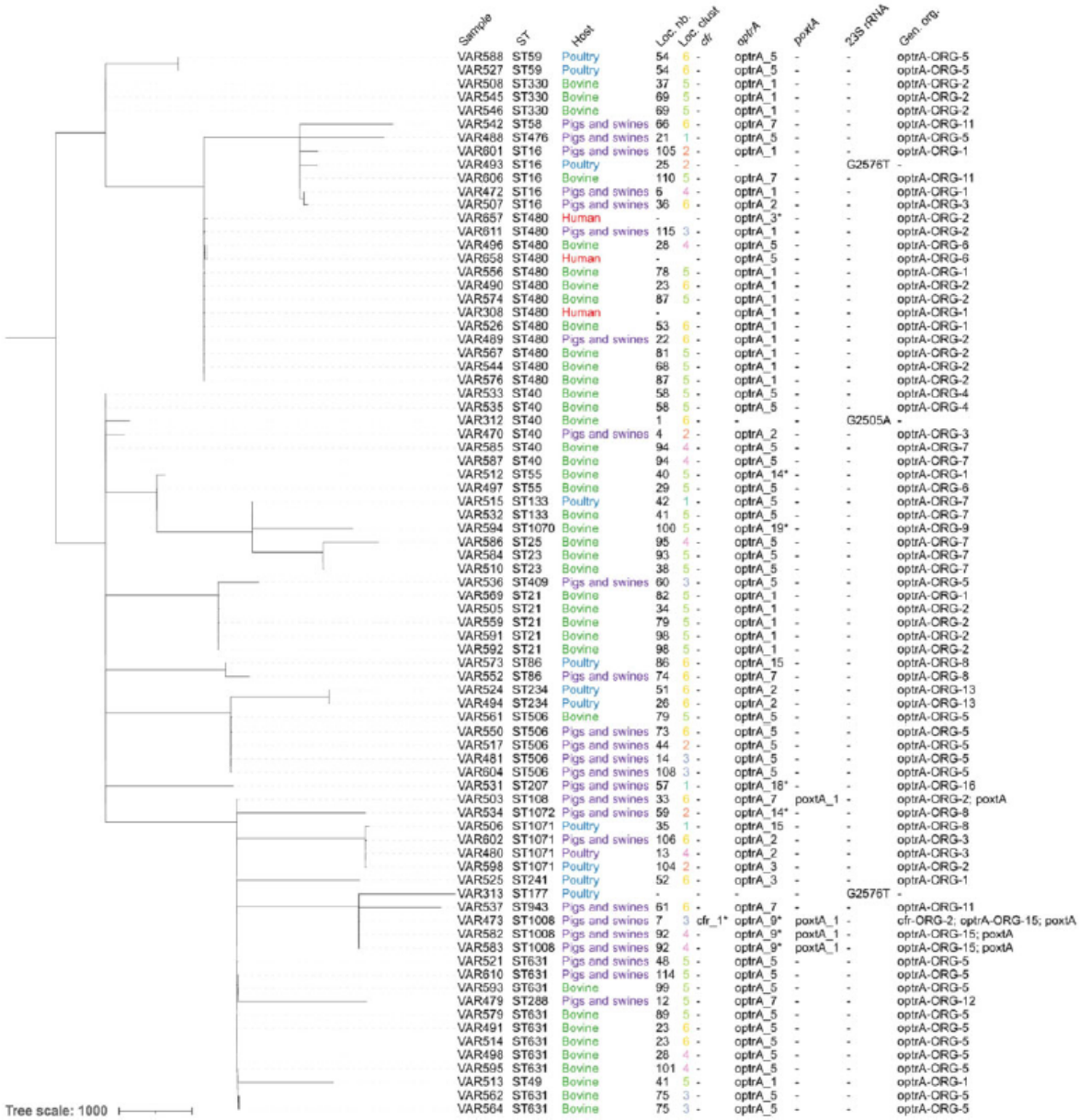


Figure 1. Phylogenetic tree containing the *E. faecalis* sequenced samples from this study. MST based on cgMLST results. Branch lengths represent the number of allele differences. Dotted lines are used to help the reader. Imperfect matches for the detected AMR alleles are indicated with an asterisk. A total of 1953 loci after filtering of the allele matrix were used to construct the phylogeny. Dashes for locations indicate that this information was not available. Dashes for genes indicate that no hits were found. Loc., location; nb., number; Gen. org., genetic organization. This figure appears in colour in the online version of *JAC* and in black and white in the print version of *JAC*.

new) different STs were observed for *E. faecalis* and *E. faecium*, respectively (Figures 1 and 2 and Table S2). For the majority of observed STs, samples collected from (clinical) human cases were present in the PubMLST isolate database. Complete overviews of host statistics per species are provided in Table S3. For *S. aureus*, all six isolates were classified as ST398 and had relatively similar cgMLST profiles. For both *Enterococcus* species, samples collected at the same location generally clustered together in the phylogenies (e.g. *E. faecalis* location 54 or *E. faecium* location 88). However, for both species, samples collected in the same location with large

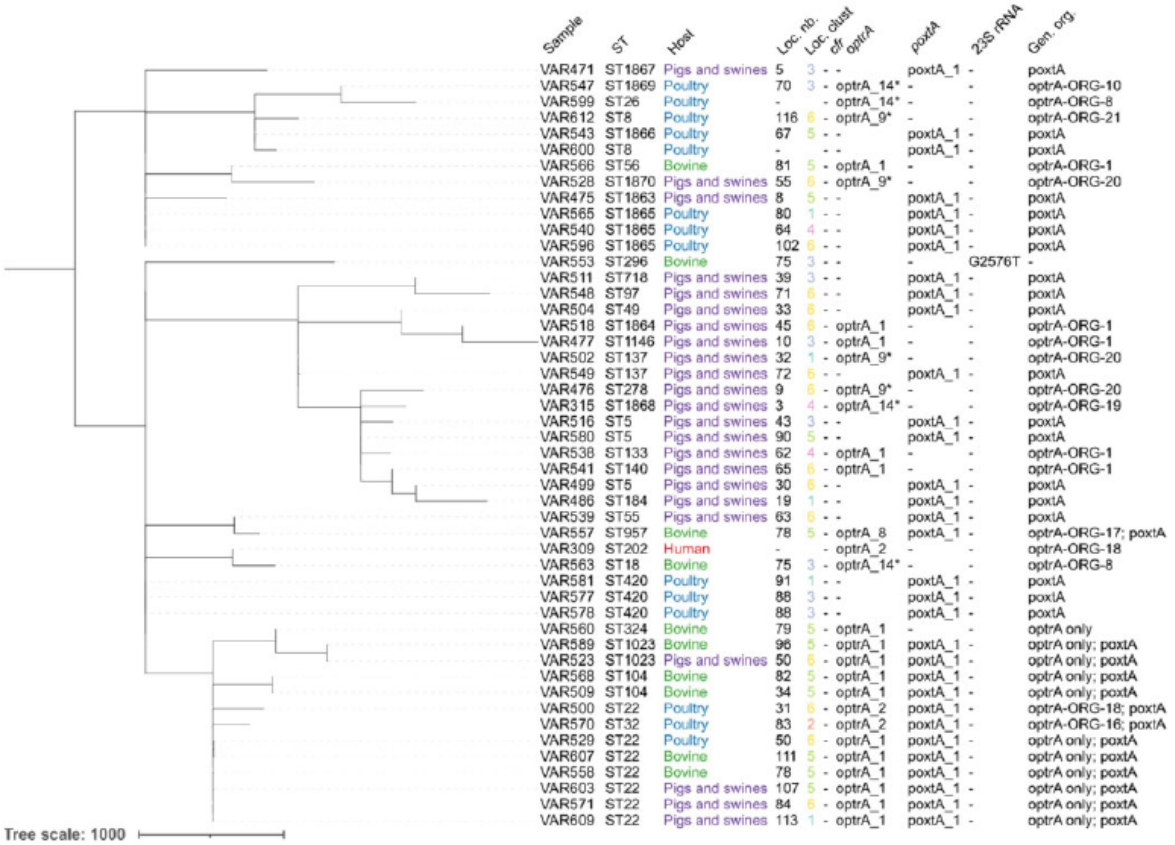


Figure 2. Phylogenetic tree containing the *E. faecium* sequenced samples from this study. MST based on cgMLST results. Branch lengths represent the number of allele differences. Dotted lines are used to help the reader. Imperfect matches for the detected AMR alleles are indicated with an asterisk. A total of 1380 loci after filtering of the allele matrix were used to construct the phylogeny. Dashes for locations indicate that this information was not available. Dashes for genes indicate that no hits were found. Loc., location; nb., number; Gen. org., genetic organization. This figure appears in colour in the online version of *JAC* and in black and white in the print version of *JAC*.

phylogenetic differences were also observed (e.g. *E. faecalis* location 41 or *E. faecium* location 78). For each species, the ST containing the most isolates from this study is discussed in detail below.

E. faecalis—ST480 cluster

Thirteen isolates from this study and 13 datasets obtained from NCBI were assigned to ST480 and were included in this cluster. Except for isolate VAR657, all isolates from this study assigned to ST480 clustered within 20 allele differences on a total of 1945 cgMLST loci after filtering (Figure 4). This group contained isolates from pigs, cattle, dogs and humans collected in various countries between 2013 and 2019 (Table S3). Isolate VAR544 collected from a bovine host showed similarity to isolates collected from humans, since it differed by five alleles compared with samples GCF_014325425.1 and GCF_014325545.1 and eight alleles compared with isolate VAR308 (Figure 4). Except for isolates VAR574 and VAR576, all isolates sequenced in this study were obtained at different locations in Belgium, spread out over 4/6 geographical clusters. *optrA* was detected in all isolates except for three that had a relatively large distance to the rest of the isolates. Despite the relatively small distances, six different alleles of *optrA* were detected in total. For only two of the NCBI isolates, suitable WGS data for constructing a SNP phylogeny were available, but the overall topology in the SNP phylogeny was consistent with results obtained using cgMLST (Figure S4). The SNP address identified a group of nine closely related samples from this study that differed between 10 and 25 SNPs from each other (i.e. SNP address starting with 2.2.2.2), indicating a close phylogenomic relatedness and suggesting a potential epidemiological link, and four additional samples that differed between 50 and 250 SNPs from this group.

E. faecium—ST22 cluster

Seven isolates from this study and 24 datasets obtained from NCBI were assigned to ST22 and were included in this cluster. Six out of seven isolates from this study in this group clustered within 10

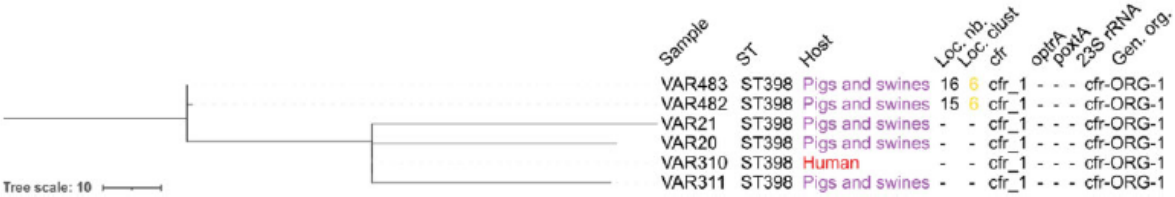


Figure 3. Phylogenetic tree containing the *S. aureus* sequenced samples from this study. MST based on cgMLST results. Branch lengths represent the number of allele differences. Dotted lines are used to help the reader. A total of 2046 loci after filtering of the allele matrix were used to construct the phylogeny. Dashes for locations indicate that this information was not available. Dashes for genes indicate that no hits were found. Loc., location; nb., number; Gen. org., genetic organization. This figure appears in colour in the online version of *JAC* and in black and white in the print version of *JAC*.

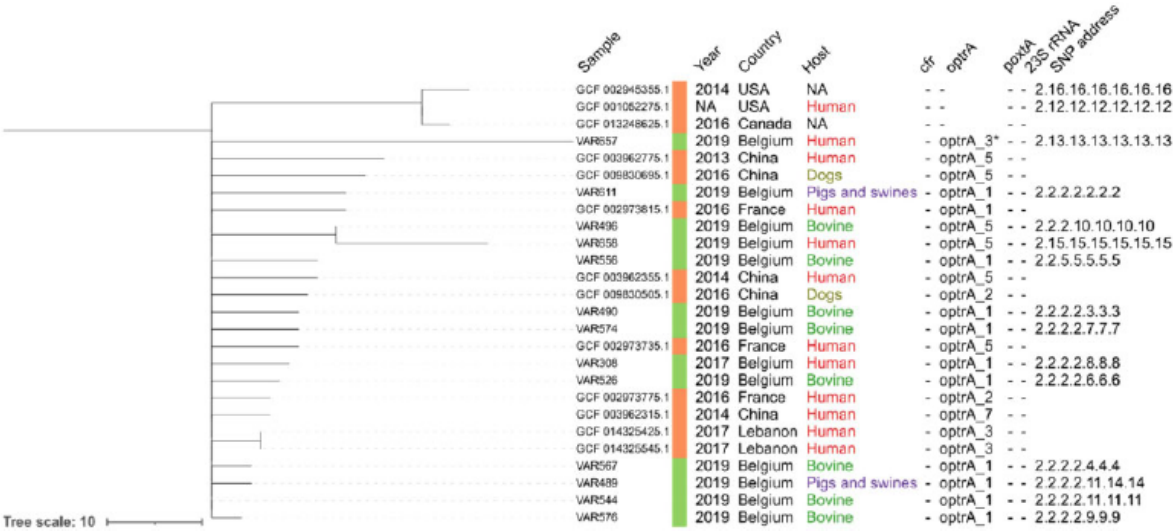


Figure 4. Phylogenetic tree for *E. faecalis* cluster ST480. MST based on cgMLST results. Branch lengths represent the number of allele differences. Dotted lines are used to help the reader. A total of 1945 loci after filtering of the allele matrix were used to construct the phylogeny. Imperfect matches for the detected AMR alleles are indicated with an asterisk. A dash indicates that no hits were found. The colouring represents data retrieved from NCBI (orange) and sequenced in this study (green). Samples without an SNP address did not have suitable Illumina WGS data available (see the Materials and methods section). NA, not available. This figure appears in colour in the online version of *JAC* and in black and white in the print version of *JAC*.

allele differences of each other on a total of 1404 cgMLST loci after filtering (Figure 5). Despite these small distances, the isolates were obtained from various host species. Isolate GCF_008079215.1 (obtained from a dried meat product in Tunisia in 2017)[34] was most closely related to the aforementioned six isolates. Interestingly, this isolate (like other isolates of this ST obtained from NCBI) did not contain either *optrA* or *poxtA* that were present in all isolates from this study for this ST. An SNP-based tree is presented in Figure S5. The SNP address showed differences ranging from 10 to 25 SNPs between the six closely related isolates from this study (i.e. SNP address starting with 4.4.4.4), indicating relatively close phylogenomic relationships.

S. aureus—ST398 cluster

The six isolates from this study were complemented with 899 isolates retrieved from NCBI assigned to ST398. The cgMLST phylogeny for all samples is represented in Figure S6. A subset of 34 samples selected based on their similarity to the samples of this study (≤20 allele differences) is presented in Figure S7. Interestingly, all isolates from this study carried *cfr*, whereas it was absent in all isolates obtained from NCBI in this subset. With the exception of isolate GCF_000638855.1, isolates in the subset were collected from the Netherlands ($n=18$) or Germany ($n=12$), which both share a border with Belgium. The majority of isolates in this subset, including VAR310, were obtained from humans ($n=14$), but various other host species were also observed, including pigs and swine ($n=5$), poultry ($n=4$), horses ($n=4$) and cattle ($n=2$). The coverage of sample VAR20 was not sufficiently high to determine an SNP address, but, for the other isolates from this study, the SNP addresses indicated differences between 50 and 250 SNPs from each other and the isolates retrieved from NCBI, suggesting a relatively distant phylogenomic relationship (Figure S8).

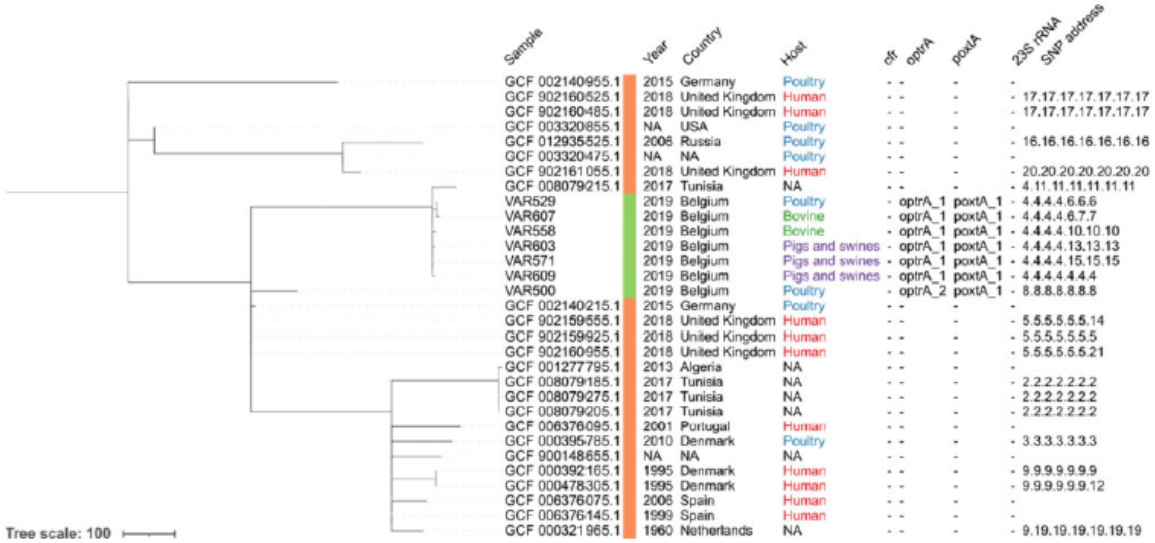


Figure 5. Phylogenetic tree for *E. faecium* cluster ST22. MST based on cgMLST results. Branch lengths represent the number of allele differences. Dotted lines are used to help the reader. A total of 1404 loci after filtering of the allele matrix were used to construct the phylogeny. The colouring represents data retrieved from NCBI (orange) and sequenced in this study (green). A dash indicates that no hits were found. Samples without an SNP address did not have suitable Illumina WGS data available (see the Materials and methods section). NA, not available. This figure appears in colour in the online version of *JAC* and in black and white in the print version of *JAC*.

Discussion

This study showed that the LR rate differed widely between different animal host species, with the highest rates occurring in faecal samples from veal calves (16.4%) and nasal samples from sows and pigs (20.5% and 25.7%, respectively). These results indicate that the addition of nasal sampling for enterococci monitoring in food-producing animals could be of added value. Our selective approach combined with a 48 h incubation revealed a much broader reservoir of LR bacteria in food-producing animals than observable through the 2019 OM.[12] In enterococci, LR was mainly conferred by *optrA*, *poxtA* and *cfr* (in this order), while all LR staphylococci harboured *cfr* with the same genetic organization. Mutations conferring LR were observed less frequently. Co-occurrences of two LR genes in one isolate were reported previously,[8,35] but, to the best of our knowledge, this is the first report of an isolate containing *optrA*, *poxtA* and *cfr* (VAR473). These results were observed even though the use of linezolid in food-producing animals is not approved.[13] *cfr*, *optrA* and *poxtA* provide cross-resistance to other antibiotics, with phenicols being the unique common cross-resistance among these three genes.[3–5] Moreover, LR genes were often found to be co-located with phenicol resistance genes (*fexA* or *fexB*). Consequently, phenicol use could also result in co-selection of LR genes. This is important to highlight because florfenicol use has increased each year between 2011 and 2018 in veterinary medicine in Belgium[36] and phenicols have traditionally been considered as one of the antibacterial classes with the lowest importance for human medicine in terms of resistance selection and transfer.[36]

Our study highlighted that a 48 h incubation of the BMD plates enhanced the phenotypic detection of isolates carrying LR determinants compared with a 24 h incubation (147 versus 118, respectively). Similarly, a higher rate of isolates was above the chloramphenicol thresholds after a 48 h incubation. This could suggest that *optrA* and *poxtA* are potentially inducible, similarly to *cfr*,[6] but more experiments are required to confirm this hypothesis. Consequently, we would suggest, for future studies, an additional 24 h incubation period, at least for isolates exhibiting a linezolid MIC of 4 mg/L after 24 h of incubation. Such an extended period of incubation was also recommended by Dejoies *et al.*[15]

Phylogenomic analysis showed that, for both *E. faecalis* and *E. faecium*, isolates belonged to many different STs (28 and 32, respectively), including 11 not previously described, indicating a substantial diversity among LR isolates. Some of the observed STs have also been reported previously in clinical settings, such as *E. faecalis* ST480 and *E. faecium* ST22 (Table S3).[37,38] Overall, large phylogenomic distances were observed for both species between clades of more related isolates (Figures 1 and 2). These observations indicate that reported LR enterococci likely constitute merely the 'tip of the iceberg' and a largely uncharacterized reservoir of LR isolates is circulating. For *S. aureus*, all six isolates were classified as ST398 with relatively large SNP distances, however, between most isolates. Although too few Belgian staphylococci isolates were included to make definitive claims, this suggests a similar trend as observed for *Enterococcus* spp.

Locations that were sampled multiple times typically contained mostly closely related isolates differing by only a limited number of SNPs, suggesting a potential clonal relationship, which would therefore be prime candidates for more detailed epidemiological investigation. Nevertheless, for several locations, isolates with phylogenetically distant strains, or even different species (e.g. location 34), were observed. The presence of multiple unrelated LR

isolates at a single location could indicate that even more variation exists at the sampled locations than observed here. On the other hand, clusters of closely related isolates were not limited to a single location or geographical cluster, but were often spread out across the whole country, indicating transmission of strains within Belgium.

While certain lineages are commonly associated with hospital outbreaks (i.e. ST6 for *E. faecalis*[39] and ST180, ST117 or ST78 for *E. faecium*;[40] Table S3), sharing of *E. faecalis* or *E. faecium* strains between livestock and humans has also been reported.[41,42] In this study, we observed *E. faecalis* isolates with high genomic similarity collected from various host species, including humans (e.g. Figure 4), suggesting that a spillover of such strains could occur. Additionally, since enterococci in livestock can serve as reservoirs for resistance genes,[41,43] these strains pose a substantial threat for AMR transmission to humans, even when direct transmission is unlikely.

In general, no clear correlation was observed between phylogenies and AMR genotypes, for all three species. These findings suggest that strains can easily exchange or acquire genetic material to obtain LR genes. In some cases, genotypic LR profiles were not consistent between isolates obtained at the same sampling location, indicating a non-unique source of LR at a single place.

In conclusion, this study showed that LR is present in a wide variety of isolates circulating in the agricultural sector in Belgium. Related isolates were recovered from different host species, including humans. Geographically, related isolates were spread out across the whole country and even across international borders. The lack of correlation between the phylogenies and the LR genes suggests that these genomic features are easily transferable as was already shown in previous studies.[44–46] Importantly, a substantial amount of genomic diversity was observed, including the detection of several features that were not yet documented, such as potential novel variants of resistance genes, new genetic organizations and new STs, indicating that much diversity exists among enterococci circulating in the agricultural sector, which remains hidden when only considering isolates obtained from human patients. This study showed that LR strains, genes and mutations are spread across the whole country and internationally, posing a risk to human health. The cross-selection of LR through the use of antibiotics currently listed as of lowest importance for human medicine (among others phenicols) should be considered in future action plans against AMR and in future objectives for rational antibiotic use. LR dedicated monitoring based on WGS analysis should be considered to monitor LR and prevent potential outbreaks. Similar studies in other countries, as recently conducted in Italy,[47] would increase knowledge and awareness about LR in the agricultural sector in a One Health perspective.

Acknowledgements

Parts of this work were presented at the 2019 and 2020 annual scientific meetings of the One Health European Joint Programme in the form of posters (posters 56 and 147, respectively).

We thank the Federal Agency for the Safety of the Food Chain for collecting the samples used in this study and providing the metadata. Technical support from A. Radu and D. Petrone was highly appreciated. We also thank Michèle Driesen and Xavier Simons from the Veterinary Epidemiology Service at Sciensano for the geographical coordinates of the samples. We thank the technicians of the Transversal Activities in Applied Genomics Service at Sciensano (Belgium) for performing the next-generation sequencing runs. We also thank the team of 'Hygiène Hospitalière' from St Luc Hospital, Woluwe-Saint-Lambert, Belgium.

Funding

This work was supported by funding from the European Union's Horizon 2020 Research and Innovation programme under Grant Agreement No. 773830: One Health European Joint Programme, and from Sciensano.

Transparency declarations

None to declare.

Supplementary data

Tables S1 to S3 and Figures S1 to S8 are available as Supplementary data at *JAC* Online.

References

1 WHO. Critically Important Antimicrobials for Human Medicine 6th Revision 2018. 2019. https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/312266/9789241515528-eng.pdf?ua=1.

2 Prystowsky J, Siddiqui F, Chosay J *et al.* Resistance to linezolid: characterization of mutations in rRNA and comparison of their occurrences in vancomycin-resistant enterococci. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; **45**: 2154–6.

3 Long KS, Poehlsgaard J, Kehrenberg C *et al.* The Cfr rRNA methyltransferase confers resistance to phenicols, lincosamides, oxazolidinones, pleuromutilins, and streptogramin A antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; **50**: 2500–5.

4 Wang Y, Lv Y, Cai J *et al.* A novel gene, *optrA*, that confers transferable resistance to oxazolidinones and phenicols and its presence in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* of human and animal origin. *J Antimicrob Chemother* 2015; **70**: 2182–90.

5 Antonelli A, D'Andrea MM, Brenciani A *et al.* Characterization of *poxtA*, a novel phenicol-oxazolidinone-tetracycline resistance gene from an MRSA of clinical origin. *J Antimicrob Chemother* 2018; **73**: 1763–9.

6 Schwarz S, Werckenthin C, Kehrenberg C. Identification of a plasmid-borne chloramphenicol-florfenicol resistance gene in *Staphylococcus sciuri*. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; **44**: 2530–3.

7 Sharkey LKR, Edwards TA, O'Neill AJ. ABC-F proteins mediate antibiotic resistance through ribosomal protection. *mBio* 2016; **7**: e01975.

8 Li D, Wang Y, Schwarz S *et al.* Co-location of the oxazolidinone resistance genes optrA and cfr on a multiresistance plasmid from *Staphylococcus sciuri*. *J Antimicrob Chemother* 2016; **71**: 1474–8.

9 Paridaens H, Coussement J, Argudin MA *et al.* Clinical case of *cfr*-positive MRSA CC398 in Belgium. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2017; **36**: 1527–9.

10 Argudin MA, Youzaga S, Dodémont M *et al.* Detection of *optrA*-positive enterococci clinical isolates in Belgium. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2019; **38**: 985–7.

11 European Food Safety Authority, ECDC. EU summary report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2013. *EFSA J* 2015; **13**: 4036.

12 Federal Agency for the Safety of the Food Chain. 2020. http://www.favv.be/productionanimale/antibioresistance/resultats/#sciensano.

13 European Food Safety Authority. Report from the Task Force on Zoonoses Data Collection including guidance for harmonized monitoring and reporting of antimicrobial resistance in commensal *Escherichia coli* and *Enterococcus* spp. from food animals. *EFSA J* 2008; **141**: 1–44.

14 Werner G, Fleige C, Klare I *et al.* Validating a screening agar for linezolid-resistant enterococci. *BMC Infect Dis* 2019; **19**: 1078.

15 Dejoies L, Boukthir S, Péan de Ponfilly G *et al.* Performance of commercial methods for linezolid susceptibility testing of *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis*. *J Antimicrob Chemother* 2020; **75**: 2587–93.

16 EUCAST. Breakpoint Tables for Interpretation of MICs and Zone Diameters, Version 10.0. 2020. https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/v_10.0_Breakpoint_Tables.pdf.

17 EUCAST. Epidemiological Cut-Off - MIC EUCAST. 2020. https://mic.eucast.org/search/.

18 Leinonen R, Sugawara H, Shumway M on behalf of the International Nucleotide Sequence Database Collaboration. The sequence read archive. *Nucleic Acids Res* 2011; **39**: D19–21.

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

20 Jolley KA, Bliss CM, Bennett JS *et al.* Ribosomal multilocus sequence typing: universal characterization of bacteria from domain to strain. *Microbiology (Reading)* 2012; **158**: 1005–15.

21 Hasman H, Clausen PTLC, Kaya H *et al.* LRE-Finder, a Web tool for detection of the 23S rRNA mutations and the *optrA*, *cfr*, *cfr*(B) and *poxtA* genes encoding linezolid resistance in enterococci from whole-genome sequences. *J Antimicrob Chemother* 2019; **74**: 1473–6.

22 Bortolaia V, Kaas RS, Ruppe E *et al.* ResFinder 4.0 for predictions of phenotypes from genotypes. *J Antimicrob Chemother* 2020; **75**: 3491–500.

23 Milne I, Stephen G, Bayer M *et al.* Using Tablet for visual exploration of second-generation sequencing data. *Brief Bioinform* 2013; **14**: 193–202.

24 Bratcher HB, Corton C, Jolley KA *et al.* A gene-by-gene population genomics platform: *de novo* assembly, annotation and genealogical analysis of 108 representative *Neisseria meningitidis* genomes. *BMC Genomics* 2014; **15**: 1138.

25 Neumann B, Prior K, Bender JK *et al.* A core genome multilocus sequence typing scheme for *Enterococcus faecalis*. *J Clin Microbiol* 2019; **57**: e01686–18.

26 de Been M, Pinholt M, Top J *et al.* Core genome multilocus sequence typing scheme for high-resolution typing of *Enterococcus faecium*. *J Clin Microbiol* 2015; **53**: 3788–97.

27 Zhou Z, Alikhan N-F, Sergeant MJ *et al.* GrapeTree: visualization of core genomic relationships among 100,000 bacterial pathogens. *Genome Res* 2018; **28**: 1395–404.

28 Letunic I, Bork P. Interactive Tree Of Life (iTOL) v4: recent updates and new developments. *Nucleic Acids Res* 2019; **47**: W256–9.

29 Davis S, Pettengill JB, Luo Y *et al.* CFSAN SNP Pipeline: an automated method for constructing SNP matrices from next-generation sequence data. *PeerJ Comput Sci* 2015; https://doi.org/10.7717/peerj-cs.20.

30 Kumar S, Stecher G, Li M *et al.* MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Mol Biol Evol* 2018; **35**: 1547–9.

31 Van Driessche L, Vanneste K, Bogaerts B *et al.* Isolation of drug-resistant *Gallibacterium anatis* from calves with unresponsive bronchopneumonia, Belgium. *Emerg Infect Dis* 2020; **26**: 721–30.

32 Dallman T, Ashton P, Schafer U *et al.* SnapperDB: a database solution for routine sequencing analysis of bacterial isolates. *Bioinformatics* 2018; **34**: 3028–9.

33 Nouws S, Bogaerts B, Verhaegen B *et al.* Impact of DNA extraction on whole genome sequencing analysis for characterization and relatedness of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolates. *Sci Rep* 2020; **10**: 14649.

34 Zommiti M, Cambronel M, Maillot O *et al.* Evaluation of probiotic properties and safety of *Enterococcus faecium* isolated from artisanal Tunisian meat 'Dried Ossban'. *Front Microbiol* 2018; **9**: 1685.

35 Lazaris A, Coleman DC, Kearns AM *et al.* Novel multiresistance cfr plasmids in linezolid-resistant methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* and vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* (VRE) from a hospital outbreak: co-location of *cfr* and *optrA* in VRE. *J Antimicrob Chemother* 2017; **72**: 3252–7.

36 Belgian Veterinary Surveillance of Antibacterial Consumption, National Consumption Report, 2019. 2020. https://www.fagg.be/sites/default/files/content/belvetsac_sanimed_rapport_2019_finaal.pdf.

37 Egan SA, Shore AC, O'Connell B *et al.* Linezolid resistance in *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* from hospitalized patients in Ireland: high prevalence of the MDR genes *optrA* and *poxtA* in isolates with diverse genetic backgrounds. *J Antimicrob Chemother* 2020; **75**: 1704–11.

38 Tedim AP, Ruiz-Garbajosa P, Corander J *et al.* Population biology of intestinal *Enterococcus* isolates from hospitalized and nonhospitalized individuals in different age groups. *Appl Environ Microbiol* 2015; **81**: 1820–31.

39 Leavis HL, Bonten MJM, Willems RJL. Identification of high-risk enterococcal clonal complexes: global dispersion and antibiotic resistance. *Curr Opin Microbiol* 2006; **9**: 454–60.

40 Eisenberger D, Tuschak C, Werner M *et al.* Whole-genome analysis of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* causing nosocomial outbreaks suggests the occurrence of few endemic clonal lineages in Bavaria, Germany. *J Antimicrob Chemother* 2020; **75**: 1398–404.

41 Hammerum AM. Enterococci of animal origin and their significance for public health. *Clin Microbiol Infect* 2012; **18**: 619–25.

42 Gouliouris T, Raven KE, Ludden C *et al.* Genomic surveillance of *Enterococcus faecium* reveals limited sharing of strains and resistance genes between livestock and humans in the United Kingdom. *mBio* 2018; **9**: e01780–18.

43 Rolain J-M. Food and human gut as reservoirs of transferable antibiotic resistance encoding genes. *Front Microbiol* 2013; **4**: 173.

44 Ntokou E, Stathopoulos C, Kristo I *et al.* Intensive care unit dissemination of multiple clones of linezolid-resistant *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium*. *J Antimicrob Chemother* 2012; **67**: 1819–23.

45 Huang J, Chen L, Wu Z *et al.* Retrospective analysis of genome sequences revealed the wide dissemination of *optrA* in Gram-positive bacteria. *J Antimicrob Chemother* 2017; **72**: 614–6.

46 Freitas AR, Tedim AP, Novais C *et al.* Comparative genomics of global *optrA*-carrying *Enterococcus faecalis* uncovers a common chromosomal hotspot for *optrA* acquisition within a diversity of core and accessory genomes. *Microb Genom* 2020; **6**: e000350.

47 Fioriti S, Morroni G, Coccitto SN *et al.* Detection of oxazolidinone resistance genes and characterization of genetic environments in enterococci of swine origin, Italy. *Microorganisms* 2020; **8**: 2021.

Discussion générale

La résistance aux antibiotiques est aujourd'hui considérée comme une des plus grandes menaces pour la santé humaine selon l'OMS (Matamoros-Recio et al., 2021). L'utilisation intensive des antibiotiques ainsi que l'apparition et la propagation de la résistance à ceux-ci doivent être combattues afin d'éviter que les solutions thérapeutiques ne se retrouvent limitées. La résistance aux antibiotiques ne concerne pas uniquement la santé humaine mais également les animaux et l'environnement ; une optique *One Health* doit devenir la généralité. Les différentes surveillances ont déjà montré leur utilité, notamment concernant l'utilisation des antibiotiques dans le domaine vétérinaire où des diminutions importantes ont été constatées (Anonymous, 2020d). Cependant, le combat ne s'arrête pas là : il faut continuer de suivre la situation de près, via les campagnes de surveillance et de diminuer la pression de sélection des différents antibiotiques pour éviter l'émergence et la propagation de bactéries ultra résistantes.

Cette thèse avait pour but d'apporter des outils supplémentaires et des connaissances, principalement génotypiques, pour compléter les données phénotypiques de la surveillance de la résistance aux antimicrobiens et ce dans une optique *One Health*. Pour ce faire, une méthode de détection multiplexée de déterminants de résistance a été développée, l'AMR-ARRAY, et deux études sur des résistances à des antibiotiques d'importance critique pour la médecine humaine, la colistine et le linézolide, ont été menées. Le premier objectif, le développement de l'AMR-ARRAY devait permettre la détection, chez des bactéries Gram-négatives isolées d'animaux PDA, de déterminants de résistance à des antibiotiques importants ou d'importance critique utilisés en médecine humaine. Cet outil devait apporter un volet génétique et cibler des déterminants de résistance principalement transférables, donner des résultats en un court laps de temps et devait être en libre accès. Le second objectif était d'étudier la collection d'*E. coli* isolés d'animaux PDA entre 2012 et 2016, résistantes à la colistine. Les déterminants de résistance à la colistine, leur environnement génétique, les réplicons associés ainsi que les relations génétiques entre les isolats devaient être déterminés par WGS. Enfin, le troisième objectif consistait à réaliser une surveillance sélective pour étudier la résistance au linézolide chez des bactéries Gram-positives isolées d'animaux PDA via le développement d'un protocole de surveillance dédié. L'identification des déterminants responsables de la résistance au linézolide devait être faite

dans les bactéries isolées des animaux PDA et dans des bactéries isolées d'échantillons humains reçus de collaborateurs du projet LIN-RES. Les organisations génétiques entourant ces déterminants devaient être déterminées de même que les relations phylogénétiques entre les différents isolats collectés et ceux disponibles sur NCBI. Les différents objectifs liés à cette thèse ont pu être remplis.

Les apports, avantages et applications de l'AMR-ARRAY seront d'abord discutés. L'importance de surveillances ciblées, surtout au niveau d'antibiotiques d'importance critique, sera ensuite abordée.

L'AMR-ARRAY : un outil multiplexé, modulable et facile d'utilisation pour détecter des déterminants de résistance

L'AMR-ARRAY est un outil de détection de déterminants de résistance aux antibiotiques mis au point dans le but d'apporter un volet génétique à la surveillance de la RAM.

Aspect modulable de l'AMR-ARRAY

L'AMR-ARRAY peut rapidement être adapté en fonction des demandes, des situations épidémiologiques ou des directives des autorités. En effet, la composition de l'ensemble des sondes utilisées peut être choisie sur mesure. Le nombre de sondes peut également être réduit s'il est nécessaire de ne cibler qu'une certaine famille de déterminants de résistance par exemple, dans un souci d'économie. L'ajout de sondes peut par exemple être fait si la situation épidémiologique l'exige, si un nouveau déterminant de résistance est découvert ou si les autorités demandent que de nouveaux déterminants soient intégrés à la surveillance de la RAM. Dans tous les cas, seules les sondes nouvellement synthétisées doivent être validées. Il n'est en effet normalement pas nécessaire de revalider l'entièreté de la méthode. L'AMR-ARRAY est donc un outil multiplexé et modulable, l'ensemble de sondes étant adaptable à différentes situations. Il est toutefois à noter que l'AMR-ARRAY présentait une bonne corrélation avec la majorité des phénotypes connus des isolats analysés. Cela montre bien que les déterminants de résistance sélectionnés pour constituer le set de PLPs est représentatif des principaux mécanismes retrouvés en Belgique.

L'AMR-ARRAY, un outil facile d'utilisation

L'AMR-ARRAY est un outil facile d'utilisation à tous les niveaux. En effet, le design des sondes a été décrit dans un protocole précis développé en interne et expliqué dans Wattiau et al 2011 qui permet une compréhension simple et rapide des étapes à suivre et des paramètres à appliquer (Wattiau et al., 2011). Durant cette thèse, plusieurs personnes ont rapidement appris et réussi à designer des sondes avec succès grâce à ce protocole. De plus, un protocole « *step by step* » a été mis au point pour toutes les étapes en laboratoire (LCR et analyses sur le Luminex®), rendant les manipulations simples et compréhensibles pour quelqu'un ayant une formation scientifique. Concernant les résultats, leur traitement et leur analyse, une macro a été développée sur Excel (codé en *Visual Basic for Application* ou VBA) permettant un traitement des données automatisé en cliquant uniquement sur des boutons et une lecture aisée des résultats via un tableau indiquant par un code couleur la présence ou non des déterminants ciblés. Tous ces éléments font de l'AMR-ARRAY un outil « *user friendly* » et facilement intégrable dans des laboratoires de routine ou de recherche. Les réactifs quant à eux peuvent, pour certains, être changés. En effet, la majorité des réactifs utilisés pour la partie LCR peuvent être changés en fonction par exemple des habitudes du laboratoire qui utiliserait l'outil. Il suffirait alors d'éventuellement adapter les concentrations des différents réactifs si cela s'avérait nécessaire (en fonction des résultats obtenus). Il n'est cependant pas possible de changer les réactifs liés directement à l'appareil Luminex®.

L'AMR-ARRAY comparé aux autres méthodes de détection de gènes

L'AMR-ARRAY présente certains avantages comparé à d'autres techniques comme cela a déjà été mentionné dans le chapitre 1. Les analyses WGS ont confirmé que l'AMR-ARRAY détectait correctement les mutations qu'il ciblait, à condition qu'un SNP ne soit pas présent à côté du SNP ciblé. Ce cas est normalement rare étant donné que des Blast sont faits lors des designs des sondes. Par rapport au nombre de cibles que l'AMR-ARRAY peut détecter, le WGS est plus puissant mais les PCR multiplexées sont moins performantes et demandent plus de temps pour l'obtention des résultats pour un même nombre de cibles (n=53). Ce nombre de déterminants ciblés est également plus élevé que dans la majorité des kits commerciaux de détection de

déterminants de résistance aux antibiotiques. Un autre avantage est que le coût des réactifs pour un échantillon analysé avec l'AMR-ARRAY est très attractif dans une optique de screening, 18€ par échantillon pour une plaque de 96 échantillons (dont deux contrôles intégrés). De plus, l'AMR-ARRAY est un outil destiné à être open access, les séquences des sondes de l'AMR-ARRAY sont mises à disposition dans l'article associé.

Comparé au WGS, l'AMR-ARRAY reste bien évidemment moins puissant. Là où l'AMR-ARRAY ne cible que des déterminants de résistance, le WGS donne toutes les informations de la bactérie séquencée. De plus, avec les développements constants de la bioinformatique, de nouveaux outils informatiques permettent d'utiliser et/ou réutiliser les données générées par WGS. Ces données peuvent également être conservées pour d'autres études ultérieures. L'AMR-ARRAY présente cependant des aspects intéressants comparés au WGS. C'est un outil facilement accessible ne requérant pas une formation poussée, aucune librairie d'ADN ne doit être construite car l'ADN est utilisable directement après extraction, exception faite pour les billes MagPlex-TAG™, les autres réactifs sont des réactifs habituellement trouvés dans la majorité des laboratoires de biologie moléculaire, les résultats sont obtenus plus rapidement et sont facilement interprétables et le matériel nécessaire demande un investissement moins conséquent comparé à un séquenceur. À titre d'exemple, un Luminex® 200™ comme l'appareil utilisé durant cette thèse revient à environ 50.000€ (prix 2021) comprenant les softwares, l'installation de tous les éléments et même une séance d'entrainement à l'utilisation de la machine si nécessaire. Le séquenceur utilisé pour séquencer les isolats de cette thèse, un Illumina MiSeq, revenait à 100.000€ en 2015, prix d'achat (communication interne).

Champs d'application de l'AMR-ARRAY

De par son aspect modulable, sa facilité d'utilisation et son adaptabilité, l'AMR-ARRAY peut être utilisé non seulement pour les surveillances de la RAM mais également en recherche. Dans le cadre clinique, plus particulièrement pour les diagnostics, les analyses phénotypiques restent les plus adéquates. En effet, lorsque l'on veut soigner un patient d'une infection causée par une bactérie pathogène, le plus important est de connaître le profil de résistance de la bactérie, l'importance du génotype étant la plupart du temps négligeable.

Actuellement, en Belgique et en Europe, beaucoup d'analyses d'antibiorésistance se font au niveau phénotypique en ce qui concerne les campagnes de surveillance de la RAM (EFSA and ECDC, 2021). L'utilisation du WGS est encore limitée pour ces campagnes en raison du coût. Dans le dernier rapport de l'ECDC et de l'EFSA sur l'antibiorésistance, peu de pays ont rapporté des données issues de WGS (EFSA and ECDC, 2021). L'apport de données génétiques est cependant recommandé, en tout cas pour certaines résistances à des antibiotiques critiques pour la médecine humaine (EFSA and ECDC, 2021). Durant cette thèse, il est ressorti fréquemment lors de diverses discussions que le WGS serait la technique à utiliser pour avoir les informations génétiques qui permettraient de déterminer la présence et les occurrences des différents déterminants de résistance mais l'argument du coût revenait sans cesse car ceux liés au WGS étaient trop élevés. L'AMR-ARRAY a été développé dans l'optique d'apporter une alternative au WGS. De plus, l'AMR-ARRAY peut servir d'outil de criblage afin de choisir les isolats à séquencer complètement comme par exemple des isolats pour lesquels aucun déterminant de résistance n'aurait été trouvé pour un phénotype donné (en partant du postulat que les analyses phénotypiques et génotypiques se font de concert). Ce faisant, cela permettrait de ne séquençer que les profils les plus intéressants. Ce nouvel outil avec les avantages qu'il amène peut s'inscrire comme une alternative au WGS dans le cadre de la surveillance et de la recherche des déterminants de résistance aux antibiotiques.

Au niveau de la recherche, il peut être un outil permettant la détection de gènes pour des études ciblées sur une ou plusieurs familles de gènes de résistance aux antibiotiques. Il peut également être orienté pour détecter des mutations conférant des résistances étant donné que l'AMR-ARRAY est sensible au niveau du nucléotide. Par exemple, durant cette thèse, l'AMR-ARRAY a été adapté pour ne cibler que des gènes *mcr* (ce qui a mené à l'étude sur la résistance à la colistine), ou que certaines mutations dans la région promotrice du gène *ampC* pour le stage d'une étudiante à Sciensano ou encore pour ne cibler que des gènes codant pour des carbapénémases pour aider une autre doctorante (résultats non montrés). Ces différents exemples illustrent donc bien l'adaptabilité de l'AMR-ARRAY.

Que ce soit pour la surveillance ou pour la recherche l'AMR-ARRAY pourrait éventuellement permettre de mettre sur la piste de nouveaux mécanismes de résistance. En effet, si un résultat incohérent est observé avec l'AMR-ARRAY (aucune sonde positive pour une résistance phénotypique pour laquelle tous les déterminants connus sont intégrés au set de sondes par exemple), la souche concernée serait alors entièrement séquencée afin de chercher une explication à cette anomalie.

Anomalies rencontrées

L'AMR-ARRAY a pu notamment mettre en évidence une discordance entre le phénotype de sensibilité à l'azithromycine de certains isolats, malgré la présence du gène *mphA* qui confère normalement une résistance à cet antibiotique. La présence de ce gène dans les isolats étudiés durant ce travail a bien entendu été confirmée par WGS. Il est cependant possible que les gènes ne soient pas exprimés ou qu'ils comportent des mutations qui rendraient l'enzyme non fonctionnelle.

L'AMR-ARRAY a également montré que plusieurs bactéries isolées d'aminaux PDA présentant un phénotype AmpC ne possédaient aucun des déterminants ciblés par l'AMR-ARRAY. Les analyses ResFinder et PointFinder n'ont détecté aucun autre déterminant pouvant expliquer ce phénotype laissant donc un point d'interrogation sur ces observations. Il est toutefois possible que ce phénotype soit le résultat d'une absence de porine permettant l'entrée de l'antibiotique ou de la surexpression de pompes à efflux évacuant l'antibiotique hors de la cellule. Ceci n'a pas été vérifié ou confirmé durant ce travail bien que l'hypothèse ait été envisagée.

Une troisième anomalie a été observée plusieurs fois dans l'AMR-ARRAY. Les 2 sondes ciblant un nucléotide en particulier dans le gène *parC*, le nucléotide sauvage et une mutation étaient toutes les deux négatives. En théorie, au moins une des deux est supposée s'allumer. Dans le cas présent, l'explication a été fournie par l'analyse des données de WGS. Il s'est avéré qu'il existe d'autres mutations au niveau des nucléotides

adjacents au nucléotide ciblé responsable de la résistance. Si le nucléotide adjacent est muté et donc ne correspond pas au nucléotide complémentaire de la sonde, ni la sonde dite sauvage ni la sonde dite mutée ne peut détecter sa cible. Dans une telle situation, les deux sondes sont négatives, pouvant dès lors mener à une discordance entre le phénotype de l'isolat (s'il est connu) et le résultat AMR-ARRAY (si la mutation est l'unique déterminant présent conférant le phénotype associé de la bactérie).

L'AMR-ARRAY est donc un outil qui peut avoir plusieurs applications et constitue donc un outil complémentaire très utile. Il ne faut pas pour autant remplacer les analyses phénotypiques par des analyses génotypiques car celles-ci peuvent mener à des interprétations erronées. En effet, prédire un phénotype avec une analyse génétique reste une prédiction et peut dès lors être fausse. Il est important de lier les deux types d'analyses afin d'avoir une vue d'ensemble la plus complète possible pour pouvoir caractériser au mieux les mécanismes de résistances circulant dans les différents réservoirs.

La surveillance et la résistance aux antibiotiques d'importance critique pour la médecine humaine.

Durant cette thèse, deux études sur la résistance à des antibiotiques d'importance critique pour la médecine humaine ont été réalisées, une sur la colistine et une sur le linézolide. Dans les deux cas, la totalité ou la majorité des bactéries étudiées provenaient d'animaux PDA. De telles études permettent d'examiner un réservoir qui est en contact avec l'humain et donc potentiellement à risque. Il a été montré ici que même si un antibiotique n'est pas utilisé dans un secteur, une résistance pouvait s'y développer et s'y propager, à savoir la résistance au linézolide. Heureusement, ce n'est semble-t-il pas toujours le cas. En effet, durant le développement de l'AMR-ARRAY nous avons voulu tester des isolats de terrains isolés d'animaux PDA et de la nourriture destinée à l'alimentation humaine résistants aux carbapénèmes et pas ou peu de souches répondaient à ce critère. Ceci semble montrer que la résistance aux carbapénèmes circule peu ou très peu au sein de ces populations bactériennes.

La surveillance, un outil d'importance capitale

La surveillance de la RAM démontre son importance, non seulement par le suivi des résistances qui sont observées, les données générées et les décisions que cela permet de prendre mais aussi par l'établissement de collections de souches qui rendent possibles des études rétrospectives ou en parallèle. Les études rétrospectives, comme l'étude sur les gènes *mcr*, peuvent mettre en évidence l'évolution d'une (ou plusieurs) résistance(s) dans le temps, des déterminants associés et ainsi souligner les potentiels risques tandis que les études en parallèle comme celle réalisée pour la surveillance de la résistance au linézolide, permettent d'avoir une idée de ce qui circule à un moment donné.

Dans le cas de l'étude sur la résistance à la colistine, celle-ci était associée à la présence de gènes *mcr* dans toutes les bactéries isolées à partir d'animaux PDA en Belgique de l'étude. Ceci montre que la croyance qui disait que cette résistance était principalement causée par des mutations non transférables était bel et bien erronée, comme cela a été montré après les multiples découvertes de gènes *mcr*. L'étude a également montré que ces gènes étaient présents dans plusieurs lignées d'*E. coli*, qu'une même lignée pouvait porter plusieurs gènes *mcr* différents, que ceux-ci étaient portés par différents plasmides et qu'ils étaient présents sur une grande partie du territoire belge. La résistance à la colistine observée dans ce cas-ci ne se retrouve donc pas dans des *E. coli* issus d'un clone unique ni d'un cas isolé. Pour rappel, le gène *mcr-1* a été observé pour la première fois en 2015 en Chine dans des *E. coli* isolés d'animaux et d'humains (Liu et al., 2016). Cependant, il a été montré que ce gène était déjà présent chez *E. coli* dans les années 1980 en Chine (Shen et al., 2016). Cinq ans après la découverte de *mcr-1*, 9 autres gènes *mcr* ont été découverts (dont 1 en Belgique, *mcr-2* (Xavier et al., 2016)) et 5 d'entre eux ont été observés en Belgique durant ce travail. Cette étude a permis d'observer pour la première fois certains gènes *mcr* en Belgique et a également permis de montrer que ces différents gènes circulaient déjà tous au moment, voire avant la découverte de *mcr-1*. Toujours durant cette étude, un isolat portant 3 gènes *mcr* différents a été observé. Des isolats portant 2 gènes *mcr* différents ont déjà été rapportés à de nombreuses reprises (García et al., 2018; Hadjadj et al., 2019) mais il s'agirait, d'après les données publiées, du premier isolat portant 3 gènes *mcr* différents : *mcr-1*, *mcr-3* et

mcr-5. Les études ayant décrit *mcr-3* et *mcr-5* ont rapporté une identité au niveau de la séquence des acides aminés par rapport à Mcr-1 de respectivement 99,8 et 36,1% (Yin et al., 2017b; Borowiak et al., 2017) et ces trois gènes codent tous les 3 pour des phosphoéthanolamines transférases. La présence de plusieurs gènes *mcr* au sein d'un seul isolat ne semble pas augmenter le niveau d'expression de résistance à la colistine, c'est dire la CMI par rapport à des isolats ne portant qu'un gène *mcr* (García et al., 2018; Hadjadj et al., 2019) comme observé dans notre étude. Il se peut qu'un seul des gènes *mcr* porté soit actif. Nous pourrions le démontrer en clonant le promoteur des différents gènes devant une séquence codant pour une protéine fluorescente afin de vérifier si le promoteur est actif ou non. Il est cependant légitime de se demander quel est l'intérêt pour une bactérie de conserver plusieurs gènes différents conférant une même résistance. Il semblerait que cela puisse généralement être lié au fait que ces différents gènes soient portés par des plasmides comportant simultanément d'autres gènes de résistance à d'autres antibiotiques. Dans l'étude de la résistance à la colistine menée ici, *mcr-5* est porté par un contigs qui porte également d'autres gènes de résistance (*aac(3)Iva* et *aph(4)Ia*). Ces autres gènes de résistance participeraient donc peut-être à la sélection des multiples gènes *mcr* présents dans la bactérie. Une autre explication de la présence de plusieurs gènes *mcr* serait que la bactérie aurait la possibilité de perdre un des plasmides portant un gène *mcr* sans pour autant perdre sa résistance à la colistine. Cela permettrait alors à la bactérie d'avoir plusieurs alternatives pour se défendre contre un antibiotique, dans ce cas-ci, la colistine.

L'étude de la résistance au linézolide menée durant cette thèse a permis de montrer que l'occurrence de cette résistance était plus élevée chez les animaux PDA que celle observée via la surveillance officielle, non sélective, et qu'elle était majoritairement causée par des gènes habituellement retrouvés sur des éléments transférables. Comme dans l'étude sur la colistine, cette résistance a été observée dans différentes lignées de bactéries, dont certaines qui ont déjà été impliquées dans des infections chez l'homme comme par exemple *E. faecalis* ST480 et *E. faecium* ST22 (Egan et al., 2020; Tedim et al., 2015). De plus, cette étude a permis de mettre en évidence des réservoirs de gènes de résistance au linézolide qui étaient jusque-là insoupçonnés ou méconnus. En effet, la surveillance sélective des échantillons nasaux destinés à la surveillance des MRSA a mis en évidence la présence non négligeable d'entérocoques résistants au linézolide.

Ces observations ont pu être faites et ces connaissances acquises grâce à la mise en place d'un protocole de surveillance dédié, adapté pour le linézolide en particulier avec un volet génétique intégré. Il est à noter que parmi les échantillons nasaux analysés, peu de souches de MRSA résistantes au linézolide ont été isolées. En effet, seulement deux MRSA et une S. sciuri portant *cfr* ont été isolées durant l'étude LIN-RES. Cependant, ce gène a tout de même déjà été observé plusieurs fois sur des plasmides chez des MRSA associées au bétail (EFSA and ECDC, 2021) ainsi que dans des cassettes chromosomiques de staphylocoques (cassette SCC*mec*) portant également des gènes *mec* responsables de la résistance à la méthicilline (Li et al., 2015). Dans les isolats de staphylocoques étudiés pendant ce travail, aucun des gènes *cfr* ne se sont retrouvés sur les mêmes contigs que les gènes *mecA* portés par les isolats. Dans d'autres études, *cfr* a été observé sur des plasmides portant d'autres gènes de résistance et il semblerait que le fait de porter *cfr* ne soit pas coûteux d'un point de vue « fitness », favorisant donc sa stabilité dans la bactérie (Shen et al., 2013). Ceci montre la capacité du gène *cfr* à se transférer et met en évidence les possibles co-sélections de ce gène. Dans l'étude LIN-RES, deux gènes cfr étaient portés par des contigs comportant également d'autres gènes de résistance : *aph(2'')-1c* et *aadD2* dans un cas et *aadD2*, *aph(2'')-Ic* et *erm(B)* dans l'autre. Ceux-ci pourraient être impliqués également dans cette co-sélection. Donc, même si peu de MRSA résistantes au linézolide ont été trouvées au cours de la surveillance effectuée lors de ce travail, il faut rester vigilant et continuer à garder un œil sur les occurrences des gènes de résistance au linézolide.

À l'instar de l'étude de la résistance à la colistine, un isolat portant 3 gènes différents de résistance au linézolide (*cfr*, *optrA* et *poxtA*) a été observé. Les autres études ayant rapporté des co-occurrences n'ont pas observé d'effets additif ou synergique sur la résistance suite à la présence simultanée de plusieurs gènes de résistance au linézolide (Lazaris et al., 2017; Li et al., 2016). Si l'on s'intéresse à l'organisation génétique entourant *optrA* dans l'isolat avec la triple occurrence (un *E. faecalis* ST1008), on observe que cette organisation (*optrA*-ORG-14) est trouvée dans deux autres isolats *d'E. faecalis* du même ST, le ST1008. De plus, cette organisation est à chaque fois observée avec *poxtA* dans la même bactérie mais sur des contigs différents. Cependant, *poxtA* a été observé simultanément avec d'autres organisations entourant *optrA*. Ces différents résultats ne permettent pas ici de mettre en évidence d'éventuelles corrélations car il

n'a pas été possible de reconstituer les plasmides. Un séquençage MinION par exemple permettrait d'avoir sans doute plus d'informations sur les plasmides impliqués. Les autres résultats obtenus ne permettent pas non plus d'expliquer la présence simultanée de 2 ou 3 gènes de résistance au linézolide dans une même bactérie et les CMI pour le linézolide sont comparables aux isolats ne portant qu'un seul gène de résistance à cet antibiotique. Les raisons de la présence de plusieurs gènes de résistance au linézolide peuvent être les mêmes que celles évoquées plus haut pour la triple occurrence de gènes *mcr*.

Une des questions posées lors de l'élaboration du projet et à laquelle il n'a pas été possible de répondre au terme de ce travail est l'origine de la résistance au linézolide. Cependant, au vu des résultats des travaux précédents et de ceux obtenus durant ce travail, une hypothèse peut être avancée. L'apparition de la résistance au linézolide pourrait avoir eu lieu suite à l'émergence de gènes de résistance au linézolide (*cfr*, *optrA*, *poxtA*) due à l'utilisation de phénicols chez les animaux. Les différents gènes recensés (*cfr*, *optrA* et *poxtA*) confèrent une résistance aux phénicols en plus du linézolide. *cfr* code pour une méthyltransférase qui va modifier le nucléotide A2503 situé dans le centre peptidile transférase (PTC), rendant l'action de différents antibiotiques ciblant ce site nulle (phénicols, lincosamides, pleuromutilines, streptogramine A et le linézolide) (Figure 17A). *optrA* et *poxtA* quant à eux, codent pour des protéines chargées de protéger le ribosome, et plus particulièrement le PTC de l'action d'antibiotiques dont les phénicols et les oxazolidinones (Figure 17B) (Long et al., 2006; Wang et al., 2015; Antonelli et al., 2018; Ero et al., 2019; Wilson et al., 2008). Il se pourrait donc que cette résistance soit le fruit du hasard étant donné que les phénicols ciblent le ribosome bactérien tout comme le linézolide. Cette utilisation exerce une pression de sélection qui aurait sélectionné de tels gènes. Suite à cela, les gènes auraient pu être transférés vers des bactéries de l'environnement et/ou chez l'homme et se propager ensuite vers les autres secteurs et ainsi coloniser ceux-ci (Figure 18). Pour confirmer ou infirmer cette hypothèse, des analyses phylogénétiques seraient nécessaires afin de pouvoir déterminer l'origine de ces différents gènes. Le maintien de la résistance (dans le secteur animal) pourrait être lié à l'utilisation du florfénicol. La présence simultanée d'autres gènes de résistance (notamment aux macrolides et aux aminoglycosides) pourraient également être un facteur de co-sélection de la résistance au linézolide.

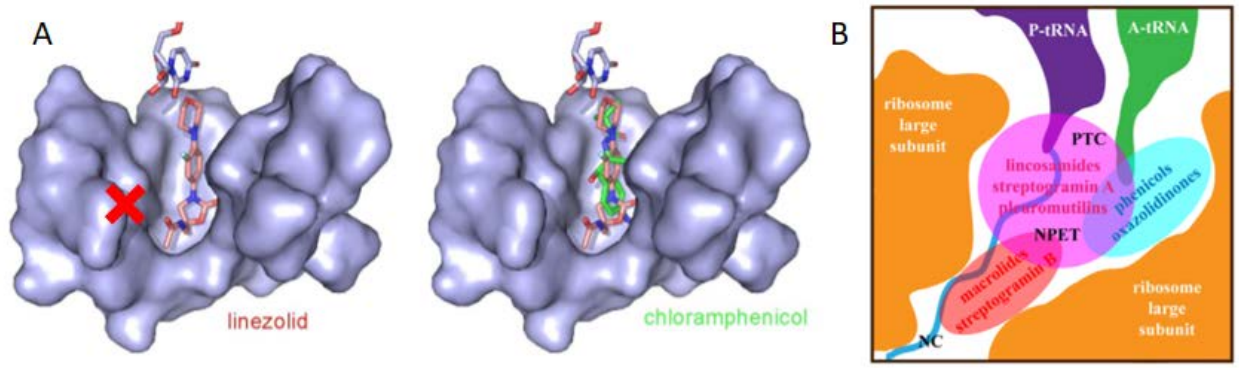


Figure 17 : mécanismes de résistance au linézolide liés à cfr, optrA et poxtA. A) Image adaptée de Wilson et al., 2008 qui montre la localisation du linézolide (molécule rouge) et du chloramphénicol (en vert) dans le PTC du ribosome. La croix rouge montre la position du nucléotide A2503 modifié par la protéine Cfr. B) Image adaptée de Ero et al.2019 qui montre la zone protégée (zone bleue) par les protéine ARE ABC-F comme les protéines OptrA et PoxtA. Nous avons l'autorisation de publier l'image ci-dessus.

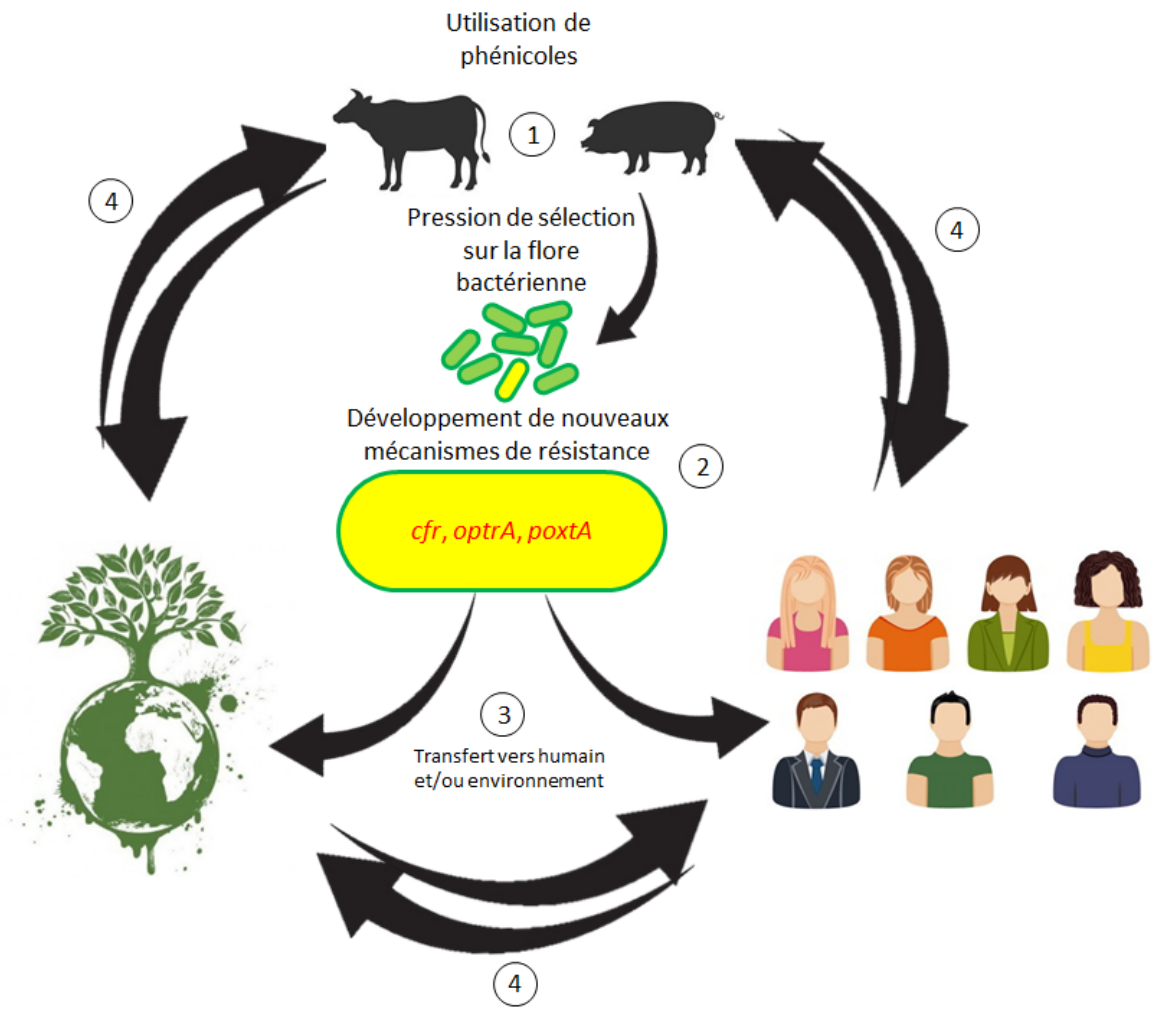


Figure 18 : illustration schématique de l'hypothèse de l'origine de la résistance au linézolide. Les chiffres entourés représentent les étapes successives depuis l'origine hypothétique jusqu'à la situation actuelle : 1) l'utilisation d'antibiotiques (ici les phénicols) exerce une pression de sélection sur la flore bactérienne des animaux d'élevage, 2) Cette pression de sélection serait à l'origine du développement de nouveaux mécanismes de résistance (ici, cfr, optrA et poxtA), 3) ces bactéries seraient ensuite transmises vers l'environnement et/ou les humains pour enfin 4) coloniser les différents secteurs et continuer à se propager parmi ceux-ci. Les formes allongées arrondies représentent des bactéries, celle en jaune représente une bactérie ayant développé une résistance au linézolide.

Des observations telles que celles rapportées dans cette thèse ne seraient pas possibles sans les campagnes de surveillance opérées chaque année car les échantillons ne seraient pas récoltés/disponibles pour réaliser ce genre d'études qui permettent de caractériser en profondeur les réservoirs de gènes de résistance aux antibiotiques, dont les antibiotiques critiques en médecine humaine. Ces études génétiques et ces surveillances sélectives orientées sur les antibiotiques critiques sont complémentaires à la surveillance actuelle et leur intégration systématique dans les campagnes de surveillance serait un réel atout pour la surveillance.

Vers une évolution de la surveillance de la RAM et une meilleure utilisation des antibiotiques ?

Les bactéries étudiées durant ce travail étaient majoritairement des bactéries multirésistantes et bien que celles-ci aient été isolées en grande partie d'animaux sains, cela n'en reste pas moins problématique. En effet, ces animaux sont régulièrement en contact (direct ou indirect) avec des humains et les échanges de bactéries entre humains et animaux peuvent donc se faire. Les bactéries dites « animales » et celles dites « humaines » peuvent donc entrer en contact et échanger du matériel génétique. Le transfert de résistance vers des bactéries de lignées humaines, pathogènes ou non, peut donc avoir lieu, ce qui représente un risque pour la santé humaine si ces résistances se retrouvent dans des bactéries pathogènes. Les études menées ici ont montré que les gènes de résistance sont souvent portés sur des éléments transférables qui peuvent eux-mêmes être porteurs de plusieurs gènes de résistance. Cela couplé au fait que plusieurs gènes conférant une même résistance peuvent être portés par une même bactérie (par exemple les gènes *mcr* pour la colistine ou les gènes *cfr*, *optrA* et *poxtA* pour le linézolide) et qu'un même gène peut donner des résistances à plusieurs antibiotiques (par exemple les gènes *cfr*, *optrA* et *poxtA* pour les oxazolidinones et les phénicols), le problème de la RAM ne s'en trouve qu'augmenté. Avec ces observations, il est clair qu'une surveillance génétique de la RAM doit être plus développée. Cela permettrait par exemple de pouvoir déterminer les éléments génétiques qui portent les résistances et/ou les facteurs permettant le maintien des gènes de résistance aux antibiotiques (présence de plusieurs gènes de résistance à différents antibiotiques sur un même élément génétique mobile, de système toxine/antitoxine, d'autres gènes apportant des avantages métaboliques à la bactérie). Pouvoir déterminer si une résistance peut être transférée, seule ou avec d'autres résistances, est aujourd'hui primordial. Le fait qu'une bactérie soit porteuse de résistance à des antibiotiques à la fois importants et d'importance critique pour la médecine humaine est problématique. En effet, un antibiotique de moins grande importance (par exemple un phénicol) va être utilisé à plus grande échelle mais pourra dès lors sélectionner les bactéries porteuses de gènes de résistance à des antibiotiques de plus grande importance (par exemple les gènes de résistance au linézolide). Si les décisions prises pour la gestion de l'utilisation des antibiotiques ne prennent pas en compte les cas de co-résistance, de résistance

croisée et croisée étendue présentes au sein des bactéries, il se peut que les résistances continuent à se propager malgré les efforts mis en place par les différents acteurs impliqués. Afin de pouvoir déterminer si les bactéries sont porteuses de tels facteurs de résistance, un volet génétique doit impérativement être ajouté dans les campagnes de surveillance de la RAM.

Mise en place de surveillances dédiées, ciblées ?

Les études de la résistance à la colistine et au linézolide ont posé la question du développement de protocoles dédiés à certains antibiotiques. Concernant la colistine, il n'est pas possible ici de déterminer l'impact que cela aurait pu avoir car il s'agissait d'une étude rétrospective et non d'une surveillance dédiée. Pour le linézolide, nos résultats ont montré qu'une telle démarche peut mettre en évidence une forte différence entre les occurrences observées via les protocoles utilisés pour la surveillance officielle, non sélective, et les occurrences observées via le protocole dédié développé pour l'étude de la résistance au linézolide. Etant donné les différences entre les méthodes utilisées pour la surveillance officielle et la surveillance sélective, il n'est pas possible de comparer de manière rigoureuse les résultats obtenus dans les deux cas. Cependant, on peut tout de même souligner que les attentes de la surveillance sélective ont été largement dépassées. En effet, les résultats de la surveillance officielle des entérocoques et des MRSA laissaient penser que les occurrences de résistance au linézolide chez les entérocoques seraient moins importantes que ce qui a été observé ici. Concernant les MRSA, nos résultats sont similaires avec ce qui est observé dans la surveillance officielle. Des observations inattendues ont tout de même été faites au niveau de la surveillance des échantillons nasaux chez les porcins. Ceux-ci sont normalement utilisés pour la surveillance des MRSA. Ce qui a été inattendu, c'est de retrouver des *E. faecium* et/ou *E. faecalis* résistantes au linézolide dans 9,0% et 20,0% des échantillons provenant de truies et de porcs d'engraissement, respectivement. Dans tous les cas, à l'exception des dindes, les occurrences observées dans les différentes origines animales ont dépassé nos attentes basées sur les résultats des surveillances précédentes (non sélectives). Il était évident qu'en réalisant une surveillance sélective avec du linézolide, plus de bactéries résistantes au linézolide seraient isolées. La même observation est faite par exemple avec les surveillances sélective et non sélective pour la caractérisation des *E. coli* producteurs de BLSE. Un plus haut

pourcentage de BLSE est observé dans la surveillance sélective que dans la surveillance non sélective, 50% à 60% contre moins de 10% respectivement en fonction des origines animales (communication personnelle). Les résultats obtenus ont permis de montrer que l'occurrence de la résistance au linézolide était plus élevée qu'attendu grâce à la pression de sélection exercée. Ces différentes observations ont rendu possible une caractérisation plus approfondie du réservoir d'entérocoques résistantes au linézolide dans le tube digestif des animaux PDA et de mettre en évidence l'existence d'un réservoir d'entérocoques résistantes au linézolide dans les muqueuses nasales des porcins. Dès lors, il est légitime de se demander si des bactéries résistantes au linézolide (ou tout autre antibiotique d'importance critique) ne sont pas également présentes (fréquemment ?) dans les muqueuses (nasales) d'autres espèces animales non surveillées/étudiées. Instaurer des surveillances spécifiques pour la résistance à des antibiotiques particuliers (par exemple d'importance critique pour la médecine humaine) chez les animaux PDA, comme c'est déjà le cas pour les *E. coli* BLSE, serait d'une utilité de santé publique car cela pourrait permettre une détection plus précoce de l'émergence de bactéries porteuses de gènes de résistance à ces antibiotiques. De plus, des différences d'occurrences de gènes de résistance en fonction du type d'échantillons ont été observées. L'échantillonage à analyser ne devrait-il pas également être revu ? Ne faudrait-il pas analyser différents échantillons d'un même animal ? Les conditions ne sont pas les mêmes partout dans un corps et des populations bactériennes différentes colonisent les différentes niches écologiques du corps. Il serait intéressant de comparer des prélèvements de différentes matrices issus d'un même animal pour voir si les mêmes bactéries peuvent y être détectées, si les mêmes déterminants de résistance sont présents, si les mêmes lignées sont observées, etc. Cela permettrait de caractériser davantage les réservoirs de résistance. Dans le présent travail, les échantillons nasaux et fécaux de porcs provenaient d'animaux différents et donc cette investigation n'a pas pu être réalisée.

Une autre observation intéressante faite grâce à la surveillance sélective est la présence de la résistance au linézolide chez d'autres espèces d'entérocoques qu'*E. faecium* et *E. faecalis* (*E. durans, E. gallinarum, E. casseliflavus, E. saccharolyticus, E. asini* et *E. hirae*) et que *S. aureus* (*S. sciuri*) mais aussi chez d'autres bactéries Gram-positives (*Pediococcus pentosaceus* et *Lactobacillus Johnsonii*). Même si certaines de ces bactéries ne sont pas qualifiées de pathogènes,

la présence de gènes de résistance à des antibiotiques d'importance critique font d'elles des réservoirs pour ces gènes et pose donc la question de savoir si d'autres espèces bactériennes ne devraient pas être intégrées à la surveillance de la RAM ou si cette surveillance ne devrait pas être orientée, non pas vers des espèces bactériennes mais plutôt vers des résistances particulières afin de savoir quelles résistances circulent dans quelles espèces bactériennes, dans quels types d'échantillons, dans quelles origines animales. Autant de questions qui demanderaient des investissements importants mais dont les apports le seraient tout autant.

Par rapport à la surveillance officielle non sélective, la surveillance sélective au linézolide s'est basée sur une durée d'incubation de 48h pour la sélection des bactéries et deux mesures pour la détermination des CMI (une première mesure à 24h conformément au protocole harmonisé utilisé actuellement pour la surveillance officielle afin de permettre la comparaison et une mesure à 48h). Cette durée de 48h utilisée pour la surveillance sélective, recommandée par différentes études lorsque l'on recherche des résistances au linézolide (Werner et al., 2019; Dejoies et al., 2020), a mis en évidence que 19,7% des échantillons de l'étude (29/147) comportant une ou des bactéries porteuses de gènes de résistance au linézolide ou d'une mutation n'auraient pas été conservés pour l'étude si l'incubation avait été arrêtée après 24h pour la détermination des CMI. Sur ces 29 échantillons, 2 avaient une CMI de 2mg/L et 27 de 4mg/L après 24h d'incubation. D'après ces résultats, une incubation de 24h supplémentaires pour, au minimum, les cas présentant une CMI de 4mg/L tant pour une surveillance sélective que dans la surveillance officielle devrait être envisagée afin de mettre davantage en évidence ces bactéries porteuses de gènes de résistance au linézolide. Il est à noter que ceci n'augmenterait pas les budgets associés car aucun matériel supplémentaire n'est nécessaire. Une PCR de détection (ou une autre méthode comparable à l'AMR-ARRAY par exemple) des gènes de résistance pourrait également être envisagée pour les échantillons qui présenteraient une CMI de 4mg/L après une incubation de 24h, afin de confirmer ou non la présence de ces gènes potentiellement transférables, ceci afin de caractériser plus profondément le réservoir de gènes de résistance. La mise en place de cette PCR nécessiterait bien évidemment le dégagement de budgets mais serait encore une fois une plus-value de par les informations retirées de ces analyses. Enfin, le séquençage complet des bactéries porteuses de gènes de résistance

transférables au linézolide isolées dans les futures campagnes de surveillance, comme réalisé dans le cadre de cette thèse, permettrait de surveiller les différentes lignées de bactéries porteuses de ces gènes de résistance et les réservoirs associés. Ces approches phénotypiques et moléculaires proposées permettraient de compléter les données issues de la surveillance officielle (non sélective). Une surveillance sélective permettrait quant à elle un suivi plus rapproché de l'évolution de ces résistances dans les différents réservoirs investigués.

La surveillance dans une optique One Health

Le concept « *One Health* » est de plus en plus présent dans le domaine scientifique. Cette thèse s'est inscrite dans cette optique en étudiant des bactéries isolées à partir d'animaux PDA, de la nourriture destinée à l'alimentation humaine et d'échantillons humains. Les différentes études réalisées montrent que la résistance s'étend au-delà des frontières des hôtes des bactéries, des espèces bactériennes et des zones géographiques. Pour une même résistance (au linézolide ou à la colistine), une multitude de facteurs différents a été observée : différents déterminants de résistance impliqués (les différents gènes *mcr* pour la colistine et *cfr*, *optrA*, *poxtA* et des mutations pour le linézolide), différentes organisations génétiques entourant le déterminant (pour les gènes de résistance au linézolide uniquement), différentes lignées bactériennes pouvant porter le déterminant (que ce soit les gènes *mcr* ou de résistance au linézolide), plusieurs déterminants différents présents sur le même élément génétique mobile. Toutes ces observations montrent que la résistance aux antibiotiques concerne tous les secteurs et est à prendre au sérieux même en cas d'absence d'infection. Une observation qui a été faite durant le développement de l'AMR-ARRAY et qui illustre bien la phrase précédente est qu'un grand nombre de déterminants ciblés par l'AMR-ARRAY ont été retrouvés à la fois dans des échantillons provenant d'animaux PDA, de la nourriture destinée à l'alimentation humaine et d'échantillons humains (Figure 19).

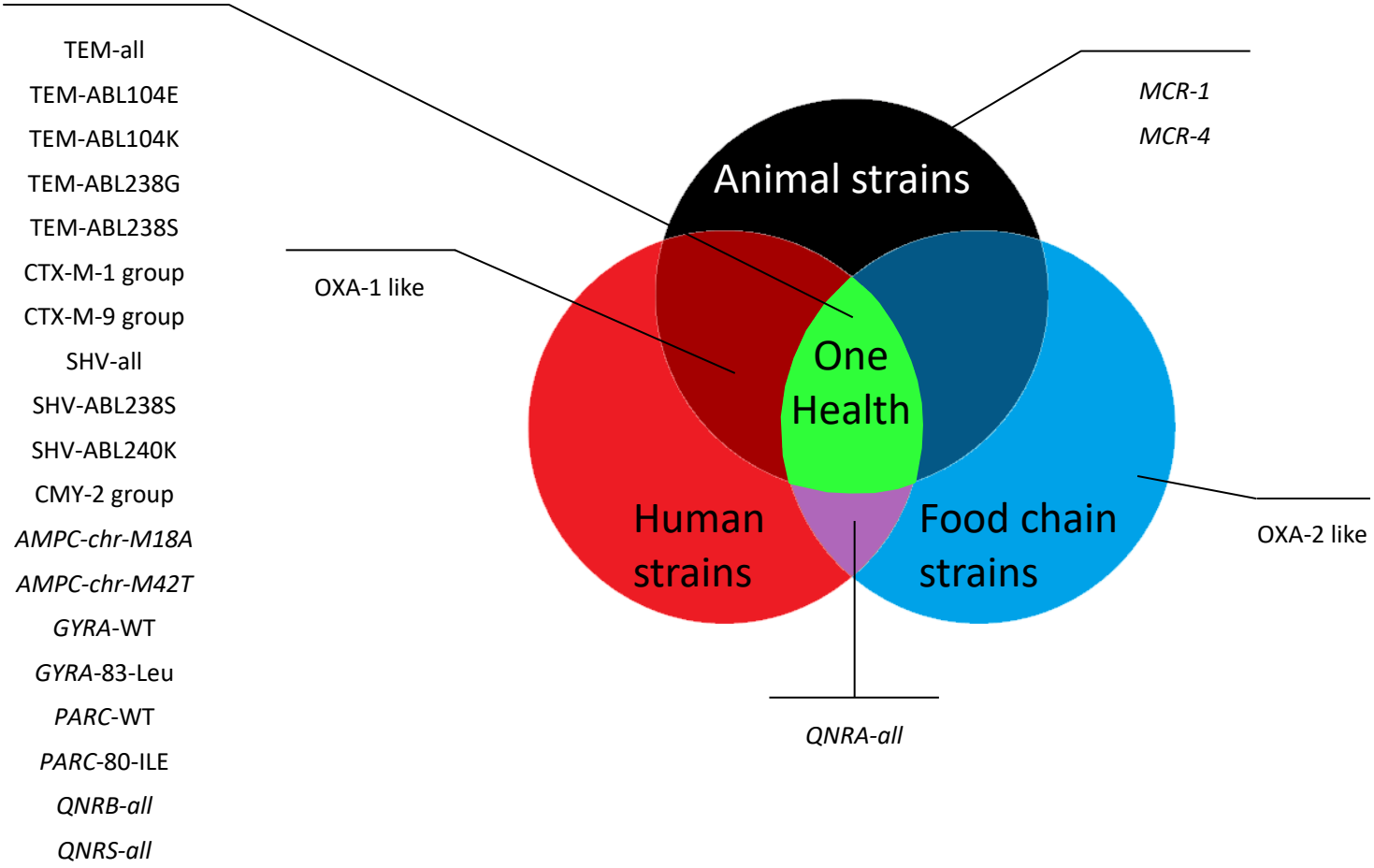


Figure 19: déterminants de résistance détectés dans des isolats provenant d'animaux PDA, de la nourriture destinée à l'alimentation humaine et d'échantillons humains avec une version réduite de l'AMR-ARRAY durant son développement.

Durant cette thèse, il n'a malheureusement pas été possible d'intégrer des échantillons provenant de l'environnement, ce qui aurait été un élément non négligeable dans ce travail, d'autant plus que ce dernier n'est pas très représenté dans la littérature scientifique actuellement (Humboldt-Dachroeden et al., 2020). En Belgique (et en Europe), l'environnement est déjà intégré dans des programmes de surveillance comme la surveillance des eaux pour la recherche de molécules antibiotiques (Anonymous, 2019b). L'intégration plus poussée de l'environnement, suite au développement du *One Health* et du plan d'action national de lutte contre l'antibiorésistance en Belgique, est en marche avec notamment des analyses d'eaux souterraines, de surface et usées dans les différentes régions du pays dans la lutte contre la RAM (Anonymous, 2019a). Il est important de pouvoir intégrer les différents secteurs à la surveillance de la RAM afin de former un ensemble complet d'informations pour lutter au mieux contre la RAM. Dans cette optique, il serait intéressant de pouvoir intégrer une surveillance de la RAM au

niveau humain chez des sujets non atteints d'infection. Il existe tout de même quelques études qui se sont penchées sur le sujet et ont démontré la présence de bactéries multi résistantes chez des humains sains (Li et al., 2014; Marincola et al., 2021; Poeta et al., 2006). Les informations qui sont extraites des surveillances chez les humains malades sont bien évidemment importantes et utiles mais il serait d'une grande plus-value de savoir ce qui circule dans la population humaine saine, habituellement pas ou peu exposée à la prise d'antibiotiques. Savoir ce qui circule dans la population humaine saine en termes de déterminants de résistance serait intéressant. En effet, lors d'une infection bactérienne et d'une prise d'antibiotique, les bactéries résistantes au dit antibiotique sont sélectionnées mais le risque de transfert de gènes (dont des gènes de résistance) entre bactéries en est aussi augmenté de par la situation de stress qui leur est imposée. La présence de déterminants de résistance dans des bactéries colonisant la flore intestinale humaine n'est donc pas anodine et peut servir de réservoir de gène pour les potentielles bactéries pathogènes (opportunistes ou non) qui infecteraient l'hôte. Inversement à l'idée de surveiller la population humaine saine, il serait intéressant de surveiller les bactéries pathogènes qui infectent les animaux. Ce genre de surveillance apporterait des informations permettant d'adapter au mieux les stratégies thérapeutiques chez les animaux et d'avoir un usage rationnel des antibiotiques dans le domaine vétérinaire. Pour rappel, le programme européen EARS-VET est actuellement en développement et permettra la surveillance des résistances observées chez des pathogènes isolés chez des animaux avec un panel d'antibiotiques composés de molécules utilisées pour les animaux.

Un point qui a été abordé dans les discussions durant cette thèse et durant l'écriture des articles concerne les seuils servant à déterminer la résistance des bactéries. En effet, il y a les ECOFF utilisés lors des surveillances de la RAM chez les animaux PDA, pour la nourriture destinée à l'alimentation humaine et certaines analyses en médecine humaine et les seuils cliniques utilisés dans le domaine clinique humain. Dans tous les cas, si une bactérie supporte la présence de l'antibiotique au-delà du seuil de concentration utilisé, elle sera qualifiée de résistante. Cependant, le mot « résistante » ne signifie pas la même chose dans les deux domaines. De plus, pour une même espèce bactérienne et un même antibiotique, les seuils peuvent être différents

entre ECOFF et seuils cliniques. Il est dès lors difficile de pouvoir établir une vision *One Health* si les seuils et le vocabulaire utilisés sont différents.

Conclusion et perspectives

L'AMR-ARRAY est d'ores et déjà utilisable pour caractériser génétiquement des bactéries issues de la routine de la surveillance de la RAM et répond aux objectifs fixés en termes de libre accès, d'adaptabilité, de rapidité, de coût et de performance. En effet, les résultats générés par celui-ci ont été comparés aux résultats d'analyses phénotypiques et génotypiques et les concordances obtenues sont bonnes (>90% et >99% respectivement). L'AMR-ARRAY a en outre permis de mettre en évidence la forte présence des gènes *mcr* au sein des *E. coli* résistants à la colistine isolées à partir d'animaux PDA. Bien que déjà utilisable et performant dans sa version actuelle, l'AMR-ARRAY pourrait encore être amélioré. Certaines mutations dans les gènes bla_{TEM} (par exemple en position 164 selon la nomenclature Ambler (Cohen Stuart et al., 2010)) et bla_{SHV} (par exemple en position 35 selon la nomenclature Ambler (Liakopoulos et al., 2016)) conférant un phénotype BLSE, bien que moins fréquentes, pourraient être ajoutées au set de sondes si leur occurrence venait à augmenter dans le futur. Il est important de prendre en compte le but de l'ajout de sondes. En effet, certains allèles du gène bla_{SHV} (-8, -16, -24, -27, -38, -40, -41, -42, -57, -70, -98, -99, -104) associés à un phénotype BLSE et observés en clinique, n'ont cependant été observés que très rarement, voire une seule fois selon la littérature. Il serait peu intéressant de cibler l'ensemble des mutations conférant un phénotype BLSE si les allèles concernés sont rares. Des sondes pourraient être développées également pour cibler d'autres gènes transférables conférant des résistances aux (fluoro)quinolones (comme les gènes *qepA* et *OqxAB*) bien que ces gènes soient actuellement moins fréquemment rencontrés que les mutations dans les gènes *gyr* et *par*. D'autres mutations dans ces deux gènes ont été rapportées, bien que moins fréquentes mais qui pourraient tout de même faire l'objet de sondes pour l'AMR-ARRAY, comme la mutation Asp87Asn dans le gène *gyrA* ou Glu84Gly dans le gène *parC* ou encore des mutations dans les gènes *gyrB* (p. ex. Asp426Asn) ou *parE* (p. ex. Ser458Ala) (Hopkins et al., 2005; Röderova et al., 2017). Des sondes ciblant d'autres gènes de résistances aux macrolides (commes les gènes *ermA*, *mef* ou *mph*) ou aux aminoglycosides (l'ensemble des gènes *aac*, *ant* ou *aph* qui ne sont pas

encore tous inclus dans le set de sondes) pourraient également être mises au point. Une sonde ciblant le gène *dha*, conférant un phénotype AmpC pourrait également être développée. Certaines sondes qui n'ont pas pu être intégrées au set actuel car présentant des réactions croisées avec d'autres sondes pourraient être revues et corrigées pour également étendre la portée de l'AMR-ARRAY comme les sondes ciblant le gène *armA* (résistance aux aminoglycosides) ou le gène *mefA* (résistance aux macrolides). Toute ces différentes cibles citées ci-dessus pourraient faire l'objet de nouvelles sondes afin d'étoffer le set de PLPs de l'AMR-ARRAY. Il serait également possible de cibler des déterminants de résistance plus rares posant des problèmes dans les hôpitaux. Cependant, ajouter des sondes ciblant de tels déterminants, moins fréquemment rencontrés, augmenterait le coût des analyses et supprimerait l'avantage du faible coût par échantillon de l'AMR-ARRAY. Si ces déterminants aujourd'hui plus rares devenaient à l'avenir plus fréquents, il serait alors judicieux de les ajouter au set de PLPs de l'AMR-ARRAY. Concernant le protocole, certaines étapes et notamment certains volumes des réactifs pourraient être optimisés afin d'améliorer non seulement le temps nécessaire à la manipulation mais également le prix par échantillon comme par exemple le nombre de micro-billes utilisées à l'étape d'hybridation qui pourrait être diminué pour diminuer le prix par échantillon. Différentes anomalies ont été observées suite aux analyses effectuées avec l'AMR-ARRAY. Il n'a cependant pas été possible, lors de ce travail, de s'attarder sur les causes de ces anomalies mais il serait intéressant à l'avenir de pouvoir les investiguer. L'analyse de l'expression des gènes *mphA* conférant la résistance à l'azithromycine pourrait être étudiée. Une étude plus approfondie sur les phénotypes AmpC inexpliqués pourrait être faite pour voir si les porines (absence empêchant donc l'entrée de l'antibiotique) ou pompes à efflux (favorisant l'évacuation de l'antibiotique hors de la cellule) ne sont pas impliquées ou si de nouveaux mécanismes ne sont pas responsables de ce phénotype. Enfin, une valeur ajoutée pour l'outil serait de pouvoir tester plus de bactéries provenant d'échantillons humains et de la nourriture mais il serait également intéressant de pouvoir analyser des bactéries prélevées dans l'environnement afin de savoir si les PLPs actuellement présentes dans le set sont suffisament représentatives de ce réservoir. L'AMR-ARRAY est le nom que l'on a donné à l'outil tel qu'il est avec le set de sondes pour cibler des déterminants de résistance aux antibiotiques mais les applications ne se limitent pas à la

résistance aux antibiotiques. Il est en effet possible d'imaginer des sets de sondes pour d'autres cibles comme des gènes de virulence, des réplicons ou toutes sortes de marqueurs d'intérêt. Ceci est valable pour les bactéries mais comme la cible est de l'ADN, il est possible d'imaginer des cibles pour tout ce qui comporte de l'ADN et ainsi pouvoir avoir des sets de sondes associés à différentes questions scientifiques, quelles qu'elles soient.

Le deuxième objectif a également été atteint. Les isolats d'*E. coli* résistants à la colistine qui ont pu être recultivés des collections de 2012 à 2016 inclus ont été caractérisés pour leur résistance à la colistine. Les analyses génotypiques ont pu montrer que la résistance observée ici était toujours liée à la présence d'un gène *mcr*. En plus de la résistance à la colistine, les analyses phénotypiques et génotypiques ont montré que l'ensemble des isolats de l'étude étaient multi-résistants. Les environnements génétiques ont pu être déterminés et pour les gènes *mcr* observés plusieurs fois (*mcr-1* et *mcr-4*), une seule organisation génétique entourant les gènes (une pour l'ensemble des *mcr-1* et une pour l'ensemble des *mcr-4*) a été observée. L'association des réplicons aux gènes *mcr* trouvés dans les mêmes souches n'a pas pu se faire pour tous les isolats. Les contigs portant les gènes *mcr* et/ou les réplicons n'étaient pas toujours les mêmes et dans ce cas il n'était pas possible d'affirmer qu'un gène *mcr* était associé avec tel ou tel réplicon. Cependant, une grande diversité de réplicons a été observée au sein des isolats ainsi qu'une diversité de STs malgré le nombre réduit d'isolats étudiés, mettant en évidence les présences des gènes *mcr* dans différentes lignées d'*E. coli*. Cela aurait été une valeur ajoutée d' identifier les plasmides porteurs des gènes *mcr*, surtout pour l'isolat qui porte les trois gènes *mcr* (*mcr-1*, *mcr-3* et *mcr-5*) afin de savoir s'ils étaient sur des plasmides différents ou non. Pour ce faire, un séquençage MinION ou encore une extraction et purification de plasmides suivies de PCRs pourraient être réalisés. Des analyses permettant de déterminer l'activité de ces 3 gènes seraient intéressantes : le clonage des promoteurs des différents gènes en amont de la séquence codante d'une protéine fluorescente permettrait de voir si ce dernier est actif ou non par exemple. Cela permettrait peut-être d'expliquer pourquoi une CMI plus importante n'est pas observée si par exemple seulement un des trois gènes est exprimé. L'observation de co-occurrence de gènes *mcr* reste malgré tout relativement rare. La découverte des gènes *mcr* a fait réagir la communauté scientifique et les recherches de ces gènes se sont multipliées. L'ajout de la recherche des gènes

mcr dans les surveillances a été suggéré par de nombreuses études. L'étude de la résistance à la colistine réalisée durant ce travail en est arrivée à la même conclusion et il est important de prévenir l'émergence et la propagation de telles résistances.

Le troisième objectif a lui aussi été atteint. Un protocole dédié a été développé pour l'étude de la résistance au linézolide, permettant de sélectionner des bactéries portant des déterminants de résistance à cet antibiotique. Ce protocole a permis de déterminer les occurrences de bactéries résistantes au linézolide, principalement des entérocoques, dans des échantillons issus de matrices différentes à partir de différentes origines animales (matières fécales de volailles, bovins et porcins et prélèvements nasaux de porcins). Les analyses WGS ont démontré l'efficacité de ce protocole étant donné que 100% des bactéries isolées étaient porteuses d'au moins un déterminant de résistance au linézolide. Ces mêmes analyses ont également mis en évidence une forte diversité au sein des bactéries étudiées que ce soit au niveau des organisations génétiques entourant les gènes de résistance au linézolide ou au niveau des lignées bactériennes. En plus des objectifs fixés, un outil d'analyses des données de WGS a été développé avec l'aide du service « Activités transversales en génomique appliquée » de Sciensano. Il s'agit d'un outil informatique (appelé *pipeline*) pour l'analyse automatisée des données de WGS obtenues pour les isolats du projet LIN-RES. Cet outil analyse la qualité des reads, assemble les reads, analyses la qualité de l'assemblage, détecte les déterminants de résistance (gènes et mutations connus), les facteurs de virulence connus, caractérise les plasmides dans la mesure du possible (assemblage des reads qui seraient plasmidiques, détermination des réplicons et détections des déterminants de résistances issus de l'assemblage des reads potentiellement plasmidiques) et enfin, détermine les profils STs et cgMLSTs des isolats. Il aurait été intéressant de pouvoir faire des recherches plus approfondies au niveau des fermes à l'origine des échantillons porteurs de bactéries résistantes au linézolide étudiés pour voir si d'autres animaux (de l'exploitation ou de compagnie), les travailleurs et/ou les membres de la famille vivant sur place étaient également porteurs ou pas. Ceci était prévu au début du projet. En effet, les estimations de cas d'échantillons positifs pour des bactéries résistantes au linézolide laissaient croire que peu de cas seraient trouvés. Dans cette optique, il était alors prévu d'aller échantillonner les fermes concernées par des cas positifs afin d'alimenter le plus possible la collection de bactéries résistantes. Toujours dans l'optique

d'augmenter la taille de la collection de bactéries résistantes pour le projet, des contacts avaient été établis avec d'autres pays pour collecter d'autres bactéries résistantes. Ceci dans le but de pouvoir comparer les génomes des bactéries provenant de différentes régions géographiques. Cependant, les collaborateurs du projet n'ont pas pu nous fournir de bactéries résistantes. Il aurait également été intéressant de pouvoir échantillonner les eaux et les terres de ces exploitations pour ajouter un volet « environnement » au projet. Vu le nombre de cas positifs observés durant ce travail, ces investigations n'ont pu être faites dans le cadre de ce projet. De telles investigations seraient intéressantes à mener à l'avenir. Plusieurs cas de co-occurrences de gènes de résistance au linézolide ont été observés durant ce travail dont une triple-occurrence. Il n'a pas été possible durant ce travail de reconstituer les plasmides qui sont impliqués ici mais un séquençage MinION des isolats ou l'extraction et purification des plasmides suivies de PCR permettrait sans doute d'identifier les plasmides porteurs des gènes de résistance au linézolide. Il serait intéressant de pouvoir déterminer si les gènes de résistance au linézolide retrouvés dans ces co-occurrences sont portés par un même élément génétique mobile ou pas afin de savoir s'ils sont transférables ensemble, séparément ou pas du tout. S'ils sont portés par différents éléments, le taux de propagation de la résistance au linezolide pourrait s'en retrouver augmenté. Ceci montre l'importance de savoir quels déterminants sont impliqués dans une résistance mais également combien et quel est leur environnement génétique et par quels éléments ils sont portés. La détermination du taux de transfert des gènes *cfr*, *optrA* et *poxtA* apporterait encore plus d'informations quant à la capacité à se propager de ces gènes. Des expériences de conjugaison sont actuellement effectuées sur des isolats de l'étude. Enfin, afin de pouvoir ajouter un argument en faveur de l'implication de l'utilisation des phénicols dans la sélection des gènes de résistance au linézolide, il faudrait étudier les consommations de florfénicol dans les fermes dans lesquelles des bactéries résistantes au linézolide ont été trouvées. Une étude est également actuellement en cours pour répondre à cette question. Il est à noter cependant que les phénicols ne sont que très peu utilisés chez la volaille en Belgique (uniquement chez les poulets de chair et en faible quantité) (communication personnelle). La question est donc de savoir ce qui pourrait sélectionner la résistance au linézolide chez la volaille. La tétracycline est utilisée chez la volaille mais seulement 5 isolats sur les 14 isolés de poulets de chair portent un gène *poxtA* conférant

une résistance à cet antibiotique. Il faudrait alors savoir si dans les exploitations des cas positifs de volailles, d'autres animaux PDA sont aussi élevés et porteurs de bactéries ayant des gènes de résistance au linézolide. Si tel était le cas, cela pourrait être une explication. À l'issue de ce travail, l'apport d'une surveillance dédiée pour le linézolide a été mis en lumière. Afin de réellement pouvoir comparer les résultats d'une telle surveillance, il faudrait qu'elle se fasse de la même manière que la surveillance officielle non sélective (pour la surveillance chez les entérocoques par exemple) : un même échantillon devrait être étalé sur S&B et sur S&B avec linézolide (à 4mg/L) et incubé 48h. De là, les même étapes devraient être réalisées : isolement selon la morphologie et identification par MALDI-TOF (pour avoir *E. faecium* et *E. faecalis*), et détermination des CMI. Enfin, une question à laquelle il n'a pas été possible de répondre dans le cadre de ce travail est l'origine de cette résistance. En effet, est-ce que cette résistance est apparue d'abord chez les animaux, chez les humains ? La première observation d'un gène de résistance au linézolide s'est faite chez une souche animale (Schwarz et al., 2000) mais cela ne répond pas à la question. Cette question pourrait faire l'objet d'un projet de recherche à elle toute seule tellement l'étendue du travail semble énorme.

L'ensemble de ce travail a permis de développer des méthodes pouvant mettre en évidence la présence de déterminants génétiques de résistance aux antibiotiques chez des bactéries d'origines diverses. Ces outils et notamment l'AMR-ARRAY, pourront être un atout non seulement pour les surveillances de la RAM mais également en recherche.

Une bonne gestion de l'utilisation des antibiotiques est primordiale afin de mener à bien la lutte contre la RAM. Il a en effet été montré que l'utilisation abusive des antibiotiques menait à l'augmentation des taux de résistance (Bush, 2018) et au contraire, que s'ils n'étaient plus utilisés, les occurrences des résistances à ceux-ci diminuaient (van den Bogaard et al., 2000; Roberts and Schwarz, 2016; Tang et al., 2019; Y. Wang et al., 2020; Hamel et al., 2021). Ce travail a montré que l'utilisation d'antibiotiques considérés comme peu importants pour la médecine humaine (échelon le plus bas dans l'importance des antibiotiques de l'OMS) chez les animaux de rente (par exemple les phénicols) pourrait être impliqué dans la sélection de gènes de résistance transférables à des antibiotiques d'importance critique (échelon le plus haut dans l'importance

des antibiotiques de l'OMS) pour la médecine humaine. La combinaison des surveillances phénotypiques, génétiques et de l'utilisation des antibiotiques pourrait servir à la mise en place et au suivi d'un système de rotation dans l'utilisation des antibiotiques. Comme expliqué plus haut, l'utilisation des antibiotiques influe sur l'occurrence des résistances ; une occurrence importante d'une résistance dans un secteur serait l'indication qu'il faut diminuer/améliorer l'utilisation du ou des antibiotiques concernés par cette résistance pour peut-être favoriser l'utilisation d'autres antibiotiques pour lesquels les occurrences de résistance sont plus basses. En parallèle, les analyses génétiques, via notamment les outils développés durant cette thèse (l'AMR-ARRAY, le protocole de sélection de bactéries porteuses de déterminants de résistance au linézolide, le pipeline pour les analyses WGS pour le projet LIN-RES), permettraient de déterminer si les facteurs génétiques responsables de la/des résistances sont potentiellement transférables et s'il peut y avoir des co- et/ou cross-sélections. En effet, connaître les déterminants de résistance qui circulent, ceux qui sont localisés dans un même isolat, voire sur un même plasmide est quelque chose d'important pour l'adoption d'une mesure telle qu'une rotation de l'utilisation des antibiotiques comme proposé ci-dessus.

S'intégrer dans une perspective *One Health* demande des adaptations à différents niveaux et demande également des moyens techniques, des investissements et le développement de méthodes adaptées. Un souci majeur lorsque l'on parle d'augmenter les moyens techniques est le financement. La mise en place de nouvelles analyses, l'installation de nouveau matériel et cætera, demande en effet des fonds. Cependant, la résistance aux antibiotiques coûte elle aussi de l'argent, même beaucoup d'argent (Jim O'Niel, 2016). Un investissement permettrait, sur le long terme, non seulement d'économiser de l'argent mais également de sauver des vies. En effet, comme déjà évoqué plus haut, le nombre de morts causés actuellement par la résistance aux antimicrobiens (chiffres de 2016) serait de 700 000 voire 1 000 000 par an et ce nombre pourrait passer à 10 000 000 de morts par an en 2050 (Figure 20) (Jim O'Niel, 2016). Les chiffres ne sont guère meilleurs dans les estimations de l'ECDC qui estime à 33 000 décès chaque année dans l'UE et l'espace économique européen. En Belgique, ce nombre atteint 530 par an selon l'OCDE (Organisation de coopération et de développement économiques) et atteindrait 22 500 d'ici 2050

(Anonymous, 2021h). Le combat contre la résistance aux antibiotiques est donc d'ordre capital et doit être une priorité pour l'ensemble des acteurs concernés.

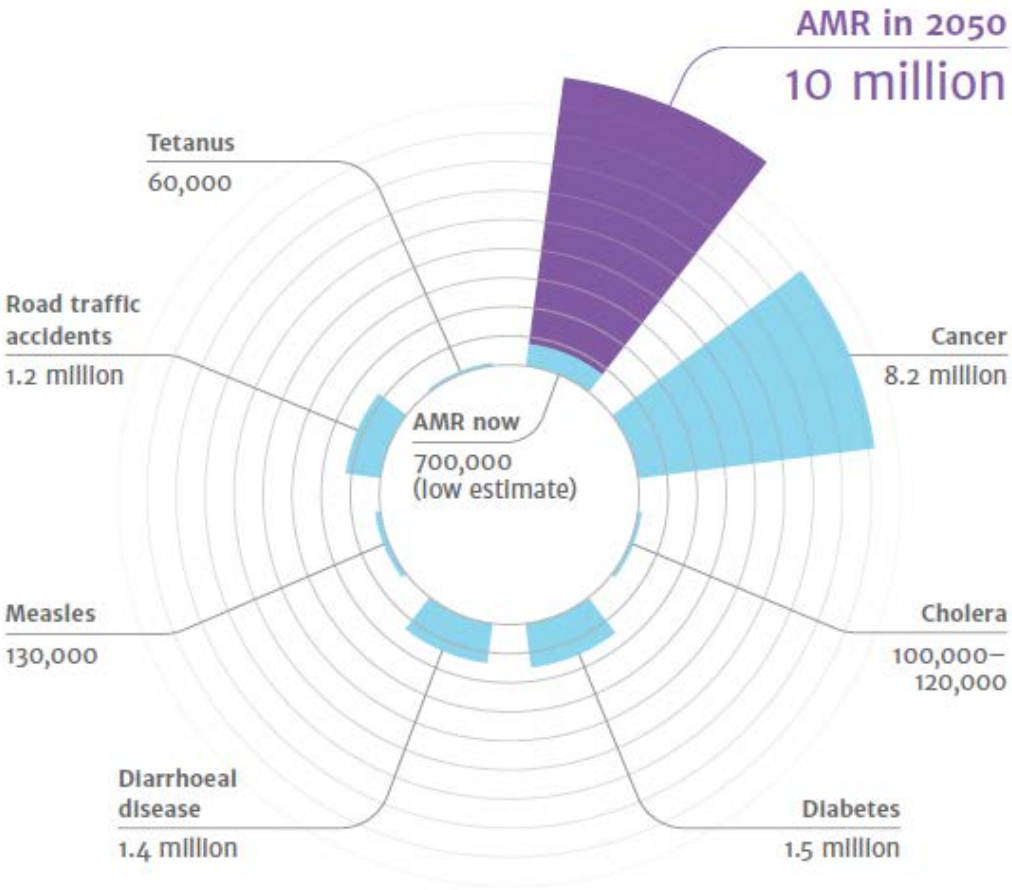


Figure 20: mort attribuable à la résistance aux antimicrobiens chaque année dans le monde. Source : Jim O'Niel 2016

Bibliographie

AbuOun, M., Stubberfield, E.J., Duggett, N.A., Kirchner, M., Dormer, L., Nunez-Garcia, J., Randall, L.P., Lemma, F., Crook, D.W., Teale, C., Smith, R.P., Anjum, M.F., 2017. mcr-1 and mcr-2 (mcr-6.1) variant genes identified in Moraxella species isolated from pigs in Great Britain from 2014 to 2015. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 72, 2745–2749. https://doi.org/10.1093/jac/dkx286

Aldred, K.J., Kerns, R.J., Osheroff, N., 2014. Mechanism of quinolone action and resistance. Biochemistry 53, 1565–1574. https://doi.org/10.1021/bi5000564

Alexander Fleming, 1929. On the Antibacterial Action of Cultures of a Penicillium, with Special Reference to their Use in the Isolation of B. influenzæ. Br J Exp Pathol. 10(3), 226–236.

Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., Lipman, D.J., 1990. Basic local alignment search tool. J Mol Biol 215, 403–410. https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2

AMCRA and UGent, 2020. Belgian Veterinary Surveillance of Antibacterial Consumption National consumption report 2019.

Anonymous, 2021a. The One Health European Joint Programme (OHEJP) [WWW Document]. URL https://onehealthejp.eu/about

Anonymous, 2021b. AMCRA Vision 2020 [WWW Document]. URL https://amcra.be/fr/vision-2020/

Anonymous, 2021c. AMCRA Vision 2024 [WWW Document]. URL https://amcra.be/fr/vision-2024/

Anonymous, 2021d. Activités et réalisations relatives à la réduction de l'utilisation d'antibiotiques et de l'antibiorésistance chez les animaux en Belgique 2016 - 2020 [WWW Document]. URL https://www.favv-afsca.be/professionnels/publications/thematiques/reportconvenantAB/_documents/20210622PublikerapportconvenantAB2016-2020_FR.pdf

Anonymous, 2021e. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters Version 11.0, valid from 2021-01-01.

Anonymous, 2021f. AFSCA - Rapports liés à la lutte contre l'antibiorésistance [WWW Document]. URL https://www.favv-afsca.be/productionanimale/antibioresistance/resultats/#cerva

Anonymous, 2021g. Centre National de Référence de Salmonella et Shigella (CNRSS) [WWW Document]. URL https://nrchm.wiv-isp.be/fr/centres_ref_labo/salmonella_et_shigella_spp/Rapports/Forms/AllItems.aspx

Anonymous, 2021h. Projet de plan d'action national belge "One Health" de lutte contre la résistance au antimicrobiens (RAM) 2020-2024 - Draft (Version 07/05/2021) [WWW Document]. URL https://www.health.belgium.be/sites/default/files/uploads/fields/fpshealth_theme_file/fr-draft_amr_one_health_national_plan_cp.pdf

Anonymous, 2020a. 21 JUILLET 2016. - Arrêté royal relatif aux conditions d'utilisation des médicaments par les médecins vétérinaires et par les responsables des animaux [WWW Document]. URL http://www.ejustice.just.fgov.be/cgi_loi/change_lg.pl?language=fr&la=F&cn=2016072106&table_name=loi

Anonymous, 2020b. Rapports BelVet-SAC (Belgian Veterinary Surveillance of Antibiotic Consumption) [WWW Document]. URL https://www.afmps.be/fr/rapports_belvet_sac

Anonymous, 2020c. Agence fédérale pour la sécurité de la chaîne alimentaire (AFSCA) - Rapports liés à la lutte contre l'antibiorésistance [WWW Document]. URL https://www.favv-afsca.be/productionanimale/antibioresistance/resultats/#intro (accessed 7.4.20).

Anonymous, 2020d. Activités et réalisations relatives à la réduction de l'utilisation d'antibiotiques et de l'antibiorésistance chez les animaux en Belgique en 2019 [WWW Document]. URL https://www.favv-

afsca.be/professionnels/publications/thematiques/reportconvenantAB/_documents/20200622_Publiekrapport22_06_2020_finaal_FR.pdf
Anonymous, 2019a. Lutte contre la résistance aux antimicrobiens (AMR) [WWW Document]. URL https://www.health.belgium.be/fr/lutte-contre-la-resistance-aux-antimicrobiens-amr
Anonymous, 2019b. COMMUNICATION DE LA COMMISSION AU PARLEMENT EUROPÉEN, AU CONSEIL ET AU COMITÉ ÉCONOMIQUE ET SOCIAL EUROPÉEN Approche stratégique de l'Union européenne concernant les produits pharmaceutiques dans l'environnement [WWW Document]. URL https://ec.europa.eu/transparency/documents-register/detail?ref=COM(2019)128&lang=fr
Antonelli, A., D'Andrea, M.M., Brenciani, A., Galeotti, C.L., Morroni, G., Pollini, S., Varaldo, P.E., Rossolini, G.M., 2018. Characterization of poxtA, a novel phenicol-oxazolidinone-tetracycline resistance gene from an MRSA of clinical origin. J. Antimicrob. Chemother. 73, 1763–1769. https://doi.org/10.1093/jac/dky088
A.P. Johnson, L., T., M., S., N., W., M., K., M., W., D., L., F., Asboth, F., Allerberger, 2002. Emerging Linezolid-Resistant Enterococcus faecalis and Enterococcus faecium Isolated from Two Austrian Patients in the Same Intensive Care Unit. European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases 21, 751–754. https://doi.org/10.1007/s10096-002-0807-0
Argudín, M.A., Youzaga, S., Dodémont, M., Heinrichs, A., Roisin, S., Deplano, A., Nonhoff, C., Hallin, M., 2019. Detection of optrA-positive enterococci clinical isolates in Belgium. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 38, 985–987. https://doi.org/10.1007/s10096-019-03504-3
Armstrong, E.S., Kostrub, C.F., Cass, R.T., Moser, H.E., Serio, A.W., Miller, G.H., 2012. Aminoglycosides, in: Dougherty, T.J., Pucci, M.J. (Eds.), Antibiotic Discovery and Development. Springer US, Boston, MA, pp. 229–269. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-1400-1_7
Aslam, A., Okafor, C.N., 2021. Shigella, in: StatPearls. StatPearls Publishing, Treasure Island (FL).
Auckland, C., Teare, L., Cooke, F., Kaufmann, M.E., Warner, M., Jones, G., Bamford, K., Ayles, H., Johnson, A.P., 2002. Linezolid-resistant enterococci: report of the first isolates in the United Kingdom. J Antimicrob Chemother 50, 743–746. https://doi.org/10.1093/jac/dkf246
Azzouz, A., Preuss, C.V., 2021. Linezolid, in: StatPearls. StatPearls Publishing, Treasure Island (FL).
Bankevich, A., Nurk, S., Antipov, D., Gurevich, A.A., Dvorkin, M., Kulikov, A.S., Lesin, V.M., Nikolenko, S.I., Pham, S., Prjibelski, A.D., Pyshkin, A.V., Sirotkin, A.V., Vyahhi, N., Tesler, G., Alekseyev, M.A., Pevzner, P.A., 2012. SPAdes: A New Genome Assembly Algorithm and Its Applications to Single-Cell Sequencing. Journal of Computational Biology 19, 455–477. https://doi.org/10.1089/cmb.2012.0021
Batchelor, M., Hopkins, K.L., Liebana, E., Slickers, P., Ehricht, R., Mafura, M., Aarestrup, F., Mevius, D., Clifton-Hadley, F.A., Woodward, M.J., Davies, R.H., Threlfall, E.J., Anjum, M.F., 2008. Development of a miniaturised microarray-based assay for the rapid identification of antimicrobial resistance genes in Gram-negative bacteria. Int J Antimicrob Agents 31, 440–451. https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2007.11.017
Ben Braïek, O., Smaoui, S., 2019. Enterococci: Between Emerging Pathogens and Potential Probiotics. Biomed Res Int 2019, 5938210. https://doi.org/10.1155/2019/5938210
Besser, J.M., 2018. Salmonella epidemiology: A whirlwind of change. Food Microbiol 71, 55–59. https://doi.org/10.1016/j.fm.2017.08.018
Bi, R., Qin, T., Fan, W., Ma, P., Gu, B., 2018. The emerging problem of linezolid-resistant enterococci. J Glob Antimicrob Resist 13, 11–19. https://doi.org/10.1016/j.jgar.2017.10.018
Boland, C., Van Hessche, M., Mahillon, J., Wattiau, P., 2018. A liquid bead array for the identification and characterization of fljB-positive and fljB-negative monophasic variants of Salmonella Typhimurium. Food Microbiol 71, 17–24. https://doi.org/10.1016/j.fm.2017.04.006
Borowiak, M., Fischer, J., Hammerl, J.A., Hendriksen, R.S., Szabo, I., Malorny, B., 2017. Identification of a novel transposon-associated phosphoethanolamine transferase gene, mcr-5, conferring colistin

resistance in d-tartrate fermenting Salmonella enterica subsp. enterica serovar Paratyphi B. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 72, 3317–3324. https://doi.org/10.1093/jac/dkx327
Bortolaia, V., Kaas, R.S., Ruppe, E., Roberts, M.C., Schwarz, S., Cattoir, V., Philippon, A., Allesoe, R.L., Rebelo, A.R., Florensa, A.F., Fagelhauer, L., Chakraborty, T., Neumann, B., Werner, G., Bender, J.K., Stingl, K., Nguyen, M., Coppens, J., Xavier, B.B., Malhotra-Kumar, S., Westh, H., Pinholt, M., Anjum, M.F., Duggett, N.A., Kempf, I., Nykäsenoja, S., Olkkola, S., Wieczorek, K., Amaro, A., Clemente, L., Mossong, J., Losch, S., Ragimbeau, C., Lund, O., Aarestrup, F.M., 2020. ResFinder 4.0 for predictions of phenotypes from genotypes. J. Antimicrob. Chemother. https://doi.org/10.1093/jac/dkaa345
Braz, V.S., Melchior, K., Moreira, C.G., 2020. Escherichia coli as a Multifaceted Pathogenic and Versatile Bacterium. Front Cell Infect Microbiol 10, 548492. https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.548492
Briñas, L., Lantero, M., de Diego, I., Alvarez, M., Zarazaga, M., Torres, C., 2005. Mechanisms of resistance to expanded-spectrum cephalosporins in Escherichia coli isolates recovered in a Spanish hospital. J Antimicrob Chemother 56, 1107–1110. https://doi.org/10.1093/jac/dki370
Bui, T., Preuss, C.V., 2021. Cephalosporins, in: StatPearls. StatPearls Publishing, Treasure Island (FL).
Bush, K., 2018. Past and Present Perspectives on β-Lactamases. Antimicrob Agents Chemother 62. https://doi.org/10.1128/AAC.01076-18
Bush, K., 2013a. The ABCD's of β-lactamase nomenclature. J Infect Chemother 19, 549–559. https://doi.org/10.1007/s10156-013-0640-7
Bush, K., 2013b. Proliferation and significance of clinically relevant β-lactamases. Ann N Y Acad Sci 1277, 84–90. https://doi.org/10.1111/nyas.12023
Carattoli, A., Villa, L., Feudi, C., Curcio, L., Orsini, S., Luppi, A., Pezzotti, G., Magistrali, C.F., 2017. Novel plasmid-mediated colistin resistance *mcr-4 g* ene in *Salmonella* and *Escherichia coli* , Italy 2013, Spain and Belgium, 2015 to 2016. Euro Surveill. 22, 30589. https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2017.22.31.30589
Caroff, N., Espaze, E., Gautreau, D., Richet, H., Reynaud, A., 2000. Analysis of the effects of -42 and -32 ampC promoter mutations in clinical isolates of Escherichia coli hyperproducing ampC. J Antimicrob Chemother 45, 783–788. https://doi.org/10.1093/jac/45.6.783
Carroll, L.M., Gaballa, A., Guldimann, C., Sullivan, G., Henderson, L.O., Wiedmann, M., 2019. Identification of Novel Mobilized Colistin Resistance Gene *mcr-9* in a Multidrug-Resistant, Colistin-Susceptible *Salmonella enterica* Serotype Typhimurium Isolate. mBio 10, e00853-19, /mbio/10/3/mBio.00853-19.atom. https://doi.org/10.1128/mBio.00853-19
Cars, O., Odenholt-Tornqvist, I., 1993. The post-antibiotic sub-MIC effect in vitro and in vivo. J Antimicrob Chemother 31 Suppl D, 159–166. https://doi.org/10.1093/jac/31.suppl_d.159
Ceyssens, P.-J., Garcia-Graells, C., Fux, F., Botteldoorn, N., Mattheus, W., Wuyts, V., De Keersmaecker, S., Dierick, K., Bertrand, S., 2016. Development of a Luminex xTAG® assay for cost-effective multiplex detection of β-lactamases in Gram-negative bacteria. J Antimicrob Chemother 71, 2479–2483. https://doi.org/10.1093/jac/dkw201
Chaudhuri, R.R., Henderson, I.R., 2012. The evolution of the Escherichia coli phylogeny. Infect Genet Evol 12, 214–226. https://doi.org/10.1016/j.meegid.2012.01.005
Check-Points [WWW Document], 2021. URL https://check-pointshealth.com/
Chisholm, S.A., Dave, J., Ison, C.A., 2010. High-Level Azithromycin Resistance Occurs in *Neisseria gonorrhoeae* as a Result of a Single Point Mutation in the 23S rRNA Genes. Antimicrob Agents Chemother 54, 3812–3816. https://doi.org/10.1128/AAC.00309-10
Clancy, J., Petitpas, J., Dib-Hajj, F., Yuan, W., Cronan, M., Kamath, A.V., Bergeron, J., Retsema, J.A., 1996. Molecular cloning and functional analysis of a novel macrolide-resistance determinant, mefA, from Streptococcus pyogenes. Mol Microbiol 22, 867–879. https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1996.01521.x

Coates, R., Moran, J., Horsburgh, M.J., 2014. Staphylococci: colonizers and pathogens of human skin. Future Microbiol 9, 75–91. https://doi.org/10.2217/fmb.13.145

CODA-CERVA, 2016. Antimicrobial resistance in methicillin-resistant Staphylococcus aureus from pigs in 2016 in Belgium [WWW Document]. URL http://www.afsca.be/productionanimale/antibioresistance/resultats/_documents/2016MRSApigs.pdf

CODA-CERVA, 2013a. Report antimicrobial resistance in commensal Enterococcus spp. from poultry, pigs, cows and veal calves, 2013 [WWW Document]. URL http://www.favv.be/productionanimale/antibioresistance/resultats/_documents/2013AMRenterococcusanimals.pdf

CODA-CERVA, 2013b. MRSA surveillance 2013: Pigs [WWW Document]. URL http://10.253.130.229/images/pdf/Report%20MRSA%20Pigs%20data%202013.pdf

CODA-CERVA, 2012. Report antimicrobial resistance in commensal Enterococcus spp. from poultry, pigs, cows and veal calves, 2012 [WWW Document]. URL http://www.favv.be/productionanimale/antibioresistance/resultats/_documents/2012AMRenterococcusanimals.pdf

CODA-CERVA, 2011. Report antimicrobial resistance in commensal Enterococcus spp. from poultry, pigs, cows and veal calves, 2011 [WWW Document]. URL http://www.afsca.be/dierlijkeproductie/antibioticaresistentie/resultaten/_documents/2011AMRenterococcusanimals.pdf

Cohen Stuart, J., Dierikx, C., Al Naiemi, N., Karczmarek, A., Van Hoek, A.H.A.M., Vos, P., Fluit, A.C., Scharringa, J., Duim, B., Mevius, D., Leverstein-Van Hall, M.A., 2010. Rapid detection of TEM, SHV and CTX-M extended-spectrum β-lactamases in Enterobacteriaceae using ligation-mediated amplification with microarray analysis. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 65, 1377–1381. https://doi.org/10.1093/jac/dkq146

Courvalin, P., 2008. LA RÉSISTANCE DES BACTÉRIES AUX ANTIBIOTIQUES : COMBINAISONS DE MÉCANISMES BICHIMIQUES ET GÉNÉTIQUES. Bul. de l'Ac. Vét. de France 7. https://doi.org/10.4267/2042/47917

Crombé, F., Willems, G., Dispas, M., Hallin, M., Denis, O., Suetens, C., Gordts, B., Struelens, M., Butaye, P., 2012. Prevalence and Antimicrobial Susceptibility of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Among Pigs in Belgium. Microbial Drug Resistance 18, 125–131. https://doi.org/10.1089/mdr.2011.0138

Dejoies, L., Boukthir, S., Péan de Ponfilly, G., Le Guen, R., Zouari, A., Potrel, S., Collet, A., Auger, G., Jacquier, H., Fihman, V., Dortet, L., Cattoir, V., 2020. Performance of commercial methods for linezolid susceptibility testing of Enterococcus faecium and Enterococcus faecalis. J Antimicrob Chemother 75, 2587–2593. https://doi.org/10.1093/jac/dkaa180

Denis, O., Suetens, C., Hallin, M., Catry, B., Ramboer, I., Dispas, M., Willems, G., Gordts, B., Butaye, P., Struelens, M.J., 2009. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* ST398 in Swine Farm Personnel, Belgium. Emerg. Infect. Dis. 15, 1098–1101. https://doi.org/10.3201/eid1507.080652

Deshpande, L.M., Ashcraft, D.S., Kahn, H.P., Pankey, G., Jones, R.N., Farrell, D.J., Mendes, R.E., 2015. Detection of a New cfr-Like Gene, cfr(B), in Enterococcus faecium Isolates Recovered from Human Specimens in the United States as Part of the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. Antimicrob. Agents Chemother. 59, 6256–6261. https://doi.org/10.1128/AAC.01473-15

Diekema, D.I., Jones, R.N., 2000. Oxazolidinones: a review. Drugs 59, 7–16. https://doi.org/10.2165/00003495-200059010-00002

ECDC, 2016. EU protocol for harmonised monitoring of antimicrobial resistance in human Salmonella and Campylobacter isolates: June 2016. Publications Office, LU.

ECDC, EFSA and EMA, 2021. Antimicrobial consumption and resistance in bacteria from humans and animals [WWW Document]. URL https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/JIACRA-III-Antimicrobial-Consumption-and-Resistance-in-Bacteria-from-Humans-and-Animals.pdf

EFSA, 2008. Report from the Task Force on Zoonoses Data Collection including guidance for harmonized monitoring and reporting of antimicrobial resistance in commensal Escherichia coli and Enterococcus spp. from food animals. The EFSA Journal (2008) 141 1-44 [WWW Document]. URL https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.2903/j.efsa.2008.141r

EFSA and ECDC, 2021. The European Union Summary Report on Antimicrobial Resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2018/2019. EFS2 19. https://doi.org/10.2903/j.efsa.2021.6490

EFSA and ECDC, 2017. The European Union summary report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2015. EFSA Journal 15(2):4694, 212 pp. https://doi.org/10.2903/j.efsa.2017.4694

Egan, S.A., Shore, A.C., O'Connell, B., Brennan, G.I., Coleman, D.C., 2020. Linezolid resistance in Enterococcus faecium and Enterococcus faecalis from hospitalized patients in Ireland: high prevalence of the MDR genes optrA and poxtA in isolates with diverse genetic backgrounds. J Antimicrob Chemother 75, 1704–1711. https://doi.org/10.1093/jac/dkaa075

El-Sayed Ahmed, M.A.E.-G., Zhong, L.-L., Shen, C., Yang, Y., Doi, Y., Tian, G.-B., 2020. Colistin and its role in the Era of antibiotic resistance: an extended review (2000-2019). Emerg Microbes Infect 9, 868–885. https://doi.org/10.1080/22221751.2020.1754133

Enright, M.C., Robinson, D.A., Randle, G., Feil, E.J., Grundmann, H., Spratt, B.G., 2002. The evolutionary history of methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA). Proc Natl Acad Sci U S A 99, 7687–7692. https://doi.org/10.1073/pnas.122108599

Ero, R., Kumar, V., Su, W., Gao, Y., 2019. Ribosome protection by ABC-F proteins—Molecular mechanism and potential drug design. Protein Science 28, 684–693. https://doi.org/10.1002/pro.3589

Ettayebi, M., Prasad, S.M., Morgan, E.A., 1985. Chloramphenicol-erythromycin resistance mutations in a 23S rRNA gene of Escherichia coli. J Bacteriol 162, 551–557. https://doi.org/10.1128/JB.162.2.551-557.1985

EUCAST, 2021. MIC and zone diameter distributions and ECOFFs [WWW Document].

EUCAST, 2020. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing [WWW Document]. URL https://www.eucast.org/

European Union, 2020. COMMISSION IMPLEMENTING DECISION (EU) 2020/1729 of 17 November 2020 [WWW Document]. URL https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:32020D1729&from=FR

European Union, 2013. 2013/652/EU: Commission Implementing Decision of 12 November 2013 on the monitoring and reporting of antimicrobial resistance in zoonotic and commensal bacteria (notified under document C(2013) 7145) Text with EEA relevance [WWW Document]. URL https://op.europa.eu/en/publication-detail/-/publication/83e1934f-4d39-11e3-ae03-01aa75ed71a1

European Union, 2003. DIRECTIVE 2003/99/EC OF THE EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL of 17 November 2003 [WWW Document]. URL http://extwprlegs1.fao.org/docs/pdf/eur40333.pdf

FASFC, 2020. Federal Agency for the Safety of the Food Chain (FASFC) [WWW Document]. URL http://www.favv.be/productionanimale/antibioresistance/resultats/#sciensano

Fröhlich, C., Chen, J.Z., Gholipour, S., Erdogan, A.N., Tokuriki, N., 2021. Evolution of β-lactamases and enzyme promiscuity. Protein Eng Des Sel 34. https://doi.org/10.1093/protein/gzab013

Garau, J., Wilson, W., Wood, M., Carlet, J., 1997. Fourth-generation cephalosporins: a review of in vitro activity, pharmacokinetics, pharmacodynamics and clinical utility. Clinical Microbiology and Infection 3, S87–S101. https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.1997.tb00649.x

García, V., García-Meniño, I., Mora, A., Flament-Simon, S.C., Díaz-Jiménez, D., Blanco, J.E., Alonso, M.P., Blanco, J., 2018. Co-occurrence of mcr-1, mcr-4 and mcr-5 genes in multidrug-resistant ST10 Enterotoxigenic and Shiga toxin-producing Escherichia coli in Spain (2006-2017). International Journal of Antimicrobial Agents 52, 104–108. https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2018.03.022

GENESIG - Antibiotic Resistance: blaGES [WWW Document], 2021. URL https://www.genesig.com/products/9670-antibiotic-resistance-blages

Ghai, I., Ghai, S., 2018. Understanding antibiotic resistance via outer membrane permeability. IDR Volume 11, 523–530. https://doi.org/10.2147/IDR.S156995

Gomes, C., Martínez-Puchol, S., Palma, N., Horna, G., Ruiz-Roldán, L., Pons, M.J., Ruiz, J., 2017. Macrolide resistance mechanisms in *Enterobacteriaceae* : Focus on azithromycin. Critical Reviews in Microbiology 43, 1–30. https://doi.org/10.3109/1040841X.2015.1136261

Gonzales, R.D., Schreckenberger, P.C., Graham, M.B., Kelkar, S., DenBesten, K., Quinn, J.P., 2001. Infections due to vancomycin-resistant Enterococcus faecium resistant to linezolid. The Lancet 357, 1179. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(00)04376-2

Guerin, F., Sassi, M., Dejoies, L., Zouari, A., Schutz, S., Potrel, S., Auzou, M., Collet, A., Lecointe, D., Auger, G., Cattoir, V., 2020. Molecular and functional analysis of the novel cfr(D) linezolid resistance gene identified in Enterococcus faecium. J Antimicrob Chemother 75, 1699–1703. https://doi.org/10.1093/jac/dkaa125

Guérin, V., Thiry, D., Lucas, P., Blanchard, Y., Cawez, F., Mercuri, P.S., Galleni, M., Saulmont, M., Mainil, J., 2021. Identification of β-Lactamase-Encoding (bla) Genes in Phenotypically β-Lactam-Resistant Escherichia coli Isolated from Young Calves in Belgium. Microb Drug Resist. https://doi.org/10.1089/mdr.2020.0472

Hadjadj, L., Baron, S.A., Olaitan, A.O., Morand, S., Rolain, J.-M., 2019. Co-occurrence of Variants of mcr-3 and mcr-8 Genes in a Klebsiella pneumoniae Isolate From Laos. Front Microbiol 10, 2720. https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02720

Hamel, M., Rolain, J.-M., Baron, S.A., 2021. The History of Colistin Resistance Mechanisms in Bacteria: Progress and Challenges. Microorganisms 9. https://doi.org/10.3390/microorganisms9020442

Hopkins, K.L., Davies, R.H., Threlfall, E.J., 2005. Mechanisms of quinolone resistance in Escherichia coli and Salmonella: Recent developments. International Journal of Antimicrobial Agents 25, 358–373. https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2005.02.006

Huehn, S., Malorny, B., 2009. DNA microarray for molecular epidemiology of Salmonella. Methods Mol Biol 551, 249–285. https://doi.org/10.1007/978-1-60327-999-4_19

Humboldt-Dachroeden, S., Rubin, O., Sylvester Frid-Nielsen, S., 2020. The state of One Health research across disciplines and sectors – a bibliometric analysis. One Health 10, 100146. https://doi.org/10.1016/j.onehlt.2020.100146

Hutchings, M.I., Truman, A.W., Wilkinson, B., 2019. Antibiotics: past, present and future. Curr Opin Microbiol 51, 72–80. https://doi.org/10.1016/j.mib.2019.10.008

Jacoby, G.A., 2009. AmpC β-Lactamases. Clin Microbiol Rev 22, 161–182. https://doi.org/10.1128/CMR.00036-08

Jana, S., Deb, J.K., 2006. Molecular understanding of aminoglycoside action and resistance. Appl Microbiol Biotechnol 70, 140–150. https://doi.org/10.1007/s00253-005-0279-0

Jim O'Niel, 2016. TACKLING DRUG-RESISTANT INFECTIONS GLOBALLY: FINAL REPORT AND RECOMMENDATIONS. The Review on Antimicrobial Resistance.

Kerr, I.D., 2004. Sequence analysis of twin ATP binding cassette proteins involved in translational control, antibiotic resistance, and ribonuclease L inhibition. Biochem Biophys Res Commun 315, 166–173. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.01.044

Klein, N.C., Cunha, B.A., 1995. Third-generation cephalosporins. Med Clin North Am 79, 705–719. https://doi.org/10.1016/s0025-7125(16)30034-7

Koch-Weser, J., Sidel, V.W., Federman, E.B., Kanarek, P., Finer, D.C., Eaton, A.E., 1970. Adverse effects of sodium colistimethate. Manifestations and specific reaction rates during 317 courses of therapy. Ann Intern Med 72, 857–868. https://doi.org/10.7326/0003-4819-72-6-857

Lauri, A., Castiglioni, B., Mariani, P., 2011. Comprehensive analysis of Salmonella sequence polymorphisms and development of a LDR-UA assay for the detection and characterization of selected serotypes. Appl Microbiol Biotechnol 91, 189–210. https://doi.org/10.1007/s00253-011-3308-1

Lazaris, A., Coleman, D.C., Kearns, A.M., Pichon, B., Kinnevey, P.M., Earls, M.R., Boyle, B., O'Connell, B., Brennan, G.I., Shore, A.C., 2017. Novel multiresistance cfr plasmids in linezolid-resistant methicillin-resistant Staphylococcus epidermidis and vancomycin-resistant Enterococcus faecium (VRE) from a hospital outbreak: co-location of cfr and optrA in VRE. J Antimicrob Chemother 72, 3252–3257. https://doi.org/10.1093/jac/dkx292

Li, B., Zhao, Z.-C., Wang, M.-H., Huang, X.-H., Pan, Y.-H., Cao, Y.-P., 2014. Antimicrobial resistance and integrons of commensal Escherichia coli strains from healthy humans in China. J Chemother 26, 190–192. https://doi.org/10.1179/1973947813Y.0000000113

Li, D., Wang, Y., Schwarz, S., Cai, J., Fan, R., Li, J., Feßler, A.T., Zhang, R., Wu, C., Shen, J., 2016. Co-location of the oxazolidinone resistance genes optrA and cfr on a multiresistance plasmid from Staphylococcus sciuri. J Antimicrob Chemother 71, 1474–1478. https://doi.org/10.1093/jac/dkw040

Li, D., Wu, C., Wang, Y., Fan, R., Schwarz, S., Zhang, S., 2015. Identification of Multiresistance Gene *cfr* in Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus from Pigs: Plasmid Location and Integration into a Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* Complex. Antimicrob. Agents Chemother. 59, 3641–3644. https://doi.org/10.1128/AAC.00500-15

Liakopoulos, A., Mevius, D., Ceccarelli, D., 2016. A Review of SHV Extended-Spectrum β-Lactamases: Neglected Yet Ubiquitous. Front Microbiol 7, 1374. https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01374

Liu, Y.-Y., Wang, Y., Walsh, T.R., Yi, L.-X., Zhang, R., Spencer, J., Doi, Y., Tian, G., Dong, B., Huang, X., Yu, L.-F., Gu, D., Ren, H., Chen, X., Lv, L., He, D., Zhou, H., Liang, Z., Liu, J.-H., Shen, J., 2016. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. The Lancet Infectious Diseases 16, 161–168. https://doi.org/10.1016/S1473-3099(15)00424-7

Long, K.S., Poehlsgaard, J., Kehrenberg, C., Schwarz, S., Vester, B., 2006. The Cfr rRNA methyltransferase confers resistance to Phenicols, Lincosamides, Oxazolidinones, Pleuromutilins, and Streptogramin A antibiotics. Antimicrob. Agents Chemother. 50, 2500–2505. https://doi.org/10.1128/AAC.00131-06

Luminex - MagPlex-TAG™ Microspheres [WWW Document], 2021. URL https://www.luminexcorp.com/magplex-tag-microspheres/

Mader, R., Damborg, P., Amat, J.-P., Bengtsson, B., Bourély, C., Broens, E.M., Busani, L., Crespo-Robledo, P., Filippitzi, M.-E., Fitzgerald, W., Kaspar, H., Madero, C.M., Norström, M., Nykäsenoja, S., Pedersen, K., Pokludova, L., Urdahl, A.M., Vatopoulos, A., Zafeiridis, C., Madec, J.-Y., EU-JAMRAI, 2021. Building the European Antimicrobial Resistance Surveillance network in veterinary medicine (EARS-Vet). Euro Surveill 26. https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2021.26.4.2001359

Maffioli, S.I., Sosio, M., Ebright, R.H., Donadio, S., 2019. Discovery, properties, and biosynthesis of pseudouridimycin, an antibacterial nucleoside-analog inhibitor of bacterial RNA polymerase. J Ind Microbiol Biotechnol 46, 335–343. https://doi.org/10.1007/s10295-018-2109-2

Maffioli, S.I., Zhang, Y., Degen, D., Carzaniga, T., Del Gatto, G., Serina, S., Monciardini, P., Mazzetti, C., Guglierame, P., Candiani, G., Chiriac, A.I., Facchetti, G., Kaltofen, P., Sahl, H.-G., Dehò, G., Donadio, S., Ebright, R.H., 2017. Antibacterial Nucleoside-Analog Inhibitor of Bacterial RNA Polymerase. Cell 169, 1240-1248.e23. https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.05.042

Marincola, G., Liong, O., Schoen, C., Abouelfetouh, A., Hamdy, A., Wencker, F.D.R., Marciniak, T., Becker, K., Köck, R., Ziebuhr, W., 2021. Antimicrobial Resistance Profiles of Coagulase-Negative Staphylococci in Community-Based Healthy Individuals in Germany. Front Public Health 9, 684456. https://doi.org/10.3389/fpubh.2021.684456

Matamoros-Recio, A., Franco-Gonzalez, J.F., Forgione, R.E., Torres-Mozas, A., Silipo, A., Martín-Santamaría, S., 2021. Understanding the Antibacterial Resistance: Computational Explorations in Bacterial Membranes. ACS Omega 6, 6041–6054. https://doi.org/10.1021/acsomega.0c05590

Milne, I., Stephen, G., Bayer, M., Cock, P.J.A., Pritchard, L., Cardle, L., Shaw, P.D., Marshall, D., 2013. Using Tablet for visual exploration of second-generation sequencing data. Brief Bioinform 14, 193–202. https://doi.org/10.1093/bib/bbs012

Newman, D.J., Cragg, G.M., 2016. Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. J. Nat. Prod. 79, 629–661. https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.5b01055

OIE, 2021. OIE LIST OF ANTIMICROBIAL AGENTS OF VETERINARY IMPORTANCE (June 2021).

Page M.G.P., 2012. Beta-Lactam Antibiotics. In: Dougherty T., Pucci M. (eds) Antibiotic Discovery and Development. Springer, Boston, MA. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-1400-1_3.

Pai, H., Lyu, S., Lee, J.H., Kim, J., Kwon, Y., Kim, J.W., Choe, K.W., 1999. Survey of extended-spectrum beta-lactamases in clinical isolates of Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae: prevalence of TEM-52 in Korea. J Clin Microbiol 37, 1758–1763. https://doi.org/10.1128/JCM.37.6.1758-1763.1999

Papp-Wallace, K.M., Endimiani, A., Taracila, M.A., Bonomo, R.A., 2011. Carbapenems: past, present, and future. Antimicrob Agents Chemother 55, 4943–4960. https://doi.org/10.1128/AAC.00296-11

Park, Y.-J., Lee, S., Kim, Y.R., Oh, E.-J., Woo, G.-J., Lee, K., 2006. Occurrence of extended-spectrum (beta)-lactamases and plasmid-mediated AmpC (beta)-lactamases among Korean isolates of Proteus mirabilis. J Antimicrob Chemother 57, 156–158. https://doi.org/10.1093/jac/dki408

Perry, C.M., Jarvis, B., 2001. Linezolid: A Review of its Use in the Management of Serious Gram-Positive Infections. Drugs 61, 525–551. https://doi.org/10.2165/00003495-200161040-00008

Peter-Getzlaff, S., Polsfuss, S., Poledica, M., Hombach, M., Giger, J., Böttger, E.C., Zbinden, R., Bloemberg, G.V., 2011. Detection of AmpC beta-lactamase in Escherichia coli: comparison of three phenotypic confirmation assays and genetic analysis. J Clin Microbiol 49, 2924–2932. https://doi.org/10.1128/JCM.00091-11

Phillips, O.A., Sharaf, L.H., 2016. Oxazolidinone antimicrobials: a patent review (2012-2015). Expert Opin Ther Pat 26, 591–605. https://doi.org/10.1517/13543776.2016.1168807

Poeta, P., Costa, D., Rodrigues, J., Torres, C., 2006. Antimicrobial resistance and the mechanisms implicated in faecal enterococci from healthy humans, poultry and pets in Portugal. Int J Antimicrob Agents 27, 131–137. https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2005.09.018

Poirel, L., Jayol, A., Nordmann, P., 2017. Polymyxins: Antibacterial Activity, Susceptibility Testing, and Resistance Mechanisms Encoded by Plasmids or Chromosomes. Clin. Microbiol. Rev. 30, 557–596. https://doi.org/10.1128/CMR.00064-16

Poirel, L., Walsh, T.R., Cuvillier, V., Nordmann, P., 2011. Multiplex PCR for detection of acquired carbapenemase genes. Diagn Microbiol Infect Dis 70, 119–123. https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2010.12.002

Prystowsky, J., Siddiqui, F., Chosay, J., Shinabarger, D.L., Millichap, J., Peterson, L.R., Noskin, G.A., 2001. Resistance to linezolid: characterization of mutations in rRNA and comparison of their occurrences in vancomycin-resistant enterococci. Antimicrob. Agents Chemother. 45, 2154–2156. https://doi.org/10.1128/AAC.45.7.2154-2156.2001

Pucciarelli, M.G., García-Del Portillo, F., 2017. Salmonella Intracellular Lifestyles and Their Impact on Host-to-Host Transmission. Microbiol Spectr 5. https://doi.org/10.1128/microbiolspec.MTBP-0009-2016

Rammelkamp, C.H., Maxon, T., 1942. Resistance of Staphylococcus aureus to the Action of Penicillin. Experimental Biology and Medicine 51, 386–389. https://doi.org/10.3181/00379727-51-13986

Ramsey, C., MacGowan, A.P., 2016. A review of the pharmacokinetics and pharmacodynamics of aztreonam. J. Antimicrob. Chemother. 71, 2704–2712. https://doi.org/10.1093/jac/dkw231

Reading, C., Cole, M., 1977. Clavulanic acid: a beta-lactamase-inhiting beta-lactam from Streptomyces clavuligerus. Antimicrob Agents Chemother 11, 852–857. https://doi.org/10.1128/AAC.11.5.852

Roberts, M.C., Schwarz, S., 2016. Tetracycline and Phenicol Resistance Genes and Mechanisms: Importance for Agriculture, the Environment, and Humans. J Environ Qual 45, 576–592. https://doi.org/10.2134/jeq2015.04.0207

Röderova, M., Halova, D., Papousek, I., Dolejska, M., Masarikova, M., Hanulik, V., Pudova, V., Broz, P., Htoutou-Sedlakova, M., Sauer, P., Bardon, J., Cizek, A., Kolar, M., Literak, I., 2017. Characteristics of Quinolone Resistance in Escherichia coli Isolates from Humans, Animals, and the Environment in the Czech Republic. Front. Microbiol. 7. https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.02147

Schlünzen, F., Zarivach, R., Harms, J., Bashan, A., Tocilj, A., Albrecht, R., Yonath, A., Franceschi, F., 2001. Structural basis for the interaction of antibiotics with the peptidyl transferase centre in eubacteria. Nature 413, 814–821. https://doi.org/10.1038/35101544

Schwarz, S., Kehrenberg, C., Doublet, B., Cloeckaert, A., 2004. Molecular basis of bacterial resistance to chloramphenicol and florfenicol. FEMS Microbiol Rev 28, 519–542. https://doi.org/10.1016/j.femsre.2004.04.001

Schwarz, S., Werckenthin, C., Kehrenberg, C., 2000. Identification of a plasmid-borne chloramphenicol-florfenicol resistance gene in Staphylococcus sciuri. Antimicrob. Agents Chemother. 44, 2530–2533. https://doi.org/10.1128/aac.44.9.2530-2533.2000

Sciensano, 2019. La résistance antimicrobienne chez les E. coli BLSE et Commensales, Campylobacter spp., Salmonella spp., Staphylococcus aureus résistants à la méthicilline (MRSA) et Enterococcus faecalis et faecium isolés des populations d'animaux producteurs d'aliments (production primaire) et des denrées alimentaires en 2019 [WWW Document]. URL http://www.favv.be/productionanimale/antibioresistance/resultats/_documents/Bijlage2-RapportAMR_2019_FR_final.pdf

Sharkey, L.K.R., Edwards, T.A., O'Neill, A.J., 2016. ABC-F Proteins Mediate Antibiotic Resistance through Ribosomal Protection. mBio 7, e01975. https://doi.org/10.1128/mBio.01975-15

Shen, J., Wang, Y., Schwarz, S., 2013. Presence and dissemination of the multiresistance gene cfr in Gram-positive and Gram-negative bacteria. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 68, 1697–1706. https://doi.org/10.1093/jac/dkt092

Shen, Z., Wang, Y., Shen, Y., Shen, J., Wu, C., 2016. Early emergence of mcr-1 in Escherichia coli from food-producing animals. The Lancet Infectious Diseases 16, 293. https://doi.org/10.1016/S1473-3099(16)00061-X

Smith, J.T., Eckhardt, E.M., Hansel, N.B., Eliato, T.R., Martin, I.W., Andam, C.P., 2021. Genomic epidemiology of methicillin-resistant and -susceptible Staphylococcus aureus from bloodstream infections. BMC Infect Dis 21, 589. https://doi.org/10.1186/s12879-021-06293-3

Spratt, B.G., Cromie, K.D., 1988. Penicillin-binding proteins of gram-negative bacteria. Rev Infect Dis 10, 699–711. https://doi.org/10.1093/clinids/10.4.699

Stojković, V., Ulate, M.F., Hidalgo-Villeda, F., Aguilar, E., Monge-Cascante, C., Pizarro-Guajardo, M., Tsai, K., Tzoc, E., Camorlinga, M., Paredes-Sabja, D., Quesada-Gómez, C., Fujimori, D.G., Rodríguez, C., 2019. cfr(B), cfr(C), and a New cfr-Like Gene, cfr(E), in Clostridium difficile Strains Recovered across Latin America. Antimicrob. Agents Chemother. 64. https://doi.org/10.1128/AAC.01074-19

STRECK - Antibiotic Resistance Kits [WWW Document], 2021. URL https://www.streck.com/products/molecular/antibiotic-resistance-kits/

Tang, K.L., Caffrey, N.P., Nóbrega, D.B., Cork, S.C., Ronksley, P.E., Barkema, H.W., Polachek, A.J., Ganshorn, H., Sharma, N., Kellner, J.D., Checkley, S.L., Ghali, W.A., 2019. Comparison of different approaches to antibiotic restriction in food-producing animals: stratified results from a systematic review and meta-analysis. BMJ Glob Health 4, e001710. https://doi.org/10.1136/bmjgh-2019-001710

Tang, Y., Dai, L., Sahin, O., Wu, Z., Liu, M., Zhang, Q., 2017. Emergence of a plasmid-borne multidrug resistance gene cfr(C) in foodborne pathogen Campylobacter. J. Antimicrob. Chemother. 72, 1581–1588. https://doi.org/10.1093/jac/dkx023

Tanner, M., Whittaker, M.A., Waltner-Toews, D., Schelling, E., Zinsstag, J., 2020. One Health, une seule santé. Éditions Quæ.

Tartaglione, T.A., Polk, R.E., 1985. Review of the new second-generation cephalosporins: cefonicid, ceforanide, and cefuroxime. Drug Intell Clin Pharm 19, 188–198. https://doi.org/10.1177/106002808501900304

Tedim, A.P., Ruiz-Garbajosa, P., Corander, J., Rodríguez, C.M., Cantón, R., Willems, R.J., Baquero, F., Coque, T.M., 2015. Population Biology of Intestinal Enterococcus Isolates from Hospitalized and Nonhospitalized Individuals in Different Age Groups. Appl. Environ. Microbiol. 81, 1820–1831. https://doi.org/10.1128/AEM.03661-14

Terreni, M., Taccani, M., Pregnolato, M., 2021. New Antibiotics for Multidrug-Resistant Bacterial Strains: Latest Research Developments and Future Perspectives. Molecules 26. https://doi.org/10.3390/molecules26092671

Timmermans, M., Bogaerts, B., Vanneste, K., De Keersmaecker, S.C.J., Roosens, N.H.C., Kowalewicz, C., Simon, G., Argudín, M.A., Deplano, A., Hallin, M., Wattiau, P., Fretin, D., Denis, O., Boland, C., 2021a. Large diversity of linezolid-resistant isolates discovered in food-producing animals through linezolid selective monitoring in Belgium in 2019. J Antimicrob Chemother 77, 49–57. https://doi.org/10.1093/jac/dkab376

Timmermans, M., Wattiau, P., Denis, O., Boland, C., 2021b. Colistin resistance genes mcr-1 to mcr-5, including a case of triple occurrence (mcr-1, -3 and -5), in Escherichia coli isolates from faeces of healthy pigs, cattle and poultry in Belgium, 2012–2016. International Journal of Antimicrobial Agents 106350. https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2021.106350

Tooke, C.L., Hinchliffe, P., Bragginton, E.C., Colenso, C.K., Hirvonen, V.H.A., Takebayashi, Y., Spencer, J., 2019. β-Lactamases and β-Lactamase Inhibitors in the 21st Century. J Mol Biol 431, 3472–3500. https://doi.org/10.1016/j.jmb.2019.04.002

Tracz, D.M., Boyd, D.A., Hizon, R., Bryce, E., McGeer, A., Ofner-Agostini, M., Simor, A.E., Paton, S., Mulvey, M.R., the Canadian Nosocomial Infection Surveillance Program, 2007. *ampC* gene expression in promoter mutants of cefoxitin-resistant *Escherichia coli* clinical isolates. FEMS Microbiology Letters 270, 265–271. https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2007.00672.x

van den Bogaard, A.E., Bruinsma, N., Stobberingh, E.E., 2000. The effect of banning avoparcin on VRE carriage in The Netherlands. J Antimicrob Chemother 46, 146–148. https://doi.org/10.1093/jac/46.1.146

van Hoek, A.H.A.M., Scholtens, I.M.J., Cloeckaert, A., Aarts, H.J.M., 2005. Detection of antibiotic resistance genes in different Salmonella serovars by oligonucleotide microarray analysis. J Microbiol Methods 62, 13–23. https://doi.org/10.1016/j.mimet.2005.01.004

Vandendriessche, S., Vanderhaeghen, W., Soares, F.V., Hallin, M., Catry, B., Hermans, K., Butaye, P., Haesebrouck, F., Struelens, M.J., Denis, O., 2013. Prevalence, risk factors and genetic diversity of methicillin-resistant Staphylococcus aureus carried by humans and animals across livestock production sectors. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 68, 1510–1516. https://doi.org/10.1093/jac/dkt047

Vázquez-Laslop, N., Mankin, A.S., 2018. How Macrolide Antibiotics Work. Trends Biochem Sci 43, 668–684. https://doi.org/10.1016/j.tibs.2018.06.011

Velkov, T., Thompson, P.E., Nation, R.L., Li, J., 2010. Structure--activity relationships of polymyxin antibiotics. J. Med. Chem. 53, 1898–1916. https://doi.org/10.1021/jm900999h

vitro - master diagnostica: AMR direct flow chip [WWW Document], 2021. URL https://www.vitro.bio/Inter/DNA

Wang, C., Feng, Y., Liu, L., Wei, L., Kang, M., Zong, Z., 2020. Identification of novel mobile colistin resistance gene *mcr-10*. Emerging Microbes & Infections 9, 508–516. https://doi.org/10.1080/22221751.2020.1732231

Wang, X., Wang, Yao, Zhou, Y., Li, J., Yin, W., Wang, S., Zhang, S., Shen, J., Shen, Z., Wang, Yang, 2018. Emergence of a novel mobile colistin resistance gene, *mcr-8* , in NDM-producing *Klebsiella pneumoniae*. Emerging Microbes & Infections 7, 1–9. https://doi.org/10.1038/s41426-018-0124-z

Wang, Y., Lv, Y., Cai, J., Schwarz, S., Cui, L., Hu, Z., Zhang, R., Li, J., Zhao, Q., He, T., Wang, D., Wang, Z., Shen, Y., Li, Y., Feßler, A.T., Wu, C., Yu, H., Deng, X., Xia, X., Shen, J., 2015. A novel gene, optrA, that confers transferable resistance to oxazolidinones and phenicols and its presence in Enterococcus faecalis and Enterococcus faecium of human and animal origin. J. Antimicrob. Chemother. 70, 2182–2190. https://doi.org/10.1093/jac/dkv116

Wang, Y., Xu, C., Zhang, R., Chen, Y., Shen, Y., Hu, F., Liu, D., Lu, J., Guo, Y., Xia, X., Jiang, J., Wang, X., Fu, Y., Yang, L., Wang, J., Li, J., Cai, C., Yin, D., Che, J., Fan, R., Wang, Yongqiang, Qing, Y., Li, Y., Liao, K., Chen, H., Zou, M., Liang, L., Tang, J., Shen, Z., Wang, S., Yang, X., Wu, C., Xu, S., Walsh, T.R., Shen, J., 2020. Changes in colistin resistance and mcr-1 abundance in Escherichia coli of animal and human origins following the ban of colistin-positive additives in China: an epidemiological comparative study. Lancet Infect Dis 20, 1161–1171. https://doi.org/10.1016/S1473-3099(20)30149-3

Waters, M., Tadi, P., 2021. Streptomycin, in: StatPearls. StatPearls Publishing, Treasure Island (FL).

Wattiau, P., Whatmore, A.M., Van Hessche, M., Godfroid, J., Fretin, D., 2011. Nucleotide polymorphism-based single-tube test for robust molecular identification of all currently described Brucella species. Appl Environ Microbiol 77, 6674–6679. https://doi.org/10.1128/AEM.00767-11

Weisblum, B., 1995. Erythromycin resistance by ribosome modification. Antimicrob Agents Chemother 39, 577–585. https://doi.org/10.1128/AAC.39.3.577

Werner, G., Fleige, C., Klare, I., Weber, R.E., Bender, J.K., 2019. Validating a screening agar for linezolid-resistant enterococci. BMC Infect Dis 19, 1078. https://doi.org/10.1186/s12879-019-4711-y

White R.J., 2012. The Early History of Antibiotic Discovery: Empiricism Ruled. In: Dougherty T., Pucci M. (eds) Antibiotic Discovery and Development. Springer, Boston, MA. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-1400-1_1.

WHO, 2021. WHO - Antimicrobial resistance [WWW Document]. URL https://www.who.int/health-topics/antimicrobial-resistance

WHO, 2018. Critically Important Antimicrobials for Human Medicine 6th Revision 2018.pdf [WWW Document]. URL https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/312266/9789241515528-eng.pdf?ua=1

Wilke, M.S., Lovering, A.L., Strynadka, N.C., 2005. β-Lactam antibiotic resistance: a current structural perspective. Current Opinion in Microbiology 8, 525–533. https://doi.org/10.1016/j.mib.2005.08.016

Wilson, D.N., Schluenzen, F., Harms, J.M., Starosta, A.L., Connell, S.R., Fucini, P., 2008. The oxazolidinone antibiotics perturb the ribosomal peptidyl-transferase center and effect tRNA positioning. Proceedings of the National Academy of Sciences 105, 13339–13344. https://doi.org/10.1073/pnas.0804276105

Wright, A.J., 1999. The penicillins. Mayo Clin Proc 74, 290–307. https://doi.org/10.4065/74.3.290

Wright, W.W., Welch, H., 1959. Chemical, biological and clinical observations on colistin. Antibiot Annu 7, 61–74.

Xavier, Lammens, C., Ruhal, R., Kumar-Singh, S., Butaye, P., Goossens, H., Malhotra-Kumar, S., 2016. Identification of a novel plasmid-mediated colistin-resistance gene, *mcr-2* , in *Escherichia coli* , Belgium, June 2016. Euro Surveill. 21, 30280. https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2016.21.27.30280

Xu, Z.-Q., Flavin, M.T., Eiznhamer, D.A., 2012. Macrolides and Ketolides, in: Dougherty, T.J., Pucci, M.J. (Eds.), Antibiotic Discovery and Development. Springer US, Boston, MA, pp. 181–228. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-1400-1_6

Yang, Y.-Q., Li, Y.-X., Lei, C.-W., Zhang, A.-Y., Wang, H.-N., 2018. Novel plasmid-mediated colistin resistance gene mcr-7.1 in Klebsiella pneumoniae. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 73, 1791–1795. https://doi.org/10.1093/jac/dky111

Yin, W., Li, H., Shen, Y., Liu, Z., Wang, S., Shen, Z., Zhang, R., Walsh, T.R., Shen, J., Wang, Y., 2017a. Erratum for Yin et al., "Novel Plasmid-Mediated Colistin Resistance Gene *mcr-3* in *Escherichia coli* ." mBio 8, e01166-17, /mbio/8/4/e01166-17.atom. https://doi.org/10.1128/mBio.01166-17

Yin, W., Li, H., Shen, Y., Liu, Z., Wang, S., Shen, Z., Zhang, R., Walsh, T.R., Shen, J., Wang, Y., 2017b. Novel Plasmid-Mediated Colistin Resistance Gene mcr-3 in Escherichia coli. mBio 8. https://doi.org/10.1128/mBio.00543-17

Zankari, E., Allesøe, R., Joensen, K.G., Cavaco, L.M., Lund, O., Aarestrup, F.M., 2017. PointFinder: a novel web tool for WGS-based detection of antimicrobial resistance associated with chromosomal point mutations in bacterial pathogens. J. Antimicrob. Chemother. 72, 2764–2768. https://doi.org/10.1093/jac/dkx217

Zuker, M., 2003. Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. Nucleic Acids Res 31, 3406–3415. https://doi.org/10.1093/nar/gkg595

Annexes

Annexe 1 : Matériel supplémentaire pour le chapitre 1

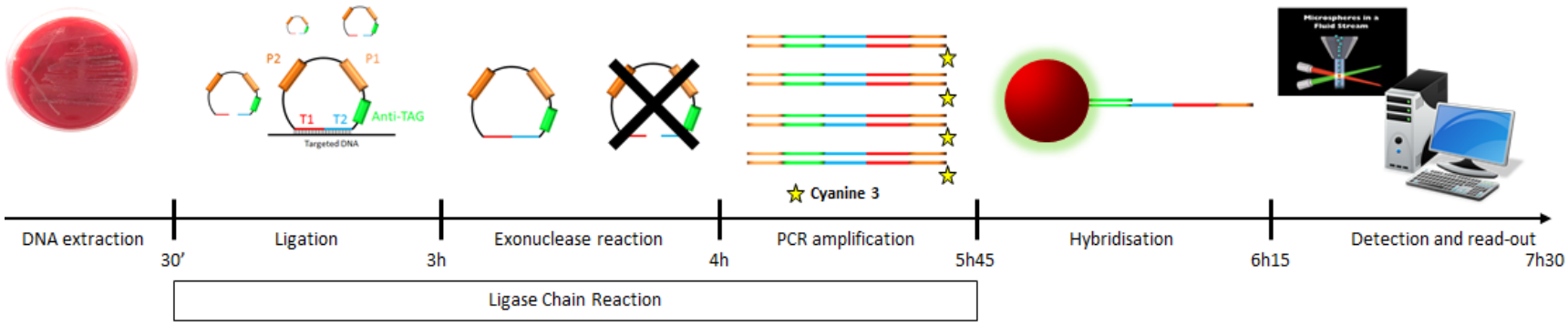


Figure S1: Schematic representation of the AMR-ARRAY with Ligase Chain Reaction (LCR) method. Ligation occurs if a PLP is hybridised to its target sequence. If the targeted gene/SNP is not present the PLP remains linear. During the exonuclease reaction, all linear DNA (linear PLPs included) are degraded. Each PLP carries 2 sequences (P1 and P2 light and dark orange respectively) allowing PCR amplification. The universal reverse primer complementary to the sequence P2 is labeled with CyA-3 for fluorescence detection. PLPs carry also a specific sequence (Anti-TAG in green) corresponding to the coated TAG of the MagPLAX-TAG microspheres (Luminex). Hybridised LCR products and microspheres are analysed on the Luminex® 200™ instrument. A red laser allows bead identification while a green laser allows LCR products detection.

Table S1: control strains and related PLPs

Control strain	Species	Source	PLPs
EURL S-6.3	*Salmonella* spp.	EURL reference strain	SHV-ABL238S, SVH-ABL240K, CTX-M1 group SHV-all
EURL S-7.2	*Salmonella* spp.	EURL reference strain	OXA-10 like, TEM-ABL104E, OXA-1 like, TEM-ABL238G, TEM_all
EURL S-9.4	*Salmonella* spp.	EURL reference strain	CTX-M9 group
EURL S-8.4	*Salmonella* spp.	EURL reference strain	VIM-general
EC OXA-2	*E. coli*	EURL reference strain	OXA-2 like
EC CMY-1	*E. coli*	EURL reference strain	CMY-1 group
Salmonella Paratyphi B 2010/02956	*Salmonella* spp.	Sciensano	CTX-M2 group
EC NDM-1	*E. coli*	EURL reference strain	NDM_all
EURL S-7.6	*Salmonella* spp.	EURL reference strain	ACC-1 like
EC KPC-2	*E. coli*	EURL reference strain	KPC_all
EC pMSC 122	*E. coli*	EURL reference strain	OXA-48 like
EURL S-9.3	*Salmonella* spp.	EURL reference strain	CMY-2 group
MRSA 5 37	*S. aureus*	Sciensano	negative control for LCR
EC ATCC25922	*E. coli*	bought from ATCC collection	negative control for AMR probes
Eco2015 54	*E. coli*	Sciensano	AMPC-chr-M18A, AMPC-chr-M42T
TEM-52b	*E. coli*	EURL reference strain	TEM-ABL104K, TEM-ABL238S, TEM_all
MCR-1	*E. coli*	EURL reference strain	MCR-1
MCR-2	*E. coli*	EURL reference strain	MCR-2
MCR-3	*E. coli*	EURL reference strain	MCR-3
MCR-4	*E. coli*	EURL reference strain	MCR-4
MCR-5	*Salmonella* spp.	EURL reference strain	MCR-5
NRZ 008814	*E. coli*	Ruhr Universität Bochum, GE	CTX-M-8/25 groups
qnrA1	*E. cloacae*	EURL reference strain	qnrA all
qnrB5	*K. pneumoniae*	EURL reference strain	qnrB all

qnrS1	*Salmonella* spp.	EURL reference strain	qnrS all
ECO 168	*E. coli*	Sciensano	ermB, aac(3)-II
U1609778	*E. coli*	Sciensano	mphA, aac(3)-IV, aac(6')-Ib all
U15018730001	*E. coli*	Sciensano	aac(3)-VI
88-438	*E. coli*	Sciensano	aph(3')-VIa
ESBL20150072	*E. coli*	Sample ESBL20150072 from the Bioproject PRJNA514245	rmtB
EURL E. COLI 2	*E. coli*	EURL reference strain	ant(2'')-Ia
MCR-6	*Moraxella pluranimalium*	AbuOun et al 2017(AbuOun et al., 2017)	mcr-6

PLPs controlling the strain species (*Escherichia coli* or *Shigella* spp. (UIDA) and *Salmonella* spp.(INVA)) were controlled with the different *E. coli* and *Salmonella* spp. present in the table. PLPs targeting SNP WT and mutated in *gyrA* and *parC* and SNP WT in the *23SrRNA* gene were controlled with the isolates sequenced by WGS. PLPs targeting SNP mutated in the *23SrRNA* gene and the *mcr-7* and *mcr-8* genes did not have control strains.

Table S2: 251 food-producing animal E. coli isolates tested with the AMR-ARRAY: susceptibility profiles, AMR-ARRAY and NGS results

Sample ID	AZI		COL		CIP and NAL			GEN		ESBL		AmpC		WGS internal Nr	AMR-ARRAY vs. WGS concordance (genes & mutations)
	BMD	Determinant detected with AMR-ARRAY	BMD	Determinant detected with AMR-ARRAY	BMD CIP	BMD NAL	Determinant detected with AMR-ARRAY	BMD	Determinant detected with AMR-ARRAY	BMD	Determinant detected with AMR-ARRAY	BMD	Determinant detected with AMR-ARRAY		
1203686 1STR1	S	-	R	Yes	R	R	Yes	S	-	ND	-	No AmpC	-	VAR-613	Yes
1211226	S	-	R	Yes	S	S	-	S	-	ND	-	No AmpC	-	VAR-614	Yes
1217177	S	-	R	Yes	R	R	Yes	R	Yes	ND	-	No AmpC	-	VAR-632	Yes
1217795	S	-	R	Yes	S	S	-	S	-	ND	-	No AmpC	-	VAR-213	Yes
1220582	S	-	R	Yes	R	R	Yes	S	-	ND	-	No AmpC	-	VAR-615	Yes
1223744	S	-	R	Yes	R	R	Yes	R	Yes	ND	-	No AmpC	-	VAR-214	Yes
1301649 STR1	S	-	R	Yes	S	S	-	S	-	ND	-	No AmpC	-	VAR-215	Yes
1302187 STR1	S	-	R	Yes	R	R	Yes	S	-	ND	-	No AmpC	-	VAR-633	Yes
1303300 STR1	S	-	R	Yes	R	R	Yes	S	-	ND	-	No AmpC	-	VAR-634	Yes
1307926 STR1	S	-	R	Yes	R	R	Yes	R	Yes	ND	-	No AmpC	-	VAR-635	Yes
1309946 STR1	S	-	R	Yes	R	R	Yes	R	Yes	ND	-	No AmpC	-	VAR-636	Yes
1309964 STR1	S	-	R	Yes	R	R	Yes	S	-	ND	-	No AmpC	-	VAR-217	Yes
1309979 STR1	S	-	R	Yes	S	S	-	R	Yes	ND	-	No AmpC	-	VAR-616	Yes
1311456 STR1	S	-	R	Yes	R	R	Yes	S	-	ND	-	No AmpC	-	VAR-637	Yes
1311787 STR1	S	-	R	Yes	R	R	Yes	S	-	ND	-	No AmpC	-	VAR-638	Yes
1314414 STR1	S	-	R	Yes	R	R	Yes	R	Yes	ND	-	No AmpC	-	VAR-639	Yes
1316991 STR1	S	-	R	Yes	R	R	Yes	S	-	ND	-	No AmpC	-	VAR-216	Yes
1402931 1STR1	R	No	R	Yes	S	S	-	S	-	ND	-	No AmpC	-	VAR-640	Yes
1403964 1STR1	S	-	R	Yes	R	R	Yes	R	Yes	ND	-	No AmpC	-	VAR-641	Yes
1405327 1STR1	S	-	R	Yes	R	R	Yes	R	Yes	ND	-	No AmpC	-	VAR-642	Yes
1411966 1STR1	S	-	R	Yes	R	R	Yes	S	-	ND	-	No AmpC	-	No NGS	-
1411979 1STR1	S	-	R	Yes	S	S	-	S	-	ND	-	No AmpC	-	VAR-218	Yes
1505942 1STR1	S	-	S	-	S	S	-	R	Yes	ESBL	Yes	No AmpC	-	VAR-219	Yes
1505942 2STR1	S	-	S	-	S	S	-	R	Yes	ESBL	Yes	No AmpC	-	VAR-356	Yes

Sample ID	AZI		COL		CIP and NAL			GEN		ESBL		AmpC		WGS internal Nr	AMR-ARRAY vs. WGS concordance (genes & mutations)
	BMD	Determinant detected with AMR-ARRAY	BMD	Determinant detected with AMR-ARRAY	BMD CIP	BMD NAL	Determinant detected with AMR-ARRAY	BMD	Determinant detected with AMR-ARRAY	BMD	Determinant detected with AMR-ARRAY	BMD	Determinant detected with AMR-ARRAY		
1505945 1STR1	R	No	S	-	S	S	-	S	-	ESBL	Yes	No AmpC	-	VAR-617	Yes
1505989 1STR1	S	-	S	-	R	R	Yes	R	Yes	ESBL	Yes	No AmpC	-	No NGS	-
1506202 2STR1	S	-	S	-	R	R	Yes	R	Yes	ESBL	Yes	No AmpC	-	No NGS	-
1506205 2STR1	S	-	S	-	R	R	Yes	S	-	BL	-	AmpC	Yes	VAR-274	Yes
1506535 1STR1	R	Yes	S	-	S	S	-	S	-	ESBL	Yes	No AmpC	-	No NGS	-
1506538 1STR1	S	-	S	-	R	R	Yes	S	-	BL	-	AmpC	Yes	VAR-275	Yes
1506539 1STR1	S	-	S	-	R	R	No	R	Yes	ESBL	Yes	No AmpC	-	VAR-618	Yes
1506551 1STR1	R	Yes	R	Yes	R	R	Yes	R	Yes	ESBL	Yes	No AmpC	-	VAR-276	Yes
1506554 1STR1	S	-	S	-	R	R	Yes	R	Yes	ESBL	Yes	No AmpC	-	No NGS	-
1506555 1STR1	S	-	S	-	R	R	Yes	R	Yes	ESBL	Yes	No AmpC	-	No NGS	-
1506932 1STR1	S	-	R	Yes	R	R	Yes	S	-	BL	-	No AmpC	-	VAR-220	Yes
1506934 1STR1	S	-	R	Yes	R	R	Yes	R	Yes	BL	-	No AmpC	-	VAR-221	Yes
1507570 1STR1	R	Yes	S	-	R	R	Yes	R	Yes	ESBL	Yes	No AmpC	-	No NGS	-
1508075 1STR1	S	-	S	-	R	S	Yes	S	-	ESBL	Yes	No AmpC	-	No NGS	-
1508079 1STR1	S	-	S	-	S	S	-	S	-	ESBL	Yes	No AmpC	-	No NGS	-
1508086 1STR1	S	-	S	-	R	R	Yes	R	Yes	ESBL	Yes	No AmpC	-	No NGS	-
1508087 1STR1	S	-	S	-	S	S	-	S	-	ESBL	Yes	No AmpC	-	No NGS	-
1508089 1STR1	S	-	S	-	S	S	-	S	-	ESBL	Yes	No AmpC	-	No NGS	-
1508474 1STR1	S	-	S	-	R	R	Yes	S	-	BL	-	AmpC	Yes	VAR-277	Yes
1508479 1STR2	S	-	R	Yes	R	R	Yes	R	Yes	ESBL	Yes	AmpC	Yes	VAR-278	Yes
1508481 1STR1	S	-	S	-	R	R	Yes	S	-	BL	-	AmpC	Yes	VAR-279	Yes
1508493 1STR1	R	Yes	S	-	R	R	Yes	R	Yes	ESBL	Yes	No AmpC	-	VAR-357	Yes
1508879 1STR1	S	-	S	-	R	R	Yes	R	Yes	ESBL	Yes	No AmpC	-	No NGS	-
1508887 1STR1	S	-	S	-	R	R	Yes	R	Yes	ESBL	Yes	No AmpC	-	No NGS	-
1508888 1STR1	S	-	S	-	R	R	Yes	R	Yes	ESBL	Yes	AmpC	No	No NGS	-

Sample ID	AZI		COL		CIP and NAL			GEN		ESBL		AmpC		WGS internal Nr	AMR-ARRAY vs. WGS concordance (genes & mutations)
	BMD	Determinant detected with AMR-ARRAY	BMD	Determinant detected with AMR-ARRAY	BMD CIP	BMD NAL	Determinant detected with AMR-ARRAY	BMD	Determinant detected with AMR-ARRAY	BMD	Determinant detected with AMR-ARRAY	BMD	Determinant detected with AMR-ARRAY		
1508891 1STR1	S	-	S	-	S	S	-	S	-	BL	-	AmpC	Yes	VAR-280	Yes
1508900 1STR1	S	-	R	Yes	R	R	Yes	R	Yes	ESBL	Yes	No AmpC	-	VAR-224	Yes
1508900 2STR1	R	Yes	R	Yes	R	R	Yes	R	Yes	ESBL	Yes	No AmpC	-	VAR-225	No
1508911 1STR1	S	-	S	-	R	R	Yes	S	-	BL	-	AmpC	Yes	VAR-281	Yes
1509430 2STR1	R	No	S	-	R	R	Yes	S	-	ESBL	Yes	No AmpC	-	VAR-621	Yes
1509438 2STR1	R	Yes	S	-	S	S	-	S	-	ESBL	Yes	No AmpC	-	VAR-359	Yes
1509795 1STR1	R	Yes	R	Yes	R	S	Yes	S	-	ESBL	Yes	No AmpC	-	VAR-226	Yes
1509796 1STR1	S	-	S	-	S	S	-	R	Yes	ESBL	Yes	No AmpC	-	No NGS	-
1509799 1STR1	R	No	S	-	S	S	-	S	-	ESBL	Yes	No AmpC	-	VAR-619	Yes
1509999 1STR1	S	-	S	-	R	R	Yes	R	Yes	ESBL	Yes	No AmpC	-	No NGS	-
1510003 1STR1	R	Yes	S	-	R	R	Yes	S	-	ESBL	Yes	No AmpC	-	No NGS	-
1510007 1STR1	S	-	S	-	R	S	Yes	R	Yes	ESBL	Yes	No AmpC	-	No NGS	-
1510008 1STR1	S	-	S	-	R	R	Yes	R	Yes	ESBL	Yes	No AmpC	-	No NGS	-
1510169 2STR1	R	Yes	S	-	R	R	Yes	R	Yes	ESBL	Yes	No AmpC	-	VAR-360	Yes
1510182 2STR1	R	Yes	S	-	S	S	-	S	-	ESBL	Yes	No AmpC	-	No NGS	-
1510489 1STR1	S	-	S	-	R	S	Yes	S	-	ESBL	Yes	No AmpC	-	VAR-361	Yes
1510668 1STR1	S	-	S	-	S	S	-	R	Yes	ESBL	Yes	No AmpC	-	No NGS	-
1510669 1STR1	R	Yes	S	-	R	S	Yes	R	No	ESBL	Yes	No AmpC	-	VAR-282	Yes
1510672 1STR1	R	Yes	S	-	R	S	Yes	S	-	ESBL	Yes	No AmpC	-	No NGS	-
1510674 1STR1	S	-	S	-	R	R	Yes	S	-	ESBL	Yes	AmpC	Yes	VAR-283	Yes
1510934 1STR1	S	-	S	-	R	R	Yes	R	Yes	ESBL	Yes	No AmpC	-	VAR-362	Yes
1510945 2STR1	R	Yes	S	-	S	S	-	S	-	ESBL	Yes	No AmpC	-	No NGS	-
1510950 1STR1	S	-	S	-	R	S	Yes	R	Yes	ESBL	Yes	No AmpC	-	No NGS	-
1511116 1STR1	S	-	S	-	R	R	Yes	R	Yes	ESBL	Yes	No AmpC	-	VAR-620	Yes
1511124 2STR1	S	-	S	-	R	R	Yes	R	Yes	ESBL	Yes	No AmpC	-	No NGS	-

Sample ID	AZI		COL		CIP and NAL			GEN		ESBL		AmpC		WGS internal Nr	AMR-ARRAY vs. WGS concordance (genes & mutations)
	BMD	Determinant detected with AMR-ARRAY	BMD	Determinant detected with AMR-ARRAY	BMD CIP	BMD NAL	Determinant detected with AMR-ARRAY	BMD	Determinant detected with AMR-ARRAY	BMD	Determinant detected with AMR-ARRAY	BMD	Determinant detected with AMR-ARRAY		
1511127 1STR1	S	-	S	-	R	S	Yes	R	Yes	ESBL	Yes	No AmpC	-	No NGS	-
1511131 1STR1	R	Yes	S	-	S	S	-	S	-	ESBL	Yes	No AmpC	-	No NGS	-
1511333 1STR1	R	Yes	S	-	R	R	Yes	R	Yes	ESBL	Yes	No AmpC	-	VAR-363	Yes
1511421 1STR1	R	Yes	S	-	S	S	-	S	-	ESBL	Yes	No AmpC	-	No NGS	-
1511425 1STR1	S	-	R	Yes	R	R	Yes	R	Yes	ESBL	Yes	No AmpC	-	VAR-227	Yes
1511600 1STR1	R	Yes	S	-	R	R	Yes	R	Yes	ESBL	Yes	No AmpC	-	No NGS	-
1511604 1STR1	R	Yes	S	-	R	R	Yes	S	-	ESBL	Yes	AmpC	No	VAR-228	Yes
1511607 2STR1	R	Yes	S	-	R	R	Yes	S	-	ESBL	Yes	No AmpC	-	No NGS	-
1511610 2STR1	R	No	S	-	R	R	Yes	R	Yes	ESBL	Yes	No AmpC	-	VAR-364	Yes
1511614 1STR1	R	Yes	S	-	R	R	Yes	S	-	ESBL	Yes	No AmpC	-	No NGS	-
1511907 2STR1	R	Yes	S	-	R	S	Yes	S	-	ESBL	Yes	No AmpC	-	VAR-365	Yes
1511914 2STR1	S	-	R	Yes	R	R	Yes	R	Yes	ESBL	Yes	AmpC	Yes	VAR-229	Yes
1511922 1STR1	S	-	S	-	S	S	-	R	Yes	BL	-	No AmpC	-	VAR-693	Yes
1511922 2STR1	S	-	S	-	S	S	-	S	-	BL	-	AmpC	Yes	VAR-284	Yes
1511925 1STR1	S	-	S	-	S	S	-	S	-	ESBL	Yes	No AmpC	-	VAR-366	Yes
U15000660001	S	-	S	-	R	R	Yes	R	Yes	ESBL	Yes	No AmpC	-	VAR-367	Yes
U15000920001	R	No	S	-	R	S	Yes	S	-	BL	-	AmpC	Yes	VAR-368	Yes
U15005120002	S	-	S	-	R	R	Yes	S	-	BL	-	AmpC	Yes	VAR-369	Yes
U15005170002	R	Yes	S	-	S	S	-	R	Yes	ESBL	Yes	No AmpC	-	VAR-370	Yes
U15006490001	R	Yes	S	-	S	S	-	S	-	ESBL	Yes	No AmpC	-	No NGS	-
U15011410002	S	-	S	-	R	R	Yes	R	Yes	ESBL	Yes	No AmpC	-	No NGS	-
U15017090001	R	Yes	S	-	R	R	Yes	R	Yes	ESBL	Yes	No AmpC	-	No NGS	-
U15017160001	S	-	S	-	S	R	No	S	-	ESBL	Yes	No AmpC	-	VAR-230	Yes
U15018720001	S	-	S	-	R	R	Yes	R	Yes	ESBL	Yes	No AmpC	-	No NGS	-
U15018730001	S	-	S	-	R	R	Yes	R	Yes	ESBL	Yes	AmpC	No	VAR-285	Yes

Sample ID	AZI		COL		CIP and NAL			GEN		ESBL		AmpC		WGS internal Nr	AMR-ARRAY vs. WGS concordance (genes & mutations)
	BMD	Determinant detected with AMR-ARRAY	BMD	Determinant detected with AMR-ARRAY	BMD CIP	BMD NAL	Determinant detected with AMR-ARRAY	BMD	Determinant detected with AMR-ARRAY	BMD	Determinant detected with AMR-ARRAY	BMD	Determinant detected with AMR-ARRAY		
U15018780001	R	Yes	S	-	R	R	Yes	R	Yes	ESBL	Yes	No AmpC	-	VAR-371	Yes
U15018810001	R	Yes	S	-	S	S	-	S	-	ESBL	Yes	No AmpC	-	No NGS	-
U15018920001	S	-	S	-	S	S	-	R	Yes	BL	-	No AmpC	-	No NGS	-
U15019320001	S	-	S	-	S	R	No	S	-	BL	-	No AmpC	-	VAR-372	Yes
U15019340001	S	-	S	-	R	R	Yes	S	-	ESBL	Yes	No AmpC	-	VAR-231	Yes
U15019530001	R	Yes	S	-	R	R	Yes	R	Yes	ESBL	Yes	No AmpC	-	No NGS	-
U15022190001	S	-	S	-	S	S	-	S	-	ESBL	Yes	AmpC	Yes	VAR-286	Yes
U15022280001	S	-	S	-	R	R	Yes	R	Yes	ESBL	Yes	No AmpC	-	VAR-373	Yes
U15022560001	R	Yes	S	-	S	S	-	R	Yes	ESBL	Yes	No AmpC	-	No NGS	-
U15023040001	R	No	S	-	R	R	Yes	R	Yes	ESBL	Yes	No AmpC	-	VAR-622	Yes
U15024830001	R	No	S	-	R	R	Yes	R	Yes	ESBL	Yes	No AmpC	-	VAR-623	Yes
U15024960001	R	Yes	S	-	S	S	-	S	-	ESBL	Yes	No AmpC	-	No NGS	-
U15024970001	R	Yes	S	-	S	S	-	S	-	ESBL	Yes	No AmpC	-	VAR-374	Yes
U15026750001	R	Yes	S	-	S	S	-	S	-	ESBL	Yes	No AmpC	-	No NGS	-
U15026780001	R	Yes	S	-	S	S	-	S	-	ESBL	Yes	No AmpC	-	VAR-375	Yes
U15026800001	S	-	S	-	R	R	Yes	S	-	ESBL	Yes	No AmpC	-	VAR-376	Yes
U15027620002	S	-	S	-	R	S	Yes	R	Yes	ESBL	Yes	No AmpC	-	No NGS	-
U15027930002	S	-	S	-	S	S	-	S	-	BL	-	No AmpC	-	VAR-377	Yes
U15028110001	S	-	S	-	R	R	Yes	R	Yes	BL	-	No AmpC	-	VAR-378	Yes
U15028480001	S	-	S	-	S	S	-	S	-	ESBL	Yes	AmpC	No	VAR-287	Yes
U15035550001	R	Yes	S	-	R	S	Yes	S	-	ESBL	Yes	No AmpC	-	No NGS	-
U15036230001	S	-	S	-	R	R	Yes	S	-	ESBL	Yes	AmpC	No	VAR-288	Yes
U15036280002	R	Yes	S	-	S	S	-	S	-	ESBL	Yes	No AmpC	-	No NGS	-
U15036310001	R	Yes	S	-	R	R	Yes	S	-	ESBL	Yes	AmpC	No	VAR-289	Yes
U15036350001	S	-	S	-	R	S	Yes	R	Yes	ESBL	Yes	No AmpC	-	No NGS	-

Sample ID	AZI		COL		CIP and NAL			GEN		ESBL		AmpC		WGS internal Nr	AMR-ARRAY vs. WGS concordance (genes & mutations)
	BMD	Determinant detected with AMR-ARRAY	BMD	Determinant detected with AMR-ARRAY	BMD CIP	BMD NAL	Determinant detected with AMR-ARRAY	BMD	Determinant detected with AMR-ARRAY	BMD	Determinant detected with AMR-ARRAY	BMD	Determinant detected with AMR-ARRAY		
U15036390001	R	Yes	S	-	R	R	Yes	R	Yes	ESBL	Yes	No AmpC	-	VAR-379	Yes
U15040560001	R	Yes	S	-	R	R	Yes	S	-	BL	-	No AmpC	-	No NGS	-
U15040630001	R	Yes	S	-	R	R	Yes	S	-	BL	-	No AmpC	-	VAR-380	Yes
U15043870001	S	-	S	-	R	R	Yes	R	Yes	BL	-	No AmpC	-	VAR-381	Yes
U15044280001	S	-	S	-	R	R	Yes	R	Yes	BL	-	No AmpC	-	No NGS	-
U15046370001	S	-	S	-	R	R	Yes	R	Yes	ESBL	Yes	No AmpC	-	VAR-382	Yes
U1601509 001	S	-	R	Yes	R	R	Yes	R	Yes	BL	-	No AmpC	-	VAR-232	Yes
U1601674 001	R	Yes	S	-	R	S	Yes	S	-	ESBL	Yes	No AmpC	-	VAR-233	Yes
U1601813 001	S	-	S	-	R	R	Yes	R	Yes	ESBL	Yes	No AmpC	-	No NGS	-
U1601818 001	R	Yes	S	-	R	R	Yes	R	Yes	ESBL	Yes	No AmpC	-	VAR-383	Yes
U1601826 001	R	Yes	S	-	R	R	Yes	S	-	ESBL	Yes	No AmpC	-	No NGS	-
U1601833 001	R	Yes	S	-	R	R	Yes	S	-	ESBL	Yes	No AmpC	-	No NGS	-
U1601834 001	S	-	S	-	S	S	-	R	Yes	ESBL	Yes	No AmpC	-	VAR-234	Yes
U1601939 001	S	-	S	-	R	R	Yes	S	-	ESBL	Yes	AmpC	No	VAR-290	Yes
U1602204 001	S	-	S	-	R	S	Yes	S	-	ESBL	Yes	No AmpC	-	VAR-236	Yes
U1602207 001	S	-	S	-	R	R	Yes	S	-	ESBL	Yes	AmpC	No	VAR-291	Yes
U1602210 001	R	Yes	S	-	S	S	-	S	-	ESBL	Yes	No AmpC	-	No NGS	-
U1602297 001	R	Yes	S	-	R	R	Yes	R	Yes	ESBL	Yes	No AmpC	-	No NGS	-
U1602299 001	R	Yes	S	-	S	S	-	S	-	ESBL	Yes	No AmpC	-	No NGS	-
U1602300 001	R	Yes	S	-	S	S	-	S	-	ESBL	Yes	No AmpC	-	No NGS	-
U1602566 001	S	-	S	-	R	R	Yes	R	Yes	ESBL	Yes	No AmpC	-	No NGS	-
U1602581 001	R	Yes	S	-	R	R	Yes	R	Yes	ESBL	Yes	No AmpC	-	No NGS	-
U1602624 001	R	Yes	R	Yes	R	R	Yes	R	Yes	BL	-	No AmpC	-	VAR-237	Yes
U1602627 001	R	Yes	S	-	R	R	Yes	S	-	ESBL	Yes	No AmpC	-	No NGS	-
U1602850 001	S	-	S	-	R	R	Yes	S	-	ESBL	Yes	AmpC	No	VAR-292	No

Sample ID	AZI		COL		CIP and NAL			GEN		ESBL		AmpC		WGS internal Nr	AMR-ARRAY vs. WGS concordance (genes & mutations)
	BMD	Determinant detected with AMR-ARRAY	BMD	Determinant detected with AMR-ARRAY	BMD CIP	BMD NAL	Determinant detected with AMR-ARRAY	BMD	Determinant detected with AMR-ARRAY	BMD	Determinant detected with AMR-ARRAY	BMD	Determinant detected with AMR-ARRAY		
U1602912 001	S	-	S	-	S	S	-	R	Yes	BL	-	No AmpC	-	No NGS	-
U1602923 001	S	-	S	-	R	S	Yes	R	Yes	ESBL	Yes	No AmpC	-	No NGS	-
U1602935 001	S	-	R	Yes	R	R	Yes	S	-	BL	-	No AmpC	-	VAR-238	Yes
U1602948 001	R	Yes	S	-	R	R	Yes	S	-	ESBL	Yes	No AmpC	-	No NGS	-
U1602982 001	S	-	S	-	R	R	Yes	S	-	ESBL	Yes	AmpC	No	VAR-384	Yes
U1602986 001	S	-	S	-	R	R	Yes	R	Yes	ESBL	Yes	No AmpC	-	No NGS	-
U1603188 001	S	-	S	-	R	R	Yes	R	Yes	BL	-	AmpC	Yes	VAR-630	No
U1603190 001	S	-	S	-	R	R	Yes	R	Yes	ESBL	Yes	No AmpC	-	VAR-385	Yes
U1603192 001	S	-	S	-	R	R	No	S	-	BL	-	No AmpC	-	VAR-239	Yes
U1603296 001	S	-	R	Yes	R	R	Yes	R	Yes	BL	-	No AmpC	-	VAR-240	Yes
U1603300 001	S	-	S	-	R	R	Yes	R	Yes	ESBL	Yes	No AmpC	-	VAR-386	Yes
U1603383 001	S	-	R	Yes	S	S	-	S	-	ESBL	Yes	No AmpC	-	VAR-241	Yes
U1603508 001	R	Yes	S	-	R	R	Yes	R	Yes	BL	-	AmpC	Yes	No NGS	-
U1603514 001	R	Yes	S	-	R	R	Yes	S	-	ESBL	Yes	No AmpC	-	No NGS	-
U1603537 001	S	-	S	-	R	R	Yes	R	Yes	BL	-	No AmpC	-	No NGS	-
U1603544 001	S	-	R	Yes	S	S	-	S	-	ESBL	Yes	No AmpC	-	VAR-243	Yes
U1603545 001	S	-	S	-	R	R	Yes	S	-	ESBL	Yes	AmpC	No	VAR-293	Yes
U1603878 001	R	Yes	S	-	R	R	Yes	R	Yes	ESBL	Yes	No AmpC	-	VAR-387	Yes
U1603881 001	R	Yes	S	-	R	R	Yes	S	-	ESBL	Yes	No AmpC	-	No NGS	-
U1604122 001	S	-	S	-	R	R	Yes	S	-	BL	-	No AmpC	-	VAR-244	Yes
U1604124 001	S	-	S	-	R	R	Yes	R	Yes	BL	-	No AmpC	-	No NGS	-
U1604147 001	S	-	S	-	R	S	Yes	S	-	ESBL	Yes	No AmpC	-	VAR-245	Yes
U1604152 001	R	Yes	S	-	R	R	Yes	R	Yes	ESBL	Yes	AmpC	No	VAR-388	Yes
U1604153 001	R	Yes	S	-	R	R	Yes	R	Yes	ESBL	Yes	No AmpC	-	No NGS	-
U1604154 001	S	-	S	-	R	R	Yes	R	Yes	ESBL	Yes	No AmpC	-	No NGS	-

Sample ID	AZI		COL		CIP and NAL			GEN		ESBL		AmpC		WGS internal Nr	AMR-ARRAY vs. WGS concordance (genes & mutations)
	BMD	Determinant detected with AMR-ARRAY	BMD	Determinant detected with AMR-ARRAY	BMD CIP	BMD NAL	Determinant detected with AMR-ARRAY	BMD	Determinant detected with AMR-ARRAY	BMD	Determinant detected with AMR-ARRAY	BMD	Determinant detected with AMR-ARRAY		
U1604365 001	S	-	S	-	R	R	No	S	-	BL	-	No AmpC	-	VAR-246	Yes
U1604627 001	R	Yes	S	-	R	R	Yes	R	Yes	ESBL	Yes	No AmpC	-	No NGS	-
U1604644 001	R	Yes	S	-	R	S	Yes	R	Yes	ESBL	Yes	No AmpC	-	No NGS	-
U1604912 001	R	Yes	S	-	S	S	-	S	-	ESBL	Yes	No AmpC	-	No NGS	-
U1604979 001	S	-	S	-	R	R	Yes	S	-	ESBL	Yes	AmpC	No	VAR-389	Yes
U1605233 001	S	-	R	Yes	R	R	Yes	S	-	ESBL	Yes	AmpC	No	VAR-247	No
U1605244 001	R	Yes	S	-	R	R	Yes	R	Yes	ESBL	Yes	No AmpC	-	No NGS	-
U1605255 001	S	-	R	Yes	R	R	Yes	S	-	ESBL	Yes	No AmpC	-	VAR-248	No
U1605305 001	S	-	S	-	S	R	No	S	-	BL	-	AmpC	Yes	VAR-390	Yes
U1605307 001	S	-	S	-	R	S	Yes	S	-	ESBL	Yes	No AmpC	-	VAR-294	Yes
U1605315 001	S	-	S	-	R	R	Yes	R	Yes	BL	-	No AmpC	-	No NGS	-
U1605318 001	S	-	R	Yes	S	S	-	R	Yes	BL	-	No AmpC	-	VAR-249	Yes
U1605413 001	S	-	S	-	S	S	-	R	Yes	BL	-	No AmpC	-	No NGS	-
U1605539 001	S	-	S	-	R	S	Yes	S	-	ESBL	Yes	No AmpC	-	VAR-250	Yes
U1605543 001	S	-	S	-	R	R	Yes	S	-	ESBL	Yes	No AmpC	-	VAR-251	No
U1605606 001	R	Yes	S	-	R	R	Yes	S	-	ESBL	Yes	No AmpC	-	No NGS	-
U1605680 001	S	-	S	-	S	S	-	R	Yes	BL	-	No AmpC	-	No NGS	-
U1606081 001	R	Yes	S	-	S	S	-	S	-	BL	-	No AmpC	-	No NGS	-
U1606098 001	R	Yes	S	-	R	R	Yes	S	-	ESBL	Yes	No AmpC	-	No NGS	-
U1606130 001	S	-	S	-	R	S	Yes	S	-	ESBL	Yes	No AmpC	-	VAR-391	Yes
U1606137 001	R	Yes	S	-	R	S	Yes	S	-	ESBL	Yes	No AmpC	-	No NGS	-
U1606161 001	R	Yes	S	-	R	R	Yes	S	-	ESBL	Yes	No AmpC	-	No NGS	-
U1606162 001	R	Yes	S	-	R	R	Yes	S	-	ESBL	Yes	No AmpC	-	No NGS	-
U1606386 001	S	-	S	-	R	S	Yes	S	-	ESBL	Yes	No AmpC	-	VAR-252	Yes
U1606396 001	S	-	S	-	S	S	-	S	-	BL	-	AmpC	Yes	VAR-295	Yes

Sample ID	AZI		COL		CIP and NAL			GEN		ESBL		AmpC		WGS internal Nr	AMR-ARRAY vs. WGS concordance (genes & mutations)
	BMD	Determinant detected with AMR-ARRAY	BMD	Determinant detected with AMR-ARRAY	BMD CIP	BMD NAL	Determinant detected with AMR-ARRAY	BMD	Determinant detected with AMR-ARRAY	BMD	Determinant detected with AMR-ARRAY	BMD	Determinant detected with AMR-ARRAY		
U1606407 001	R	No	S	-	R	R	Yes	S	-	ESBL	Yes	No AmpC	-	VAR-624	Yes
U1606685 001	R	Yes	S	-	R	R	Yes	S	-	ESBL	Yes	No AmpC	-	No NGS	-
U1606696 001	S	-	S	-	R	R	Yes	S	-	ESBL	Yes	AmpC	No	VAR-296	Yes
U1606697 001	R	Yes	S	-	S	S	-	S	-	ESBL	Yes	No AmpC	-	No NGS	-
U1606701 001	S	-	S	-	S	R	No	S	-	ESBL	Yes	No AmpC	-	VAR-253	Yes
U1606877 001	S	-	S	-	R	S	Yes	R	Yes	ESBL	Yes	No AmpC	-	VAR-254	Yes
U1607105 001	R	Yes	S	-	S	S	-	S	-	ESBL	Yes	No AmpC	-	No NGS	-
U1607108 001	R	Yes	S	-	R	R	Yes	S	-	ESBL	Yes	No AmpC	-	No NGS	-
U1607115 001	S	-	S	-	S	S	-	R	Yes	BL	-	AmpC	Yes	No NGS	-
U1607117 001	R	Yes	S	-	R	S	Yes	R	Yes	ESBL	Yes	No AmpC	-	VAR-392	Yes
U1607187 001	R	Yes	S	-	R	R	Yes	S	-	BL	-	No AmpC	-	VAR-393	Yes
U1607583 001	R	No	S	-	R	R	Yes	S	-	BL	-	No AmpC	-	No NGS	-
U1607587 001	R	Yes	S	-	R	R	Yes	S	-	ESBL	Yes	No AmpC	-	No NGS	-
U1607589 001	S	-	S	-	R	R	Yes	R	Yes	BL	-	AmpC	Yes	No NGS	-
U1607591 001	S	-	R	Yes	R	S	Yes	S	-	ESBL	Yes	No AmpC	-	VAR-255	Yes
U1607654 001	S	-	S	-	R	R	Yes	S	-	BL	-	AmpC	Yes	VAR-297	Yes
U1607791 001	S	-	S	-	S	S	-	R	Yes	BL	-	AmpC	Yes	No NGS	-
U1607981 001	R	Yes	S	-	R	R	Yes	S	-	BL	-	No AmpC	-	VAR-256	Yes
U1607982 001	R	Yes	S	-	R	R	Yes	S	-	ESBL	Yes	No AmpC	-	No NGS	-
U1607986 001	R	Yes	S	-	S	S	-	S	-	ESBL	Yes	No AmpC	-	No NGS	-
U1607988 001	R	Yes	S	-	R	R	Yes	S	-	ESBL	Yes	No AmpC	-	No NGS	-
U1608134 001	S	-	S	-	R	R	Yes	S	-	BL	-	No AmpC	-	VAR-395	Yes
U1608230 001	R	Yes	S	-	S	S	-	S	-	ESBL	Yes	No AmpC	-	No NGS	-
U1608682 001	R	Yes	S	-	S	S	-	R	Yes	ESBL	Yes	No AmpC	-	VAR-396	Yes
U1608690 001	S	-	S	-	R	R	Yes	R	Yes	BL	-	No AmpC	-	No NGS	-

Sample ID	AZI		COL		CIP and NAL			GEN		ESBL		AmpC		WGS internal Nr	AMR-ARRAY vs. WGS concordance (genes & mutations)
	BMD	Determinant detected with AMR-ARRAY	BMD	Determinant detected with AMR-ARRAY	BMD CIP	BMD NAL	Determinant detected with AMR-ARRAY	BMD	Determinant detected with AMR-ARRAY	BMD	Determinant detected with AMR-ARRAY	BMD	Determinant detected with AMR-ARRAY		
U1608697 001	R	Yes	S	-	R	R	Yes	S	-	ESBL	Yes	AmpC	No	VAR-397	Yes
U1608702 001	R	No	S	-	R	R	Yes	S	-	ESBL	Yes	No AmpC	-	VAR-626	Yes
U1608703 001	R	Yes	S	-	R	R	Yes	R	Yes	ESBL	Yes	No AmpC	-	VAR-298	Yes
U1608750 001	S	-	S	-	S	S	-	R	No	BL	-	No AmpC	-	No NGS	-
U1608902 001	S	-	S	-	R	R	Yes	R	Yes	ESBL	Yes	No AmpC	-	No NGS	-
U1609202 001	S	-	S	-	R	R	Yes	R	Yes	BL	-	No AmpC	-	No NGS	-
U1609303 001	R	Yes	S	-	R	R	Yes	S	-	ESBL	Yes	No AmpC	-	No NGS	-
U1609308 001	S	-	S	-	R	R	Yes	R	Yes	ESBL	Yes	No AmpC	-	No NGS	-
U1609309 001	R	Yes	S	-	R	R	Yes	S	-	BL	-	No AmpC	-	No NGS	-
U1609444 001	R	Yes	S	-	S	S	-	S	-	ESBL	Yes	No AmpC	-	No NGS	-
U1609459 001	S	-	S	-	R	S	Yes	S	-	ESBL	Yes	No AmpC	-	VAR-257	Yes
U1609527 001	S	-	S	-	R	R	Yes	R	Yes	ESBL	Yes	AmpC	No	VAR-258	Yes
U1609543 001	R	Yes	S	-	S	S	-	S	-	ESBL	Yes	No AmpC	-	VAR-259	Yes
U1609552 001	S	-	S	-	R	S	Yes	S	-	BL	-	No AmpC	-	VAR-260	Yes
U1609741 001	R	Yes	S	-	S	S	-	S	-	ESBL	Yes	No AmpC	-	No NGS	-
U1609773 001	S	-	S	-	S	S	-	R	Yes	BL	-	No AmpC	-	No NGS	-
U1609778 001	R	Yes	S	-	R	R	Yes	R	Yes	ESBL	Yes	No AmpC	-	VAR-299	Yes
U1609781 001	R	Yes	S	-	S	S	-	S	-	ESBL	Yes	No AmpC	-	No NGS	-
U1609860 001	S	-	S	-	R	R	Yes	R	Yes	ESBL	Yes	No AmpC	-	VAR-629	Yes
U1610133 001	R	Yes	S	-	S	S	-	S	-	ESBL	Yes	No AmpC	-	No NGS	-
U1610159 001	S	-	S	-	R	S	Yes	R	Yes	ESBL	Yes	No AmpC	-	No NGS	-
U1610215 001	S	-	S	-	R	R	Yes	R	Yes	ESBL	Yes	No AmpC	-	VAR-398	Yes
U1610216 001	R	Yes	S	-	R	R	Yes	S	-	BL	-	AmpC	Yes	No NGS	-
U1610252 001	R	No	S	-	S	S	-	S	-	BL	-	No AmpC	-	No NGS	-
U1610407 001	S	-	S	-	R	R	Yes	R	Yes	BL	-	AmpC	Yes	No NGS	-

Sample ID	AZI		COL		CIP and NAL			GEN		ESBL		AmpC		WGS internal Nr	AMR-ARRAY vs. WGS concordance (genes & mutations)
	BMD	Determinant detected with AMR-ARRAY	BMD	Determinant detected with AMR-ARRAY	BMD CIP	BMD NAL	Determinant detected with AMR-ARRAY	BMD	Determinant detected with AMR-ARRAY	BMD	Determinant detected with AMR-ARRAY	BMD	Determinant detected with AMR-ARRAY		
U1611081 001	S	-	S	-	R	R	Yes	S	-	BL	-	AmpC	Yes	VAR-399	Yes
U1611319 001	S	-	S	-	R	R	Yes	R	Yes	BL	-	No AmpC	-	No NGS	-

R means resistant while a S means susceptible. When an isolate was susceptible to an antibiotic, a dash is indicated in the "Determinant detected with AMR-ARRAY" column to signify that the AMR-ARRAY result was not analysed. Only the Broth Microdilution resistance results were assessed with the AMR-ARRAY. The grey cells are coloured to help the reader to detect the resistant isolates. VAR numbering is the internal number of the sequenced isolates. No NGS means that the isolate was not sequenced. A dash is present in the "AMR-ARRAY vs. WGS concordance (genes & mutations)" when the isolates was not sequenced.

Abbreviations: AZI=azithromycin, COL=colistin, CIP=ciprofloxacin, NAL= nalidixic acid, GEN=gentamicin, BL= Beta-Lactamase, ESBL=Extended Spectrum Beta-Lactamase, BMD=Broth Microdilution, R=resistant, S=susceptible, ND=not determined

Table S3: 124 food E. coli isolates and 9 E. coli isolates from the EURL tested with the AMR-ARRAY: resistant phenotype and concordances with the AMR-ARRAY results

Sample Id	Phenotype	Phenotype vs. AMR-ARRAY concordance			
		ESBL	FQr	COLr	MEROr
S16FP00392	ESBL+FQr	v	v	N/A	N/A
S16FP00577	ESBL+FQr	v	v	N/A	N/A
S16FP00579	ESBL+FQr	v	v	N/A	N/A
S16FP01067	ESBL+FQr	v	v	N/A	N/A
S16FP01191	ESBL+FQr	v	v	N/A	N/A
S16FP01296	ESBL+FQr	v	x	N/A	N/A
S16FP01487	ESBL+FQr	v	x	N/A	N/A
S16FP01557	ESBL+FQr	v	v	N/A	N/A
S16FP01650	ESBL+FQr	v	v	N/A	N/A
S16FP01716	ESBL+FQr	v	v	N/A	N/A
S16FP01747	ESBL+FQr	v	v	N/A	N/A
S16FP01754	ESBL+FQr	v	v	N/A	N/A
S16FP01829	ESBL+FQr	v	v	N/A	N/A
S16FP01858	ESBL+FQr	v	x	N/A	N/A
S16FP01859	ESBL+FQr	v	v	N/A	N/A
S16FP01862	ESBL+FQr	v	v	N/A	N/A
S16FP02175	ESBL+FQr	v	v	N/A	N/A
S16FP02177	ESBL+FQr	v	v	N/A	N/A
S16FP02184	ESBL+FQr	v	v	N/A	N/A
S16FP02188	ESBL+FQr	v	v	N/A	N/A
S16FP02334	ESBL+FQr	v	v	N/A	N/A
S16FP02355	ESBL+FQr	v	v	N/A	N/A
S16FP02357	ESBL+FQr	v	v	N/A	N/A
S16FP02358	ESBL+FQr	v	v	N/A	N/A
S16FP02678	ESBL+FQr	v	v	N/A	N/A
S16FP02714	ESBL+FQr	v	v	N/A	N/A
S16FP02715	ESBL+FQr	v	v	N/A	N/A
S16FP02821	ESBL+FQr	v	v	N/A	N/A
S16FP02822	ESBL+FQr	v	v	N/A	N/A
S16FP02861	ESBL+FQr	v	v	N/A	N/A
S16FP03002	ESBL+FQr	v	v	N/A	N/A
S16FP03079	ESBL+FQr	v	v	N/A	N/A
S16FP03080	ESBL+FQr	v	v	N/A	N/A
S16FP03304	ESBL+FQr	v	v	N/A	N/A
S16FP03368	ESBL+FQr	v	v	N/A	N/A
S16FP04321	ESBL+FQr	v	x	N/A	N/A
S16FP04566	ESBL+FQr	v	v	N/A	N/A
S16FP04809	ESBL+FQr	v	v	N/A	N/A

Sample Id	Phenotype	Phenotype vs. AMR-ARRAY concordance			
		ESBL	FQr	COLr	MEROr
S16FP04984	ESBL+FQr	v	v	N/A	N/A
S16FP05146	ESBL+FQr	v	v	N/A	N/A
S16FP05596	ESBL+FQr	v	v	N/A	N/A
S16FP05597	ESBL+FQr	v	v	N/A	N/A
S16FP05608	ESBL+FQr	v	v	N/A	N/A
S16FP05702	ESBL+FQr	v	v	N/A	N/A
S16FP05703	ESBL+FQr	v	v	N/A	N/A
S16FP05816	ESBL+FQr	v	v	N/A	N/A
S16FP05817	ESBL+FQr	v	v	N/A	N/A
S16FP05970	ESBL+FQr	v	v	N/A	N/A
S16FP06240	ESBL+FQr	v	v	N/A	N/A
S16FP06242	ESBL+FQr	v	v	N/A	N/A
S16FP06462	ESBL+FQr	v	v	N/A	N/A
S16FP06521	ESBL+FQr	v	v	N/A	N/A
S16FP06567	ESBL+FQr	v	v	N/A	N/A
S16FP06568	ESBL+FQr	v	v	N/A	N/A
S16FP06571	ESBL+FQr	v	v	N/A	N/A
S16FP06579	ESBL+FQr	v	x	N/A	N/A
S16FP06596	ESBL+FQr	v	v	N/A	N/A
S16FP06825	ESBL+FQr	v	v	N/A	N/A
S17FP00612	ESBL+FQr	v	v	N/A	N/A
S17FP00774	ESBL+FQr	v	v	N/A	N/A
S17FP00775	ESBL+FQr	v	x	N/A	N/A
S17FP00942	ESBL+FQr	v	v	N/A	N/A
S17FP01145	ESBL+FQr	v	v	N/A	N/A
S17FP01333	ESBL+FQr	v	v	N/A	N/A
S17FP01334	ESBL+FQr	x	x	N/A	N/A
S17FP02170	COLr	N/A	N/A	v	N/A
S17FP02198	COLr	N/A	N/A	v	N/A
S17FP02216	ESBL+FQr	v	v	N/A	N/A
S17FP02288	ESBL+FQr	v	v	N/A	N/A
S17FP02373	COLr	N/A	N/A	v	N/A
S17FP02626	ESBL+FQr	v	v	N/A	N/A
S17FP02970	ESBL+FQr	v	v	N/A	N/A
S17FP04305	ESBL+FQr	v	v	N/A	N/A
S17FP04308	ESBL+FQr	v	v	N/A	N/A
S17FP04309	ESBL+FQr	v	v	N/A	N/A
S17FP04315	ESBL+FQr	v	v	N/A	N/A
S17FP04347	ESBL+FQr	v	v	N/A	N/A
S17FP04436	ESBL+FQr	v	v	N/A	N/A
S17FP04884	ESBL+FQr	v	v	N/A	N/A

Sample Id	Phenotype	Phenotype vs. AMR-ARRAY concordance			
		ESBL	FQr	COLr	MEROr
S17FP05368	ESBL+FQr	v	v	N/A	N/A
S17FP05678	ESBL+FQr	v	v	N/A	N/A
S17FP05679	ESBL+FQr	v	v	N/A	N/A
S17FP05680	ESBL+FQr	v	v	N/A	N/A
S17FP05681	ESBL+FQr	v	v	N/A	N/A
S17FP06195	ESBL+FQr	v	v	N/A	N/A
S17FP06512	ESBL+FQr	v	v	N/A	N/A
S17FP06612	ESBL+FQr	v	v	N/A	N/A
S17FP07986	ESBL+FQr	v	v	N/A	N/A
S17FP08073	ESBL+FQr	v	v	N/A	N/A
S17FP08204	ESBL+FQr	v	v	N/A	N/A
S17FP08714	ESBL+FQr	v	v	N/A	N/A
S17FP08716	ESBL+FQr	v	v	N/A	N/A
S17FP08928	ESBL+FQr	v	v	N/A	N/A
S17FP08934	ESBL+FQr	v	v	N/A	N/A
S17FP09107	ESBL+FQr	v	v	N/A	N/A
S17FP09115	ESBL+FQr	v	v	N/A	N/A
S17FP09120	ESBL+FQr	v	v	N/A	N/A
S17FP09125	ESBL+FQr	v	v	N/A	N/A
S17FP09137	COLr	N/A	N/A	v	N/A
S17FP09332	ESBL+FQr	v	v	N/A	N/A
S17FP09333	ESBL+FQr	v	v	N/A	N/A
S17FP09400	ESBL+FQr	v	v	N/A	N/A
S17FP09401	ESBL+FQr	v	v	N/A	N/A
S17FP09403	ESBL+FQr	v	v	N/A	N/A
S17FP09449	ESBL+FQr	v	v	N/A	N/A
S17FP09452	ESBL+FQr	v	v	N/A	N/A
S17FP09454	ESBL+FQr	v	v	N/A	N/A
S17FP09469	ESBL+FQr	v	v	N/A	N/A
S17FP09811	ESBL+FQr	v	v	N/A	N/A
S17FP09828	ESBL+FQr	v	v	N/A	N/A
S17FP09898	ESBL+FQr	v	v	N/A	N/A
S17FP10090	ESBL+FQr	v	v	N/A	N/A
S17FP10169	ESBL+FQr	v	v	N/A	N/A
S17FP10176	ESBL+FQr	v	v	N/A	N/A
S17FP10191	ESBL+FQr	v	v	N/A	N/A
S17FP10496	ESBL+FQr	x	x	N/A	N/A
S17FP10677	ESBL+FQr	v	v	N/A	N/A
S17FP10719	ESBL+FQr	v	v	N/A	N/A
S17FP10730	ESBL+FQr	v	v	N/A	N/A
S17FP10732	ESBL+FQr	v	v	N/A	N/A

Sample Id	Phenotype	Phenotype vs. AMR-ARRAY concordance			
		ESBL	FQr	COLr	MEROr
S17FP10741	ESBL+FQr	v	v	N/A	N/A
S17FP11040	COLr	N/A	N/A	v	N/A
S17FP11129	ESBL+FQr	v	v	N/A	N/A
S17FP11130	ESBL+FQr	v	v	N/A	N/A
16 EURL EC 10.5*	MEROr	N/A	N/A	N/A	v
17 EURL EC 11.5*	MEROr	N/A	N/A	N/A	v
17 EURL EC 11.8*	MEROr	N/A	N/A	N/A	v
18 EURL EC 12.5*	MEROr	N/A	N/A	N/A	v
18 EURL EC 12.6*	MEROr	N/A	N/A	N/A	v
18 EURL EC 12.7*	MEROr	N/A	N/A	N/A	v
18 EURL-M_4.2*	MEROr	N/A	N/A	N/A	v
19 EURL EC 14.6*	MEROr	N/A	N/A	N/A	v
19 EURL EC 14.8*	MEROr	N/A	N/A	N/A	v

In the concordance section, the N/A means that the concordance was not evaluated in this case because no related resistant phenotype was observed. “v” means that the AMR-ARRAY detected an AMR determinant associated with the resistance observed through broth microdilution . “x” means that the AMR-ARRAY did not detect any AMR determinant for the corresponding MIC indicating a resistance. “*” means that the isolates were provided by the European Union Reference Laboratory. Abbreviations: ESBL=extended-spectrum-beta-lactamase, FQr=fluoroquinolones-resistant, COLr=colistin-resistant, MEROr=meropenem-resistant

Table S4: 112 food E. coli isolates tested with the AMR-ARRAY: Genetic resistance profile vs. AMR-ARRAY concordance assessment

Isolates	Genetic resistance profile	AMR-ARRAY detection(s)
S14FP00038	$bla_{CTX-M-1}$	detected
S14FP00039	$bla_{CTX-M-1}$	detected
S14FP00051	$bla_{CTX-M-1}$	detected
S14FP00066	bla_{CMY-2}	detected
S14FP00078	bla_{SHV-12}/bla_{TEM-1}	detected/detected
S14FP00101	$bla_{CTX-M-1}$	detected
S14FP00102	$bla_{CTX-M-1}$	detected
S14FP00103	$bla_{CTX-M-1}$/bla_{TEM-1}	detected/detected
S14FP00110	bla_{TEM-52}	detected
S14FP00136	bla_{CMY-2}	detected
S14FP00139	$bla_{CTX-M-1}$	detected
S14FP00142	bla_{TEM-1}	detected
S14FP00149	$bla_{CTX-M-1}$	detected
S14FP00157	$bla_{CTX-M-1}$	detected
S14FP00158	bla_{TEM-1}	detected
S14FP00159	bla_{SHV-12}	detected
S14FP00160	bla_{TEM-52}	detected
S14FP00161	bla_{CMY-2}	detected
S14FP00195	$bla_{CTX-M-1}$/bla_{TEM-1}	detected/detected
S14FP00196	bla_{TEM-52}	detected
S14FP00197	bla_{SHV-12}/bla_{TEM-1}	detected/detected
S14FP00201	bla_{TEM-52}	detected
S14FP00202	bla_{SHV-12}	detected
S14FP00203	$bla_{CTX-M-1}$	detected
S14FP00206	$bla_{CTX-M-1}$	detected
S14FP00230	bla_{SHV-12}/bla_{TEM-1}	detected/detected
S14FP00251	$bla_{CTX-M-1}$	detected
S14FP00326	$bla_{CTX-M-1}$	detected
S14FP00327	$bla_{CTX-M-1}$	detected
S14FP00328	bla_{CMY-2}/$bla_{CTX-M-1}$/bla_{TEM-1}	detected/detected/detected
S14FP00352	bla_{TEM-1}/bla_{SHV-12}	detected/detected
S14FP00398	bla_{TEM-1}/bla_{CMY-2}	detected/detected
S14FP00444	bla_{CMY-2}	detected
S14FP00512	$bla_{CTX-M-1}$	detected
S14FP00624	$bla_{CTX-M-1}$	detected
S14FP00633	$bla_{CTX-M-1}$	detected
S14FP00637	bla_{SHV-12}	detected
S14FP00641	bla_{TEM-52}	detected
S14FP00679	$bla_{CTX-M-1}$/bla_{TEM-1}	detected/detected

Isolates	Genetic resistance profile	AMR-ARRAY detection(s)
S14FP00681	bla_{TEM-2}/bla_{CMY-2}	detected/detected
S14FP00698	bla_{CMY-2}	detected
S14FP00706	bla_{SHV-12}/bla_{TEM-1}	detected/detected
S14FP00708	$bla_{CTX-M-1}$	detected
S14FP00742	bla_{SHV-12}/bla_{TEM-1}	detected/detected
S14FP00770	bla_{SHV-12}	detected
S14FP00792	bla_{CMY-2}	detected
S14FP00794	bla_{TEM-1}/bla_{CMY-2}	detected/detected
S14FP00840	$bla_{CTX-M-1}$	detected
S14FP00842	bla_{TEM-52}	detected
S14FP00879	bla_{SHV-12}	detected
S14FP00944	bla_{TEM-1}/bla_{CMY-2}	detected/detected
S14FP00987	bla_{TEM-1}/bla_{CMY-2}	detected/detected
S14FP00989	bla_{CMY-2}	detected
S14FP01001	bla_{CMY-2}	detected
S14FP01003	$bla_{CTX-M-1}$	detected
S14FP01122	bla_{CMY-2}	detected
S14FP01123	bla_{CMY-2}	detected
S14FP01287	$bla_{CTX-M-1}$	detected
S14FP01690	bla_{CMY-2}	detected
S14FP01701	$bla_{CTX-M-1}/bla_{TEM-1}$	detected/detected
S14FP01815	bla_{TEM-52}	detected
S14FP01817	$bla_{CTX-M-1}$	detected
S14FP01982	bla_{SHV-12}	detected
S14FP02100	bla_{CMY-2}	detected
S14FP02145	$bla_{CTX-M-14}/bla_{TEM-1}$	detected/detected
S14FP02147	$bla_{CTX-M-1}$	detected
S14FP02148	bla_{TEM-1}/bla_{CMY-2}	detected/detected
S14FP02149	bla_{SHV-12}/bla_{TEM-1}	detected/detected
S14FP02164	bla_{SHV-12}	detected
S14FP02224	bla_{TEM-1}	detected
S14FP02226	bla_{SHV-12}/bla_{CMY-2}	detected/detected
S14FP02319	bla_{TEM-1}/bla_{CMY-2}	detected/detected
S14FP02321	$bla_{CTX-M-1}/bla_{TEM-1}$	detected/detected
S14FP02323	$bla_{CTX-M-1}/bla_{TEM-1}$	detected/detected
S14FP02384	bla_{SHV-12}	detected
S14FP02398	bla_{SHV-12}/bla_{TEM-1}	detected/detected
S14FP02446	bla_{TEM-1}/bla_{CMY-2}	detected/detected
S14FP02448	bla_{TEM-1}	detected
S14FP02478	bla_{TEM-1}/bla_{CMY-2}	detected/detected
S14FP02479	$bla_{CTX-M-1}$	detected

Isolates	Genetic resistance profile	AMR-ARRAY detection(s)
S14FP02506	bla_{SHV-12}	detected
S14FP02519	bla_{TEM-52}	detected
S14FP02632	$bla_{CTX-M-1}$	detected
S14FP02639	$bla_{CTX-M-1}$	detected
S14FP02640	bla_{CMY-2}	detected
S15FP00134	bla_{SHV-12}	detected
S15FP00144	bla_{TEM-1}	detected
S15FP00197	bla_{TEM-52}	detected
S15FP00198	bla_{CMY-2}	detected
S15FP00199	$bla_{CTX-M-1}/bla_{TEM-1}$	detected/detected
S15FP00233	bla_{CMY-2}	detected
S15FP00234	$bla_{CTX-M-1}$	detected
S15FP00235	bla_{SHV-12}	detected
S15FP00236	$bla_{CTX-M-1}$	detected
S15FP00299	bla_{TEM-1}	detected
S15FP00403	bla_{SHV-12}/bla_{TEM-1}	detected/detected
S15FP00404	bla_{SHV-12}/bla_{TEM-1}	detected/detected
S15FP00418	bla_{TEM-1}	detected
S15FP00425	$bla_{CTX-M-1}$	detected
S15FP00649	$bla_{CTX-M-1}$	detected
S15FP00650	bla_{CMY-2}	detected
S15FP00651	$bla_{CTX-M-1}$	detected
S15FP00652	bla_{TEM-1}/bla_{TEM-2}	detected/detected
S15FP00653	bla_{SHV-12}	detected
S15FP00654	bla_{SHV-12}	detected
S17FP05794	$bla_{CTX-M-1}$	detected
S17FP09713	$bla_{CTX-M-1}$	detected
S17FP09782	$bla_{CTX-M-1}$	detected
S17FP10171	$bla_{CTX-M-1}$	detected
S17FP10215	$bla_{CTX-M-1}$	detected
S17FP10498	$bla_{CTX-M-1}$	detected
S17FP10721	$bla_{CTX-M-1}$	detected

Genetic resistance profile obtained through PCR and Sanger sequencing (primers listed in Ceyssens et al. 2016.

Table S5: 64 Salmonella spp. isolates from human samples tested with the AMR-ARRAY: Genetic resistance profile vs. AMR-ARRAY concordance assessment

Isolates (SALMONELLA)	Genetic resistance profile	AMR-ARRAY detection(s)
S13BD01263	$bla_{CTX-M-9}$	detected
S13BD01681	bla_{CMY}	detected
S13BD01820	$bla_{CTX-M-1}/bla_{OXA-1}$	detected/detected
S13BD02584	$bla_{CTX-M-9}$	detected
S13BD02611	$bla_{TEM}/_{CMY}$	Detected/detected
S13BD03471	$bla_{TEM-1}/bla_{CTX-M-9}$	detected/detected
S13BD03628	$bla_{CTX-M-9}$	detected
S13BD03795	$bla_{CTX-M-9}$	detected
S14BD01824	$bla_{CTX-M-9}$	detected
S14BD02694	$bla_{CTX-M-9}$	detected
S14BD02800	$bla_{CTX-M-9}$	detected
S14BD03293	$bla_{CTX-M-9}$	detected
S14BD04823	$bla_{CTX-M-9}$	detected
S14BD04920	$bla_{CTX-M-9}$	detected
S14BD04954	bla_{SHV-12}	detected
S14BD05398	$bla_{CTX-M-9}$	detected
S15BD00290	bla_{TEM}	detected
S15BD00641	bla_{TEM}	detected
S15BD01306	$bla_{TEM-1}/bla_{CTX-M-9}$	detected/detected
S15BD05742	bla_{TEM-1}/bla_{CMY}	detected/detected
S15BD06320	$bla_{CTX-M-9}$	detected
S15BD06347	$bla_{CTX-M-9}$	detected
S15BD07253	$bla_{CTX-M-9}$	detected
S15BD07307	bla_{CMY}	detected
S15BD07459	$bla_{CTX-M-9}$	detected
S15BD07518	$bla_{CTX-M-1}$	detected
S15BD07923	$bla_{CTX-M-9}$	detected
S15BD08898	$bla_{TEM-1}/bla_{CTX-M-2}$	detected/detected
S15BD09586	$bla_{CTX-M-9}$	detected
S15BD09614	$bla_{CTX-M-9}$	detected
S15BD10379	$bla_{CTX-M-9}$	detected
S15BD10528	$bla_{CTX-M-9}$	detected
S16BD00370	$bla_{CTX-M-1\ like}$	detected
S16BD02923	$bla_{CTX-M-1}$	detected
S16BD03139	$bla_{TEM-1}/bla_{CTX-M-1}$	detected/detected
S16BD03602	$bla_{CTX-M-15}$	detected
S16BD04351	$bla_{TEM-1}/bla_{CTX-M-15}/bla_{OXA-1}$	detected/detected/detected

Isolates (SALMONELLA)	Genetic resistance profile	AMR-ARRAY detection(s)
S16BD04541	$bla_{CTX\text{-}M\text{-}1}$	detected
S16BD04562	$bla_{TEM\text{-}1}/bla_{CTX\text{-}M\text{-}15}$	detected/detected
S16BD04982	$bla_{CTX\text{-}M\text{-}9}$	detected
S16BD05100	$bla_{TEM\text{-}1}/bla_{SHV\ ESBL}$	detected/detected
S16BD05311	$bla_{TEM\text{-}1}/_{CTX\text{-}M\text{-}15}$	detected/detected
S16BD05388	$bla_{TEM\text{-}1}/bla_{CTX\text{-}M\text{-}15}$	detected/detected
S16BD05938	$bla_{CTX\text{-}M\text{-}9}$	detected
S16BD06375	$bla_{TEM\text{-}1}/bla_{CTX\text{-}M\text{-}9}$	detected/detected
S16BD06461	$bla_{CTX\text{-}M\text{-}1}$	detected
S16BD07964	$bla_{CTX\text{-}M\text{-}32}$	detected
S16BD08730	$bla_{CTX\text{-}M\text{-}9\ like}$	detected
S17BD00109	$bla_{TEM\text{-}1}/bla_{CTX\text{-}M\text{-}1}$	detected/detected
S17BD00327	$bla_{TEM\text{-}1}/bla_{CTX\text{-}M\text{-}1}$	detected/detected
S17BD00573	$bla_{TEM\text{-}1}/bla_{CTX\text{-}M\text{-}15}$	detected/detected
S17BD03474	$bla_{TEM\text{-}1}/bla_{CTX\text{-}M\text{-}15}$	detected/detected
S17BD04479	$bla_{CTX\text{-}M\text{-}9}$	detected
S17BD04785	$bla_{CTX\text{-}M\text{-}3}$	detected
S17BD05213	$bla_{CTX\text{-}M\text{-}1\text{-}like}$	detected
S17BD06808	bla_{TEM}/bla_{CMY}	detected/detected
S17BD06931	$bla_{TEM}/bla_{CTX\text{-}M\text{-}9}$	detected/detected
S17BD07288	$bla_{TEM}/bla_{CTX\text{-}M\text{-}9}$	detected/detected
S17BD07305	$bla_{OXA\text{-}1}/bla_{TEM\text{-}1}$	detected/detected
S17BD07444	$bla_{CTX\text{-}M\text{-}1}$	detected
S17BD08371	$bla_{TEM\text{-}1}/bla_{CMY}$	detected/detected
S18BD00684	$bla_{CMY}/_{TEM}$	detected/detected
S18BD02037	$bla_{CTX\text{-}M\text{-}9}$	detected
S18BD03032	$bla_{CTX\text{-}M\text{-}15}$	detected

Genetic resistance profile obtained through the micro-array published by Ceyssens et al. 2016.

Table S6: 97 Shigella spp. isolates from human samples tested with the AMR-ARRAY: Genetic resistance profile vs. AMR-ARRAY concordance assessment

Isolates (SHIGELLA)	Genetic resistance profile	AMR-ARRAY detection(s)
S17BD00112	$bla_{TEM-1}/bla_{CTX-M-1}$	detected/detected
S17BD00672	$bla_{CTX-M-3}$	detected
S17BD03431	$bla_{CTX-M-15}$	detected
S17BD03508	$bla_{TEM-1}/bla_{CTX-M-15}$	detected/detected
S17BD04134	$bla_{CTX-M-15}$	detected
S17BD04350	bla_{OXA-1}	detected
S17BD04542	$bla_{CTX-M-15}$	detected
S17BD05200	$bla_{CTX-M-15}$	detected
S17BD05456	$bla_{CTX-M-15}$	detected
S17BD06149	$bla_{CTX-M-15}$	detected
S17BD06235	bla_{TEM}	detected
S17BD06357	$bla_{CTX-M-15}$	detected
S17BD06649	$bla_{CTX-M-15}$	detected
S17BD06975	bla_{TEM}	detected
S17BD07077	$bla_{CTX-M-15}$	detected
S17BD07216	$bla_{CTX-M-15}$	detected
S17BD07293	$bla_{CTX-M-1}$	detected
S17BD07304	$bla_{CTX-M-15}/bla_{OXA-1}$	detected/detected
S17BD07332	$bla_{CTX-M-1}$	detected
S17BD07399	$bla_{CTX-M-1}$	detected
S17BD07483	$bla_{CTX-M-15}/bla_{OXA-1}$	detected/detected
S17BD07692	$bla_{CTX-M-1}$	detected
S17BD07935	$bla_{CTX-M-1}$	detected
S17BD07949	$bla_{CTX-M-15}$	detected
S17BD08123	$bla_{CTX-M-1}$	detected
S17BD08170	$bla_{CTX-M-1}$	detected
S17BD08179	$bla_{CTX-M-15}$	detected
S17BD08194	$bla_{CTX-M-15}/bla_{OXA-1}$	detected/detected
S17BD08233	$bla_{CTX-M-1}$	detected
S17BD08293	$bla_{CTX-M-1}$	detected
S18BD00005	$bla_{CTX-M-15}$	detected
S18BD00011	$bla_{CTX-M-15}$	detected
S18BD00949	bla_{TEM}	detected
S18BD01024	$bla_{CTX-M-1}$	detected
S18BD01106	$bla_{CTX-M-15}$	detected
S18BD02025	$bla_{CTX-M-15}$	detected
S18BD02468	$bla_{CTX-M-15}$	detected
S18BD02580	$bla_{CTX-M-1}$	detected
S18BD02594	$bla_{CTX-M-15}/bla_{TEM-1}$	detected/detected
S18BD02657	$bla_{CTX-M-15}$	detected
S18BD02761	$bla_{CTX-M-15}$	detected
S18BD02818	$bla_{CTX-M-15}$	detected

Isolates (SHIGELLA)	Genetic resistance profile	AMR-ARRAY detection(s)
S18BD03178	*bla*$_{CTX-M-9}$	detected
S18BD03186	*bla*$_{CTX-M-9}$	detected
S18BD03411	*bla*$_{CTX-M-9}$	detected
S18BD03575	*bla*$_{CTX-M-9}$	detected
S18BD03841	*bla*$_{CTX-M-9}$	detected
S18BD04258	*bla*$_{CTX-M-9}$	detected
S18BD04337	*bla*$_{CTX-M-9}$	detected
S18BD04382	*bla*$_{CTX-M-9}$	detected
S18BD04853	*bla*$_{CTX-M-9}$	detected
S18BD04903	*bla*$_{CTX-M-9}$	detected
S18BD04953	*bla*$_{CTX-M-9}$	detected
S14BD00802	*gyrA-Ser83-Leu*	detected
S14BD02488	*gyrA-Ser83-Leu*	detected
S14BD02792	*gyrA-Ser83-Leu*	detected
S14BD02795	*gyrA-Ser83-Leu*	detected
S14BD02797	*gyrA-Ser83-Leu*	detected
S14BD02798	*gyrA-Ser83 (WT)*	detected
S14BD03054	*gyrA-Ser83-Leu/parC-Ser80-Ile*	detected/detected
S14BD03573	*gyrA-Ser83 (WT)*	detected
S14BD03609	*gyrA-Ser83-Leu*	detected
S14BD04585	*gyrA-Ser83-Leu*	detected
S14BD04882	*gyrA-Ser83-Leu*	detected
S14BD05234	*gyrA-Ser83 (WT)*	detected
S14BD05506	*gyrA-Ser83-Leu/parC-Ser80-Ile*	detected/detected
S15BD00055	*gyrA-Ser83-Leu/parC-Ser80-Ile*	detected/detected
S15BD00457	*gyrA-Ser83-Leu/parC-Ser80-Ile*	detected/detected
S15BD00494	*gyrA-Ser83-Leu/parC-Ser80-Ile*	detected/detected
S15BD00569	*gyrA-Ser83-Leu/parC-Ser80-Ile*	detected/detected
S15BD00797	*gyrA-Ser83-Leu/parC-Ser80-Ile*	detected/detected
S15BD00889	*gyrA-Ser83-Leu*	detected
S15BD00932	*gyrA-Ser83-Leu*	detected
S15BD01283	*gyrA-Ser83-Leu*	detected
S15BD02268	*gyrA-Ser83-Leu/parC-Ser80-Ile*	detected/not detected**
S15BD02324	*gyrA-Ser83-Leu*	detected
S15BD02325	*gyrA-Ser83-Leu*	detected
S15BD02326	*gyrA-Ser83-Leu*	detected
S15BD02368	*gyrA-Ser83-Leu*	detected
S15BD02407	*gyrA-Ser83-Leu*	detected
S15BD02515	*gyrA-Ser83-Leu*	detected
S15BD02737	*gyrA-Ser83-Leu/parC-Ser80-Ile*	detected/detected
S15BD02867	*gyrA-Ser83-Leu/parC-Ser80-Ile*	detected/detected
S15BD02979	*gyrA-Ser83-Leu*	detected
S15BD02995	*gyrA-Ser83-Leu*	detected
S15BD03192	*gyrA-Ser83-Leu*	detected
S15BD03801	*gyrA-Ser83-Leu/parC-Ser80-Ile*	detected/detected
S15BD03806	*gyrA-Ser83-Leu/parC-Ser80-Ile*	detected/detected

Isolates (SHIGELLA)	Genetic resistance profile	AMR-ARRAY detection(s)
S15BD03807	*gyrA-Ser83-Leu/parC-Ser80-Ile*	detected/detected
S15BD03808	*gyrA-Ser83-Leu/parC-Ser80-Ile*	detected/detected
S15BD03850	*gyrA-Ser83-Leu*	detected
S15BD04030	*gyrA-Ser83-Leu*	detected
S15BD04031	*gyrA-Ser83-Leu/parC-Ser80-Ile*	detected/detected
S15BD04119	*gyrA-Ser83-Leu/parC-Ser80-Ile*	detected/detected
S15BD04165	*gyrA-Ser83-Leu/parC-Ser80-Ile*	detected/detected
S15BD04166	*gyrA-Ser83-Leu/parC-Ser80-Ile*	detected/detected
S15BD04168	*gyrA-Ser83-Leu/parC-Ser80-Ile*	detected/detected

** The mutation in *gyrA* was detected but not the mutation in the *parC* gene. Both parC PLPs (PARC-80-WT and PARC-80-ILE) were negative for this isolate. Such result could be explained if another mutation, next to the targeted SNP, would be present and unable the ligation of both PARC-80 probes. Sequencing would be needed to confirm this hypothesis. β-lactamases genetic resistance profiles were determined through the micro-array published by Ceyssens et al. 2016 and quinolone genetic resistance profiles were determine through a validated and unpublished micro-array.

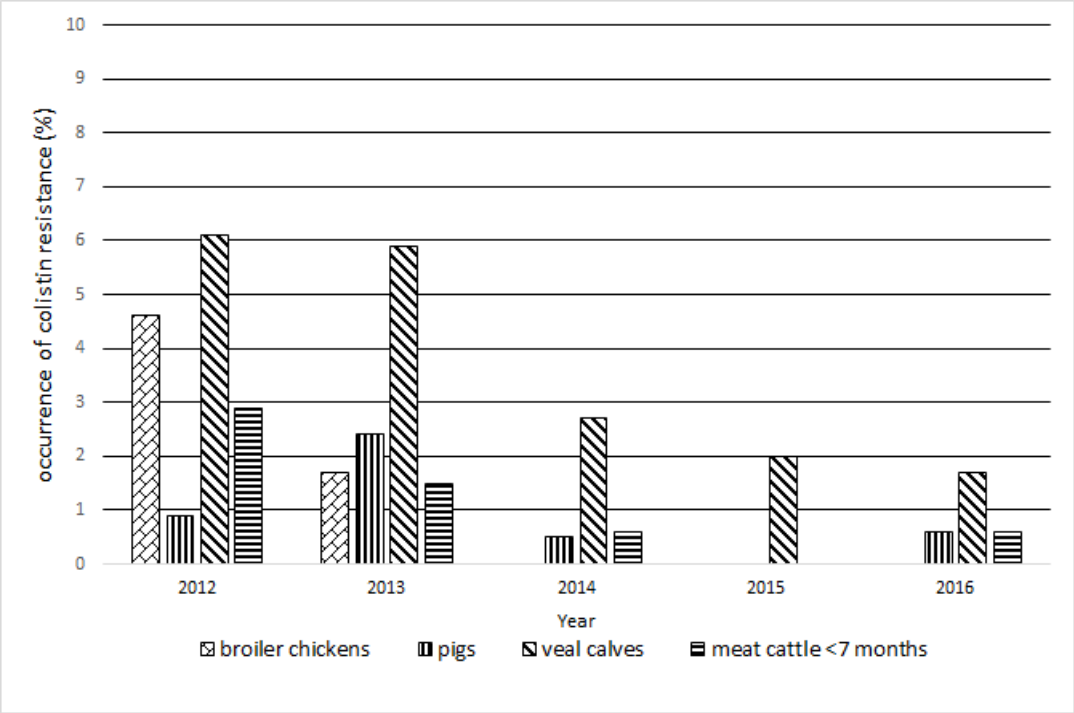


Figure S1 : Occurrence of colistin resistance in commensal E. coli *isolated between 2012-2016 from food-producing animals in Belgium (data published in the FASFC reports[10]).*

1. ESBL-Phenotype
- FOT or TAZ > 1 mg/L AND
- MERO ≤ 0.12 mg/L AND
- FOX ≤ 8 mg/L AND
- SYN FOT/CLV and/or TAZ/CLV

2. AmpC-Phenotype
- FOT or TAZ > 1 mg/L AND
- MERO ≤ 0.12 mg/L AND
- FOX > 8 mg/L AND
- No SYN FOT/CLV nor TAZ/CLV
- (Not excluded presence of ESBLs)

3. ESBL + AmpC-Phenotype
- FOT or TAZ > 1 mg/L AND
- MERO ≤ 0.12 mg/L AND
- FOX >8 mg/L AND
- SYN FOT/CLV and/or TAZ/CLV

4. Carbapenemase-Phenotype
- MERO > 0.12 mg/L
- Needs confirmation
- (Not excluded presence of ESBLs or AmpC)

Susceptible

FOT-TAZ-FOX-MEM ≤ ECOFF

5. Other phenotypes

1) If FOT or TAZ > 1 mg/ml AND
- MEM ≤ 0.12 mg/L AND
- FOX ≤ 8 mg/L AND
- NO SYN FOT/CLV nor TAZ/CLV
- Not excluded CPs (consult EURL)

2) If FOT and/or TAZ ≤ 1 mg/L AND > ECOFF AND
- MERO ≤ 0.12 mg/L
- FOX ≤ 8 mg/L

3) If FOT and TAZ ≤ 1 mg/L
- MERO ≤ 0.12 mg/L
- FOX > 8 mg/L
*cAmpCs could be included here

4) If MERO ≤ 0.12 mg/L BUT
- ETP > ECOFF AND/OR
- IMI > ECOFF
- Not excluded CPs, needs confirmation (consult EURL)

5) Any other combinations not described in previous boxes (consult EURL)

Figure S2 : EFSA criteria to determine ESBL, AmpC, ESBL+AmpC and Carbapenemase phenotypes. Illustration from "EFSA (European Food Safety Authority) and ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control), 2017. The European Union summary report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2015. EFSA Journal 2017;15(2):4694, 212 pp. doi:10.2903/j.efsa.2017.4694"

Table S2 : Minimum inhibitory concentration (mg/L) of the different tested antimicrobials, multi-resistance and mcr profiles of the 40 E. coli isolates.

Year	Strain N°	Animal origin	Antibiotic MIC (mg/L)														Multi Res	*mcr* profile
			CST	AMP	CTX	CAZ	MEM	NAL	CIP	GEN	AZM	CHL	SXT	TET	TGC	TMP		
2012	12036861STR1	BROILER CHICKENS	8	>64	<=0.25	<=0.5	<=0.03	128	0.25	1	8	64	>1024	64	<=0.25	<=0.25	6	*mcr-1.1*
2012	1211226	VEAL CALVES	4	>64	<=0.25	<=0.5	<=0.03	8	0.06	<=0.5	16	16	>1024	>64	<=0.25	>32	5	*mcr-1.1*
2012	1217177	VEAL CALVES	4	>64	<=0.25	<=0.5	<=0.03	>128	>8	>32	4	64	>1024	>64	<=0.25	>32	8	*mcr-1.1*
2012	1217795	VEAL CALVES	8	>64	<=0.25	<=0.5	<=0.03	<=4	0.03	1	8	<=8	>1024	4	<=0.25	<=0.25	3	*mcr-4.6*
2012	1220582	VEAL CALVES	4	>64	<=0.25	<=0.5	<=0.03	>128	>8	1	8	<=8	>1024	>64	<=0.25	>32	6	*mcr-1.1*
2012	1223744	VEAL CALVES	8	>64	<=0.25	<=0.5	<=0.03	>128	>8	16	16	>128	>1024	>64	0.5	>32	8	*mcr-4.6*
2013	1303300 STR1	MEAT CATTLE < 7 months	4	>64	<=0.25	<=0.5	<=0.03	>128	>8	1	8	>128	>1024	>64	<=0.25	>32	7	*mcr-1.1*
2013	1311456 STR1	MEAT CATTLE < 7 months	8	>64	0.5	<=0.5	<=0.03	>128	>8	<=0.5	8	>128	>1024	>64	<=0.25	>32	7	*mcr-1.1*
2013	1301649 STR1	VEAL CALVES	8	>64	<=0.25	<=0.5	<=0.03	<=4	0.03	1	<=2	<=8	>1024	>64	0.5	>32	5	*mcr-4.6*
2013	1302187 STR1	VEAL CALVES	4	>64	<=0.25	<=0.5	<=0.03	>128	>8	<=0.5	16	>128	>1024	16	<=0.25	>32	7	*mcr-1.1*
2013	1307926 STR1	VEAL CALVES	4	>64	<=0.25	<=0.5	<=0.03	>128	>8	>32	4	64	>1024	>64	<=0.25	>32	8	*mcr-1.1*
2013	1309946 STR1	VEAL CALVES	4	>64	<=0.25	<=0.5	<=0.03	>128	8	16	16	>128	>1024	>64	<=0.25	>32	8	*mcr-1.1*
2013	1309964 STR1	VEAL CALVES	4	>64	<=0.25	<=0.5	<=0.03	>128	0.5	<=0.5	8	<=8	>1024	>64	0.5	>32	6	*mcr-4.6*

2013	1309979 STR1	VEAL CALVES	4	>64	<=0.25	<=0.5	<=0.03	<=4	0.03	32	16	>128	>1024	>64	1	>32	8	*mcr-1.1*
2013	1311787 STR1	VEAL CALVES	4	>64	<=0.25	<=0.5	<=0.03	>128	>8	<=0.5	16	<=8	>1024	>64	<=0.25	>32	6	*mcr-1.1*
2013	1314414 STR1	VEAL CALVES	4	>64	<=0.25	<=0.5	<=0.03	>128	>8	8	8	64	>1024	>64	<=0.25	>32	8	*mcr-1.1*
2013	1316991 STR1	VEAL CALVES	4	>64	<=0.25	<=0.5	<=0.03	>128	1	2	16	<=8	>1024	>64	0.5	>32	6	*mcr-4.6*
2014	14029311STR1	VEAL CALVES	4	>64	<=0.25	<=0.5	<=0.03	<=4	0.03	<=0.5	32	16	>1024	>64	0.5	>32	6	*mcr-4.6*
2014	14039641STR1	VEAL CALVES	4	>64	<=0.25	<=0.5	<=0.03	>128	>8	>32	4	<=8	>1024	>64	<=0.25	>32	7	*mcr-1.1*
2014	14053271STR1	VEAL CALVES	8	>64	<=0.25	<=0.5	<=0.03	>128	>8	>32	8	32	>1024	>64	<=0.25	>32	8	*mcr-1.1*
2014	14119791STR1	VEAL CALVES	4	>64	<=0.25	<=0.5	<=0.03	8	0.06	1	16	>128	>1024	>64	<=0.25	>32	6	*mcr-4.6*
2015	15097951STR1[a]	FATTENING PIGS	8	>64	>4	8	<=0.03	16	0.5	1	32	<=8	16	>64	<=0.25	<=0.25	5	*mcr-1.1*
2015	15065511STR1[a]	VEAL CALVES	8	>64	>4	8	<=0.03	>128	>8	>32	>64	>128	>1024	>64	<=0.25	>32	9	*mcr-1.1-3.2-5.1*
2015	15069321STR1	VEAL CALVES	4	>64	<=0.25	<=0.5	<=0.03	>128	0.25	1	8	<=8	>1024	64	<=0.25	>32	6	*mcr-1.1*
2015	15069341STR1	VEAL CALVES	8	>64	<=0.25	<=0.5	<=0.03	>128	>8	>32	4	32	>1024	>64	<=0.25	>32	8	*mcr-1.1*
2015	15084791STR2[b]	VEAL CALVES	8	>64	>4	8	<=0.03	>128	8	>32	8	>128	>1024	>64	0.5	>32	8	*mcr-1.1*

2015	15089001STR1[a]	VEAL CALVES	8	>64	>4	8	<=0.03	>128	>8	32	4	>128	>1024	>64	<=0.25	>32	8	*mcr-1.1*
2015	15089002STR1[a]	VEAL CALVES	8	>64	1	1	<=0.03	>128	>8	16	64	>128	>1024	>64	<=0.25	>32	9	*mcr-4.6*
2015	15114251STR1[a]	VEAL CALVES	8	>64	>4	8	<=0.03	>128	>8	>32	8	128	>1024	>64	0.5	>32	8	*mcr-1.1*
2015	15119142STR1[b]	VEAL CALVES	8	>64	>4	8	<=0.03	>128	8	>32	8	>128	>1024	>64	1	>32	9	*mcr-1.1*
2016	U1603383001[a]	FATTENING PIGS	4	>64	2	8	<=0.03	<=4	0.03	<=0.5	4	64	>1024	64	<=0.25	>32	6	*mcr-2.1*
2016	U1603544001[a]	FATTENING PIGS	4	>64	4	4	<=0.03	<=4	<=0.015	<=0.5	4	<=8	>1024	64	<=0.25	>32	5	*mcr-1.1*
2016	U1605318001	FATTENING PIGS	4	>64	<=0.25	<=0.5	<=0.03	<=4	<=0.015	>32	4	<=8	>1024	64	<=0.25	>32	6	*mcr-1.1*
2016	U1603296001	MEAT CATTLE < 7 months	4	>64	<=0.25	<=0.5	<=0.03	>128	>8	8	8	128	>1024	>64	<=0.25	>32	8	*mcr-1.1*
2016	U1601509001	VEAL CALVES	4	>64	<=0.25	<=0.5	<=0.03	>128	>8	32	4	>128	>1024	>64	<=0.25	>32	8	*mcr-1.1*
2016	U1602624001	VEAL CALVES	8	>64	<=0.25	<=0.5	<=0.03	>128	8	>32	32	>128	>1024	64	<=0.25	>32	9	*mcr-1.1*
2016	U1602935001	VEAL CALVES	4	>64	<=0.25	<=0.5	<=0.03	>128	>8	<=0.5	4	32	>1024	>64	<=0.25	>32	7	*mcr-1.1*
2016	U1605233001[b]	VEAL CALVES	4	>64	>4	4	<=0.03	>128	8	<=0.5	<=2	<=8	>1024	>64	<=0.25	<=0.25	5	*mcr-1.1*
2016	U1605255001[a]	VEAL CALVES	8	>64	>4	>8	<=0.03	>128	8	<=0.5	<=2	<=8	>1024	>64	<=0.25	<=0.25	5	*mcr-1.1*
2016	U1607591001[a]	VEAL CALVES	4	>64	>4	1	<=0.03	8	0.5	<=0.5	8	64	>1024	>64	<=0.25	>32	7	*mcr-1.1*

Veal calves were sampled at slaughterhouse, "meat cattle < 7 months" were sampled at farm. Selective medium was McConkey agar supplemented with cefotaxime at 1mg L^{-1}. The EUCAST ECOFFs values are indicated hereafter under brackets: AMP = ampicillin (MIC > 8), AZM = azithromycin (MIC > 16, tentative ECOFF), CHL = chloramphenicol (MIC > 16), CIP = ciprofloxacin (MIC > 0,06), CST = colistin (MIC > 2), CTX = cefotaxime (MIC > 0,25), GEN = gentamicin (MIC > 2), MEM = meropenem (MIC > 0,125), NAL = nalidixic acid (MIC > 16), SXT = sulfamethoxazole (MIC > 64), CAZ = ceftazidime (MIC > 0,5), TET = tetracycline (MIC > 8), TGC = tigecycline (MIC > 0.5), TMP = trimethoprim (MIC > 2). Cells filled in grey highlight MIC values above EUCAST ECOFFs. Multi-RES = multi-drugs resistance, i.e. resistance to three or more different antibiotic classes. [a] ESBL phenotype. [b] ESBL+AmpC phenotype.

Supplementary Figures

Figure S1: Genetic organisation surrounding *poxtA*

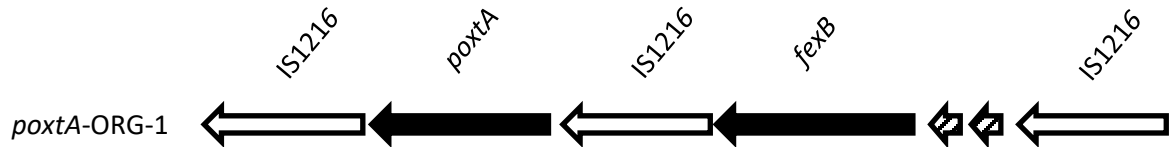


Figure S5: Genetic map of poxtA genetic environment. Antimicrobial resistance genes are represented with a black arrow, other genes with white arrows and hypothetical proteins with black hatched arrows. poxtA-ORG-1 was observed in E. faecium and E. faecalis isolates

Figure S2: Genetic organisation surrounding *cfr*

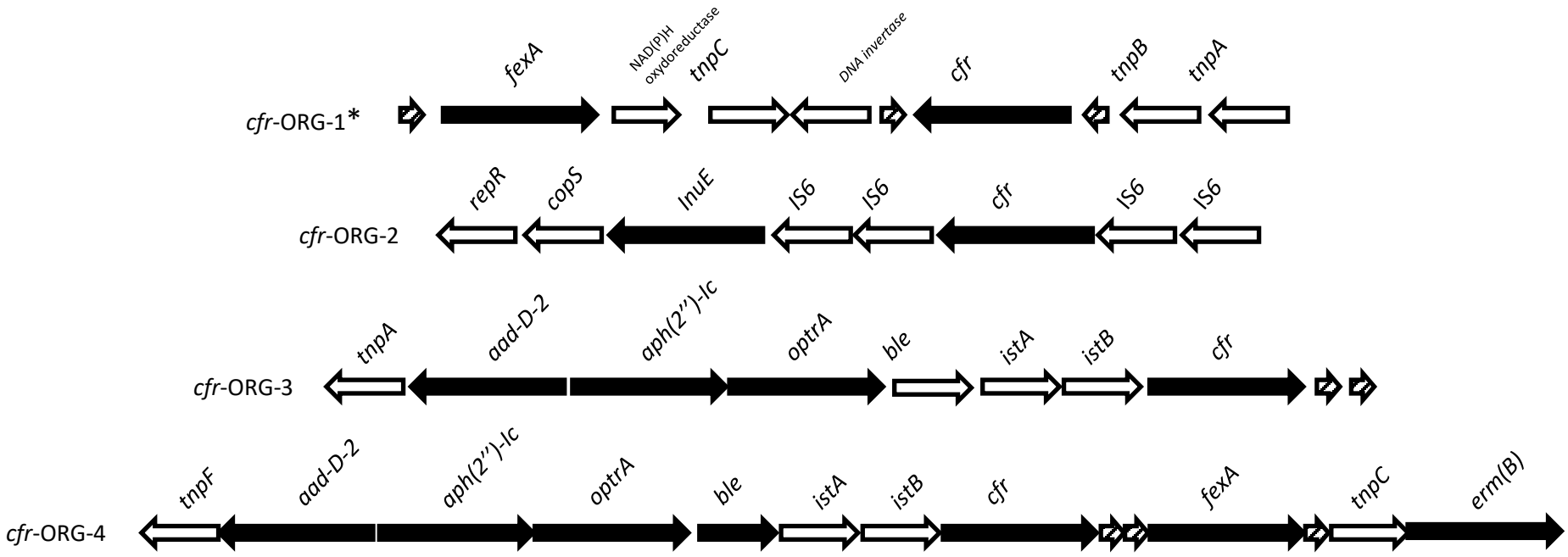
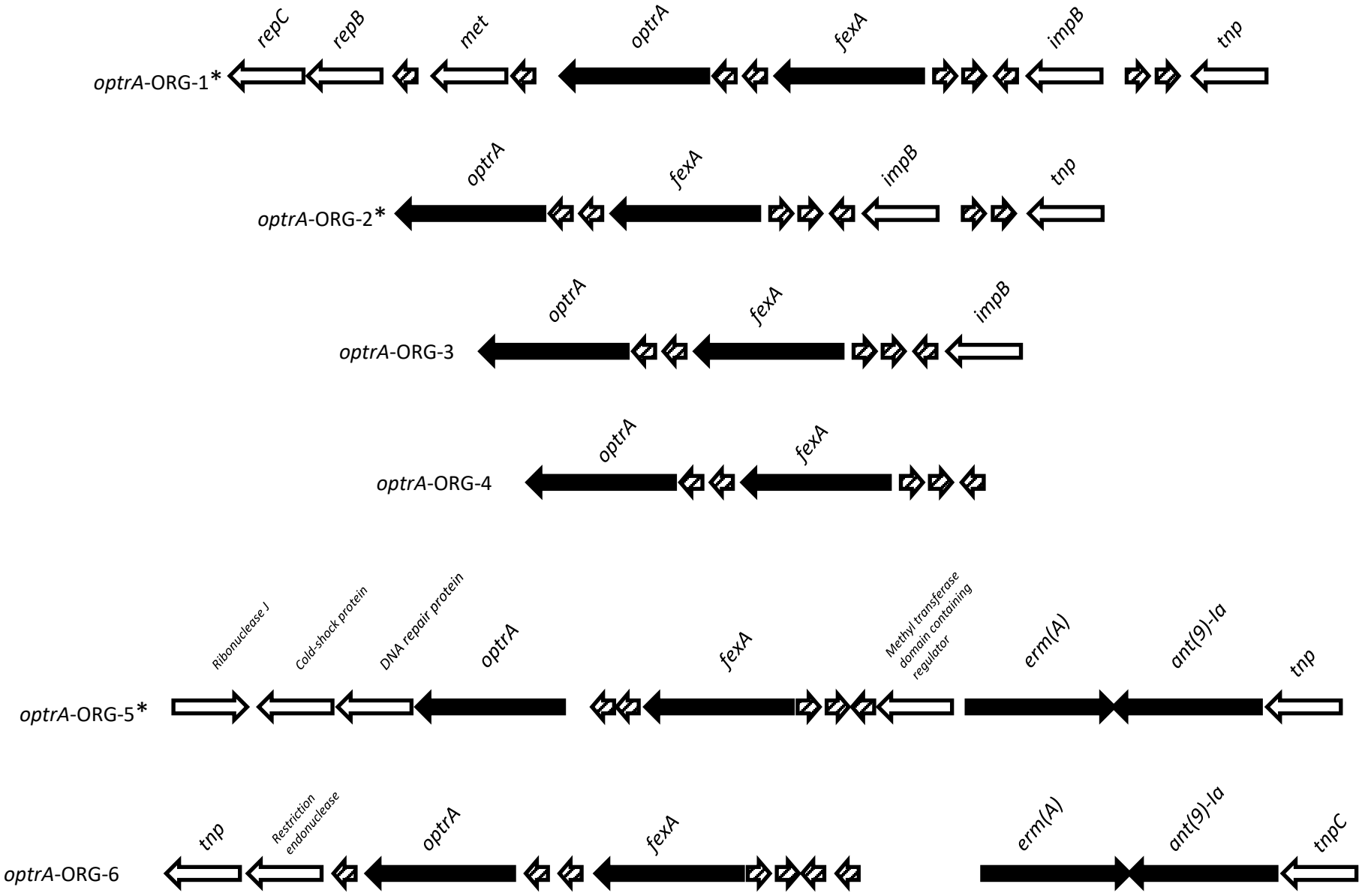
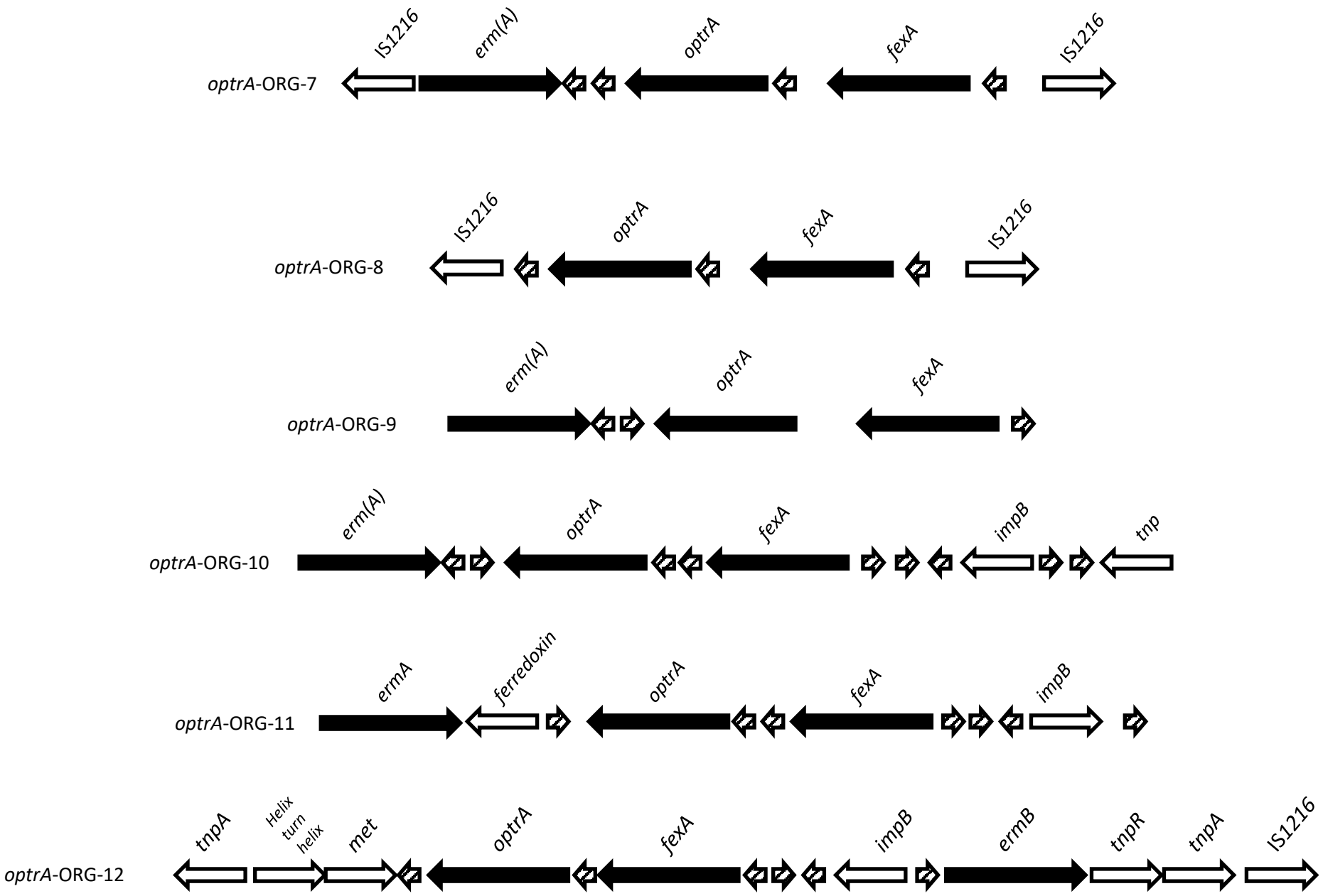
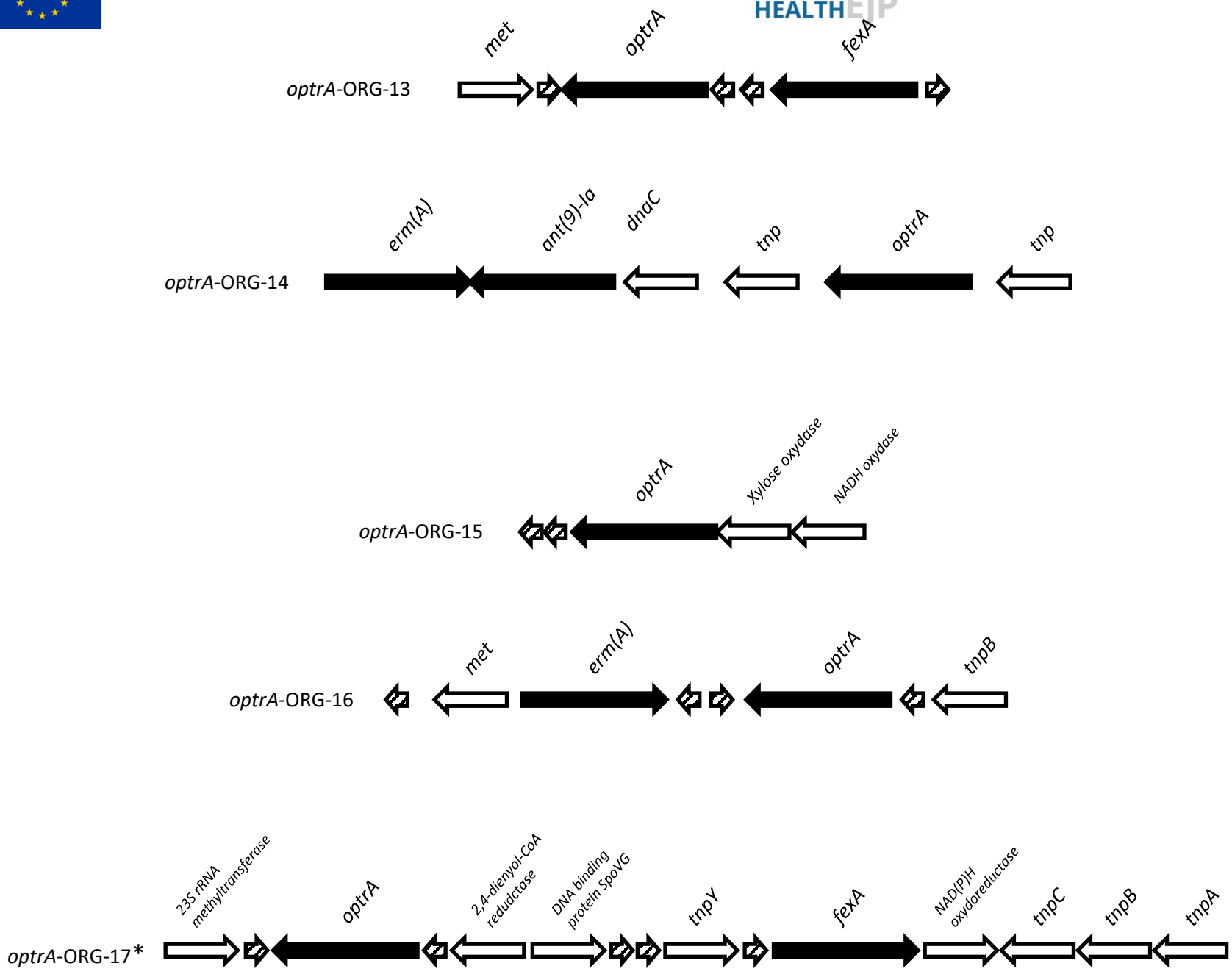


*Figure S6: Genetic map of cfr genetic environment. Antimicrobial resistance genes are represented with a black arrow, other genes with white arrows and hypothetical proteins with black hatched arrows. cfr-ORG-1 was observed in S. aureus and S. sciuri isolates, cfr-ORG-2 in E. faecalis and cfr-ORG-3 and -4 in E. gallinarum. * means that this organisation was found in a human isolate*

Figure S3: Genetic organisation surrounding *optrA*




optrA-ORG-7
IS1216
erm(A)
optrA
fexA
IS1216
optrA-ORG-8
IS1216
optrA
fexA
IS1216
optrA-ORG-9
erm(A)
optrA
fexA
optrA-ORG-10
erm(A)
optrA
fexA
impB
tnp
optrA-ORG-11
ermA
ferredoxin
optrA
fexA
impB
optrA-ORG-12
tnpA
Helix turn helix
met
optrA
fexA
impB
ermB
tnpR
tnpA
IS1216


optrA-ORG-13
met
optrA
fexA
optrA-ORG-14
erm(A)
ant(9)-Ia
dnaC
tnp
optrA
tnp
optrA-ORG-15
optrA
Xylose oxydase
NADH oxydase
optrA-ORG-16
met
erm(A)
optrA
tnpB
optrA-ORG-17*
23S rRNA methyltransferase
optrA
2,4-dienyol-CoA reduductase
DNA binding protein SpoVG
tnpY
fexA
NAD(P)H oxydoreductase
tnpC
tnpB
tnpA

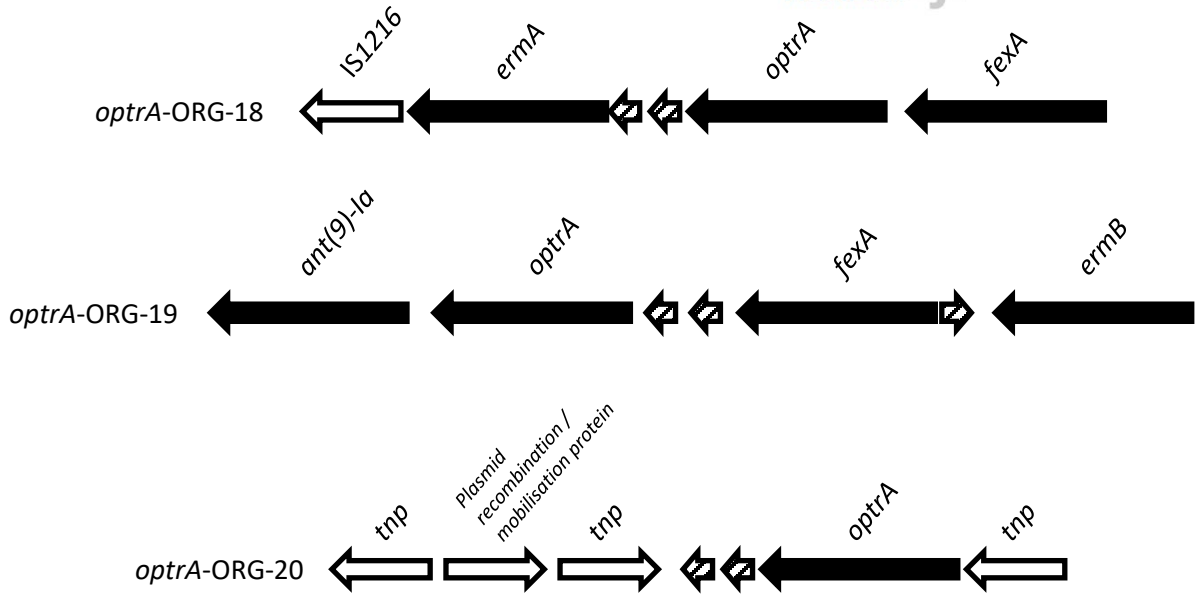


*Figure S7: Genetic maps of optrA genetic environment. Antimicrobial resistance genes are represented with black arrows, the other genes with white arrows and hypothetical proteins with black hatched arrows. optrA-ORG-1 was observed in E. faecalis, E. faecium, E. saccharoliticus, E. gallinarum, E. casseliflavus, E. hirae, E. asini isolates, optrA-ORG-2 in E. faecalis, optrA-ORG-3 in E. faecalis and E. gallinarum, optrA-ORG-4 in E. faecalis, optrA-ORG-5 in E. faecalis, optrA-ORG-6 in E. faecalis, optrA-ORG-7 in E. faecalis, E. faecium and E. durans, optrA-ORG-8 in E. faecalis, optrA-ORG-9 in E. faecium, optrA-ORG-10 in E. faecalis, optrA-ORG-11 in E. faecalis, optrA-ORG-12 in E. faecalis, optrA-ORG-13 in E. hirae, optrA-ORG-14 in E. faecalis, optrA-ORG-15 in E. faecalis and E. faecium, optrA-ORG-16 in E. faecium, optrA-ORG-17 in E. faecium, optrA-ORG-18 in E. faecium, optrA-ORG-19 in E. faecium and E. hirae, optrA-ORG-20 in E. casseliflavus. * means that this organisation was found in a human isolate.*

Figure S4: SNP phylogeny and SNP addresses for *E. faecalis* cluster ST480

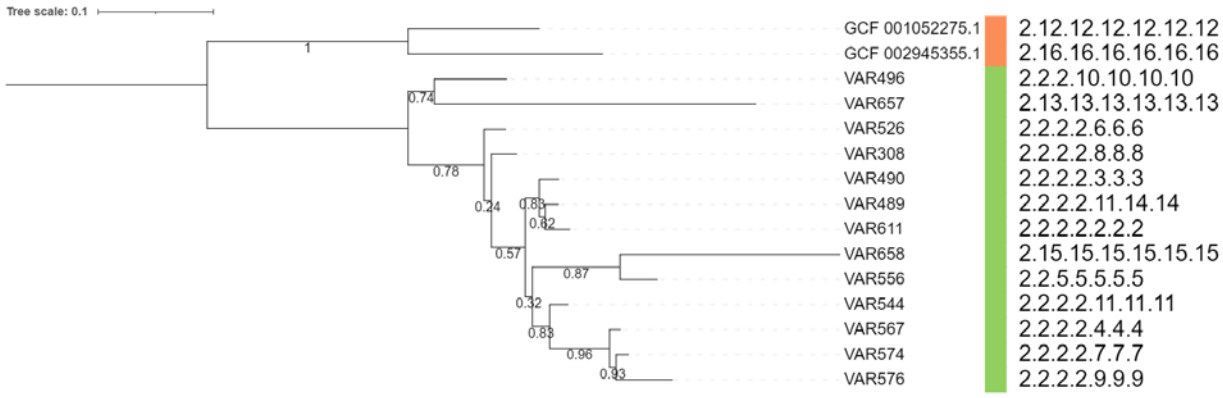


Figure S8: Maximum likelihood tree based on SNP-analysis. The scale bar is expressed as average changes per site. Dotted lines are used to help the reader. Bootstrap values are indicated on the branches. The coloring represents data retrieved from NCBI (orange) and in-house sequenced (green). The last column contains the SNP-addresses.

Figure S5: SNP phylogeny and SNP addresses for *E. faecium* cluster ST22.

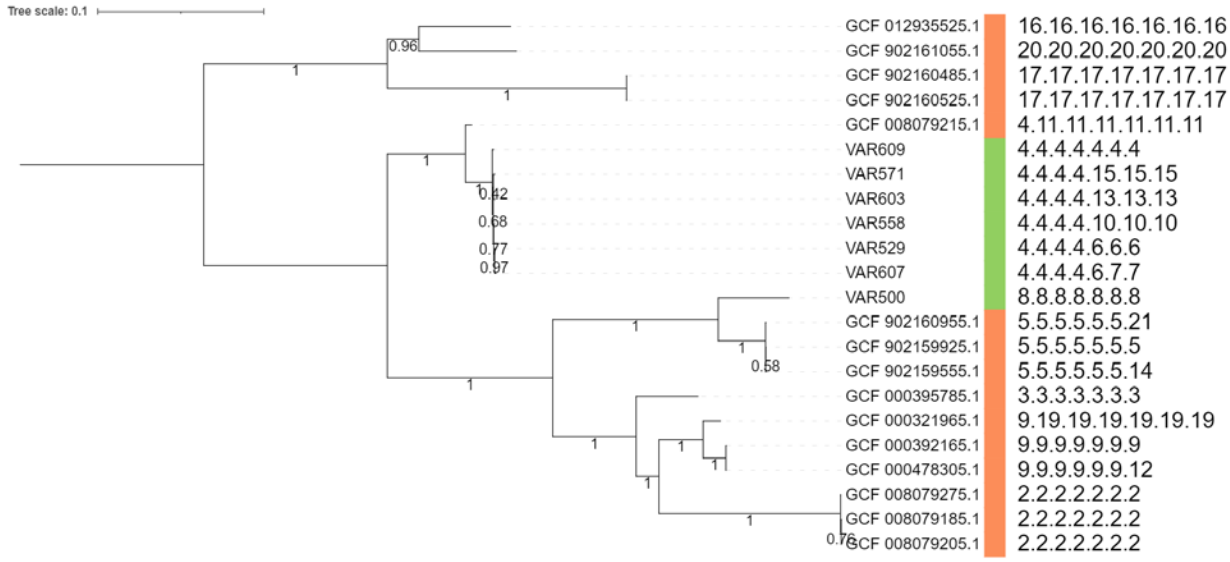


Figure S9: Maximum likelihood tree based on SNP-analysis. The scale bar is expressed as average changes per site. Dotted lines are used to help the reader. Bootstrap values are indicated on the branches. The coloring represents data retrieved from NCBI (orange) and in-house sequenced (green). The last column contains the SNP-addresses.

Figure S6: Network representation of cgMLST phylogeny *S. aureus* ST398

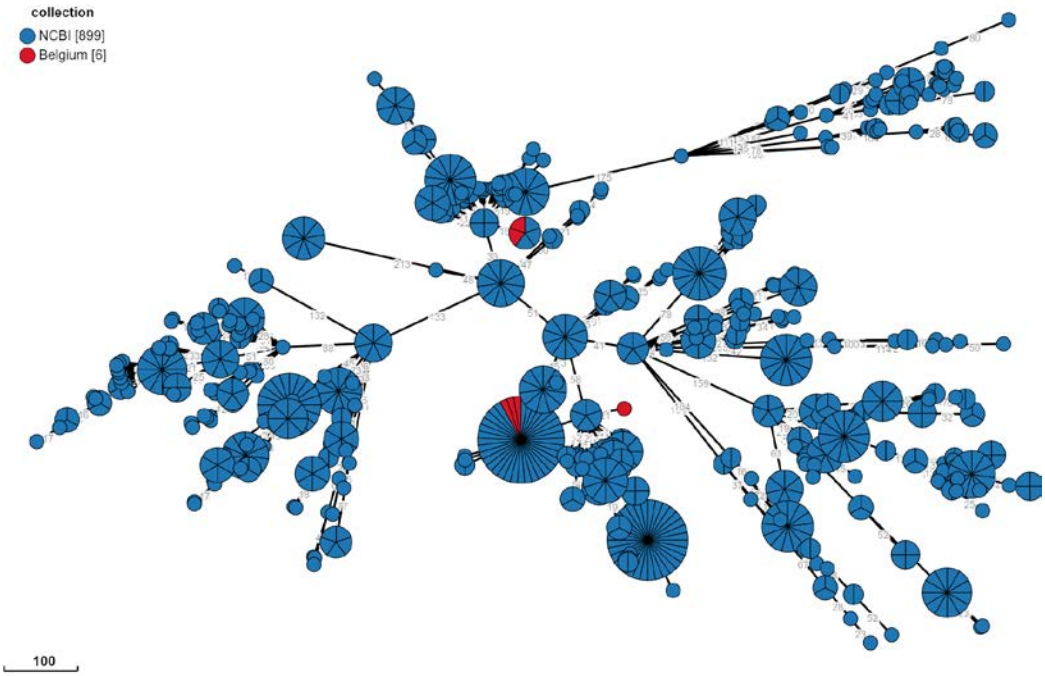


Figure S6: Minimum spanning tree based on cgMLST results. Branch lengths represent the number of allele differences. The coloring represents data retrieved from NCBI (blue) and in-house sequenced (red). Branches were collapsed on 10 allele differences.

Figure S7: Phylogenetic tree for sub-cluster of S. aureus cluster ST398.

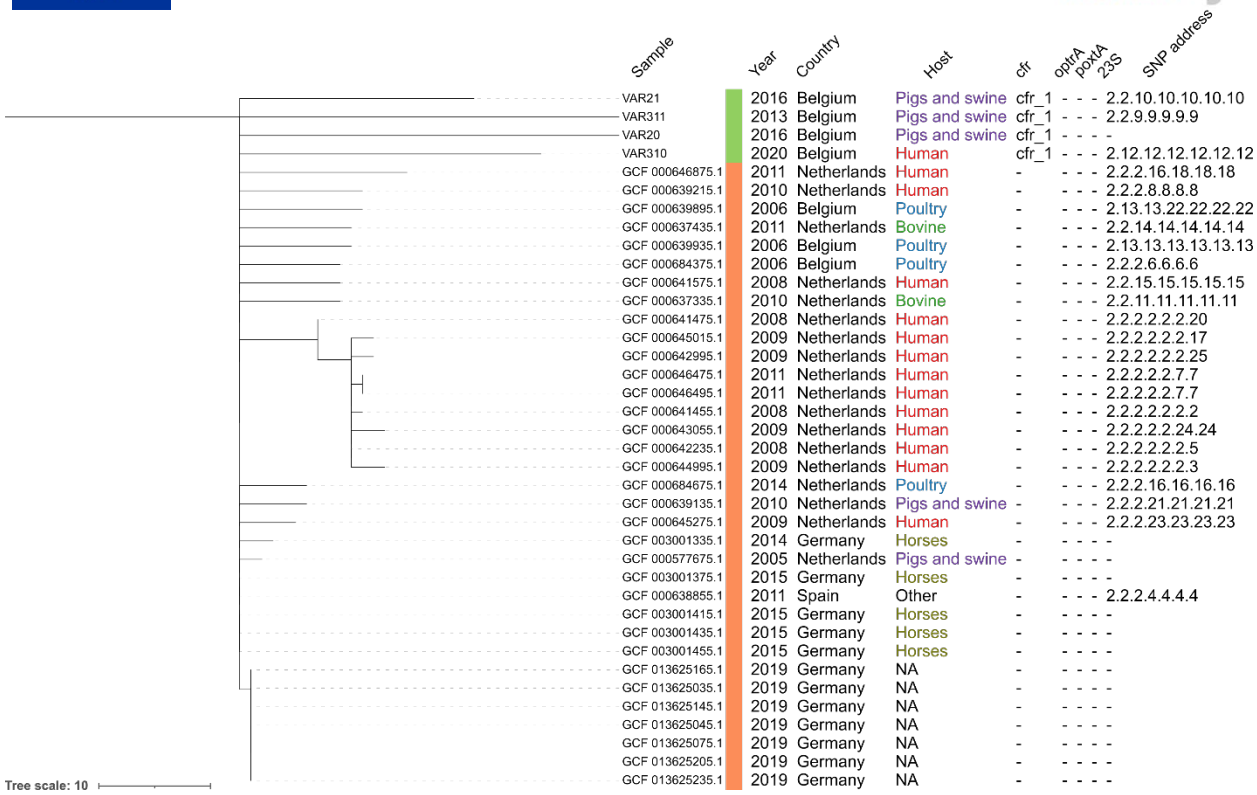


Figure S7: Minimum spanning tree based on cgMLST results. Branch lengths represent the number of allele differences. Dotted lines are used to help the reader. The coloring represents data retrieved from NCBI (orange) and sequenced in this study (green). A dash ('-') indicates no hits were found. Samples without a SNP address did not have suitable Illumina WGS data available (see Material and Methods).

Figure S8: SNP phylogeny for *S. aureus* cluster ST398.

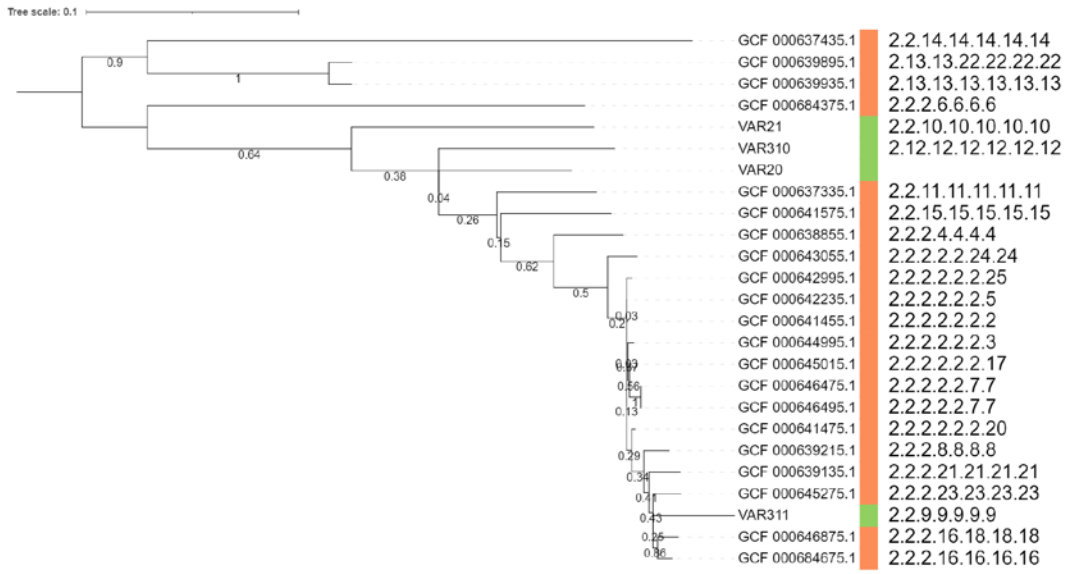


Figure S8: Maximum likelihood tree based on SNP-analysis. The scale bar is expressed as average changes per site. Dotted lines are used to help the reader. Bootstrap values are indicated on the branches. The coloring represents data retrieved from NCBI (orange) and in-house sequenced (green). The last column contains the SNP-addresses. Sample VAR20 did not pass the 30X depth cutoff and a SNP address could therefore not be determined.

Supplementary Tables

Table S1: Origin and phenotypic characteristics of linezolid resistant isolates collected in 2019.

					MIC (mg/L) LZD		MIC (mg/L) CHL	
Isolates	**n°VAR**	**Species (MALDI-TOf)**	**Animal origin**	**Sample**	**24h**	**48h**	**24h**	**48h**
U1910977	VAR572	*E. asini*	Pigs	Faecal matter	16	16	64	64
U1903386	VAR484	*E. casseliflavus*	Fattening pigs	Nasal Swabs	16	16	64	64
U1903387	VAR485	*E. casseliflavus*	Sows	Nasal Swabs	8	16	16	32
U1908577	VAR519	*E. Casseliflavus*	Pigs	Faecal matter	16	32	64	64
U1908659	VAR520	*E. casseliflavus*	Sows	Nasal Swabs	16	16	64	128
U1911066-2	VAR575	*E. durans*	Veal calves	Faecal matter	8	8	64	64
36079	VAR308	*E. faecalis*	Human	Urine	N/A	N/A	N/A	N/A
38572	VAR657	*E. faecalis*	Human	Urine	N/A	N/A	N/A	N/A
38930	VAR658	*E. faecalis*	Human	Urine	N/A	N/A	N/A	N/A
U1901956	VAR470	*E. faecalis*	Fattening pigs	Nasal Swabs	8	16	32	32
U1902377	VAR472	*E. faecalis*	Sows	Nasal Swabs	16	32	128	128
U1902381-1	VAR473	*E. faecalis*	Sows	Nasal Swabs	8	16	64	64
U1903058	VAR479	*E. faecalis*	Fattening pigs	Nasal Swabs	4	8	128	128
U1903110	VAR480	*E. faecalis*	Fattening pigs	Nasal Swabs	8	16	128	128
U1903149	VAR481	*E. faecalis*	Fattening pigs	Nasal Swabs	8	8	128	128
U1904192	VAR488	*E. faecalis*	Pigs	Faecal matter	4	8	32	64
U1904349	VAR489	*E. faecalis*	Pigs	Faecal matter	8	16	32	32
U1904783	VAR490	*E. faecalis*	Veal calves	Faecal matter	8	16	32	64
U1904784	VAR491	*E. faecalis*	Veal calves	Faecal matter	8	8	128	128
U1904901	VAR492	*E. faecalis*	Veal calves	Faecal matter	8	16	128	128
U1905516	VAR493	*E. faecalis*	Laying hens	Faecal matter	8	16	16	16
U1905701	VAR494	*E. faecalis*	Breeding hens	Faecal matter	8	8	32	64

					MIC (mg/L) LZD		MIC (mg/L) CHL	
Isolates	**n°VAR**	**Species (MALDI-TOf)**	**Animal origin**	**Sample**	**24h**	**48h**	**24h**	**48h**
U1905992	VAR514	*E. faecalis*	Veal calves	Faecal matter	4	8	128	128
U1906056	VAR496	*E. faecalis*	Veal calves	Faecal matter	8	16	32	64
U1906251	VAR497	*E. faecalis*	Veal calves	Faecal matter	8	16	128	128
U1906262	VAR498	*E. faecalis*	Veal calves	Faecal matter	4	8	128	128
U1906719-1	VAR503	*E. faecalis*	Pigs	Faecal matter	8	16	128	128
U1906874	VAR505	*E. faecalis*	Veal calves	Faecal matter	8	16	32	64
U1906974	VAR506	*E. faecalis*	Broilers	Faecal matter	4	8	64	64
U1906976	VAR507	*E. faecalis*	Pigs	Faecal matter	8	16	32	64
U1907136	VAR508	*E. faecalis*	Veal calves	Faecal matter	8	16	128	128
U1907188	VAR510	*E. faecalis*	Veal calves	Faecal matter	4	16	128	128
U1907487	VAR512	*E. faecalis*	Veal calves	Faecal matter	4	16	8	64
U1907500	VAR513	*E. faecalis*	Veal calves	Faecal matter	8	16	64	64
U1907649	VAR515	*E. faecalis*	Broilers	Faecal matter	4	16	32	64
U1907899	VAR517	*E. faecalis*	Fattening pigs	Nasal Swabs	8	8	128	128
U1908804	VAR521	*E. faecalis*	Sows	Nasal Swabs	4	8	128	128
U1908968	VAR524	*E. faecalis*	Broilers	Faecal matter	8	8	64	64
U1908971	VAR525	*E. faecalis*	Broilers	Faecal matter	4	8	32	64
U1908972	VAR526	*E. faecalis*	Veal calves	Faecal matter	8	16	64	64
U1908983	VAR527	*E. faecalis*	Broilers	Faecal matter	4	8	128	128
U1909036	VAR531	*E. faecalis*	Fattening pigs	Nasal Swabs	8	16	64	64
U1909058	VAR532	*E. faecalis*	Veal calves	Faecal matter	8	16	32	64
U1909113	VAR533	*E. faecalis*	Veal calves	Faecal matter	8	8	128	128
U1909135	VAR534	*E. faecalis*	Pigs	Faecal matter	8	8	64	64
U1909139	VAR535	*E. faecalis*	Veal calves	Faecal matter	8	8	128	128
U1909178	VAR536	*E. faecalis*	Sows	Nasal Swabs	8	8	128	128

					MIC (mg/L) LZD		MIC (mg/L) CHL	
Isolates	**n°VAR**	**Species (MALDI-TOf)**	**Animal origin**	**Sample**	**24h**	**48h**	**24h**	**48h**
U1909532	VAR537	*E. faecalis*	Fattening pigs	Nasal Swabs	8	8	128	128
U1909753	VAR542	*E. faecalis*	Pigs	Faecal matter	8	8	64	64
U1909777	VAR544	*E. faecalis*	Veal calves	Faecal matter	8	16	64	128
U1909944	VAR545	*E. faecalis*	Veal calves	Faecal matter	8	16	128	128
U1909945	VAR546	*E. faecalis*	Veal calves	Faecal matter	8	16	128	128
U1910218	VAR550	*E. faecalis*	Fattening pigs	Nasal Swabs	8	8	128	128
U1910220-2	VAR552	*E. faecalis*	Fattening pigs	Nasal Swabs	8	8	128	128
U1910420-1	VAR556	*E. faecalis*	Veal calves	Faecal matter	8	32	32	64
U1910544	VAR559	*E. faecalis*	Veal calves	Faecal matter	8	16	128	128
U1910553-2	VAR561	*E. faecalis*	Veal calves	Faecal matter	8	8	128	128
U1910695	VAR562	*E. faecalis*	Veal calves	Faecal matter	4	8	128	128
U1910701	VAR564	*E. faecalis*	Veal calves	Faecal matter	4	8	128	128
U1910760-2	VAR567	*E. faecalis*	Veal calves	Faecal matter	8	16	64	128
U1910763	VAR569	*E. faecalis*	Veal calves	Faecal matter	8	16	32	64
U1911057	VAR573	*E. faecalis*	Broilers	Faecal matter	8	16	64	64
U1911066-1	VAR574	*E. faecalis*	Veal calves	Faecal matter	8	8	128	128
U1911067	VAR576	*E. faecalis*	Veal calves	Faecal matter	8	16	64	128
U1911181	VAR579	*E. faecalis*	Veal calves	Faecal matter	4	8	128	128
U1911542	VAR582	*E. faecalis*	Pigs	Faecal matter	8	16	128	128
U1911543	VAR583	*E. faecalis*	Pigs	Faecal matter	8	16	128	128
U1911548	VAR584	*E. faecalis*	Veal calves	Faecal matter	4	8	>128	>128
U1911579	VAR585	*E. faecalis*	Veal calves	Faecal matter	8	8	128	128
U1911602	VAR586	*E. faecalis*	Veal calves	Faecal matter	8	16	128	128
U1911603	VAR587	*E. faecalis*	Veal calves	Faecal matter	8	8	128	128
U1911610	VAR588	*E. faecalis*	Broilers	Faecal matter	4	8	128	128

					MIC (mg/L) LZD		MIC (mg/L) CHL	
Isolates	**n°VAR**	**Species (MALDI-TOf)**	**Animal origin**	**Sample**	**24h**	**48h**	**24h**	**48h**
U1911770	VAR591	*E. faecalis*	Veal calves	Faecal matter	8	16	32	64
U1911772	VAR592	*E. faecalis*	Veal calves	Faecal matter	8	16	32	64
U1911775	VAR593	*E. faecalis*	Veal calves	Faecal matter	4	8	128	128
U1911826	VAR594	*E. faecalis*	Veal calves	Faecal matter	4	8	128	128
U1911827	VAR595	*E. faecalis*	Veal calves	Faecal matter	8	8	128	128
U1912064	VAR598	*E. faecalis*	Broilers	Faecal matter	8	16	128	128
U1912161	VAR601	*E. faecalis*	Fattening pigs	Nasal Swabs	16	16	64	64
U1912354	VAR602	*E. faecalis*	Fattening pigs	Nasal Swabs	8	8	128	128
U1912420	VAR604	*E. faecalis*	Pigs	Faecal matter	4	8	128	128
U1912428	VAR606	*E. faecalis*	Veal calves	Faecal matter	4	8	64	128
U1912667	VAR610	*E. faecalis*	Sows	Nasal Swabs	4	8	128	128
U1912795	VAR611	*E. faecalis*	Sows	Nasal Swabs	8	16	64	128
36656	VAR309	*E. faecium*	Human	Blood Culture	N/A	N/A	N/A	N/A
U1902000	VAR471	*E. faecium*	Sows	Nasal Swabs	4	16	32	64
U1902884	VAR475	*E. faecium*	Sows	Nasal Swabs	4	16	32	64
U1902891	VAR476	*E. faecium*	Fattening pigs	Nasal Swabs	16	16	64	64
U1902986	VAR477	*E. faecium*	Sows	Nasal Swabs	8	16	64	64
U1903413	VAR486	*E. faecium*	Sows	Nasal Swabs	8	16	32	64
U1906556	VAR499	*E. faecium*	Pigs	Faecal matter	8	16	32	64
U1906559	VAR500	*E. faecium*	Breeding hens	Faecal matter	16	16	64	64
U1906592-2	VAR502	*E. faecium*	Pigs	Faecal matter	16	16	64	64
U1906719-2	VAR504	*E. faecium*	Pigs	Faecal matter	8	16	32	64
U1907153	VAR509	*E. faecium*	Veal calves	Faecal matter	8	16	64	64
U1907464	VAR511	*E. faecium*	Sows	Nasal Swabs	8	16	32	64
U1907681	VAR516	*E. faecium*	Pigs	Faecal matter	8	16	32	64

					MIC (mg/L) LZD		MIC (mg/L) CHL	
Isolates	**n°VAR**	**Species (MALDI-TOf)**	**Animal origin**	**Sample**	**24h**	**48h**	**24h**	**48h**
U1907985	VAR518	*E. faecium*	Pigs	Faecal matter	16	32	64	64
U1908878	VAR523	*E. faecium*	Fattening pigs	Nasal Swabs	8	16	64	64
U1908989	VAR528	*E. faecium*	Pigs	Faecal matter	16	16	64	64
U1908996	VAR529	*E. faecium*	Laying hens	Faecal matter	8	16	64	64
U1909740	VAR538	*E. faecium*	Fattening pigs	Nasal Swabs	16	32	64	128
U1909745	VAR539	*E. faecium*	Pigs	Faecal matter	8	16	32	64
U1909746	VAR540	*E. faecium*	Broilers	Faecal matter	16	16	64	64
U1909749	VAR541	*E. faecium*	Pigs	Faecal matter	16	16	64	128
U1909769	VAR543	*E. faecium*	Breeding hens	Faecal matter	16	32	16	16
U1909947	VAR547	*E. faecium*	Breeding hens	Faecal matter	8	8	64	64
U1910000	VAR548	*E. faecium*	Sows	Nasal Swabs	4	8	32	32
U1910129	VAR549	*E. faecium*	Pigs	Faecal matter	8	8	32	32
U1910375	VAR553	*E. faecium*	Veal calves	Faecal matter	4	8	8	16
U1910420-2	VAR557	*E. faecium*	Veal calves	Faecal matter	8	16	64	128
U1910421	VAR558	*E. faecium*	Veal calves	Faecal matter	8	8	32	64
U1910553-1	VAR560	*E. faecium*	Veal calves	Faecal matter	4	8	32	32
U1910700	VAR563	*E. faecium*	Veal calves	Faecal matter	16	16	64	64
U1910758	VAR565	*E. faecium*	Broilers	Faecal matter	8	8	32	64
U1910760-1	VAR566	*E. faecium*	Veal calves	Faecal matter	16	32	64	128
U1910762	VAR568	*E. faecium*	Veal calves	Faecal matter	8	16	64	64
U1910909	VAR570	*E. faecium*	Broilers	Faecal matter	8	16	64	64
U1910963	VAR571	*E. faecium*	Pigs	Faecal matter	8	16	64	64
U1911073	VAR577	*E. faecium*	Breeding hens	Faecal matter	16	16	32	64
U1911075	VAR578	*E. faecium*	Breeding hens	Faecal matter	8	16	32	64
U1911267	VAR580	*E. faecium*	Pigs	Faecal matter	16	16	32	64

					MIC (mg/L) LZD		MIC (mg/L) CHL	
Isolates	**n°VAR**	**Species (MALDI-TOf)**	**Animal origin**	**Sample**	**24h**	**48h**	**24h**	**48h**
U1911537	VAR581	*E. faecium*	Broilers	Faecal matter	8	16	32	64
U1911618	VAR589	*E. faecium*	Veal calves	Faecal matter	8	16	64	64
U1911830	VAR596	*E. faecium*	Broilers	Faecal matter	4	16	32	64
U1912067	VAR599	*E. faecium*	Breeding hens	Faecal matter	16	16	32	64
U1912069	VAR600	*E. faecium*	Breeding hens	Faecal matter	2	8	32	32
U1912416	VAR603	*E. faecium*	Pigs	Faecal matter	8	8	64	64
U1912429	VAR607	*E. faecium*	Veal calves	Faecal matter	8	16	32	64
U1912581	VAR609	*E. faecium*	Fattening pigs	Nasal Swabs	8	8	32	64
U1912967	VAR612	*E. faecium*	Breeding hens	Faecal matter	2	16	16	64
U1902381-2	VAR474	*E. gallinarum*	Sows	Nasal Swabs	8	16	32	32
U1902987	VAR478	*E. gallinarum*	Fattening pigs	Nasal Swabs	16	32	64	64
U1908814	VAR522	*E. gallinarum*	Breeding hens	Faecal matter	8	16	32	64
U1909000	VAR530	*E. gallinarum*	Veal calves	Faecal matter	8	8	64	64
U1910220-1	VAR551	*E. gallinarum*	Fattening pigs	Nasal Swabs	16	32	64	64
U1903744	VAR487	*E. hirae*	Pigs	Faecal matter	32	32	64	64
U1906055	VAR495	*E. hirae*	Pigs	Faecal matter	16	32	64	64
U1906592-1	VAR501	*E. hirae*	Pigs	Faecal matter	8	32	32	64
U1910389	VAR554	*E. hirae*	Pigs	Faecal matter	16	32	64	64
U1910391	VAR555	*E. hirae*	Pigs	Faecal matter	16	32	64	64
U1911969	VAR597	*E. hirae*	Pigs	Faecal matter	16	32	64	64
U1912421	VAR605	*E. hirae*	Pigs	Faecal matter	16	32	64	64
U1901103	VAR312	*E. faecalis*	Veal calves	Faecal matter	16	32	32	64
U1901112	VAR313	*E. faecalis*	Broilers	Faecal matter	8	16	8	16
U1903107	VAR315	*E. faecium*	Pigs	Faecal matter	8	16	64	128
U1902783	VAR314	*E. saccharolyticus*	Pigs	Faecal matter	8	16	32	64

					MIC (mg/L) LZD		MIC (mg/L) CHL	
Isolates	**n°VAR**	**Species (MALDI-TOf)**	**Animal origin**	**Sample**	**24h**	**48h**	**24h**	**48h**
U1911728	VAR590	*P. pentosaceus*	Pigs	Faecal matter	16	16	32	32
1303960	VAR311	*S. aureus*	Fattening pigs	Nasal Swabs	N/A	N/A	N/A	N/A
2015 S421	VAR310	*S. aureus*	Human	Skin Lesion	N/A	N/A	N/A	N/A
U1606488	VAR20	*S. aureus*	breeding pigs	Nasal Swabs	N/A	N/A	N/A	N/A
U1608895	VAR21	*S. aureus*	breeding pigs	Nasal Swabs	N/A	N/A	N/A	N/A
U1903295	VAR482	*S. aureus*	Fattening pigs	Nasal Swabs	16	16	128	>128
U1903297	VAR483	*S. aureus*	Sows	Nasal Swabs	8	16	128	>128
U1912491	VAR608	*S. sciuri*	Sows	Nasal Swabs	8	8	>128	>128

Identical isolates numbers followed by a dash indicate that these isolates come from the same sample. VAR numbers are internal numbers for sequenced isolates. Minimum inhibitory concentration above the clinical breakpoint are in grey. One isolate of Lactobacillus johnsonii was also observed but not kept in collection. Vancomycin resistance is caused by chromosomic Van gene or mutation. Abbreviations: N/A = data not available, VAR number is an intern numbering dedicated to NGS isolates, LZD = linezolid, CHL = chloramphenicol, TET = tetracycline.

Table S2: Detected LR genes and mutations.

Sample	Species (MALDI-TOF)	Sequence type[a,b]	*cfr*	*optrA*	*poxtA_1*	23S mutations	Genetic organisation
VAR572	*E. asini*	N/A	-	*optrA*_1_KP399637	-	-	*optrA*-ORG-1
VAR484	*E. casseliflavus*	N/A	-	*optrA*_1_KP399637	-	-	*optrA*-ORG-1
VAR485	*E. casseliflavus*	N/A	-	*optrA*_9_KT892063*	-	-	*optrA-ORG-20*
VAR519	*E. casseliflavus*	N/A	-	*optrA*_1_KP399637	-	-	*optrA*-ORG-1
VAR520	*E. casseliflavus*	N/A	-	*optrA*_1_KP399637	-	-	*optrA*-ORG-1
VAR575	*E. durans*	N/A	-	*optrA*_14_KX620941*	-	-	*optrA-ORG-7*
VAR308	*E. faecalis*	ST480	-	*optrA*_1_KP399637	-	-	*optrA*-ORG-1
VAR312	*E. faecalis*	ST40	-	-	-	G2505A	mutation
VAR313	*E. faecalis*	ST177	-	-	-	G2576T	mutation
VAR470	*E. faecalis*	ST40	-	*optrA*_2_KT862781	-	-	*optrA*-ORG-3

Sample	Species (MALDI-TOF)	Sequence type[a,b]	*cfr*	*optrA*	*poxtA_1*	23S mutations	Genetic organisation
VAR472	*E. faecalis*	ST16	-	*optrA*_1_KP399637	-	-	*optrA*-ORG-1
VAR473	*E. faecalis*	ST1008	*cfr*_1_AM408573*	*optrA*_9_KT892063*	*poxtA*_1_MF095097	-	*cfr*-ORG-2; *optrA-ORG-14*; *poxtA*-ORG-1
VAR479	*E. faecalis*	ST288	-	*optrA*_7_KT862775	-	-	*optrA-ORG-11*
VAR480	*E. faecalis*	ST1071[a]	-	*optrA*_2_KT862781	-	-	*optrA*-ORG-3
VAR481	*E. faecalis*	ST506	-	*optrA*_5_KT862783	-	-	*optrA*-ORG-5
VAR488	*E. faecalis*	ST476	-	*optrA*_5_KT862783	-	-	*optrA*-ORG-5
VAR489	*E. faecalis*	ST480	-	*optrA*_1_KP399637	-	-	*optrA*-ORG-2
VAR490	*E. faecalis*	ST480	-	*optrA*_1_KP399637	-	-	*optrA*-ORG-2
VAR491	*E. faecalis*	ST631	-	*optrA*_5_KT862783	-	-	*optrA*-ORG-5
VAR492	*E. faecalis*	ST480[b]	-	*optrA*_1_KP399637	-	-	*optrA*-ORG-5
VAR493	*E. faecalis*	ST16	-	-	-	G2576T	mutation
VAR494	*E. faecalis*	ST234	-	*optrA*_2_KT862781	-	-	*optrA-ORG-12*
VAR496	*E. faecalis*	ST480	-	*optrA*_5_KT862783	-	-	*optrA*-ORG-5
VAR497	*E. faecalis*	ST55	-	*optrA*_5_KT862783	-	-	*optrA*-ORG-5
VAR498	*E. faecalis*	ST631	-	*optrA*_5_KT862783	-	-	*optrA*-ORG-5
VAR503	*E. faecalis*	ST108	-	*optrA*_7_KT862775	*poxtA*_1_MF095097	-	*optrA*-ORG-2; *poxtA*-ORG-1
VAR505	*E. faecalis*	ST21	-	*optrA*_1_KP399637	-	-	*optrA*-ORG-2
VAR506	*E. faecalis*	ST1071[a]	-	*optrA*_15_KX620942	-	-	*optrA-ORG-7*
VAR507	*E. faecalis*	ST16	-	*optrA*_2_KT862781	-	-	*optrA*-ORG-3
VAR508	*E. faecalis*	ST330	-	*optrA*_1_KP399637	-	-	*optrA*-ORG-2
VAR510	*E. faecalis*	ST23	-	*optrA*_5_KT862783	-	-	*optrA-ORG-6*
VAR512	*E. faecalis*	ST55	-	*optrA*_14_KX620941*	-	-	*optrA*-ORG-1
VAR513	*E. faecalis*	ST49	-	*optrA*_1_KP399637	-	-	*optrA*-ORG-1
VAR514	*E. faecalis*	ST631	-	*optrA*_5_KT862783	-	-	*optrA*-ORG-5
VAR515	*E. faecalis*	ST133	-	*optrA*_5_KT862783	-	-	*optrA-ORG-6*
VAR517	*E. faecalis*	ST506	-	*optrA*_5_KT862783	-	-	*optrA*-ORG-5

Sample	Species (MALDI-TOF)	Sequence type[a,b]	*cfr*	*optrA*	*poxtA_1*	23S mutations	Genetic organisation
VAR521	*E. faecalis*	ST631	-	*optrA*_5_KT862783	-	-	*optrA*-ORG-5
VAR524	*E. faecalis*	ST234	-	*optrA*_2_KT862781	-	-	*optrA-ORG-12*
VAR525	*E. faecalis*	ST241	-	*optrA*_3_KT862780	-	-	*optrA*-ORG-1
VAR526	*E. faecalis*	ST480	-	*optrA*_1_KP399637	-	-	*optrA*-ORG-1
VAR527	*E. faecalis*	ST59	-	*optrA*_5_KT862783	-	-	*optrA*-ORG-5
VAR531	*E. faecalis*	ST207	-	*optrA*_18_ALMH01000001*	-	-	*optrA-ORG-15*
VAR532	*E. faecalis*	ST133	-	*optrA*_5_KT862783	-	-	*optrA-ORG-6*
VAR533	*E. faecalis*	ST40	-	*optrA*_5_KT862783	-	-	*optrA*-ORG-4
VAR534	*E. faecalis*	ST1072[a]	-	*optrA*_14_KX620941*	-	-	*optrA-ORG-7*
VAR535	*E. faecalis*	ST40	-	*optrA*_5_KT862783	-	-	*optrA*-ORG-4
VAR536	*E. faecalis*	ST409	-	*optrA*_5_KT862783	-	-	*optrA*-ORG-5
VAR537	*E. faecalis*	ST943	-	*optrA*_7_KT862775	-	-	*optrA-ORG-10*
VAR542	*E. faecalis*	ST58	-	*optrA*_7_KT862775	-	-	*optrA-ORG-10*
VAR544	*E. faecalis*	ST480	-	*optrA*_1_KP399637	-	-	*optrA*-ORG-2
VAR545	*E. faecalis*	ST330	-	*optrA*_1_KP399637	-	-	*optrA*-ORG-2
VAR546	*E. faecalis*	ST330	-	*optrA*_1_KP399637	-	-	*optrA*-ORG-2
VAR550	*E. faecalis*	ST506	-	*optrA*_5_KT862783	-	-	*optrA*-ORG-5
VAR552	*E. faecalis*	ST86	-	*optrA*_7_KT862775	-	-	*optrA-ORG-7*
VAR556	*E. faecalis*	ST480	-	*optrA*_1_KP399637	-	-	*optrA*-ORG-1
VAR559	*E. faecalis*	ST21	-	*optrA*_1_KP399637	-	-	*optrA*-ORG-2
VAR561	*E. faecalis*	ST506	-	*optrA*_5_KT862783	-	-	*optrA*-ORG-5
VAR562	*E. faecalis*	ST631	-	*optrA*_5_KT862783	-	-	*optrA*-ORG-5
VAR564	*E. faecalis*	ST631	-	*optrA*_5_KT862783	-	-	*optrA*-ORG-5
VAR567	*E. faecalis*	ST480	-	*optrA*_1_KP399637	-	-	*optrA*-ORG-2
VAR569	*E. faecalis*	ST21	-	*optrA*_1_KP399637	-	-	*optrA*-ORG-1
VAR573	*E. faecalis*	ST86	-	*optrA*_15_KX620942	-	-	*optrA-ORG-7*

Sample	Species (MALDI-TOF)	Sequence type[a,b]	*cfr*	*optrA*	*poxtA_1*	23S mutations	Genetic organisation
VAR574	*E. faecalis*	ST480	-	*optrA*_1_KP399637	-	-	*optrA*-ORG-2
VAR576	*E. faecalis*	ST480	-	*optrA*_1_KP399637	-	-	*optrA*-ORG-2
VAR579	*E. faecalis*	ST631	-	*optrA*_5_KT862783	-	-	*optrA*-ORG-5
VAR582	*E. faecalis*	ST1008	-	*optrA*_9_KT892063*	*poxtA*_1_MF095097	-	*optrA-ORG-14*; *poxtA*-ORG-1
VAR583	*E. faecalis*	ST1008	-	*optrA*_9_KT892063*	*poxtA*_1_MF095097	-	*optrA-ORG-14*; *poxtA*-ORG-1
VAR584	*E. faecalis*	ST23	-	*optrA*_5_KT862783	-	-	*optrA-ORG-6*
VAR585	*E. faecalis*	ST40	-	*optrA*_5_KT862783	-	-	*optrA-ORG-6*
VAR586	*E. faecalis*	ST25	-	*optrA*_5_KT862783	-	-	*optrA-ORG-6*
VAR587	*E. faecalis*	ST40	-	*optrA*_5_KT862783	-	-	*optrA-ORG-6*
VAR588	*E. faecalis*	ST59	-	*optrA*_5_KT862783	-	-	*optrA*-ORG-5
VAR591	*E. faecalis*	ST21	-	*optrA*_1_KP399637	-	-	*optrA*-ORG-2
VAR592	*E. faecalis*	ST21	-	*optrA*_1_KP399637	-	-	*optrA*-ORG-2
VAR593	*E. faecalis*	ST631	-	*optrA*_5_KT862783	-	-	*optrA*-ORG-5
VAR594	*E. faecalis*	ST1070[a]	-	*optrA*_19_ALMN01000021*	-	-	*optrA-ORG-8*
VAR595	*E. faecalis*	ST631	-	*optrA*_5_KT862783	-	-	*optrA*-ORG-5
VAR598	*E. faecalis*	ST1071[a]	-	*optrA*_3_KT862780	-	-	*optrA*-ORG-2
VAR601	*E. faecalis*	ST16	-	*optrA*_1_KP399637	-	-	*optrA*-ORG-1
VAR602	*E. faecalis*	ST1071[a]	-	*optrA*_2_KT862781	-	-	*optrA*-ORG-3
VAR604	*E. faecalis*	ST506	-	*optrA*_5_KT862783	-	-	*optrA*-ORG-5
VAR606	*E. faecalis*	ST16	-	*optrA*_7_KT862775	-	-	*optrA-ORG-10*
VAR610	*E. faecalis*	ST631	-	*optrA*_5_KT862783	-	-	*optrA*-ORG-5
VAR611	*E. faecalis*	ST480	-	*optrA*_1_KP399637	-	-	*optrA*-ORG-2
VAR657	*E. faecalis*	ST480	-	*optrA*_3_KT862780*	-	-	*optrA*-ORG-2
VAR658	*E. faecalis*	ST480	-	*optrA*_5_KT862783	-	-	*optrA*-ORG-5
VAR309	*E. faecium*	ST202	-	*optrA*_2_KT862781	-	-	*optrA-ORG-17*
VAR315	*E. faecium*	ST1868[a]	-	*optrA*_14_KX620941*	-	-	*optrA-ORG-18*

Sample	Species (MALDI-TOF)	Sequence type[a,b]	*cfr*	*optrA*	*poxtA_1*	23S mutations	Genetic organisation
VAR471	*E. faecium*	ST1867[a]	-	-	*poxtA*_1_MF095097	-	*poxtA*-ORG-1
VAR475	*E. faecium*	ST1863[a]	-	-	*poxtA*_1_MF095097	-	*poxtA*-ORG-1
VAR476	*E. faecium*	ST278	-	*optrA*_9_KT892063*	-	-	*optrA-ORG-19*
VAR477	*E. faecium*	ST1146	-	*optrA*_1_KP399637	-	-	*optrA*-ORG-1
VAR486	*E. faecium*	ST184	-	-	*poxtA*_1_MF095097	-	*poxtA*-ORG-1
VAR499	*E. faecium*	ST5	-	-	*poxtA*_1_MF095097	-	*poxtA*-ORG-1
VAR500	*E. faecium*	ST22	-	*optrA*_2_KT862781	*poxtA*_1_MF095097	-	*optrA-ORG-17*; *poxtA*-ORG-1
VAR502	*E. faecium*	ST137	-	*optrA*_9_KT892063*	-	-	*optrA-ORG-19*
VAR504	*E. faecium*	ST49	-	-	*poxtA*_1_MF095097	-	*poxtA*-ORG-1
VAR509	*E. faecium*	ST104	-	*optrA*_1_KP399637	*poxtA*_1_MF095097	-	*optrA* alone; *poxtA*-ORG-1
VAR511	*E. faecium*	ST718	-	-	*poxtA*_1_MF095097	-	*poxtA*-ORG-1
VAR516	*E. faecium*	ST5	-	-	*poxtA*_1_MF095097	-	*poxtA*-ORG-1
VAR518	*E. faecium*	ST1864[a]	-	*optrA*_1_KP399637	-	-	*optrA*-ORG-1
VAR523	*E. faecium*	ST1023	-	*optrA*_1_KP399637	*poxtA*_1_MF095097	-	*optrA* alone; *poxtA*-ORG-1
VAR528	*E. faecium*	ST1870[a]	-	*optrA*_9_KT892063*	-	-	*optrA-ORG-19*
VAR529	*E. faecium*	ST22	-	*optrA*_1_KP399637	*poxtA*_1_MF095097	-	*optrA* alone; *poxtA*-ORG-1
VAR538	*E. faecium*	ST133	-	*optrA*_1_KP399637	-	-	*optrA*-ORG-1
VAR539	*E. faecium*	ST55	-	-	*poxtA*_1_MF095097	-	*poxtA*-ORG-1
VAR540	*E. faecium*	ST1865[a]	-	-	*poxtA*_1_MF095097	-	*poxtA*-ORG-1
VAR541	*E. faecium*	ST140	-	*optrA*_1_KP399637	-	-	*optrA*-ORG-1
VAR543	*E. faecium*	ST1866[a]	-	-	*poxtA*_1_MF095097	-	*poxtA* alone
VAR547	*E. faecium*	ST1869[a]	-	*optrA*_14_KX620941*	-	-	*optrA-ORG-9*
VAR548	*E. faecium*	ST97	-	-	*poxtA*_1_MF095097	-	*poxtA*-ORG-1
VAR549	*E. faecium*	ST137	-	-	*poxtA*_1_MF095097	-	*poxtA*-ORG-1
VAR553	*E. faecium*	ST296	-	-	-	G2576T	mutation
VAR557	*E. faecium*	ST957	-	*optrA*_8_KT862782	*poxtA*_1_MF095097	-	*optrA-ORG-16*; *poxtA*-ORG-1

Sample	Species (MALDI-TOF)	Sequence type[a,b]	*cfr*	*optrA*	*poxtA_1*	23S mutations	Genetic organisation
VAR558	*E. faecium*	ST22	-	*optrA*_1_KP399637	*poxtA*_1_MF095097	-	*optrA* alone; *poxtA*-ORG-1
VAR560	*E. faecium*	ST324	-	*optrA*_1_KP399637	-	-	*optrA* alone
VAR563	*E. faecium*	ST18	-	*optrA*_14_KX620941*	-	-	*optrA-ORG-7*
VAR565	*E. faecium*	ST1865[a]	-	-	*poxtA*_1_MF095097	-	*poxtA*-ORG-1
VAR566	*E. faecium*	ST56	-	*optrA*_1_KP399637	-	-	*optrA*-ORG-1
VAR568	*E. faecium*	ST104	-	*optrA*_1_KP399637	*poxtA*_1_MF095097	-	*optrA* alone; *poxtA*-ORG-1
VAR570	*E. faecium*	ST32	-	*optrA*_2_KT862781	*poxtA*_1_MF095097	-	*optrA-ORG-15*; *poxtA*-ORG-1
VAR571	*E. faecium*	ST22	-	*optrA*_1_KP399637	*poxtA*_1_MF095097	-	*optrA* alone; *poxtA*-ORG-1
VAR577	*E. faecium*	ST420	-	-	*poxtA*_1_MF095097	-	*poxtA*-ORG-1
VAR578	*E. faecium*	ST420	-	-	*poxtA*_1_MF095097	-	*poxtA*-ORG-1
VAR580	*E. faecium*	ST5	-	-	*poxtA*_1_MF095097	-	*poxtA*-ORG-1
VAR581	*E. faecium*	ST420	-	-	*poxtA*_1_MF095097	-	*poxtA*-ORG-1
VAR589	*E. faecium*	ST1023	-	*optrA*_1_KP399637	*poxtA*_1_MF095097	-	*optrA* alone; *poxtA*-ORG-1
VAR596	*E. faecium*	ST1865[a]	-	-	*poxtA*_1_MF095097	-	*poxtA*-ORG-1
VAR599	*E. faecium*	ST26	-	*optrA*_14_KX620941*	-	-	*optrA-ORG-7*
VAR600	*E. faecium*	ST8	-	-	*poxtA*_1_MF095097	-	*poxtA*-ORG-1
VAR603	*E. faecium*	ST22	-	*optrA*_1_KP399637	*poxtA*_1_MF095097	-	*optrA* alone; *poxtA*-ORG-1
VAR607	*E. faecium*	ST22	-	*optrA*_1_KP399637	*poxtA*_1_MF095097	-	*optrA* alone; *poxtA*-ORG-1
VAR609	*E. faecium*	ST22	-	*optrA*_1_KP399637	*poxtA*_1_MF095097	-	*optrA* alone; *poxtA*-ORG-1
VAR612	*E. faecium*	ST8	-	*optrA*_9_KT892063*	-	-	*optrA-ORG-19*
VAR474	*E. gallinarum*	N/A	*cfr*_1_AM408573	*optrA*_6_KT862784*	-	-	*cfr*-ORG-3 (*optrA* is included in *cfr*-ORG-3)
VAR478	*E. gallinarum*	N/A	-	*optrA*_1_KP399637	-	-	*optrA*-ORG-1
VAR522	*E. gallinarum*	N/A	*cfr*_1_AM408573	*optrA*_12_KX620936*	-	-	*cfr*-ORG-4 (*optrA* is included in *cfr*-ORG-4)
VAR530	*E. gallinarum*	N/A	-	*optrA*_2_KT862781	-	-	*optrA*-ORG-3
VAR551	*E. gallinarum*	N/A	-	*optrA*_1_KP399637	-	-	*optrA*-ORG-1
VAR487	*E. hirae*	N/A	-	*optrA*_1_KP399637	-	-	*optrA*-ORG-1

Sample	Species (MALDI-TOF)	Sequence type[a,b]	*cfr*	*optrA*	*poxtA_1*	23S mutations	Genetic organisation
VAR495	*E. hirae*	N/A	-	*optrA*_1_KP399637	-	-	*optrA*-ORG-1
VAR501	*E. hirae*	N/A	-	*optrA*_9_KT892063*	-	-	*optrA-ORG-19*
VAR554	*E. hirae*	N/A	-	*optrA*_1_KP399637	-	-	*optrA-ORG-13*
VAR555	*E. hirae*	N/A	-	*optrA*_1_KP399637	-	-	*optrA-ORG-13*
VAR597	*E. hirae*	N/A	-	*optrA*_1_KP399637	-	-	*optrA*-ORG-1
VAR605	*E. hirae*	N/A	-	*optrA*_1_KP399637	-	-	*optrA-ORG-13*
VAR314	*E.saccharolyticus* **	N/A	-	*optrA*_1_KP399637	-	-	*optrA*-ORG-1
VAR590	*P. pentosaceus*	N/A	-	-	*poxtA*_1_MF095097	-	*poxtA alone*
VAR20	*S. aureus*	ST398	*cfr*_1_AM408573	-	-	-	*cfr*-ORG-1
VAR21	*S. aureus*	ST398	*cfr*_1_AM408573	-	-	-	*cfr*-ORG-1
VAR310	*S. aureus*	ST398	*cfr*_1_AM408573	-	-	-	*cfr*-ORG-1
VAR311	*S. aureus*	ST398	*cfr*_1_AM408573	-	-	-	*cfr*-ORG-1
VAR482	*S. aureus*	ST398	*cfr*_1_AM408573	-	-	-	*cfr*-ORG-1
VAR483	*S. aureus*	ST398	*cfr*_1_AM408573	-	-	-	*cfr*-ORG-1
VAR608	*S. sciuri*	N/A	*cfr*_1_AM408573	-	-	-	*cfr*-ORG-1

Imperfect matches (i.e. less than 100% identity and/or target coverage) are indicated with an asterisk ''. A dash '-' indicates no gene was detected. Genetic organisation refers to the figure S1 for poxtA, S2 for cfr and S3 fot poxtA. The term "alone" in the genetic organisation column means that the contig carrying the LR gene did not contained any other genes. A double star "**" means that the identification by MALDI-TOF gives repeatedly a poor score for the identification. Abbreviations: N/A= not available; a: new sequence type; b: Sample VAR492 had a multi-hit for locus* yqiL *caused by contig fragmentation, leading to an imperfect match for ST480.*

Table S3: Host and geographical information for the different sequence type groups.

Species	Sequence type	Number of samples (this study / total)	Host(s)	Country(s)
E. faecalis	ST16	5 / 114	Human (78), N/A (17), Pigs and swines (11), Poultry (3), Bovine (2), Dogs (2), Sheep (1)	United Kingdom (44), China (12), USA (11), Japan (11), Denmark (10), Canada (7), N/A (7), Belgium (5), Estonia (3), Australia (1), Colombia (1), Ukraine (1), South Korea (1)
E. faecalis	ST21	5 / 64	NA (31), Human (18), Poultry (8), Bovine (5), Other (2)	USA (26), Canada (9), N/A (8), Belgium (5), United Kingdom (5), China (3), South Africa (1), Tunisia (1), Colombia (1), Argentina (1), Poland (1), Japan (1), Russia (1), South Korea (1)
E. faecalis	ST23	2 / 14	Human (10), Bovine (2), N/A (2)	United Kingdom (9), Belgium (2), France (2), Denmark (1)
E. faecalis	ST25	1 / 19	Human (9), N/A (9), Bovine (1)	United Kingdom (6), N/A (5), USA (2), China (2), Belgium (1), Canada (1), Tunisia (1), Russia (1)
E. faecalis	ST40	6 / 89	Human (49), N/A (28), Bovine (7), Pigs and swines (4), Other (1)	USA (37), United Kingdom (16), N/A (13), Canada (7), Belgium (6), Denmark (5), Spain (2), Lebanon (1), Germany (1), Estonia (1)
E. faecalis	ST49	1 / 14	Poultry (10), N/A (2), Human (1), Bovine (1)	Estonia (7), USA (3), Switzerland (1), Belgium (1), Russia (1), N/A (1)
E. faecalis	ST55	2 / 16	Human (7), Other (5), Bovine (2), N/A (2)	USA (7), United Kingdom (3), N/A (3), Belgium (2), Lebanon (1)
E. faecalis	ST59	2 / 13	NA (5), Poultry (4), Human (3), Dogs (1)	USA (2), Belgium (2), Brazil (2), New Zealand (2), N/A (2), Switzerland (1), United Kingdom (1), China (1)
E. faecalis	ST86	2 / 5	Poultry (2), Human (1), Pigs and swines (1), N/A (1)	USA (2), Belgium (2), Tunisia (1)
E. faecalis	ST108	1 / 108	Poultry (91), Human (12), N/A (4), Pigs and swines (1)	New Zealand (104), USA (2), Belgium (1), N/A (1)
E. faecalis	ST133	2 / 7	Human (4), Poultry (1), Bovine (1), N/A (1)	United Kingdom (3), Belgium (2), Estonia (1), China (1)
E. faecalis	ST177	1 / 12	NA (10), Poultry (2)	New Zealand (6), USA (3), N/A (2), Belgium (1)

Species	Sequence type	Number of samples (this study / total)	Host(s)	Country(s)
E. faecalis	ST207	1 / 5	NA (4), Pigs and swines (1)	China (2), Canada (1), Belgium (1), N/A (1)
E. faecalis	ST330	3 / 5	Bovine (3), Poultry (1), Pigs and swines (1)	Belgium (3), Brazil (2)
E. faecalis	ST476	1 / 11	Human (4), N/A (4), Pigs and swines (2), Dogs (1)	China (6), Tunisia (2), Belgium (1), Malaysia (1), South Korea (1)
E. faecalis	ST480	13 / 26	Human (12), Bovine (8), Dogs (2), Pigs and swines (2), N/A (2)	Belgium (13), China (5), France (3), USA (2), Lebanon (2), Canada (1)
E. faecalis	ST506	5 / 5	Pigs and swines (4), Bovine (1)	Belgium (5)
E. faecalis	ST631	10 / 10	Bovine (8), Pigs and swines (2)	Belgium (10)
E. faecium	ST5	3 / 10	Pigs and swines (7), N/A (2), Human (1)	Belgium (3), USA (2), Netherlands (2), Denmark (1), Spain (1), N/A (1)
E. faecium	ST8	2 / 12	Poultry (7), N/A (5)	New Zealand (6), USA (4), Belgium (2)
E. faecium	ST18	1 / 84	Human (46), N/A (37), Bovine (1)	USA (34), N/A (18), Canada (8), Russia (6), Tunisia (3), France (3), New Zealand (3), Netherlands (2), Belgium (1), South Africa (1), Sweden (1), Portugal (1), Tanzania (1), Denmark (1), United Kingdom (1)
E. faecium	ST22	7 / 32	Human (11), Poultry (8), N/A (8), Pigs and swines (3), Bovine (2)	Belgium (7), United Kingdom (6), Tunisia (4), Denmark (3), N/A (3), Germany (2), Spain (2), USA (1), Portugal (1), Algeria (1), Russia (1), Netherlands (1)
E. faecium	ST26	1 / 18	Poultry (13), N/A (5)	New Zealand (9), Canada (5), Belgium (1), France (1), Netherlands (1), N/A (1)
E. faecium	ST32	1 / 20	NA (9), Poultry (8), Human (2), Other (1)	USA (9), Germany (4), Estonia (2), Belgium (1), Portugal (1), Russia (1), Netherlands (1), N/A (1)
E. faecium	ST133	1 / 9	Pigs and swines (9)	Switzerland (6), Denmark (2), Belgium (1)
E. faecium	ST296	1 / 8	NA (5), Bovine (2), Human (1)	NA (3), Germany (1), USA (1), China (1), Belgium (1), Russia (1)

Species	Sequence type	Number of samples (this study / total)	Host(s)	Country(s)
S. aureus	ST398	6 / 905	Human (569), N/A (101), Pigs and swines (83), Poultry (56), Bovine (41), Horses (25), Other (9), Rodents (6), Sheep (6), Rats (4), Dogs (3), Cats (2)	Netherlands (454), Germany (110), Italy (41), N/A (38), China (34), Spain (33), USA (31), France (29), Denmark (27), Australia (25), Taiwan (18), Belgium (13), Hong Kong (12), Brazil (9), Ireland (5), Switzerland (4), Canada (3), South Korea (3), Trinidad and Tobago (3), South Africa (3), Austria (2), Poland (1), Czech Republic (1), Colombia (1), Cameroon (1), Greece (1), Dominica (1), Portugal (1), Argentina (1)

Abbreviations: N/A (Not Available)

3. PhD project self-evaluation

500 words, 1 page. *Please comment to what extent the initial PhD project objectives as laid out in the proposal have been met. Any deviation from the original project proposal should be included and justified.*

In the beginning of the project, the aim was to collect resistant isolates from the Belgian antimicrobial resistance official monitoring. As the previous Belgian data showed few linezolid resistant bacteria through this non-selective monitoring, it was planned to compare WGS results between all isolates recovered from the different geographical origins.

At the end of the 2019 selective monitoring, 139 samples were positive for linezolid resistant bacteria, more than estimated. Giving these results, we decided to not investigate concerned farms for linezolid resistant bacteria as it was planned because we had already a lot of isolates to analyse and because the number of concerned farms was too high. Moreover, the time and budget necessary to investigate all farms would have been too high.

All linezolid resistant isolates recovered from the Belgian selective monitoring (n=147) and from Sciensano collection (n=3) or given by collaborators of the project (n=5) were sequenced by NGS to look for resistance determinants and determine the genetic context surrounding resistance genes. To do that, we developed a pipeline to analyse the NGS data. Bacterial species was determined both by MALDI-TOF and Kraken and it revealed no correlation between bacteria and carried linezolid resistance determinants, except for staphylococci in which only the *cfr* gene was found. The genetic context analysis revealed several genetic organisations surrounding linezolid resistance genes, especialy for the *optrA* gene. Finally, phylogenomic analyses were carried out, showing no correlation between phylogeny and linezolid resistance determinants.

The NGS data showed that several incompatibility group markers were present among the isolates. Unfortunatly, NGS data couldn't allow us to determine for all isolates which marker was associated with which gene. We also proceed to transferability experiments. Unfortunately, no transconjugant was obtained while several experiments have been conducted. Based on our findings and the observed limitations of the design of our experiments, we cannot conclude whether or not the linezolid resistance genes of the selected donor candidates could be transferred. However, the results of this deliverable are useful to improve the design of future conjugation experiments.

Finally, a risk factors analysis based on epidemiological and consumption data has been conducted. This study explored putative risk factors for the occurrence of linezolid resistant bacteria (commensal enterococci and staphylococci) in faeces from veal calves, broilers, laying hens and pigs and in nasal swabs samples from pigs collected in 2019 in Belgium. The results of this study are available and will be published after this final reporting. As a conclusion, all main project objectives have been met and the expected deliverables have been sent.

4. Progress of the project: milestones and deliverables

The following list refers to the deliverables and milestones as mentioned in the successive project Annual Work Plans. This part of the report should demonstrate that the project has delivered all that was planned.

WP6 Team pre-filled this table with available information. Please verify, correct if required, complete, and ensure that all deliverables are uploaded - both on the private project group of the One Health EJP website and on Zenodo.

Note that all deliverables should be public by default. If a deliverable should be temporarily confidential, the justification should be mentioned in the Document Management section in the deliverable template, and the Deliverable Confidentiality Statement Form should be completed and submitted, which provide details of when the deliverable can be made public. It is the responsibility of the PhD supervisor to keep the WP6 team informed of any delays to making these deliverables public. In exceptional circumstances where confidentiality is required indefinitely, this should be clearly justified.

If applicable, please assign an integrative category (1 to 8) to each of the deliverables, as this helps PMT to assess possible impacts the outcome may have.

Deliverables

WP6 Team pre-filled the table below with available information. Please verify, correct if needed and complete. If a delay is due to the COVID-19 crisis, please add a comment. if there are no corrections required then no action is necessary.

PhD reference	PhD Project deliverable number	Deliverable name *(Original name, if different from the actual one)*	Delivery date from AWPs (month)	Date delivered (month)	Comments	Integrative categories*
PhD02-AMR2/3/6-PhD LIN-RES	~~D-E27-2.1~~ D-PhD02-2.1	Genetic resistance profiles and subtypes of strains sequenced during M13-M24	M24	M35	*public:Zenodo reference: 10.5281/zenodo.6721422*	*Not applicable*
PhD02-AMR2/3/6-PhD LIN-RES	~~D-E27-2.2~~ D-PhD02-2.2	Poster presentation at an international conference of the first results obtained from NGS analysis of linezolid-resistant strains.	M24	M35	*public:Zenodo reference: 10.5281/zenodo.6723515*	*5*
PhD02-AMR2/3/6-PhD LIN-RES	~~D-E27-2.3~~ D-PhD02-2.3	Genetic resistance profiles and subtypes of strains sequenced until M36	M39	M39	*public:Zenodo reference: 10.5281/zenodo.6723790*	*Not applicable*
PhD02-AMR2/3/6-PhD LIN-RES	~~D-E27-2.4~~ D-PhD02-2.4	Results of in silico analysis of genetic scars of horizontal transfer or recombination events	M36 (delay to M48 agreed)	M46	*public:Zenodo reference: 10.5281/zenodo.6724194. A delay was requested and agreed until M48 to submit it with D3-3.*	*Not applicable*
PhD02-AMR2/3/6-PhD LIN-RES	~~D-E27-3.1~~ D-PhD02-3.1	Results of in silico analysis of transferability	M39	M39	*public :Zenodo reference :10.5281/zenodo.6724449*	*Not applicable*
PhD02-AMR2/3/6-PhD LIN-RES	~~D-E27-3.2~~ D-PhD02-3.2	Poster or oral presentation at an international conference of the results of the linezolid selective monitoring during 2019 in Belgium	M36	M35	*Public: Zenodo reference: 10.5281/zenodo.6724563. The topic of the poster was changed with the agreement of WP6 team. This poster has been presented in the ASM2020..*	*1, 5*
PhD02-AMR2/3/6-PhD LIN-RES	~~D-E27-3.3~~ D-PhD02-3.3	Results of laboratory experiments to demonstrate transferability of linezolid resistance genes	M48	M48	*public : Zenodo reference: 10.5281/zenodo.6778115*	*Not applicable*
PhD02-AMR2/3/6-PhD LIN-RES	~~D-E27-4.1~~ D-PhD02-4.1	Summarize of the risk factors analysis (epidemiological and consumption data)	M48→ delay to M54 agreed	M54	***CONFIDENTIAL**, to ensure publication of original research results in the future paper*: https://zenodo.org/record/6992826#.YvpMsrbMKUk .	*Not applicable*
PhD02-AMR2/3/6-PhD LIN-RES	~~D-E27-5.1~~ D-PhD02-5.1	Final synthesis and reporting	M48→ delay to M54 agreed	M54	*Public in Zenodo: it is actually this Word document.*	*1,5*

** Categories of Integrative activities : 1. Design and implementation of surveillance and control activities; 2. Harmonised protocols and applied best practice; 3. Databases of reference materials and data, incl. metadata; 4. Standardised data formats, aligned data analysis for interpretation of surveillance data; 5. Sharing and communication of surveillance data; 6. Sharing of best intervention activities); 7. Prevention: aligned use of facilities and models; 8. Other (please specify);*

Milestones

PhD reference	Milestone number	Milestone name	Delivery date from AWPs	Actual delivery date	Achieved	Comments
PhD2-AMR2/3/6-PhD LIN-RES	M-E27-1	Synthesis of genetic resistance profiles and subtypes of strains sequenced during M13-M24	M24	M35	Yes	
	M-E27-2	Poster presentation at an international conference of the first results obtained from NGS analysis of linezolid-resistant strains.	M24	M24	Yes	
	M-E27-3	Synthesis of genetic resistance, subtyping and transferability markers analysis of the linezolid resistant bacteria collected.	M39	M39	Yes	
	M-E27-4	Poster or oral presentation at an international conference of the results of the linezolid selective monitoring during 2019 in Belgium	M36	M35	Yes	The topic of the poster was changed with the agreement of WP6 team. This poster has been presented in the ASM2020.
	M-E27-5	Final synthesis and reporting	M48→delay to M54 agreed	M54	Yes	

5. Interactions with JRPs/JIPs or with external (EU or national) relevant projects or initiatives such as national action plans (AMR, Zoonoses etc.),

Please describe any link (workshops, meetings, missions etc.) with a Joint Research Project or Joint Integrative Project.

Not applicable.

6. Interactions with OHEJP stakeholders, national and international surveillance programmes.

Please describe any link with any external (EU, national and international) relevant project (name + website), or with the One Health EJP stakeholders.

Samples analysed during this project were provided by the Federal Agency for the Safety of the Food Chain for the Belgian antimicrobial resistance official monitoring. The results of the LIN-RES project published in the Journal of Antimicrobial Chemotherapy (10.1093/jac/dkab376) were shared with the EFSA through personal communications and through an oral communication given at the 16th EURL-AR workshop in June 2022 and previous communications at the different ASM of the OH-EJP.

7. Added value and benefits during PhD resulting from being part of the OHEJP doctoral programme and consortium

Please describe here what you perceived as additional value as a result of your PhD being a part of the One Health EJP e.g. training, networking with other disciplines (med-vet-envrionment) or countries and access to a wide range of expertise.

The annual scientific meetings were each time good opportunities to meet other researchers including other PhDs. It was also good opportunities to share the results of the project with the One Health community. It gave a large visibility to the project. Both the ASMs and the annual meeting with Belgian stakeholders organized by Sciensano enabled to share the results with people using linezolid to treat patients at hospitals and raise awareness about the issue related to the emergence of linezolid resistance and about cross-selection of critical resistance through the use of non-critical antibiotics.

8. Transferrable skills and Training

Describe details of relevant transferrable skills, training courses or CPD training attended and undertaken by the PhD student throughout the PhD programme.

Name of Training Event	Topic	Dates (DD/MM/YY)	Organising Institute
Vulgariser sa recherche à l'écrit	Scientific vulgarisation	14 Decembre 2018	ULB
Vulgariser sa recherche à l'oral	Scientific vulgarisation	14 Decembre 2018	ULB
Galaxy live training 2019	NGS data analysis	4 April 2019	Sciensano
Formation sur l'encadrement d'équipe	Management	24-25-26 June 2019	ULB
Midi Cross-Experience - Infographie & data-visualisation	Data visualisation	13 Decembre 2019	ULB

9. Ethical Reviews

WP6 Team has pre-filled the table below with available information. Please, correct if necessary. If there are no corrections required, then no action is necessary.

Comments of Ethics Advisors, January 2020	Comments PhD Project Supervisor, mid-2020	Comments of Ethics Advisors, October 2020
Human biological samples The beneficiary must confirm that appropriate authorizations will be sought to collect the Human samples. Personal data processing The beneficiary must confirm that no personal data will be collected as part of the project; otherwise the GDPR (EU 2016/679) must be applied and the contact address of the Data Protector Officer of the institution in charge of processing the data obtained must be provided. Animal This project is focusing on laying hens. Further details are needed on the researcher's interaction and 'use' of a legal animals (e.g. the layers hens). If these are not experimental animals as defined in Directive 2010/63/EU they are still legal animals through national animal welfare laws so please comment on any implications for the animals. Please describe how the animals' welfare are protected and considered (e.g. if the chickens are affected when taking samples, even if the work is dealing with faeces as these types of study can, this can still include restricting the animals or manipulating diets, etc, all which can have an impact on the animals). Please provide a statement on the 3Rs aspects of this work If Ethical Approval is required, please state which Research Ethics Committee this will be sent to.	Since we gather a lot of samples through official sampling campaigns, we will finally not need to sample by ourselves animal or human samples. Then, there are no more ethical issues are linked to the LIN-RES project.	None.

10. Scientific Publications

WP6 have pre-filled the table below. Please correct and add to the table where necessary.

Please make sure that all publications are listed. List peer-reviewed publications and others.

For every publication please specify:

- ***Doi** reference*
- *Zenodo **link***
- *Gold or green open access?*
  - *If green: Length of the Embargo, if any. Open access to the publication must be ensured within a maximum of six months.*

If no doi reference (e.g. article in journal, publication in conference proceedings or workshop, book or monograph, chapter in a book, thesis/dissertation, other), please provide as much information as possible.

The LIN-RES project was presented at OHEJP ASM 2019-2020-2021 and 2022. In 2019, the project was presented with a poster (Deliverable D-PHD02-2.2) and was selected for a short oral presentation. In 2020 and 2021, the project was virtually presented with posters both times (Deliverable D-PHD02-3.2 for the poster presented in 2020). In 2022, Cécile Boland presented the project through an oral

presentation. Moreover, the project was presented in 2020 and 2021 during the 3MT EJP competition. As Michaël Timmermans was unable to participate at the OHEJP ASM 2022, the project was not presented at the 3MT competition of this year.

Publication date	Publication title	Authors	DOI reference	Zenodo reference	Is OHEJP acknowledged?	Is it a Green Open Access? *please specify embargo length	Is it a Gold Open Access?
2021 Oct 21	Large diversity of linezolid-resistant isolates discovered in food-producing animals through linezolid selective monitoring in Belgium in 2019	Michaël Timmermans, Bert Bogaerts, Kevin Vanneste, Sigrid C J De Keersmaecker, Nancy H C Roosens, Carole Kowalewicz, Guillaume Simon, Maria A Argudín, Ariane Deplano, Marie Hallin, Pierre Wattiau, David Fretin, Olivier Denis, Cécile Boland	10.1093/jac/dkab376	https://zenodo.org/record/5647978#.Yqyd9OxByUl	YES	No	YES

11. Additional Outputs

Other relevant dissemination outcomes can be highlighted here, e.g. non-scientific publications, proceedings, poster, video, tools, guidelines, patents, etc. If the outcome is a deliverable it should not be mentioned here.

Please indicate where the item can be found, for instance on Zenodo or any open access repository. Please indicate the link and check the functionality.

In addition to the posters already listed in the deliverables, several oral presentations were given during the project at the ASMs: in 2019 a short oral presentation was given by Michaël Timmermans and in 2022 Cécile Boland presented the project through an oral presentation. Moreover, the project was presented in 2020 and 2021 during the 3MT EJP competition. Another poster, in addition to the ones presented in the deliverables, was presented at the ASM 2021. It can be found in Zenodo (link in zenodo: 10.5281/zenodo.6724771).

Thus, the LIN-RES project was presented at each of the OHEJP ASM during the 2019-2022 period, either by a poster and/or an oral communication.

The PhD thesis itself was publically defended with success on the 9th March 2022.

12. Specific outcomes to highlight in dissemination and communications

In this paragraph you have the possibility to draw the attention to remarkable achievements that could be highlighted to illustrate the potential impact of your project.

Outcomes (deliverable, publication, folder, tool, etc.) of the project that might be suited for communication purposes to various audiences, for instance food safety or AMR scientists, national and international stakeholders, specific professionals, the general public, etc.

During the project, we developed pipelines to analyse NGS data for enterococci and staphylococci. These tools allow automatic analysis of NGS data for a large amount of samples simultaneously.

Are there any outcomes of this project that are already discussed or even implemented and in use at any institute of the project consortium, at stakeholders' organisations (ECDC, EFSA, EMA, EEA, FAO, OIE, WHO), or at the level of national authorities?

Based on the publication of our paper (DOI:10.1093/jac/dkab376), Norway has started in 2022 a linezolid selective monitoring.

The key results were shared with Belgian institutions (FASFC, FAMHP, AMCRA) & European institutions EURL-AR/EFSA/EC and presented at the 16th EURL-AR workshop in June 2022. Following this latest workshop, the EURL-AR will make a survey, with the help of Sciensano, to assess the interest and feasibility of conducting such linezolid selective monitoring in the other member states.

The awareness of the human sector has also been raised through the oral communications at the ASMs and at the Belgian stakeholder annual meetings.

AMCRA starts discussions in Belgium about the classification of phenicol antibiotics (in particular the florfenicol) in the veterinary field as these antibiotics are potential selectors of linezolid resistance genes.

Some of the outcomes of the project may already be in use or planned to be implemented in one or more partner institutes, or in external organisation (including stakeholders' organisations), or at the level of national authorities. Please describe.

13. One Health impact

***About 500 words, 1 page** – This part is extremely important, also for the One Health EJP stakeholders. Please, describe the impact of the PhD project, reflecting at least the following aspects:*

- *Specify any direct or indirect impact the outcome of your project may have for international stakeholders active in the domains of foodborne zoonoses, AMR and/or emerging threats (ECDC, EFSA, FAO, OIE, WHO-EU; EU reference laboratories, etc.) e.g. suggested improvements of existing /planned surveillance programmes, new relevant databases for risk assessment updates, improved methodologies for risk assessment and management, etc.*
- *Please describe how regional or national authorities and stakeholders may implement and/or integrate any of the results from the project in their work. Which contacts, if any, have been taken between your consortium and authorities or stakeholders that may lead to such a knowledge transfer? Please describe.*
- *Has this project helped you building and strengthening the networking with other partners of the One Health EJP and beyond? Please describe shortly and give some examples.*

The project highlighted the potential risk associated to linezolid resistance among animal bacteria. Indeed, the Belgian antimicrobial resistance official monitoring in food-producing animals showed a low level of linezolid resistant bacteria. The LIN-RES project, through a selective monitoring, revealed a much more important presence of linezolid resistance determinants carried by bacteria isolated from farm animals. Given that farms are environments propitious to contacts between animals and humans, this represents a potential risk of transfer of linezolid resistance genes from animals to humans. It is thenceforward important to follow, not only resistance to linezolid but the resistance to the most important antimicrobials.

As Sciensano is the Antimicrobial Resistance National Reference Laboratory, authorities are already aware about our work and discussions with AMCRA, responsible for strategies about antimicrobial uses in the veterinary field, are already on the table. The creation of a technical working group in Belgium on the question of the use of florfenicol in animals and the impact on the linezolid resistance is planned.

An interesting fact is that our results presented during Sciensano meetings challenged scientists in the human clinical field. They were surprised by the proportion of isolates resistant to linezolid found in our study because it is unusual to observe this kind of proportion.

The apparition of linezolid resistant bacteria is an issue because: (i) linezolid is a last resort antibiotic for human health, (ii) the genes responsible for linezolid resistance give resistance to other antibiotics and cross-selection through the use of non-critical antibiotics (a.o. phenicols) will maintain these genes, and (iii) new antibiotics are rare.

Geographically, related isolates were spread out across the whole country and even across international borders. Based on our paper such study could be conducted in other countries to assess the situation in the other European countries. The EURL-AR will launch soon a questionnaire for the member states to assess the interest and feasibility of conducting such linezolid selective monitoring in their country. The genomes of the study are published and could be compared with future studies to broader assess the clonality/diversity of linezolid-resistant isolates.

The results and the related one health impacts were already shared with Belgian institutions (FASFC, FAMHP, AMCRA) and European institutions EURL-AR/EFSA/EC and with the One Health EJP stakeholders (a. o. during the SSB meeting of the 24th March 2022).Such scientific research is important to be continued to ensure a good surveillance and understanding of the mechanisms and spread of resistance and to promote a prudent use of ALL antibiotics in a One Health perspective.

14. List of dissemination and communication activities

Please fill in one table per event you attended/organised during the entire life span of the project. Please make sure they are registered online on the OneHealth EJP webpage:

https://surveys.sciensano.be/index.php/754325?lang=en

If relevant (for instance flyer, video, etc.) please include hyperlink.

Name of the activity:	One Health EJP ASM 2019 (presentation of a poster, selected for the quick oral presentation)		
Date:	May 22 to May 24 2019		
Place:	the Teagasc Conference Centre, Ashtown, Dublin		
Specify the Dissemination and Communication activities linked to the One Health EJP project for each of the following categories			
	Yes / No		Yes / No
Organisation of a Conference	No	**Participation to a Conference**	Yes
Organisation of a Workshop	No	**Participation to a Workshop**	No
Press release	No	**Participation to an Event other than a Conference or a Workshop**	No
Non-scientific and non-peer-reviewed publication (popularised publication)	No	**Video/Film**	No
Exhibition	No	**Brokerage Event**	No
Flyer	No	**Pitch Event**	No
Training	No	**Trade Fair**	No
Social Media	No	**Participation in activities organized jointly with other H2020 projects**	No
Website	No	**Other**	No
Communication Campaign (e.g. Radio, TV)	No		
Specify the estimated number of persons reached, in the context of this dissemination and communication activity), in each of the following categories			
	Number		Number
Scientific Community (Higher Education, Research)	**100**	**Media**	0
Industry	**0**	**Investors**	0
Civil Society	**0**	**Customers**	0
General Public	**0**	**Other**	0
Policy Makers	**0**		

Name of the activity:	One Health EJP ASM 2020 (presentation of a poster and participation in 3MT competition)		
Date:	27-29 May 2020		
Place:	Digital conference		
Specify the Dissemination and Communication activities linked to the One Health EJP project for each of the following categories			
	Yes / No		Yes / No
Organisation of a Conference	No	**Participation to a Conference**	Yes
Organisation of a Workshop	No	**Participation to a Workshop**	No

Press release	*No*	*Participation to an Event other than a Conference or a Workshop*	*No*
Non-scientific and non-peer-reviewed publication (popularised publication)	*No*	*Video/Film*	*Yes*
Exhibition	*No*	*Brokerage Event*	*No*
Flyer	*No*	*Pitch Event*	*No*
Training	*No*	*Trade Fair*	*No*
Social Media	*Yes*	*Participation in activities organized jointly with other H2020 projects*	*No*
Website	*No*	*Other*	*No*
Communication Campaign (e.g. Radio, TV)	*No*		
Specify the estimated number of persons reached, in the context of this dissemination and communication activity), in each of the following categories			
	Number		*Number*
Scientific Community (Higher Education, Research)	*750+*	*Media*	*0*
Industry	*0*	*Investors*	*0*
Civil Society	*0*	*Customers*	*0*
General Public	*0*	*Other*	*0*
Policy Makers	*0*		

Name of the activity:	*One Health EJP ASM 2021 (presentation of a poster and participation in 3MT competition)*		
Date:	*9-11 June 2021*		
Place:	*Digital conference*		
Specify the Dissemination and Communication activities linked to the One Health EJP project for each of the following categories			
	Yes / No		*Yes / No*
Organisation of a Conference	*No*	*Participation to a Conference*	*Yes*
Organisation of a Workshop	*No*	*Participation to a Workshop*	*No*
Press release	*No*	*Participation to an Event other than a Conference or a Workshop*	*No*
Non-scientific and non-peer-reviewed publication (popularised publication)	*No*	*Video/Film*	*Yes*
Exhibition	*No*	*Brokerage Event*	*No*
Flyer	*No*	*Pitch Event*	*No*
Training	*No*	*Trade Fair*	*No*
Social Media	*Yes*	*Participation in activities organized jointly with other H2020 projects*	*No*
Website	*No*	*Other*	*No*
Communication Campaign (e.g. Radio, TV)	*No*		
Specify the estimated number of persons reached, in the context of this dissemination and communication activity), in each of the following categories			
	Number		*Number*
Scientific Community (Higher Education, Research)	*550+*	*Media*	*0*
Industry	*0*	*Investors*	*0*
Civil Society	*0*	*Customers*	*0*
General Public	*0*	*Other*	*0*
Policy Makers	*0*		

Name of the activity:	One Health EJP ASM 2022 (oral presentation)		
Date:	11-13 april 2022		
Place:	Orvieto, Italy		
Specify the Dissemination and Communication activities linked to the One Health EJP project for each of the following categories. Include hyperlink, if relevant. Zenodo grants the open access, it could be used as a repository for the presentations, posters, and other dissemination materials.			
	Yes / No		Yes / No
o	No	**Participation to a Conference**	Yes
Organisation of a Workshop	No	**Participation to a Workshop**	No
Press release	No	**Participation to an Event other than a Conference or a Workshop**	No
Non-scientific and non-peer-reviewed publication (popularised publication)	No	**Video/Film**	Yes
Exhibition	**No**	**Brokerage Event**	No
Flyer	**No**	**Pitch Event**	No
Training	**No**	**Trade Fair**	No
Social Media	**Yes**	**Participation in activities organized jointly with other H2020 projects**	No
Website	**No**	**Other**	No
Communication Campaign (e.g. Radio, TV)	**No**		
Specify the estimated number of persons reached, in the context of this dissemination and communication activity), in each of the following categories			
	Number		Number
Scientific Community (Higher Education, Research)	**550+**	**Media**	0
Industry	**0**	**Investors**	0
Civil Society	**0**	**Customers**	0
General Public	**0**	**Other**	0
Policy Makers	**0**		