



la science pour la vie, l'humain, la terre

Retour d'expérience sur l'antibiorésistance chez le porc et le lapin

O. ZEMB



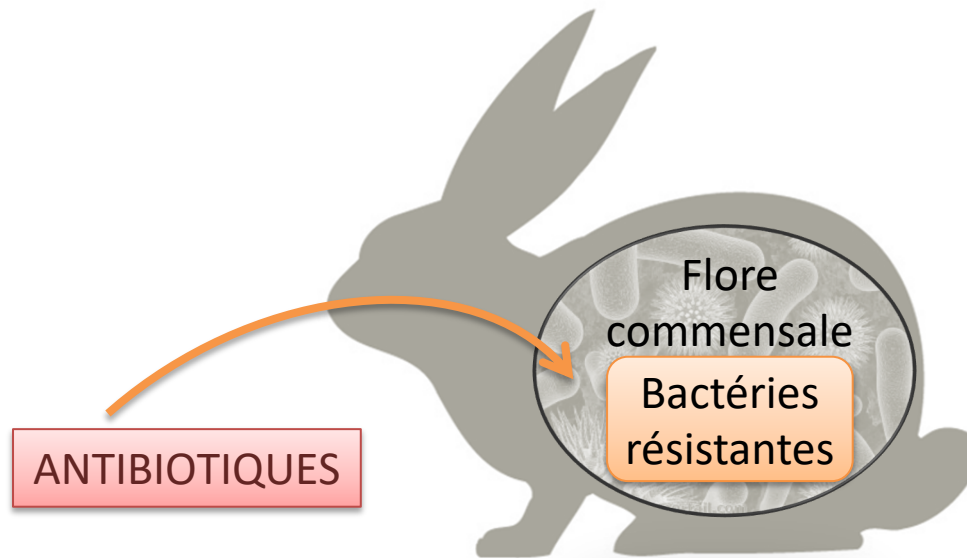
Plan de la présentation

- ❖ Contexte antibiorésistance en élevage
- ❖ Quels outils disponibles pour détecter l'antibiorésistance ?
 - culture d'isolats classique (Microreset) ou haut débit (à venir)
 - shotgun puis annotation ARDB/ Resfinder /CARD (MicroReset – inventaire élevages)
 - shotgun puis annotation élargie par modélisation repliement (MicroReset Amine)
 - shotgun puis qPCR (MicroReset – manip porc et lapin)
 - qPCR puis séquençage microarray (pas nous)
- ❖ Quel outil serait utile d'après moi

Sortie excel pour lier facilement aux métagénomique species.

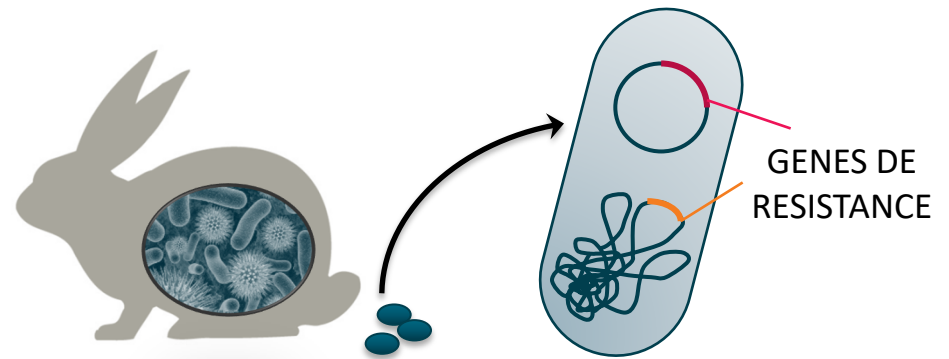
Contexte MicroReset : Limiter la diffusion d'antibiorésistance

- ❖ Etat des lieux de l'antibiorésistance en élevage cunicole français
 - ➡ Détection de gènes de résistance aux antibiotiques du microbiote intestinal
- ❖ Diminuer la présence de gènes d'antibiorésistance au sein des bactéries commensales intestinales
 - ➡ Limiter la diffusion de l'antibiorésistance de la mère au jeune

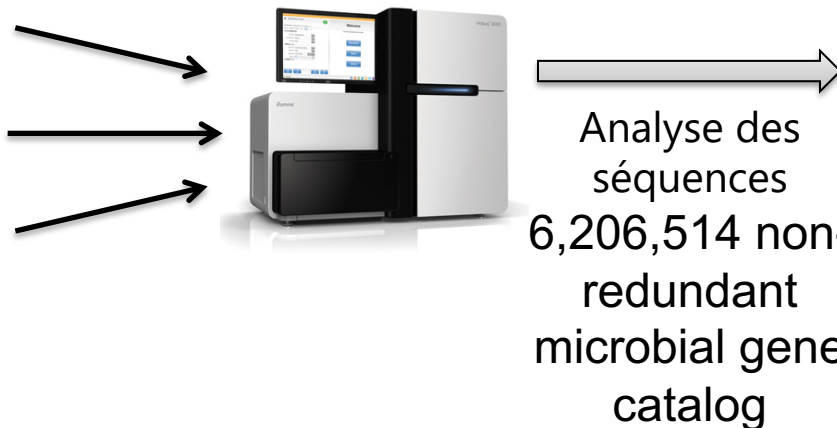
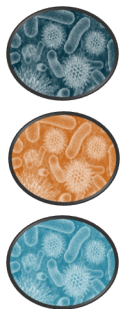


Détection de gènes par séquençage et analyse métagénomique

- ❖ 30 élevages sélectionnés
- ❖ Collecte de fèces en maternité
- ❖ Analyse d'un échantillon / élevage
- ❖ Séquençage de l'ADN microbien extrait



Séquençage Illumina
HiSeq 2500



Base ARDB (pas mise à jour donc laissée)

Base CARD
(inclut les pompes à efflux non spé donc laissée)

Base ResFinder – 95% d'identité

RESFINDER web server 2016

Catalog Gene Reference	ARG	Resistance	ResFinder Accession	Nucleotide identity to ResFinder (%)	closest related IGC ID (identity to IGC > 99%)	Farm01	Farm02	Farm03
Lapin-020_revised_scaffold355052_1_gene44910	aac(3)-IIa	Aminoglycoside	X51534	100.0		0	0	0
Lapin-014_revised_C4488998_1_gene207343	aac(3)-IVa	Aminoglycoside	X01385	99.9		0	0	0
Lapin-020_revised_scaffold366313_1_gene437270	aac(6')-aph(2'')_1	Aminoglycoside	M13771	100.0	MH0061_GL0000009	0	0	0
Lapin-022_revised_scaffold37326_5_gene83542	aac(6')-aph(2'')_2	Aminoglycoside	KF652095	99.0		6.69E-08	3.50E-08	8.00E-07
Lapin-001_revised_C2479659_1_gene308817	aac(6')-Im	Aminoglycoside	AF337947	99.4		7.11E-06	0	1.04E-05

UPDATE 2020: ResFinder 4.0 for predictions of phenotypes from genotypes

Résistance	Nbre de candidats	Nbre d'ARG	Nbre d'ARG répertoriés dans ResFinder
Aminoglycoside	26	25	160
Beta-lactamine	2	2	1545
Quinolone	1	1	96
Glycopeptide	1	1	90
MLS	19	16	74
Nitroimidazole	2	2	9
Phenicol	12	12	30
Sulfonamide	2	2	3
Tétracycline	14	14	41
Triméthoprim	7	7	43
Total	86	82	

82 gènes
d'antibiorésistance
BLASTN 95% d'identité – 80%
de couverture

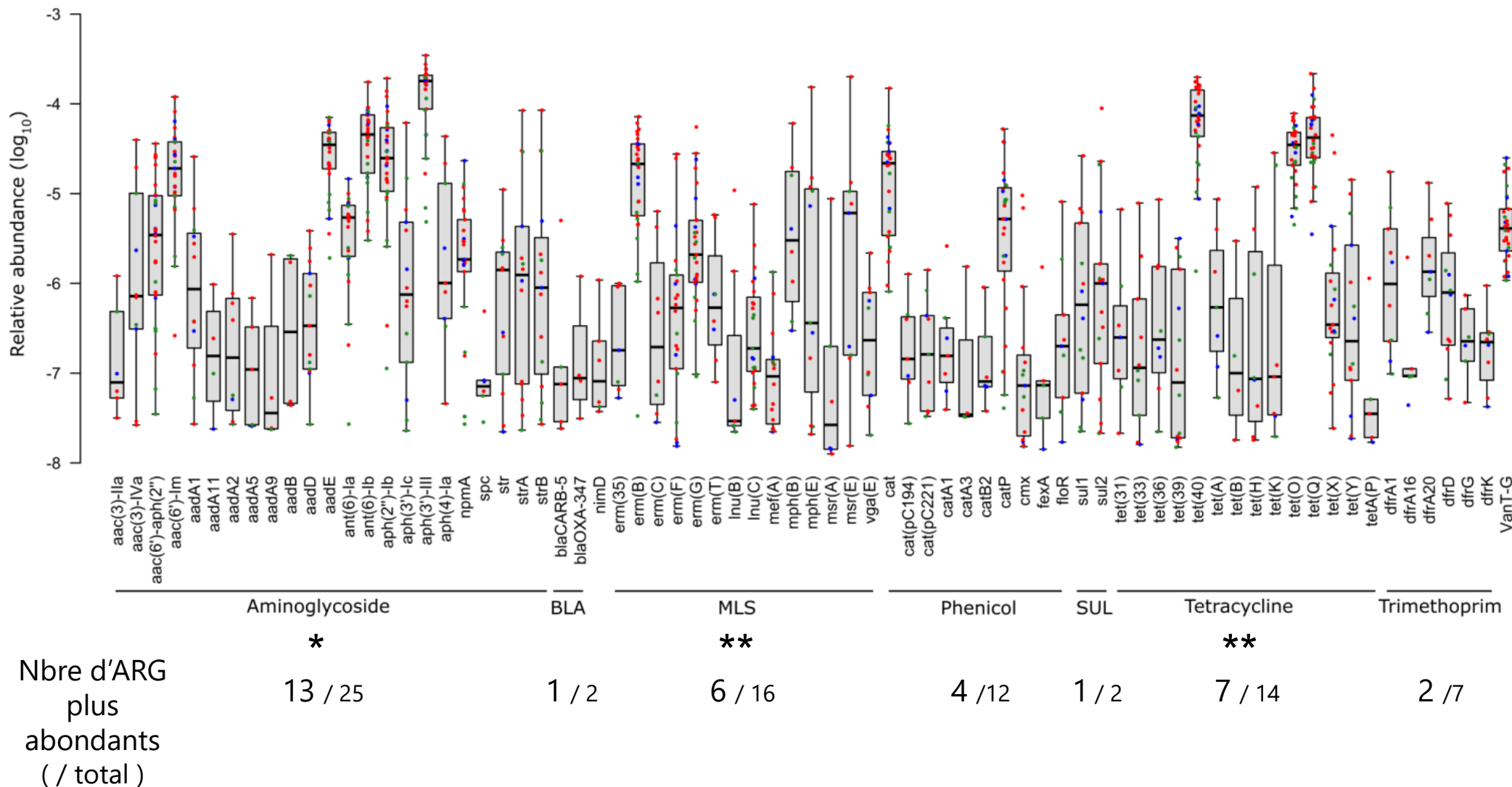
(dont 54 communs)

Zankari E. et al., *Identification of acquired antimicrobial resistance genes*. J Antimicrob Chemother, 2012.



Shotgun puis ResFinder

❖ 35 ARG sur 82 sont plus abondants dans les élevages utilisateurs d'antibiotiques



Lien entre abondance des ARG et usages d'antibiotiques

# sample	ANTIBIOTIC USES																ARG relative abundance					
	Aminoglycoside				β-lactam	Macrolide			Pleuro	Polypeptide		Quinolone		TCY	TMP/SUL	# différent	all resistance	Resistance class				
	APR	GEN	NEO	DHSM	TIO	TLD	TIL	TUL	TIA	BAC	COL	DAN	ENR	OTC	TMP/SUL	Ab		Aminoglycoside	MLS	Sulphonamide	Tetracycline	Trimethoprim
002	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5,492E-05	2,0298E-05	3,3386E-08	0	2,8240E-05	0
012	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1,061E-04	2,8724E-05	1,5520E-06	2,4987E-08	7,2127E-05	0
005	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1,093E-04	6,0624E-05	1,8290E-06	2,1430E-08	3,9406E-05	0
032	0	0	0	0	0	0	0	0	0	os	0	0	0	0	0	1	1,541E-04	3,6670E-05	2,1291E-05	7,2754E-06	6,9257E-05	2,6726E-06
026	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2,234E-04	7,9612E-05	9,8684E-06	4,2461E-07	1,1013E-04	1,9008E-06
007	0	0	talc	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2,761E-04	1,9867E-04	2,3054E-05	5,0856E-08	1,8499E-05	0
033	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3,792E-04	1,6953E-04	9,1741E-06	0	1,7106E-04	0
001	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4,583E-04	1,8862E-04	5,5710E-06	2,2471E-08	1,2525E-04	0
016	0	0	0	0	0	0	0	0	0	os	0	0	0	inj	os	3	5,265E-04	3,3188E-04	5,7261E-05	0	1,2883E-04	0
018	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5,266E-04	3,4534E-04	9,8931E-06	1,2754E-06	1,3793E-04	8,7222E-07
015	0	0	0	0	0	0	os	0	0	0	0	0	0	inj	os	3	5,781E-04	3,7014E-04	5,9585E-05	0	1,4063E-04	0
013	0	0	0	0	0	0	0	inj	0	0	0	0	0	0	0	1	5,956E-04	3,2058E-04	1,6304E-05	0	1,8198E-04	0
027	0	inj	0	0	0	0	0	0	0	0	inj	inj	0	0	0	3	6,394E-04	4,0183E-04	4,5808E-05	0	1,6534E-04	0
017	0	0	talc	0	0	0	0	inj	0	0	0	0	0	os	0	3	6,542E-04	4,3919E-04	2,7485E-05	2,2172E-08	1,0764E-04	0
004	0	0	0	0	0	0	0	0	os	os	0	0	0	0	0	2	6,559E-04	4,5165E-04	1,5525E-05	2,7543E-08	1,5204E-04	0
024	0	0	0	0	0	0	os	0	os	0	0	0	0	0	0	2	6,779E-04	3,1159E-04	3,8289E-05	0	3,0005E-04	0
023	0	0	0	0	0	0	0	0	os	0	0	0	0	os	os	3	6,900E-04	4,2330E-04	2,0965E-05	0	2,4147E-04	2,3774E-07
014	0	0	0	0	0	0	0	inj	0	0	0	0	0	0	0	1	6,974E-04	3,7242E-04	5,6329E-05	7,1062E-06	1,9417E-04	4,7768E-06
030	0	talc	0	0	0	0	0	0	os	os	talc	0	os+inj	os	os	7	7,176E-04	4,4550E-04	8,6474E-06	1,0979E-06	2,3210E-04	0
011	0	0	0	0	0	0	os	inj	os	0	0	0	0	os	0	4	7,582E-04	3,8981E-04	4,6000E-05	0	2,6624E-04	0
003	0	0	0	os	0	0	os	inj	os	os	0	0	0	os	0	6	7,758E-04	3,0349E-04	2,8151E-05	0	4,0283E-04	0
019	0	0	0	0	0	0	os	inj	0	0	os	0	0	os	0	4	7,832E-04	3,7954E-04	5,6839E-05	5,1115E-08	2,6507E-04	0
022	0	0	talc	0	0	0	0	0	0	os	0	0	0	inj	os	4	7,838E-04	4,1241E-04	8,5317E-05	5,7632E-06	2,3099E-04	9,2224E-06
025	0	os	0	0	0	0	os	0	os	0	os	0	0	os	0	5	8,130E-04	5,6593E-04	2,7407E-05	1,2763E-07	1,8765E-04	0
031	0	talc	0	0	0	0	0	0	os	os	talc	0	inj	os	os	7	8,390E-04	5,4541E-04	1,0255E-05	1,3159E-06	2,2233E-04	2,2557E-07
010	os	inj	os	0	0	0	0	0	os	0	0	0	os+inj	0	0	5	8,791E-04	4,2105E-04	1,3293E-04	1,7085E-06	2,9172E-04	2,3654E-06
028 ^a	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	9,084E-04	5,8046E-04	6,4926E-05	2,2753E-05	1,5905E-04	9,5418E-06
008 ^b	0	0	talc	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	9,180E-04	5,5488E-04	4,5469E-05	1,4073E-06	2,6538E-04	1,2126E-06
021	os	0	0	0	0	0	os	0	os	0	0	0	0	os	os	5	1,072E-03	4,8029E-04	1,4851E-04	2,9048E-05	3,7244E-04	2,1972E-05
020	os	talc	talc	0	inj	inj	os	0	0	0	os	0	0	0	0	7	1,954E-03	7,9826E-04	5,2456E-04	1,1581E-04	2,9012E-04	3,1246E-05

Raised Without Antibiotic (RWA)

Non oral exposure to antibiotics

os = per os administration

inj = per injection administration

talc = in talcum powder in nest

^a oral exposure to antibiotics until end-2013

^b oral exposure to antibiotics until 2012

Pleuro Pleuromutilin

TCY Tetracycline

TMP/SUL Trimethoprim

+ sulfadimethoxine

APR apramycin

GEN gentamicin

NEO neomycin

DHSM streptomycin

TIO ceftiofur

TLD tildipirosin

TIL tilmicosin

TUL tulathromycin

TIA tiamulin

BAC bacitracin

COL colistin

DAN danofloxacin

ENR enrofloxacin

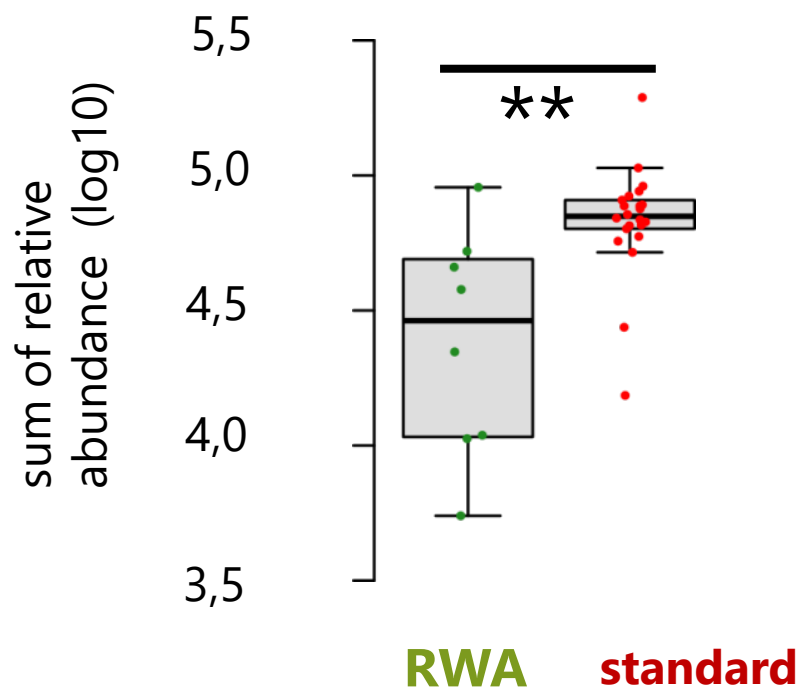
OTC oxytetracycline

Les Vignes
La Corbière H2
La Corbière H4



Shotgun puis modelisation de structure

ARG by Resfinder Blast 95% between the whole sequences



ARG by prediction of the 3D structure (Ruppe, 2019)

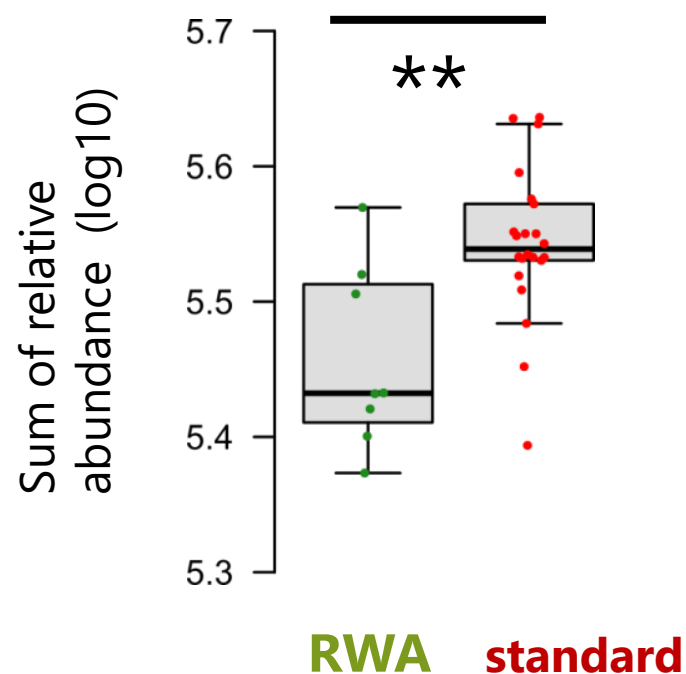
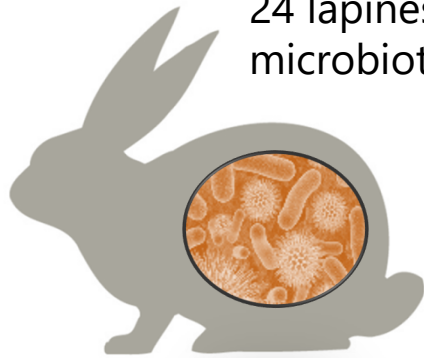


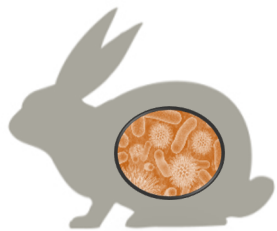
Figure 3 : Sum of relative abundances of all ARG in Raised Without Antibiotic (RWA) farms and in standard farm using antibiotics.

Shotgun puis qPCR

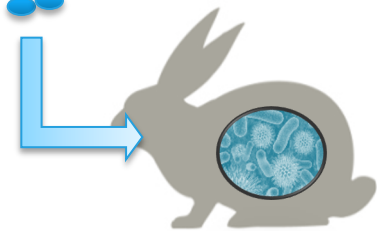
24 lapines
microbiote antibiorésistant



Ingestion de
pelotes
fécales



Inoculation d'une
suspension bactérienne
entre J2 et J25



→ Isolement de souches d'entérobactéries à partir des fèces collectées à J36.

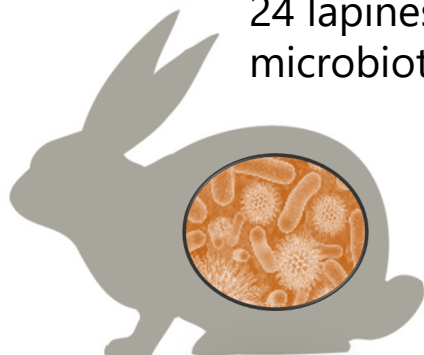
	ARG ratio of kits vs. control kits (n=37 litters, one kit per litter)							ARG ratio of kits vs. control kits lactating dams (n=37)		
	ARG ControlNF / Control	I41 / Control	P41 / Control	I43 / Control	P43 / Control	I44 / Control	P44 / Control	donor Doe41 / Lactating Dams	donor Doe43 / Lactating Dams	donor Doe44 / Lactating Dams
Aminoglycoside	aac61m			0.38			0.4	0.47	0.16	0.11
	aacA.aphD							0.15	0.00	0.01
	aadE			0.45	0.49			0.57	0.29	0.51
	ant61b				0.42			0.44	0.23	0.16
	aph21b			0.40	0.28		0.4	0.51	0.06	0.13
	aph31b							2.10	0.05	0.02
	aphA3			0.49	0.32			0.44	0.31	0.31
	MGapH							0.03	0.02	0.00
	strB							2.40	0.02	0.00
	Beta lactam	CblA1			0.04			0.04	0.11	0.19
cepA29								2.25	0.26	0.01

Antibiorésistance par culture classique

Etalement sur gélose sans antibio et avec antibio (EUCAST)

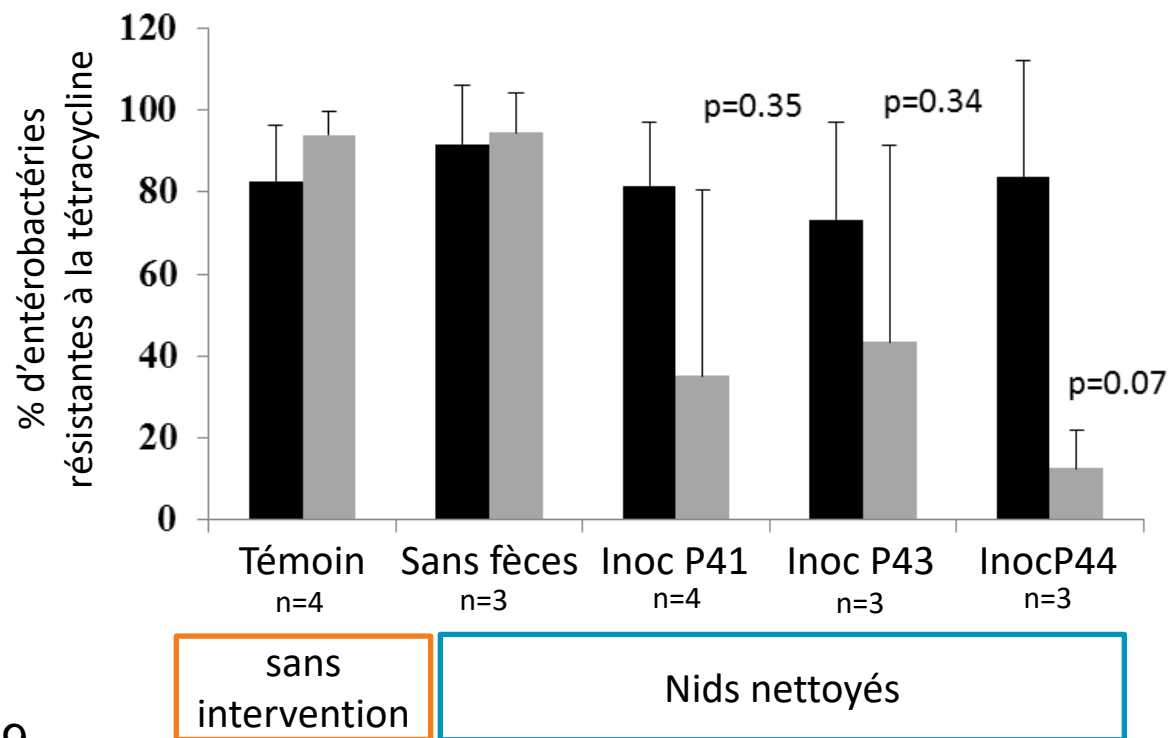


24 lapines
microbiote antibiorésistant



Analyse bactériologique de la résistance à la tétracycline

■ Lapines allaitantes
■ Lapereaux



Ingestion de
pelotes
fécales

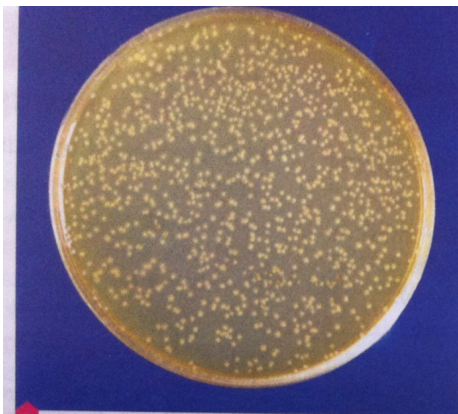
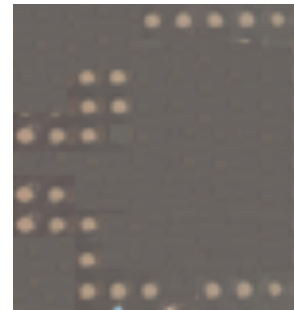
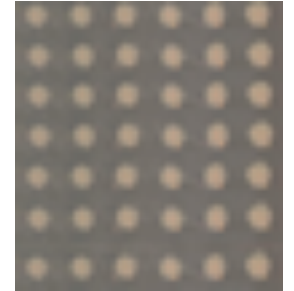
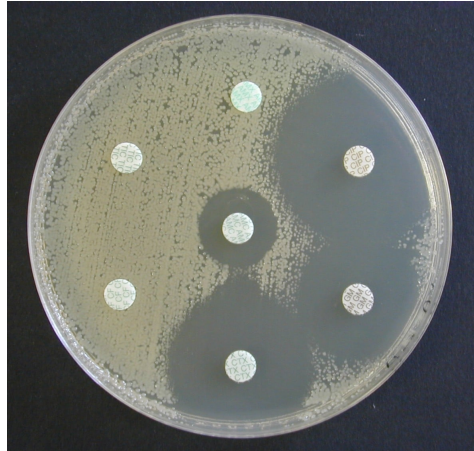
Inoculation d'une
suspension bactérienne
entre J2 et J25

→ Isolement de souches d'entérobactéries à partir des fèces collectées à J36.

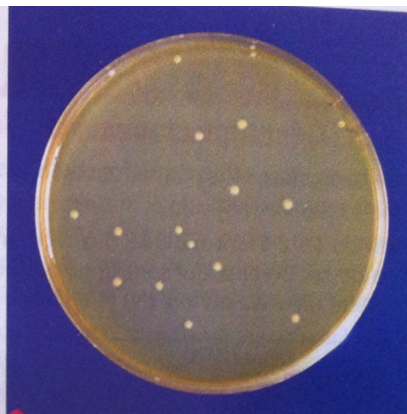
Achard et al, 2019

Culture de culture classique ou à haut débit

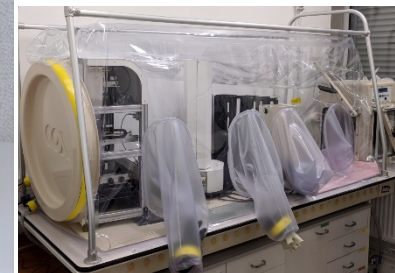
- ❖ Milieu sélectif des entérobactéries
- ❖ Test de croissance avec doses d'antibiotiques (normes recommandées par EUCAST)



a Bactéries cultivées sur un milieu sans streptomycine.



b Bactéries cultivées sur un milieu avec de la streptomycine.



Conclusions et perspectives

- ❖ Gènes d'antibiorésistance pas toujours connus (ARG colistine découvert pendant le projet)
- ❖ Base de donnée ARG -> Resfinder très bien
- ❖ Méthode de quantification à améliorer -> Standard interne (par ex Zemb et al 2019)
- ❖ Sortie excel simple pour lier les MGS aux ARGs serait top

- ❖ Pas forcément besoin d'une interface graphique, mais une vidéo youtube 'pour débutant' reprenant toutes les étapes à suivre pour obtenir des sorties en format compact et simple (xls) serait super : 80% de mes problèmes sont des problèmes de formattage ou d'étapes bêtes mais pas si faciles (quel serveur, quelle version, quelle ligne de commande).

Merci de votre attention et merci à tous les participants !

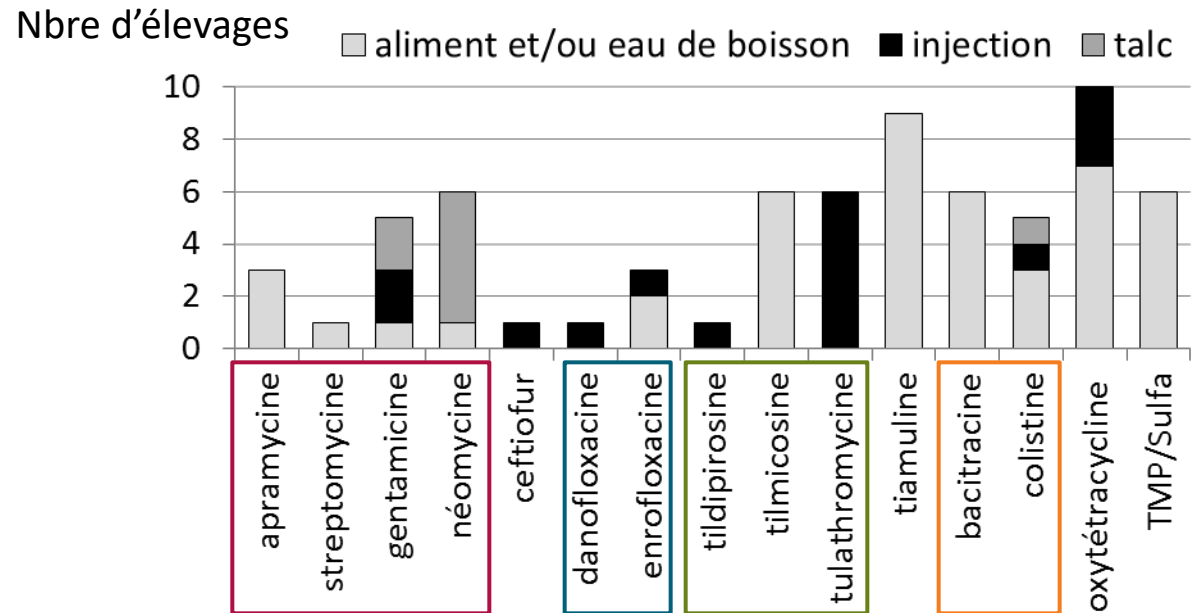
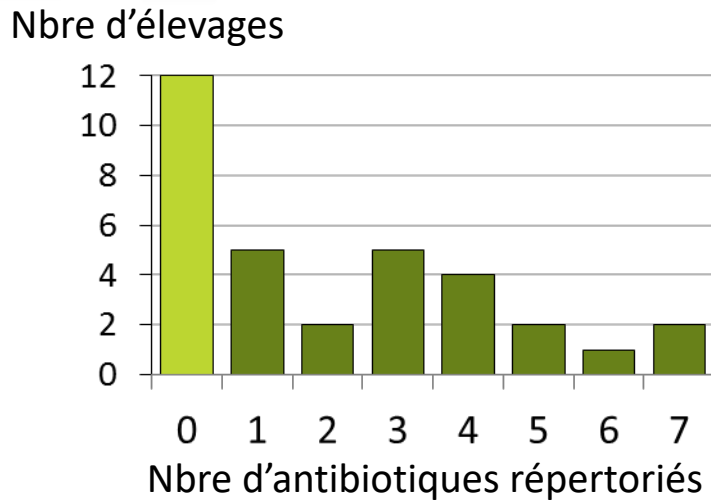


C. ACHARD, V. DUPOUY, S. SIVIGLIA, N. ARPAILLANGE, B. GABINAUD, S. COMBES, Y. RAMAYO-CALDAS, C. DENIS, M. BALLESTER, S. BOUCHER, B. DILÉ, S. CHATELLIER, B. LE NORMAND, A. CHAUBET, D. ESQUERRÉ, A. GHOZLANE, E. RUPPÉ, M. ALMEIDA, N. PONS, A. BOUSQUET-MÉLOU, J. ESTELLÉ, **O. ZEMB**



Usages d'antibiotiques dans le panel MicroReset

- ❖ Données collectées dans 33 élevages entre Mai et Octobre 2014
- ❖ Usages pour les 3 dernières bandes en maternité et sur pré-cheptel



ELEVAGE	DATE PRELEVEMENT	TYPE ELEVAGE	USAGES ANTIBIOTIQUES		
			aliment	boisson	injection
Site Les Vignes GT2 / VG02	09/07/2014	MULTIPLICATEUR	oxytétracycline tiamuline	tilmicosine	tulathromycine
Site La Corbière H2	09/07/2014	SELECTION	sans antibiotiques depuis 2007		
Site La Corbière H4	09/07/2014	SELECTION			tulathromycine