



Université de Montréal

**Prévalence et caractérisation de *Staphylococcus aureus*  
résistant à la méthicilline d'origine aviaire au Québec**

par

JOCELYN BERNIER-LACHANCE

Département de pathologie et de microbiologie

Faculté de médecine vétérinaire

Mémoire présenté à la Faculté de médecine vétérinaire

en vue de l'obtention du grade de

Maître ès Sciences (M.Sc.)

en Sciences vétérinaires

option microbiologie

juillet, 2015

© Jocelyn Bernier-Lachance, 2015

## RÉSUMÉ

Le *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline (SARM) est un enjeu majeur en santé publique. Il est responsable d'une grande variété d'infections. Les "Livestock Associated-MRSA" (LA-MRSA) sont des SARM ayant comme origine les animaux de production tels le porc ou la volaille. Ils constituent un risque de transmission à l'humain via la chaîne alimentaire. Les LA-MRSA peuvent former du biofilm ce qui augmente leur tolérance aux stress environnementaux. Le biofilm est partiellement régulé par le système Agr. Il n'existe aucune donnée sur les 'LA-MRSA' d'origine aviaire au Québec. Les objectifs de ce projet étaient : (i) de déterminer la prévalence de ces SARM dans la viande de poulet et le poulet à griller de la province de Québec et (ii) de caractériser les isolats retrouvés. La collecte d'échantillons s'est effectuée dans 43 épiceries (309 cuisses et pilons de poulet) et dans deux abattoirs (échantillons nasaux et fécaux de 200 poulets) de la Montérégie. La prévalence de SARM a été évaluée à 1.29% (IC 95%: 0.35-3.28) et 0% dans la viande et les oiseaux respectivement. Les isolats testés se sont révélés résistants aux bêta-lactamines ( $n=15$ ), à la tétracycline ( $n=10$ ), à l'oxytétracycline ( $n=10$ ), à la spectinomycine ( $n=10$ ) et à la tobramycine ( $n=1$ ). Le typage a révélé deux clones différents (ST398-V,  $n=10$ ; et ST8-IVa 'USA300',  $n=5$ ). La présence de gènes de résistance aux antibiotiques (*blaZ*, *blaR*, *blaI*, *erm(A)*, *lnu(A)*, *aad(D)*, *fosB*, *tet(K)*, *tet(L)* et *spc*) ainsi que plusieurs gènes codant pour l'évasion du système immunitaire (IEC), la production de toxines ou encore pour la production de biofilm ont aussi été détectés. Une forte production de biofilm a été observée pour la majorité des isolats ( $n=11$ ) à l'exception de certains isolats ST398. Le taux d'expression du système Agr n'a révélé aucune différence particulière entre les

SARM testés. Pour conclure, nos données indiquent une faible prévalence de SARM chez la volaille et la viande de poulet. Les isolats ont été catégorisés en deux génotypes, dont un portant plus de gènes de résistance aux antibiotiques (ST398) et l'autre possédant plus de gènes de virulence (ST8).

**Mots-clés:** viande de poulet, poulet à griller, prévalence, typage moléculaire, résistance antimicrobienne, biofilm, système Agr, gène de virulence, micropuce à ADN, Canada, *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline (SARM),

## SUMMARY

Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) is of critical concern for public health. It is responsible for a wide range of infections. Livestock-Associated MRSA (LA-MRSA) refers to MRSA of animal origin, like pork, cattle or poultry, and constitutes a risk for transmission to humans. LA-MRSA can also form biofilms enhancing their environmental survival. Biofilms are partly regulated by the Agr system. There is no data on LA-MRSA of poultry origin from Québec, Canada. The objectives of this project were: (i) to determine the prevalence of LA-MRSA from chicken meat and broiler chickens from the Province of Quebec, and (ii) to molecularly characterize these MRSA. A total of 309 chicken drumsticks and thighs were randomly collected. In addition, nasal swabs and caeca samples from 200 chickens were randomly collected at slaughterhouses. LA-MRSA was recovered from 1.29% (95% CI: 0.35-3.28) of chicken meat samples but none were recovered from poultry. Antibiotic susceptibility testing revealed resistances to beta-lactam antibiotics ( $n=15$ ), tetracycline ( $n=10$ ), oxytetracycline ( $n=10$ ), spectinomycin ( $n=10$ ) and tobramycin ( $n=1$ ). Molecular typing revealed two types of clones (ST398-V,  $n=10$ ; and ST8-IVa 'USA300',  $n=5$ ). DNA microarrays determined the presence of the antibiotic resistant genes *blaZ*, *blaR*, *blaI*, *erm(A)*, *lnu(A)*, *aad(D)*, *fosB*, *tet(K)*, *tet(L)* and *spc*. In addition, genes encoding for toxins, biofilm formation and the human-associated Immune-Evasion-Cluster (IEC) were also detected. High biofilm production was observed in most isolates ( $n=11$ ) with the exception of some ST398. Quantitative PCR of Agr expression revealed no specific difference among MRSA isolates. To conclude, our data show that the prevalence of the MRSA lineages ST398 and ST8 is low in broilers and chicken meat in the Province of

Quebec. ST398 demonstrated more antibiotic resistant genes while ST8 harboured more virulence genes.

**Keywords:** chicken meat, broiler chickens, prevalence, molecular typing, antimicrobial resistance, biofilm, Agr system, virulence genes, DNA microarray, Canada, Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)

# TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ.....	ii
SUMMARY.....	iv
TABLE DES MATIÈRES.....	vi
LISTE DES TABLEAUX.....	viii
LISTE DES FIGURES.....	x
LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS.....	xi
DÉDICACE.....	xiii
REMERCIEMENTS.....	xiv
1. INTRODUCTION.....	1
2. RECENSION DES ÉCRITS.....	4
2.0 <i>Staphylococcus aureus</i> .....	5
2.1 Histoire et découverte.....	5
2.2 Identification des <i>Staphylococcus aureus</i> .....	6
2.3 Le génome de <i>S. aureus</i> .....	7
2.4 Éléments génétiques mobiles chez <i>S. aureus</i> .....	9
2.4.1 Bactériophages.....	11
2.4.2 Ilots de pathogénicité.....	11
2.4.3 Transposons.....	11
2.4.4 Plasmides.....	12
2.5 Biofilm.....	13
2.5.1 Le système Agr.....	17
2.6 L'arrivée des <i>S. aureus</i> résistant à la méthicilline (SARM).....	19
2.6.1 SARM d'origine hospitalière.....	20
2.6.2 SARM d'origine communautaire.....	22
2.6.3 Les SARM d'origine animale.....	23
2.6.3.1 Génotype et phénotype de résistance aux antibiotiques des LA-MRSA.....	25
2.7 Cassette SCC <i>mec</i> .....	30
2.7.1 Complexe <i>ccr</i> .....	31

2.7.2 Complexe <i>mec</i> .....	32
2.7.3 Région J ‘‘ joining region’’ .....	34
2.7.8 Nomenclature des cassettes <i>SCCmec</i> .....	34
2.8 Typage des SARM .....	35
2.8.1 Casette <i>SCCmec</i> .....	35
2.8.2 Séquençage de locus multiple (MLST) .....	36
2.8.3 Gène <i>spa</i> .....	36
2.8.4 PFGE .....	36
2.9 Les SARM et la volaille .....	38
2.9.1 Colonisation de poulet à griller par SARM .....	38
2.9.1.1 Études européennes .....	38
2.9.1.2 Études asiatiques .....	40
2.9.2 SARM dans la viande de poulet .....	40
2.9.2.1 Études européennes .....	40
2.9.2.2 Études nord-américaines .....	43
2.9.2.3 Études asiatiques .....	43
3. ARTICLE SCIENTIFIQUE .....	47
4. DISCUSSION GÉNÉRALE .....	102
5. CONCLUSION ET PERSPECTIVES .....	109
Bibliographie .....	112
PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS .....	xv



## LISTE DES TABLEAUX

**Tableau I.** Gènes et facteurs de virulence retrouvés chez les HA-MRSA. (page 21)

**Tableau II.** Gènes de résistance aux antibiotiques rapportés chez les LA-MRSA ST398.  
(page 27)

**Tableau III.** Les plasmides et leurs gènes de résistance aux antibiotiques rapportés chez les LA-MRSA. (page 28)

**Tableau IV.** Les complexes *ccr* et leurs types *SCCmec* associés chez *S. aureus*. (page 31)

**Tableau V.** Classification des complexes *mec* chez *S. aureus* et leur composition. (page 32)

**Tableau VI:** Primers sequences used in this study. (page 89)

**Tableau VII:** Molecular profil, antimicrobial resistance and biofilm formation of retail chicken meat MRSA isolates ( $n=15$ ). (page 90)

**Tableau VIII:** Antibiotic resistance of retail chicken meat MRSA isolates ( $n = 15$ ) based on MIC's. (page 91)

**Tableau IX:** Retail chicken meat MRSA isolates antibiotic resistance phenotypes. (page 93)

**Tableau X:** Antimicrobial resistance genotypes of retail chicken meat MRSA isolates ( $n=15$ ) using microarrays. (page 94)

**Tableau XI:** Virulence genotypes of retail chicken meat MRSA isolates ( $n=15$ ) using microarrays. (page 95)

## LISTE DES FIGURES

**Figure 1.** Mouvement des principaux éléments génétiques mobiles retrouvés chez *S. aureus*. (page 10)

**Figure 2.** Cycle d'un biofilm. (page 15)

**Figure 3.** La régulation de la production de biofilm chez *S. aureus*. (page 16)

**Figure 4.** Le système Agr de *S. aureus*. (page 17)

**Figure 5.** Exemple de cassette staphylococcale. (page 33)

**Figure 6.** Schéma représentant le gène *spa*. (page 37)

**Figure 7:** Geographical location of retail markets and farms sampled during the project via slaughterhouses. (page 96)

**Figure 8:** Pulse-field gel electrophoresis following *Cfr9I* digestion. (page 97)

**Figure 9:** Plasmid location of *aad(D)* and *lnu(A)*: Southernblot hybridization of plasmid DNA with DIG labelled probes for *aad(D)* top panel and *lnu(A)*. (page 98)

**Figure 10:** Biofilm production in representative retail chicken meat MRSA isolates and reference strains. (page 99)

**Figure 11.** *hld* gene expression of representative retail chicken meat MRSA isolates. (page 100)

**Figure 12:** Biofilm production in retail chicken meat MRSA isolates ( $n=15$ ) and reference strains. (page 101)

## Liste des sigles et abréviations

<b>ADN</b>	Acide désoxyribonucléique
<b>Agr</b>	<i>Accessory gene regulator</i>
<b>AIP</b>	peptide autoinducteur
<b>ARN</b>	Acide ribonucléique
<b>CA-MRSA</b>	<i>Community-associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus</i>
<b>CC</b>	<i>Clonal Complex</i>
<b>CLSI</b>	<i>Clinical Laboratory Standard Institute</i>
<b>CMI</b>	Concentration Minimale Inhibitrice
<b>IEC</b>	<i>Immune-Evasion-Cluster</i>
<b>HA-MRSA</b>	<i>Healthcare-associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus</i>
<b>LA-MRSA</b>	<i>Livestock-associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus</i>
<b>MLST</b>	<i>Multilocus Sequence Typing</i>
<b>MSSA</b>	<i>Methicillin-susceptible Staphylococcus aureus</i>
<b>MSCRAMM</b>	<i>Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules</i>
<b>PCR</b>	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
<b>pb</b>	paire de base
<b>PBP</b>	<i>Penicillin Binding Protein</i>

<b>PIA</b>	<i>Polysaccharide Intercellular Adhesin</i>
<b>PFGE</b>	<i>Pulsed Field Gel Electrophoresis</i>
<b>PSM</b>	<i>Phenol Soluble Modulin</i>
<b>PVL</b>	<i>Panton-Valentin Leukocidin</i>
<b>SARM</b>	<i>Staphylococcus aureus résistant à la Méthicilline</i>
<b>SCC<i>mec</i></b>	<i>Staphylococcal Cassette Chromosome <i>mec</i></i>
<b>smMRSA</b>	<i>silent <i>mecA</i>-carrying methicillin susceptible Staphylococcus aureus</i>
<b>ST</b>	<i>Sequence type</i>

**«Il ne suffit pas de connaître la vérité,  
il faut encore la proclamer.»**

*Louis Pasteur*

## Remerciements

Merci à ma directrice de maîtrise, le Dre Marie Archambault, de m'avoir permis d'apprendre à ses côtés, mais surtout pour m'avoir permis de m'épanouir dans son laboratoire.

Merci à mes co-directeur, les Drs François Malouin et Mario Jacques, pour leurs conseils, mais surtout d'avoir partagé leurs expertises avec moi.

Merci aux Drs Julie Arsenault, Audrey Charlebois et Valentine Usongo d'avoir partagé leurs connaissances et bonne humeur avec moi.

Merci aux membres de mon laboratoire, Dr Éric Parent, Josée Labrie et Claudia Duquette, pour leur assistance technique.

Merci aux membres de mon comité-conseil ainsi qu'aux membres du jury d'évaluation de ce mémoire.

Merci aux professeurs, étudiants et membres du personnel du GREMIP.

Merci au ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation du Québec (MAPAQ) et au Conseil de recherches en sciences naturelles et en génie du Canada (CRSNG) pour leur contribution financière au projet.

Mais surtout, merci à ma fiancée pour tout l'amour et les encouragements dont j'ai été gratifié depuis les 10 dernières années: Je t'aime.

# **1. INTRODUCTION**



Isolé pour la première fois par Rosenbach, *Staphylococcus aureus* est une bactérie pouvant causer une grande variété d'infections allant de l'infection des tissus mous et de la peau à l'intoxication alimentaire [1, 2]. Suite à l'introduction de la méthicilline (bêta-lactamine de la classe des pénicillines) en médecine humaine dans les années 60, des résistances envers cet antibiotique ont émergé chez certaines souches de *S. aureus* [3]. Aujourd'hui appelé *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline (SARM), elle cause environ 75 000 cas d'infection et près de 10 000 décès par année aux États-Unis [4]. Longtemps associés aux infections nosocomiales dans les hôpitaux, les SARM sont aujourd'hui aussi retrouvés un peu partout dans différentes communautés ainsi que chez certaines espèces animales, dont le poulet [1, 3, 5, 6]. Plusieurs études nord-américaines, européennes et asiatiques ont aussi démontré la présence de SARM dans la viande de poulet [7-9]. Certaines souches de SARM d'origine animale, plus spécifiquement celles appartenant à la séquence type 398, ont été impliquées dans quelques cas d'infections chez l'humain [10-12]. Récemment, le premier décès dû à ce type de SARM a été décrit chez l'humain [13]. Aujourd'hui, des souches d'origines hospitalière, communautaire et animale ont été retrouvées chez le poulet à griller et dans la viande de poulet partout à travers le monde [6, 7, 14-16]. Certaines de ces souches ont démontré de multiples résistances aux antibiotiques autres que celle envers les bêta-lactamines [6, 7, 14-16]. Cependant, aucune donnée sur la prévalence et les caractéristiques des SARM retrouvés dans la viande de poulet et le poulet à griller de la Province de Québec n'est actuellement disponible.

C'est pourquoi nous formulons l'hypothèse que la cavité nasale du poulet à griller et la viande de poulet au détail peuvent porter des SARM multirésistants aux

antibiotiques. Les objectifs de ce projet étaient tout d'abord de déterminer la prévalence des SARM provenant du poulet à griller et de la viande de poulet au détail. Puis d'étudier leurs profils phénotypiques et génotypiques de résistance aux antibiotiques ainsi que d'identifier leurs profils génotypiques de virulence. La capacité de ces souches à produire du biofilm a été également à l'étude.

## **2. RECENSION DES ÉCRITS**

## 2.0 *Staphylococcus aureus*

### 2.1 Histoire et découverte

Les staphylocoques furent observés pour la première fois à la fin des années 1800 par Robert Koch et Louis Pasteur. C'est à la même période que Rosenbach isolat en culture pure pour la première fois *Staphylococcus aureus* [2]. *S. aureus* est une bactérie à la fois commensale et pathogène opportuniste [1]. Cette espèce bactérienne peut coloniser l'humain aussi bien que plusieurs espèces animales comme le porc, le sanglier ainsi que le cerf rouge [1, 17, 18]. Chez l'humain, on peut retrouver *S. aureus* au niveau du nez, des aisselles ou encore dans le système gastro-intestinal [19]. Le nez est la principale région anatomique colonisée chez l'humain. Le portage de la bactérie peut être temporaire ou permanent [19]. Le portage permanent de la bactérie peut aller jusqu'à 50% de la population et le portage temporaire jusqu'à 60% de la population où la durée du portage ne dépasse généralement pas une semaine [19-22]. *S. aureus* est le staphylocoque le plus virulent en raison de ses nombreux facteurs de virulence [1, 23]. Lorsque l'opportunité se présente, cette espèce de staphylocoque peut causer diverses infections telles des endocardites, ostéomyélites, infections de la peau, pneumonies, et intoxications alimentaires [1]. Le *S. aureus* a permis la découverte du premier antibiotique. C'est en 1928, qu'Alexander Fleming, biologiste britannique, revint de voyage à son laboratoire pour découvrir des cultures de *S. aureus* contaminées par un champignon (*Penicillium notatum*), ayant inhibé la croissance de la bactérie [24]. C'est ainsi qu'il découvrit la pénicilline [24].

## 2.2 Identification de *Staphylococcus aureus*

*S. aureus* est un coque à Gram positif non sporulant de la famille des *Staphylococcaceae* [25, 26]. Les staphylocoques produisent tous l'enzyme catalase, mais *S. aureus* est l'un des rares à produire une coagulase [1, 2, 26]. L'espèce bactérienne est donc confirmée par l'évaluation de la production des enzymes catalase et coagulase [26]. *S. aureus* peut, en comparaison à d'autres staphylocoques d'intérêt clinique, fermenter le mannitol et produire une enzyme de type DNase [26]. Plus récemment, des tests d'agglutination avec des billes de latex liées à des anticorps ont été mis au point [14, 27]. Certaines trousse permettent, par exemple, de mettre en évidence la présence du facteur d'agglutination et de la protéine A (par exemple, Staphytest Plus, Staphaurex®) produits par *S. aureus*. Les trousse API® ID strip sont d'autres outils développés pour identifier les *S. aureus*. Ces trousse permettent d'effectuer rapidement les tests biochimiques nécessaires à l'identification de cette bactérie [28].

De nos jours, il est possible d'identifier *S. aureus* à l'aide de réaction PCR (*Polymerase Chain Reaction*) ciblant des éléments génétiques spécifiques à cette bactérie. Le gène codant pour l'enzyme thermonucléase (*nuc*) de *S. aureus* est un bon exemple d'élément génétique utilisé pour identifier cette bactérie [29, 30]. D'autres gènes peuvent aussi nous indiquer la présence de *S. aureus*. Par exemple, le gène de la gyrase (*gyrA*) [23] et le fragment SA442 [31] ont déjà été utilisés à cette fin. Toutefois, il faut rester critique face aux résultats obtenus lors de la recherche de ces derniers segments d'ADN. Dans certaines études, des souches de *S. aureus* ont déjà été isolées par la méthode biochimique, mais se sont révélées impossibles à identifier à l'aide d'une réaction PCR

ciblant le fragment d'ADN SA442 [32, 33]. De plus, le fragment d'ADN SA442 est majoritairement retrouvé au niveau de l'espèce *S. aureus*, mais peut aussi être retrouvé chez les espèces suivantes: *Staphylococcus lugdunensis*, *Staphylococcus schleiferi* et *Staphylococcus intermedius* [23]. Le gène *gyrA*, lui, est retrouvé chez tous les staphylocoques [23].

## 2.3 Le génome de *S. aureus*

Le génome de *S. aureus* peut être divisé en deux: le 'core' génome (génome cœur) et le génome accessoire [34, 35]. Le premier est l'ensemble des gènes communs à toutes les souches de *S. aureus*. Ce génome contient différents gènes de ménage, gènes nécessaires à la croissance ainsi que quelques gènes codant pour des facteurs de virulence [34, 35]. Le génome accessoire de *S. aureus* est l'ensemble des gènes présents uniquement dans une souche étudiée ainsi que ceux présents dans deux ou plusieurs souches. Il est variable et peut contenir des gènes codant pour des résistances aux antibiotiques et des facteurs de virulence comme des exotoxines ou des superantigènes [34, 35]. Pratiquement tous les éléments du génome accessoire sont localisés sur différents vecteurs tels des plasmides et des bactériophages et peuvent influencer le comportement de la souche de *S. aureus* dont la niche écologique de ce dernier [34, 36].

Les facteurs de virulence pouvant être portés par *S. aureus* ont différents rôles permettant à cette bactérie de survivre et de créer une infection chez son hôte via l'attachement, l'évasion du système immunitaire, l'invasion, et la toxémie [1, 37]. Les gènes impliqués dans l'attachement aux surfaces codent pour des protéines telles des

protéines de liaison à la fibronectine (*fnbpA*, *fnbpB*), au fibrinogène (*clfA*, *clfB*), et au collagène (*cna*) [1, 37]. Une autre composante génétique ayant été associée à la colonisation de certaines souches de *S. aureus* chez l'humain est l'élément mobile catabolisant l'arginine (ACME) [34, 38, 39]. Le locus ACME a aussi été associé à l'évasion du système immunitaire [34, 38]. Le locus ACME permettrait à la bactérie de neutraliser l'acidité produite par les acides gras de la peau et favoriserait ainsi le catabolisme de l'arginine, le seul élément disponible pour produire de l'oxyde nitrique vitale pour les macrophages [38, 39]. Cependant, des tests supplémentaires semblent nécessaires pour bien comprendre le rôle de ce locus chez *S. aureus* [34, 39].

Selon la souche, les protéines d'attachement aux surfaces peuvent varier, ce qui explique en partie la grande variété d'infections causées par *S. aureus* [1]. Une fois adhérent aux tissus ou surfaces, *S. aureus* peut produire du biofilm et ceci lui permet, entre autres, d'échapper au système immunitaire [1, 22]. L'évasion du système immunitaire est aussi favorisée par la présence de plusieurs facteurs de virulence tels des capsules aux propriétés antiphagocytaires (*cap5*, *cap8*), les leucocidines de Pantón-Valentin (*lukS-PV*, *lukF-PV*), et la protéine A (*spa*) fixant le fragment Fc des immunoglobulines et prévenant ainsi l'opsonisation de la bactérie [1, 37]. Le complexe d'immunoévasion (IEC) est un élément important de l'évasion du système immunitaire dans les cas d'infections chez l'humain [1]. Ce complexe code pour une protéine inhibitrice du complément (*scn*), une protéine inhibitrice de la chémotaxie (*chip*) et la staphylokinase (*sak*), mais aussi certaines entérotoxines (A, Q, P, K) [40, 41].

Une fois la colonisation effectuée, la bactérie peut envahir le tissu ou l'organisme qu'elle infecte. Lors de cette phase, la bactérie peut activer différents gènes (*V8*, *hysA*,

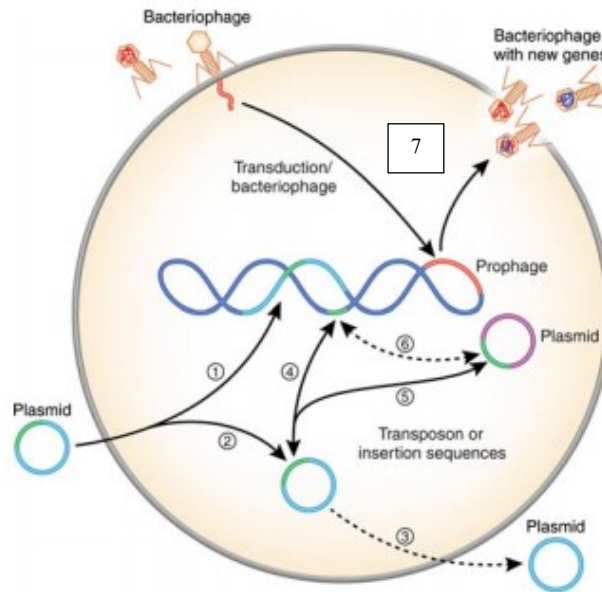
*hla*, *plc*, *sepA*) codant pour des protéases, phospholipases, lipases, nucléases, hyaluronate lyases et élastases lui permettant de détruire et d'envahir le tissu [1]. En plus des toxines de Panton-Valentin, *S. aureus* peut produire plusieurs autres toxines [1, 37]. Il peut, entre autres, produire la toxine du choc toxique-1 (*tst*) responsable d'intoxication alimentaire [42]. C'est une bactérie pouvant aussi posséder plusieurs gènes codant pour diverses entérotoxines (*sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see*, *seg*, *seh*, *sei*, *sej*, *sek*, *sel*, *sem*, *sen*, *seo*, *sep*, *seq*, *ser*, et *seu*) [37]. La toxine du choc toxique ainsi que toutes les entérotoxines retrouvées chez *S. aureus* sont considérées comme des superantigènes [37]. Afin d'éviter des pertes énergétiques, la régulation des différents facteurs de virulence est primordiale. Chez *S. aureus*, le système Agr joue un rôle important dans la régulation de l'expression de plusieurs facteurs de virulence (section 2.5.1) [1, 22, 43]. Récemment, l'opéron *msaABCR* a aussi été associé à la régulation de facteur de virulence chez *S. aureus* [44].

## 2.4 Éléments génétiques mobiles chez *S. aureus*

Le génome accessoire de *S. aureus* est grandement influencé par l'acquisition d'éléments génétiques mobiles. Un élément génétique mobile est un petit segment d'ADN capable de se déplacer et de s'intégrer par lui-même dans un autre génome [34, 35, 45]. Ce sont de bons vecteurs horizontaux et verticaux de gènes de virulence et de résistance aux antibiotiques [34, 35, 45]. Les principaux éléments génétiques mobiles chez les staphylocoques sont les bactériophages, les îlots de pathogénicité, les



transposons, les plasmides (Fig.1) et les cassettes chromosomales staphylococciques (voir section 2.7) [35, 36, 45].



**Figure 1.** Mouvement des principaux éléments génétiques mobiles retrouvés chez *S. aureus* (Malachowa, 2010). (1) Intégration d'un plasmide dans le génome bactérien. (2) Les plasmides ne s'intègrent pas toujours au génome. (3) Un plasmide peut aussi se suicider en sortant de la cellule bactérienne. (4) et (6) Échange de transposon entre un plasmide et le génome. (5) Échange de transposon entre deux plasmides. (7) Insertion d'un phage dans le génome bactérien.

### 2.4.1 Bactériophages

Les bactériophages sont des virus infectant les bactéries [35, 46]. Soixante-dix phages différents sont connus pour infecter *S. aureus* et virtuellement toutes les souches de cette espèce possèdent un phage dans leur génome et plusieurs souches même jusqu'à quatre phages différents [35, 45]. Chez *S. aureus*, ils appartiennent tous à

l'ordre des Caudovirales et possèdent un ADN double brin [46]. Ces virus insèrent leur génome dans le chromosome ou un plasmide de la bactérie (Fig.1) et sont considérés comme essentiels à l'évolution bactérienne [35, 46]. Certains d'entre eux sont porteurs de gènes codant pour des facteurs de virulence chez *S. aureus*: la toxine exfoliative A (*eta*), l'IEC (*sak*, *chp*, *scn*), et les leucocidines de Panton-Valentin (opéron *luk-PV*), en sont quelques exemples [35, 40, 45-50].

#### 2.4.2 Ilots de pathogénicité

Les ilots de pathogénicité de *S. aureus* (SaPI) sont des génomes de bactériophages ayant perdu leurs gènes codant pour la capsid et la queue du virion [35, 46]. Ces éléments mobiles contiennent, entre autres, une intégrase et peuvent coder pour des gènes de résistance à certains antibiotiques comme l'acide fusidique (*fusB*), le gène codant pour la toxine du syndrome du choc toxique *tsst-1* (*tst*) ou bien encore des gènes codant pour des entérotoxines (*seb* et *sec*) [35, 45, 46]. Ils ne peuvent pas se déplacer par eux-mêmes et nécessitent l'aide de certains phages pour y arriver [35, 46].

#### 2.4.3 Transposons

Les transposons sont des segments d'ADN mobiles pouvant transporter avec eux des gènes de résistance aux antibiotiques [35, 45, 51]. Certains sont retrouvés seuls dans le chromosome ou insérés dans un autre élément génétique mobile [35, 51]. Les transposons peuvent être retrouvés au niveau des cassettes staphylococcales (SCC), dans des bactériophages, dans le chromosome bactérien ou encore sur des plasmides [35, 45, 52]. Plusieurs copies du même transposon peuvent être présentes dans la même

souche de *S. aureus* [35, 53]. Chez *S. aureus*, on retrouve, entre autres, le transposon 554 portant les gènes *spc* et *ermA* conférant des résistances à la spectinomycine, à l'érythromycine et aux macrolide-lincosamide-streptogramine B [35, 45, 54, 55]. Plusieurs autres transposons ont été identifiés chez *S. aureus* et peuvent porter des déterminants de résistance, entre autres envers les aminoglycosides (*aacA-aphD*), la tétracycline (*tetM*), le florfénicol/chloramphénicol (*fexA*), la spectinomycine (*ant9*) et la vancomycine (opéron *vanA* : *vanA*, *vanH*, *vanX*, *vanS*, *vanR*, *vanY*, *vanZ*). [45, 51, 56]

#### 2.4.4 Plasmides

Les plasmides sont de l'ADN circulaire non chromosomique (peut toutefois s'intégrer au chromosome) présent chez certaines bactéries (Fig. 1) [35]. Par transfert horizontal, les plasmides permettent de façon très fréquente le transfert de gènes de virulence et de résistance aux antibiotiques [35]. Naturellement, *S. aureus* peut contenir un ou plusieurs plasmides [35, 45, 51]. Les plasmides de *S. aureus* sont regroupés en trois catégories [35, 45]. La première catégorie contient les petits plasmides (1 300 - 4 600 pb) non codant ou codant rarement pour plus d'un facteur de virulence [35, 45, 51]. Présents en plusieurs copies, ces plasmides ne transportent pas de transposon et de phage et se répliquent par un système de réplication circulaire asymétrique [35, 51]. La deuxième catégorie contient de plus gros plasmides (15 000 - 46 000 pb). Présent en quelques exemplaires dans la cellule (4-6 copies), cette catégorie de plasmides peut porter, entre autres, des gènes de résistance aux antibiotiques, aux métaux lourds et aux détergents [35, 45, 51]. La troisième catégorie, contient les plus gros plasmides retrouvés chez *S. aureus* (30 000 - 60 000 pb) [35, 45]. Ce type de plasmide code pour

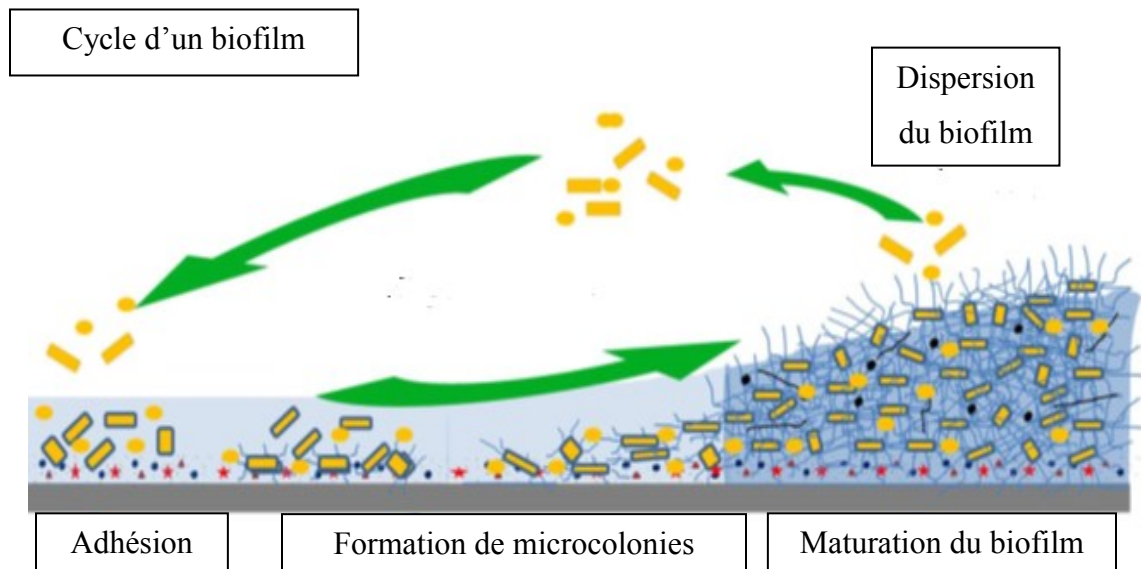
un déterminant de transfert par conjugaison (*tra*) en combinaison avec plusieurs marqueurs de résistances aux antibiotiques [35, 45]. C'est plasmides sont aussi caractérisés par l'intégration d'un ou deux transposons et plusieurs séquences d'insertion [35]. Certains plasmides sont porteurs de gènes codant pour une grande variété de résistance aux antibiotiques face à des aminoglycosides (*aadD*, *ant4'*), des pénicillines (opéron *bla*), le chloramphénicol (*cat*, *cfr*), la bléomycine (*ble*), le triméthoprime (*dfrA*, *dfrK*), la streptomycine (*str*) et des tétracyclines (*tetK*, *tetL*) [45, 51]. Excluant ceux portés par d'autres éléments génétiques mobiles intégrés aux plasmides, les gènes de virulence portés par les plasmides chez *S. aureus* peuvent coder pour la toxine exfoliative B (*etb*), les entérotoxines B, D et J (*seb*, *sed*, *sej*), l'inhibiteur de la différenciation cellulaire C (*edin-C*), et la staphopaine A (*scpA*) [35, 51]. Les gènes de résistance aux ions organiques et inorganiques toxiques retrouvés parmi les plasmides chez *S. aureus* peuvent conférer une résistance à l'arsenate (*arsRBC*), le cadmium (*cadA*, *B*, *D*, *X*), le mercure (*mer* operon) et à quelques autres composés [35, 51]. Des résistances contre certains détergents comme les ammoniums quaternaires (*qacA*, *qacB*, *qacC/D*) ont aussi été retrouvées sur certains plasmides de *S. aureus* [51].

## 2.5 Biofilm

Les biofilms sont des communautés bactériennes attachées à une surface biotique ou abiotique produisant une matrice extracellulaire où les cellules bactériennes présentent certains caractères phénotypiques différents des cellules n'étant pas adhérentes à une surface [22, 57-59]. Le biofilm permet aux bactéries d'être protégées de divers

éléments tels la dessiccation, la phagocytose et le système immunitaire [22, 57]. Le biofilm peut aussi augmenter la tolérance de la bactérie envers les antibiotiques [22, 60, 61]. Cette tolérance est principalement causée par une baisse de la pénétration de l'antibiotique dans le biofilm et par des changements physiologiques survenant dans la bactérie, rendant celle-ci moins sensible aux antibiotiques [22, 60]. Cette capacité à produire du biofilm peut permettre à *S. aureus* de provoquer diverses infections liées à des implants, des prothèses et des cathéters [58, 62]. Par contre, la capacité à produire du biofilm chez *S. aureus* est très variable selon la souche [63, 64]. La formation du biofilm s'effectue en 4 étapes : l'adhésion à une surface par la bactérie, la formation de microcolonie, la maturation du biofilm et la dispersion des cellules constituant le biofilm (Figure 2) [22, 57, 58]. L'adhésion est une étape essentielle à la formation du biofilm où la bactérie adhère à une surface de façon non spécifique, puis irréversiblement de façons spécifiques [22, 58, 65]. Les gènes codant pour les MSCRAMM (*microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules*) permettent l'adhérence des bactéries aux tissus de façon spécifique [1, 22]. Ces derniers permettent l'adhérence au collagène, à la fibronectine et au fibrinogène [22]. Lorsque l'adhésion devient irréversible, il y a alors formation de microcolonies par les bactéries [1, 22, 57, 58], puis sécrétion de substances exopolymériques (EPS), constituant la matrice du biofilm, comme des polysaccharides, des protéines, des lipides et de l'ADN extracellulaire [22, 58-60]. Le locus *ica* est associé à la production de PIA (*polysaccharide intercellular adhesin*), le polysaccharide principal constituant la matrice du biofilm chez *S. aureus* [22, 60]. Toutefois, certaines souches de *S. aureus* ne possèdent pas le locus *ica*, mais sont tout de même capables de produire un biofilm

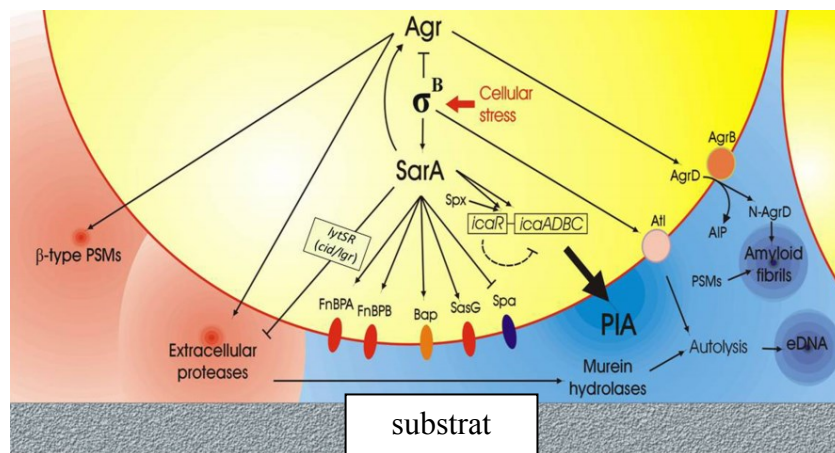
fonctionnel [22]. Des protéines et de l'ADN extracellulaire jouent alors le rôle du PIA [22]. La composition du biofilm varie énormément entre les souches et selon les conditions environnementales [22, 58, 66]. Le biofilm mature est une structure complexe parcourue de canaux permettant le passage de l'eau [22, 57, 58, 67]. La dispersion du biofilm se fait par dégradation de la matrice extracellulaire à l'aide d'un très grand nombre d'enzymes (protéases, nucléases, etc.) [22, 57, 58, 60] Cette destruction du biofilm permet la dispersion de la bactérie dans d'autres environnements où elle pourra reproduire de nouveau du biofilm [22, 60].



**Figure 2.** Cycle d'un biofilm (adapté de Abdallah et *al.*, 2014).

La formation de biofilm est un processus complexe régulé par plusieurs gènes différents (système Agr, *sarA*, *atl*, *codY*, *rsbU*, *sigB*, etc.) [60, 68, 69]. Une étude récente a aussi permis d'associer l'opéron *msaABCR* au développement du biofilm chez *S. aureus* [44]. La figure 3 décrit de façon schématique la régulation de la production et de la destruction du biofilm. La régulation de la production de biofilm s'effectue

principalement en deux phases. La phase d'anabolisme permet la production des éléments constituant la matrice extracellulaire: PIA, ADN extracellulaire et protéines (fibrilles amyloïdes) [60]. La phase de catabolisme permet la destruction de la matrice extracellulaire via la production de modulines (petits peptides) et de protéases [60, 67]. Plusieurs groupes de gènes sont impliqués dans ces deux phases et interagissent ensemble. Le système Agr induit la production de modulines et de protéases lors de la phase de catabolisme [22, 60]. Lors de la phase d'anabolisme, ce même système induit la production de protéines constitutives de la matrice [60]. Le gène  $\sigma^B$  et l'opéron *lysSR* agissent sur la production de l'ADN extracellulaire [60, 70]. Le gène *sarA* et  $\sigma^B$  sont impliqués dans la production du PIA [60, 68, 71]. Le gène *sarA* joue aussi un rôle dans l'inhibition de la production de protéase [22]. Les gènes  $\sigma^B$  et *sarA* semblent être les points centraux de cette régulation [60]. Le système Agr est en effet un élément important permettant la régulation du biofilm. De plus, il est impliqué dans la régulation de plusieurs autres facteurs de virulence.

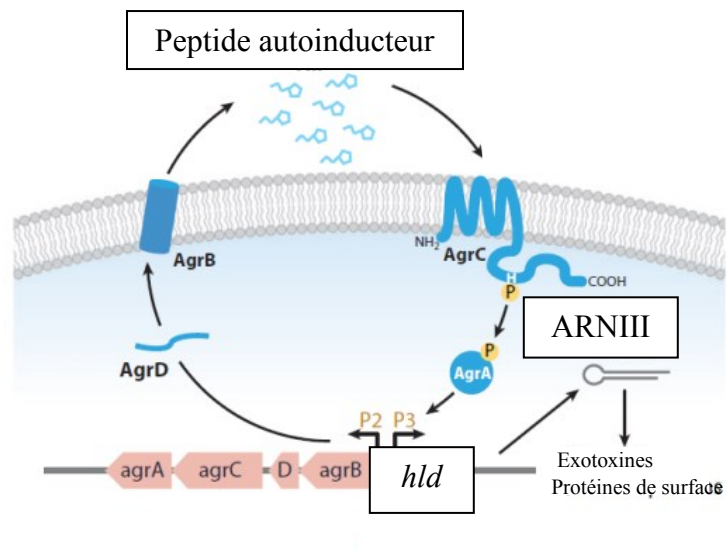


**Figure 3.** La régulation de la production de biofilm chez *S. aureus* (modifié de Arciola et al., 2015). La portion rouge de l'image représente la phase de catabolisme du biofilm.

La portion bleue représente la phase d'anabolisme. Le système Agr et le gène *SarA* sont des composantes centrales de la régulation de la production du biofilm étant eux même sous le contrôle du gène  $\sigma^B$ .

### 2.5.1 Le système Agr

Le système Agr est l'un des premiers moniteurs de population (système transcripteur/senseur) à avoir été étudié chez les bactéries à Gram positif [72]. Ce système régule l'expression de plus de 70 gènes différents dont 23 codent pour des facteurs de virulence tels des adhésines, des hémolysines, des superantigènes ou encore des facteurs liés à la production et à la dispersion du biofilm produit par cette bactérie [43, 57, 73, 74]. Ce système est constitué de cinq gènes d'intérêt : *agrA*, *agrB*, *agrC*, et *agrD* et *hld* (Fig. 4) [43, 57, 63, 64, 75, 76].



**Figure 4** : Le système Agr de *S. aureus* (modifiée de Novick et Geisinger, 2008). La protéine *agrD* est transformée et excrétée par la protéine *agrB* sous forme de petit peptide autoinducteur (AIP) stimulant la phosphorylation de la protéine transmembranaire *agrC*,



qui phosphorylera à son tour la protéine *agrA*, activateur de transcription des promoteurs P2 et P3.

Le gène *agrD*, code pour une protéine appelée AgrD [43, 57]. Cette protéine est transformée en un peptide autoinducteur (AIP) qui est sécrété à l'extérieur de la cellule par la protéine AgrB (*agrB*) [43, 57]. Le peptide autoinducteur est un petit peptide de 7-9 acides aminés contenant un cycle thiolactone [43]. Une fois à l'extérieur de la cellule, le peptide se lie sur l'extrémité extracellulaire de la protéine membranaire AgrC (*agrC*) [43, 57]. La protéine AgrC est une histidine kinase qui, une fois liée par l'AIP, entraîne la phosphorylation de la portion intracellulaire de la protéine AgrA (*agrA*) [57]. Une fois phosphorylée, la protéine AgrA entraîne la transcription de l'opéron lié au promoteur P2 (*agrA, B, C, D*) et P3 (*hld*) [43, 57, 64]. Le gène *hld* code pour un ARN appelé ARNIII [64, 75, 76]. Ce dernier joue un rôle dans la régulation de plusieurs gènes et code aussi pour l' $\delta$ -hémolysine de *S. aureus* [43, 64, 75]. L' $\delta$ -hémolysine produite par cet ARN aurait un rôle à jouer dans l'intégrité du biofilm de *S. aureus* [43]. L'ARNIII permet, entre autres, la répression de la production de la protéine A ainsi que d'une protéine de liaison à la fibronectine et augmente la production de l' $\alpha$ -hémolysine [43]. L'ARNIII agit aussi sur l'ARN messenger produit par le gène *rot* et vient interférer avec les fonctions de ce dernier. La protéine codée par le gène *rot* est un facteur de transcription qui agit généralement comme activateur des gènes codant pour des protéines de surface et comme inhibiteur des gènes codant pour des protéines sécrétées [43, 74, 77]. L'interaction entre l'ARNIII et l'ARN messenger du gène *rot* renverse l'effet de ce dernier et réprime la production des protéines de surface et induit la production des protéines sécrétées [43, 77]. Afin que le biofilm puisse se former, le

système Agr doit donc être inhibé, [78] car il réprime des facteurs d'attachement cellulaire nécessaires à la formation de biofilm [62]. La régulation de l'activité du système Agr est très complexe et implique plusieurs gènes différents comme les gènes *sarA*, *sarU*, *mgrA*, *msa* et  $\sigma^B$  [43].

## **2.6 L'arrivée des *S. aureus* résistant à la méthicilline (SARM)**

Dès les années soixante, des résistances à la pénicilline sont observées chez *S. aureus*. La méthicilline (bêta-lactamine de la classe des pénicillines), qui commença à être utilisée en médecine humaine durant cette période, permet de contourner cette problématique [3, 79]. Peu après son apparition, on rapporte rapidement des cas de résistance à la méthicilline chez *S. aureus* au Royaume-Uni [3, 79]. Au cours des années 80, les SARM sont devenus endémiques dans pratiquement tous les hôpitaux américains [80]. Selon un rapport du "Center for Diseases Control and Prevention" (CDC), 75 309 cas d'infection à SARM ont été répertoriés en 2012 et ont mené à 9 670 décès aux États-Unis [4]. Une autre étude rapporte que plusieurs pays estiment que 25-50 % des infections nosocomiales à *S. aureus* sont causées par des SARM [3]. Le terme SARM est plus une dénomination historique puisque ces derniers sont aujourd'hui résistants, voir multirésistants, à plusieurs classes d'antibiotique différentes. Cette résistance historique à la méthicilline et à presque toutes les bêta-lactamines est conférée par le gène *mecA* codant pour une protéine de liaison à la pénicilline modifiée (PBP2a) [81-

85]. Récemment, un variant du gène *mecA*, aujourd'hui appelé *mecC*, a été découvert (voir la section 2.7.2) [86-88]. De façon constitutive, les *S. aureus* possèdent des protéines périplasmiques de liaison à la pénicilline (PBP) [23, 89, 90]. Les PBP effectuent la transpeptidation du peptidoglycane de la paroi bactérienne chez *S. aureus* [83, 84, 89-92]. Les bêta-lactamines sont des analogues du substrat des PBPs bloquant leur fonction de transpeptidation [89]. La PBP2a n'est pas affectée par les bêta-lactamines ce qui provoque une résistance envers ces antibiotiques [23, 84, 89, 91, 92]. Les souches de *S. aureus* sont considérées résistantes à la méthicilline lorsqu'elles présentent une CMI supérieure ou égale à 4 ug/ml [85, 93].

### 2.6.1 SARM d'origine hospitalière

Les premiers SARM sont apparus dans des centres hospitaliers en Angleterre [3]. Les patients hospitalisés immunocompromis ou déjà atteints par une autre infection sont plus à risque que la population en général [94]. Ce type d'infection se nomme "Healthcare-Associated MRSA" (HA-MRSA). Il existe actuellement cinq géotypes d'importance chez les HA-MRSA: Ibérique, Brésilien, New-York/Japon, Hongrois et Pédiatrique [1, 94]. Les clones Ibérique et Brésilien appartiennent au complexe clonal (CC) 8 et aux séquences types (ST) 239 et 247, respectivement [1, 95, 96]. Les clones New-York/Japon et pédiatrique appartiennent au CC5 et à la ST5 [1, 95, 96]. Le clone Hongrois appartient au CC8 et à la ST239 [95]. Plusieurs autres clones ont aussi été rapportés: USA100 (ST5); USA200 (ST36); USA500 (ST8); USA600 (ST45); USA800 (ST5), UK-EMRSA-2 (ST8); -3 (ST5); -6 (ST8); -15 (ST22); -16 (ST36), Italien (ST228), Rome (ST247) et Allemand du sud (ST228) [95, 96]. Leur répartition

varie beaucoup en fonction de la région géographique, mais est généralement limitée à une zone bien définie [94]. Des résistances à d'autres catégories d'antibiotiques que les bêta-lactamines ont également été rapportées chez les HA-MRSA, notamment envers la ciprofloxacine, le levofloxacine, le linéozide, la clindamycine, la tétracycline, l'érythromycine, le mupurocine, le triméthoprim, l'acide fusidique, la daptomycine et la rifampicine [3, 94]. La vancomycine est considérée comme l'antibiotique de choix contre les SARM d'origine hospitalière [3].

Cependant, durant les dernières décennies l'apparition de résistance envers cet antibiotique a été observée chez les HA-MRSA [3, 94]. Le linézolide est un antibiotique pour lequel les SARM d'origine hospitalière ne sont généralement pas résistants [3]. Plusieurs gènes de virulence ont déjà été retrouvés chez les HA-MRSA et plusieurs de leurs fonctions ont été étudiées (tableau I) [97]. Par contre, les HA-MRSA ne possèdent généralement pas les gènes codant pour les leucocidines de Pantón-Valentín (PVL) [3].

**Tableau I.** Exemples de gènes et de facteurs de virulence retrouvés chez les HA-MRSA.

<b>Facteurs de virulence</b>	<b>Gènes de virulence associés</b>	<b>Références</b>
Superantigènes	<i>tst, sea, sed, seg, sei, sej, sem, sen, seo</i>	[97, 98]
Toxines	<i>eta, etb</i>	[97]

**Tableau I.** Exemples de gènes et de facteurs de virulence retrouvés chez les HA-MRSA (suite).

<b>Facteurs de virulence</b>	<b>Gènes de virulence associés</b>	<b>Références</b>
Biofilm	Locus <i>ica</i>	[97]
Adhésines	<i>clfA, clfB, fib, fnbA, fnbB</i>	[97]

### 2.6.2 SARM d'origine communautaire

Les SARM d'origine communautaire (CA-MRSA pour *Community-Associated MRSA*) ont été décrits pour la première fois dans les années 90 [3, 99, 100]. Les infections causées par ces SARM surviennent sans facteur de risque connu ou de contact avec les hôpitaux [1, 3, 100]. Ils sont en général différents des HA-MRSA d'un point de vue microbiologique, épidémiologique et clinique [1, 45, 101]. Plusieurs groupes d'individus se sont révélés être plus à risque de contracter une infection due au CA-MRSA, soit les prisonniers, les premières nations, les militaires, les enfants et les sportifs [1, 45, 100, 101]. Par exemple, entre 1989 et 1991, une épidémie de CA-MRSA est survenue chez des aborigènes de l'Australie n'ayant jamais fréquenté les hôpitaux [1, 100]. Les SARM d'origine communautaire ont différentes origines à en juger par la diversité des séquences types associées à ces SARM: ST8 (USA300), ST1 (USA400), ST30, ST80 (aussi appelé le clone européen), ST93 ou encore ST59 (appelé le clone du pacifique) [1, 45, 102]. Les clones USA300 et 400 sont les plus rencontrés

aux États-Unis [1, 45, 100]. Ces deux clones sont associés à des cas d'infections graves, mais le clone USA300 est de loin le plus rencontré [1, 100]. Le clone USA300 porte une cassette chromosomale staphylococcique (*SCC<sub>mec</sub>*) de type IV et porte les déterminants génétiques des toxines de Panton-Valentin (opéron *luk-PV*), d'homologues des enterotoxines Q et K (SEQ2 et SEK2) et le locus ACME [1, 100]. En générale, les CA-MRSA portent une *SSC<sub>mec</sub>* de type IV (la majorité) ou V, tous deux réputés plus mobiles que les autres *SCC<sub>mec</sub>* en raison de leur petite taille [1, 3, 45]. Les souches communautaires sont en général plus virulentes que les souches hospitalières [3]. Cette augmentation de virulence serait due à leur capacité d'échapper au système immunitaire [3]. Cette capacité à éviter le système immunitaire peut jusqu'à maintenant s'expliquer par leur capacité à produire les toxines de Panton-Valentine, des modulines solubles dans le phénol (PSM) ou encore l' $\alpha$ -toxine [1, 3, 99, 100]. À l'exception des bêta-lactamines, les CA-MRSA sont généralement peu résistants aux antibiotiques [48, 100, 103, 104].

### **2.6.3 Les SARM d'origine animale**

Depuis 2004, des SARM ont aussi été retrouvés chez les animaux (LA-MRSA pour *Livestock-Associated MRSA*) [105]. Le contact rapproché des humains avec les animaux et l'utilisation d'antibiotiques chez ces derniers semblent être les causes les plus probables de l'émergence de SARM parmi le règne animal [5, 105]. Chez les animaux de compagnie, tels le chat et le chien, des souches d'origine humaine ont surtout été retrouvées [5, 105]. Les souches retrouvées chez ces animaux reflètent celles retrouvées dans la population humaine des régions testées [5]. Par exemple, le clone USA100, une

souche d'origine hospitalière, est commune aux populations humaines et d'animaux de compagnie de l'Amérique du Nord [5]. Le même constat est obtenu, avec différentes souches d'origine hospitalière (EMRSA-15 et -16), dans des pays européens comme le Royaume-Uni [5]. Un constat similaire a aussi été observé chez les chevaux [5].

Par contre, la majorité des SARM retrouvés chez les animaux de consommation semblent avoir évolué indépendamment et ne correspondent pas à des souches hospitalières ou communautaires [5]. Ces souches ont été découvertes à la suite de cas d'infections à SARM chez des Néerlandais ayant été en contact avec des porcs [5, 105]. Suivant ces cas, des recherches supplémentaires furent effectuées [5, 105, 106]. Certains isolats d'origine humaine et d'autres provenant de porc n'ont pu être identifiés par électrophorèse en champ pulsé (PFGE) à l'aide de l'enzyme de restriction *smal*, généralement utilisé pour le typage par PFGE chez *S. aureus* [5]. Le typage par séquençage de locus multiple (MLST; voir section 2.8.2) a permis d'associer ces isolats à la séquence type 398, faisant partie du complexe clonal 398, aujourd'hui le clone de LA-MRSA le plus répandu [5, 107]. D'abord retrouvés chez le porc, les SARM ST398 ont aussi été retrouvés chez des animaux de production comme le bœuf et le poulet [5, 105, 107-110]. Les souches ST398 sont qualifiées peu transmissibles entre les humains et de faible virulence [111]. Quelques études concernant l'écologie évolutive suggèrent que sa transmission interspèce aurait provoqué la diminution de sa capacité de colonisation et de transmission chez l'humain ainsi que sa virulence pour ce dernier [107, 112]. Ceci serait attribuable, entre autres, à la perte de l'IEC [107, 112]. Cependant, des isolats de LA-MRSA ST398 portant l'IEC et le locus ACME ont fait leur apparition dans les dernières années et ceci suggère une réadaptation de ce clone

pour l'humain [38, 40]. La présence de gènes codant pour des entérotoxines, la toxine du choc toxique, et les leucocidines ne semble pas être chose commune chez ce clone [55, 105, 107]. Il a été démontré que ce clone dérive d'un MSSA humain et a acquis la résistance à la méthicilline et à la tétracycline, cette dernière étant une caractéristique des LA-MRSA après son transfert chez les animaux [112]. Ce clone a été retrouvé en Europe, mais aussi en Asie et en Amérique du Nord [15, 105, 113-115] et la section 2.9 décrit de façon détaillée les prévalences et les caractéristiques de tous les SARM retrouvés dans la viande de poulet et dans le poulet à griller. Les LA-MRSA, spécialement ceux appartenant à la séquence type 398, ont déjà été la cause de quelques cas d'infections chez l'humain ayant mené à des pathologies variées: endocardite, pneumonie, otite externe et infections de la peau et des tissus mous [10-12, 116]. Un article paru récemment rapporte le premier cas de décès dû à ce clone [13]. Il s'agit d'un cas de septicémie chez une femme dans la trentaine immunocompromise suite à des traitements aux stéroïdes subséquents à d'autres problèmes de santé [13]. L'analyse moléculaire de l'isolat révèle qu'il portait une cassette *SCCmec* de type V et les toxines de Pantón-Valentin [13].

### **2.6.3.1 Génotype et phénotype de résistance aux antibiotiques des LA-MRSA**

Il existe quatre grands types de résistance conférés par les antibiotiques : la diminution de perméabilité de la paroi, l'hyperexpression d'efflux actif, l'hydrolyse enzymatique et la modification ou la protection de la cible de ce dernier. L'imperméabilité de la bactérie à une drogue hydrophile peut provenir d'une



modification d'une porine, soit par obturation ou diminution de son nombre, empêchant ainsi son entrée dans la cellule et donc l'atteinte de sa cible.

L'hyperexpression d'efflux actif (pompes) permet à la bactérie d'évacuer l'antibiotique hors de la cellule pour maintenir une concentration de l'antibiotique en question inférieure à celle nécessaire pour maintenir son activité.

L'action de certaines enzymes permet l'inactivation de certains antibiotiques. L'exemple le plus connu est sans doute les bêta-lactamases qui clivent le noyau bêta-lactame des bêta-lactamines comme la pénicilline.

La modification ou protection de la cible de l'antibiotique peut se faire de plusieurs façons différentes. La modification de la cible peut être due à une mutation du gène codant pour la cible ou encore à un gène permettant la modification de cette dernière. Comme mentionné précédemment, la PBP2a, produite par le gène *mecA*, est un bon exemple de modification d'une protéine déjà existante. Les modifications peuvent aussi être de simples méthylation de la cible, diminuant l'affinité de l'antibiotique pour cette dernière. Les cibles des antibiotiques peuvent être les ribosomes, des topo-isomérases ou encore l'ARN polymérase. Certains gènes, comme le gène *tet(M)*, code pour une protéine protégeant la cible de l'antibiotique en question.

Plusieurs gènes de résistance aux antibiotiques peuvent se retrouver chez les LA-MRSA, alors que certains sont plus rarement rencontrés chez les staphylocoques: *fexA*, *cfr*, *tet(L)*, *dfrK*, *erm(T)*, *vga(C)*, *vga(E)* et *apmA* (Tableau II). Plusieurs plasmides responsables de la résistance aux antibiotiques ont déjà été décrits chez les LA-MRSA ST398 (Tableau III).

**Tableau II.** Gènes de résistance aux antibiotiques rapportés chez les LA-MRSA ST398.

<b>Antibiotiques</b>	<b>Mécanisme de résistances</b>	<b>Gènes</b>
<b>Pénicillines</b>	Inactivation enzymatique	<i>blaZ, I, R</i>
<b>β-lactamines<sup>a</sup></b>	Modification de la cible (PBP alternative)	<i>mecA</i>
<b>Triméthoprim</b>	Remplacement de la cible (dihydrofolate reductase résistante au triméthoprim)	<i>dfrA (dfrSI), dfrD, dfrG, dfrK</i>
<b>Tétracyclines<sup>b</sup></b>	Activation d'efflux	<i>tet(K), tet(L)</i>
<b>Tétracyclines<sup>c</sup></b>	Protection de la cible (protéine de protection du ribosome)	<i>tet(M)</i>
<b>Macrolides, lincosamides, streptogramine B</b>	Modification de la cible (méthylation de l'ARN ribosomale)	<i>erm(A), erm(B), erm(C), erm(T)</i>
<b>Macrolides, streptogramine B</b>	Activation d'efflux (transporteur ABC)	<i>msr(A)</i>
<b>Streptogramine A (+ lincosamides, pleuromutilines)</b>	Activation d'efflux (transporteur ABC)	<i>vga(A) variants, vga(C), vga(E)</i>
<b>Lincosamides</b>	Inactivation enzymatique (nucléotidylation)	<i>lnu(A)</i>
<b>Phénicoles</b>	Inactivation enzymatique (acétylation)	<i>fexA</i>
<b>Phénicoles, lincosamides, oxazolidinones, pleuromutilines, streptogramine A</b>	Modification de la cible (méthylation de l'ARN ribosomale)	<i>cfr</i>

**Tableau II.** Gènes de résistance aux antibiotiques rapportés chez les LA-MRSA ST398 (suite).

<b>Antibiotiques</b>	<b>Mécanisme de résistances</b>	<b>Gènes</b>
<b>Gentamicine, kanamycine, tobramycine, (amikacine)</b>	<b>Inactivation enzymatique (acétylation et phosphorylation)</b>	<i>aacA-aphD</i>
<b>Kanamycine, neomycine</b>	Inactivation enzymatique (adénylation)	<i>aadD</i>
<b>Kanamycine, neomycine, amikacine</b>	Inactivation enzymatique (phosphorylation)	<i>aphA3</i>
<b>Spectinomycine</b>	Inactivation enzymatique (adénylation)	<i>spc</i>
<b>Apramycine</b>	Inactivation enzymatique (acétylation)	<i>apmA</i>
<b>Mupirocine</b>	Remplacement de la cible (isoleucyl-ARNt insensible à la muciproline)	<i>mupA (ileS-2)</i>

a, excluant les  $\beta$ -lactamines avec une activité anti-SARM; b, excluant la minocycline et les glycylicyclines; c, excluant les glycylicyclines; tableau adapté de Kadlec, 2012 [55].

**Tableau III.** Les plasmides et leurs gènes de résistance aux antibiotiques rapportés chez les LA-MRSA.

<b>Plasmides</b>	<b>Gènes de résistances</b>
<b>pAFS11</b>	<i>apmA</i>
<b>pKKS825</b>	<i>aadD; vga(C); tet(L); dfrK</i>
<b>pCPS32</b>	<i>vga(A)</i>

**Tableau III.** Les plasmides et leurs gènes de résistance aux antibiotiques rapportés chez les LA-MRSA (suite).

Plasmides	Gènes de résistances
<b>pCPS49</b>	<i>vga(C)</i>
<b>pSCFS3</b>	<i>Cfr</i>
<b>pKKS25</b>	<i>erm(T); tet(L); dfrK</i>
<b>pKKS2187</b>	<i>tet(L); dfrK</i>
<b>pSK639</b>	<i>dfrA</i>

Tableau adapté de Pelletier-Jacques, 2012 [117]

De nouveaux plasmides ont été décrits très récemment chez les LA-MRSA ST398, par exemple le pDJ91S, portant un nouveau gène de résistance à la spectinomycine (*spd*) [118]. Une autre étude rapporte la présence de souches contenant un gros plasmide portant des déterminants de résistance contre la tétracycline (*tet(L)*), le triméthoprime (*dfrK*) et les aminoglycosides (*aadD*) [119]. Deux petits plasmides appelés pSWS371 et pSWS372 portant chacun le gène de résistance aux macrolides/lincosamides *erm(C)* ont également été récemment rapportés [119].

Le ST 398 se caractérise par sa résistance aux tétracyclines. En effet, la grande majorité des isolats ST 398 (de 95 à 100%) sont résistants à cet antibiotique. De plus, des résistances envers l'érythromycine, la clindamycine, la gentamicine, les fluoroquinolones, le linéozide, la daptomycine et le triméthoprime ont déjà été

observées dans la littérature [5, 105, 107, 111]. Les ST 398 peuvent donc posséder différents patrons de résistance aux antibiotiques.

## 2.7 Cassette *SCCmec*

La résistance à la méthicilline chez les SARM est portée par le gène *mecA*. Or, ce gène est retrouvé sur un élément génétique mobile unique, plus fréquemment retrouvé chez les staphylocoques, appelé cassette chromosomale staphylococcique (*SCCmec*) [120-122]. Suivant cette découverte, plusieurs types de *SCCmec* furent décrits. Jusqu'à maintenant, onze types de *SCCmec* ont été répertoriés chez *S. aureus* [120, 122]. Malgré leurs différences, ces éléments génétiques mobiles partagent plusieurs caractéristiques communes: un complexe *mec*, un complexe *ccr*, l'insertion au niveau de la portion 3' du gène *orfX* et des séquences répétées inversées à chaque extrémité [120, 122, 123]. Le complexe *mec* comprend le gène *mecA*, ses gènes régulateurs *mecRI* (activateur) et *mecI* (répresseur) et des séquences d'insertion [120, 122]. Ce complexe peut aussi inclure une séquence d'insertion appelée *IS431* [120, 122, 123]. Le complexe *ccr* est composé des gènes *ccr* codant pour des recombinaisons permettant le déplacement de l'élément génétique [120, 122]. Le gène *orfX* code pour une méthyltransférase ribosomale [120, 123]. Les cassettes *SCCmec* sont classifiées en types et sous-types en utilisant deux critères : les types de complexe *ccr* et *mec* [122]. Les jonctions J, trois segments d'ADN situés entre les complexes *mec* et *ccr*, peuvent aussi servir à classer les cassettes [122, 124]. Tout comme les autres éléments génétiques mobiles, les *SCCmec* sont des vecteurs de transfert de la résistance aux

antibiotiques (bêta-lactamines, spectinomycine, érythromycine) et aux métaux lourds (arsenic et mercure) [122]. Ces gènes de résistance peuvent être portés par d'autres éléments génétiques mobiles (plasmides, transposons) intégrés dans la cassette [122].

### 2.7.1 Complexe *ccr*

Jusqu'à maintenant, trois gènes *ccr* ont été identifiés: *ccrA*, *ccrB*, et *ccrC* [120, 122]. Ces trois gènes ont moins de 50 % d'homologie entre eux [120, 122]. Les gènes *ccrA* et *ccrB* ont été sous-catégorisés en allotypes : *ccrA1*, *ccrA2*, *ccrA3*, *ccrA4*, *ccrA5*, *ccrB1*, *ccrB2*, *ccrB3*, *ccrB4* et *ccrB6* [120, 122]. Des gènes appartenant au même allotype ont 85 % d'homologie entre eux [120, 122]. Lorsqu'ils ont entre 60 et 82 % d'homologie, ils sont considérés comme des allotypes différents du même gène [122]. Un seul allotype du gène *ccrC* est connu à ce jour [120, 122]. Jusqu'à maintenant, deux grandes catégories de complexe *ccr* ont été identifiées dans les populations de SARM: la première possédant un allotype du gène *ccrA* et un allotype du gène *ccrB* et la seconde possédant une seule copie du gène *ccrC* [120, 122]. Le tableau IV résume les différents types de complexe *ccr* et leurs types SCC*mec* associés chez *S. aureus*.

**Tableau IV.** Les complexes *ccr* et leurs types SCC*mec* associés chez *S. aureus*.

<b>Complexe</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>Réf.</b>
<b>Gène <i>ccr</i></b>	<i>A1B1</i>	<i>A2B2</i>	<i>A3B3</i>	<i>A4B4</i>	<i>C1</i>	<i>A1B6</i>	<i>A1B3</i>	[120, 122]
<b>SCC<i>mec</i></b>	I	II, IV	III	VI, VII	V, VII	X	XI	[120]

## 2.7.2 Complexe *mec*

Le complexe *mec* peut être divisé en 5 classes distinctes chez *S. aureus*: A, B, C1, C2 et E [120, 122]. Le tableau V résume ces différentes classes ainsi que leur composition. La

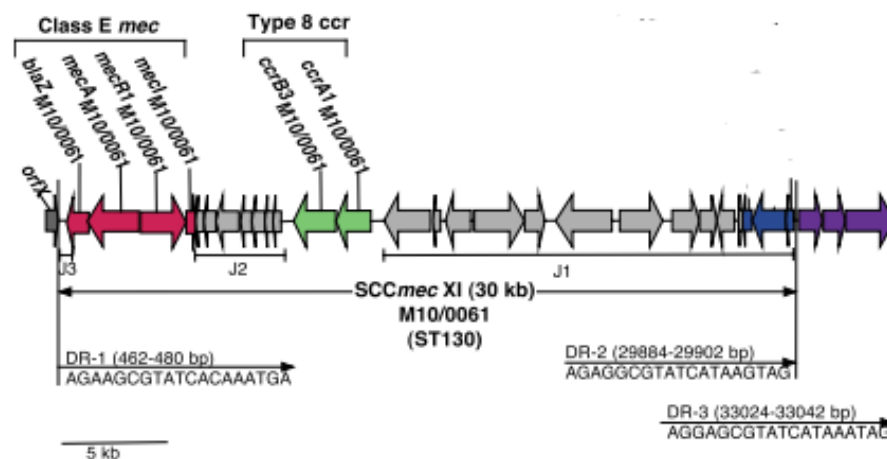
**Tableau V.** Classification des complexes *mec* chez *S. aureus* et leur composition.

Complexe <i>mec</i>	Structures	Classe SCC <i>mec</i>
Classe A	IS431 – <i>mecA</i> – <i>mecR1</i> – <i>mecI</i>	II, III, VIII
Classe B	IS431 – <i>mecA</i> – $\Delta$ <i>mecR1</i> - IS1272	I, IV, VI
Classe C1	IS431 – <i>mecA</i> – $\Delta$ <i>mecR1</i> + IS431 (IS431 dans la même direction)	VII, X
Classe C2	IS431 – <i>mecA</i> – $\Delta$ <i>mecR1</i> + 2 fois IS431	V, IX
Classe E	<i>blaZ</i> – <i>mecC</i> - <i>mecR1</i> - <i>mecI</i>	XI

**Référence :** [120, 122, 125]

classe A est celle contenant tous les éléments normalement retrouvés et est la base de comparaison pour les autres classes [122]. À l'exception des classes A et E, toutes les autres classes possèdent un gène *mecR1* tronqué dû, par exemple, à l'intégration d'une séquence d'insertion (ex : IS431 ou IS1272) [122, 123]. La classe E présente un variant du gène *mecA* appelé à l'origine *mecA*<sub>LGA251</sub> et ensuite renommé *mecC* [86, 123, 126]. Ce gène présente 70 % d'homologie avec *mecA* et code aussi pour une PBP modifiée conférant une résistance à la méthicilline [86]. Découvertes en 2011 lors d'une étude

britannique chez la vache laitière, ces souches de SARM furent rapidement répertoriées chez d'autres espèces animales et chez l'humain [86-88]. Certains isolats d'une banque de souches danoises résistantes à la méthicilline, mais négatives pour *mecA* ont même été reclassés comme SARM suite à la découverte du gène *mecC* [127]. Un de ces isolats datait même des années 70. Par contre, l'incidence des cas semble plus élevée à partir de 2003 [127]. Cette erreur de classement s'explique par le fait que le gène *mecC* est indétectable par une réaction PCR conventionnelle pour la recherche de *mecA*. Ces problèmes ont mené à l'élaboration d'un PCR spécifique au gène *mecC* [128]. Plusieurs variantes des différentes classes du complexe *mec* ont été décrites jusqu'à maintenant [120]. Certains présentent des transposons ou des séquences d'insertion supplémentaires [120]. Pour les différencier, un chiffre placé en indice (ex. classe B<sub>2</sub>) est ajouté à la classe [120]. Un exemple de cassette staphylococcale résumant plusieurs éléments abordés jusqu'à présent est donné en figure 5.



**Figure 5.** Exemple de cassette staphylococcale. (adapté de Shore *et al.*, 2011)



### 2.7.3 Région J ‘‘ joining region’’

Les régions J sont en fait les séquences non essentielles comprises entre les complexes *mec* et *ccr* pouvant contenir des gènes de résistance aux antibiotiques [122, 124]. J1 est définie comme étant la région entre la jonction avec le chromosome et le complexe *ccr*, J2 est la région entre le complexe *ccr* et le complexe *mec*, et J3 est la région entre le complexe *mec* et l’autre jonction du chromosome [122, 124]. On retrouve parfois dans ces régions le transposon Tn554 portant le gène *bla*, une pénicillinase, ainsi que des gènes de résistance à l’érythromycine et à la spectinomycine [45]. Étant de différentes tailles selon la classe, les régions J peuvent permettre de diviser les classes de cassettes en sous-types [120, 122, 124].

### 2.7.4 Nomenclature des cassettes SCC*mec*

On identifie le type de cassette SCC*mec* par un chiffre romain. Chaque classe correspond à un complexe *mec* et *ccr* particulier (voir tableaux IV et V) [122]. Une nouvelle nomenclature a récemment fait son apparition. Il s’agit d’ajouter entre parenthèses le type de complexe *ccr* suivi du type de complexe *mec* [122]. Par exemple, SCC*mec* type II (2A) signifie une cassette de classe II constituée d’un complexe *ccr* de type 2 et un complexe *mec* de classe A. Les sous-types des cassettes SCC*mec* peuvent être indiqués de plusieurs façons différentes [120, 122, 124]. La première façon consiste à ajouter une lettre minuscule (IVa, IVb, etc.) pour signifier une différence de taille pour la région J1 [122]. L’ajout d’une lettre majuscule (IVA, IVB, etc.) indique, en plus de signaler une différence de taille dans la région J1, la présence ou l’absence d’éléments génétiques mobiles dans la cassette [122]. Finalement, l’ajout de chiffres arabes permet

de représenter les différences dans les trois régions J (IV.1.1.1, IV.1.2.1, etc.) [120, 122].

## 2.8 Typage des SARM

Le typage des souches de *S. aureus* ou de SARM peut s'effectuer de plusieurs façons. La biologie moléculaire a permis le développement de plusieurs techniques ciblant différents éléments génétiques. Voici une description des techniques les plus utilisées.

### 2.8.1 Cassette *SCCmec*

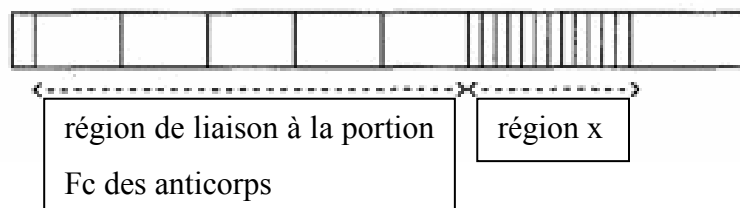
Les cassettes *SCCmec* présentent une grande diversité et représentent donc un moyen intéressant de typer les souches de SARM. Des réactions PCR ont été mises au point afin de classer rapidement les souches selon leurs types et sous-types de cassette *SCCmec* [124, 129-132]. Certaines d'entre elles permettent de classer les cassettes *SCCmec* en ciblant des segments d'ADN uniques à chaque type de cassette comprise dans les complexes *ccr* et *mec* ou encore dans les jonctions 1, 2 et 3 [124, 129, 131]. Utilisant le même principe, d'autres réactions PCR multiplexes permettent d'identifier le type et le sous-type de la cassette *SCCmec* [124, 132]. Il semble que la plupart des réactions PCR développées ciblent surtout les cassettes I à V [124, 129, 132], les plus prédominantes.

## 2.8.2 Séquençage de locus multiple (MLST)

Le MLST est une technique de typage qui nécessite le séquençage de fragments internes ( $\approx 450$  pb) de 7 gènes de ménage différents chez *S. aureus*. Les 7 gènes utilisés codent pour les protéines suivantes : carbamate kinase (*arcC*), shikimate déshydrogénase (*aroE*), glycérol kinase (*glpF*), guanylate kinase (*gmk*), phosphate acétyltransférase (*pta*), triosérophosphate isomérase (*tpi*) et acétyl coenzyme A acétyltransférase (*yqiL*) [81]. Pour chaque gène, la séquence en nucléotides peut légèrement varier. Chaque séquence différente du même gène est considérée comme un allèle du même gène [81]. Comme il y a plusieurs allèles différents pour chaque gène, il est très peu probable que la combinaison des 7 gènes soit identique d'un clone à l'autre [81]. Étant standard, cette technique permet de comparer les résultats provenant de laboratoires différents [81]. Cette technique permet de classer les SARM selon leur séquence type (ST), elle-même comprise dans des ensembles plus complexes appelés complexes clonaux [81, 133].

## 2.8.3 Gène *spa*

Le gène *spa* code pour la protéine A de *S. aureus*. Le typage de ce gène s'effectue un peu comme le MLST où le gène en question est amplifié puis séquencé. La région X de ce gène est constituée de répétition de 24 paires de bases hautement polymorphiques permettant de classer le gène en différents types [134, 135]. Le polymorphisme de la région X réside dans des mutations ponctuelles, des délétions ou des additions de répétitions [134, 135]. La figure 6 représente un schéma du gène *spa* [135].



**Figure 6.** Schéma représentant le gène *spa*.

Cette technique a un pouvoir discriminatoire intermédiaire entre le PFGE et le MLST [134]. Par contre, comparativement à ces deux autres techniques, le typage du gène *spa* permet d'étudier conjointement l'évolution de la bactérie et les épidémies hospitalières de SARM [136].

#### 2.8.4 Électrophorèse en champ pulsé (PFGE)

Le PFGE consiste à digérer l'ADN de la bactérie à l'aide d'enzymes de restriction et à le faire migrer dans un gel d'agarose avec une variation de voltage [134]. On peut ensuite comparer les profils de bandes obtenues entre deux isolats visuellement ou à l'aide de programme informatique et ainsi déterminer leur relation [134]. Chez *S. aureus*, on utilise l'enzyme *SmaI* pour digérer l'ADN de la bactérie [134]. Chez les SARM ST398, cette enzyme est inefficace dû à l'acquisition d'une nouvelle enzyme de méthylation de l'ADN [5, 137-140]. Aujourd'hui, on peut utiliser l'enzyme *Cfr9I*, un schizomère de *SmaI*, pour digérer l'ADN du clone ST398 [141, 142]. Cette technique est assez laborieuse, mais elle demeure la plus discriminatoire chez les SARM ST398 [134]. Cependant, on remarque plusieurs variations entre les laboratoires [134].

## **2.9 Les SARM et la volaille**

On observe dans la littérature de plus en plus de SARM chez les oiseaux [143]. Certains experts vont même jusqu'à pointer les grandes quantités d'antibiotiques qui ont été utilisées dans le passé pour expliquer la montée des SARM chez les animaux de consommation [143]. Un des dangers des SARM chez l'espèce aviaire vient de la manipulation de la viande de volaille par les consommateurs. Aussi, les *S. aureus* et les SARM ont un tropisme pour la peau. Contrairement à bien d'autres animaux de consommation, le poulet est vendu dans bien des cas avec la peau [144]. Les prochaines sections présenteront des données de la littérature sur les prévalences de SARM et leur résistance aux antibiotiques chez la volaille et dans la viande de poulet, et ce, pour différentes régions du globe.

### **2.9.1 Colonisation de poulet à griller par SARM**

#### **2.9.1.1 Études européennes**

Plusieurs études belges se sont penchées sur la détection des SARM chez le poulet [6, 15]. Lors d'une de leurs études, des échantillons ont été prélevés sur 75 poulets à griller où 8 (11,0%) d'entre eux étaient colonisés par SARM [15]. Tous les isolats testés appartenaient au type *spa* t1456, associé au ST398, et étaient résistants à l'érythromycine, la kanamycine, la tobramycine, la lincomycine, la tylosine, la tétracycline et le triméthoprim. Une autre étude belge rapporte la présence de SARM chez des élevages de volaille [6]. Ici, une vingtaine d'oiseaux furent échantillonnés dans chaque ferme incluse dans l'étude (92 fermes). En tout, 4,8 % des fermes échantillonnées élevaient des poulets à griller colonisés par du SARM. Le typage du

gène *spa* regroupe les isolats testés en trois groupes : t011 ( $n = 4$ ), t037 ( $n = 3$ ), t899 ( $n = 1$ ). Les isolats t011 et t899 appartiennent à la séquence type 398 et porte une *SCCmec* de type IV. Les isolats t037, eux, appartiennent à la séquence type 239 et portent une *SCCmec* de type III. Les SARM ST239 sont des clones d'origine hospitalière. Toutes les souches présentaient au moins une résistance pour sept antibiotiques différents. Tous les isolats ST239 étaient résistants à la pénicilline, au céfoxitin, à l'érythromycine, à la tétracycline, à la clindamycine, à la kanamycine, à la rifampicine, au sulfaméthoxazole et à la streptomycine. Tous les isolats ST398 étaient résistants à la pénicilline, au céfoxitin, à l'érythromycine, à la tétracycline, à la clindamycine et au triméthoprime. Chez ce clone, d'autres résistances ont été parfois observées (gentamicine, kanamycine, ciprofloxacine, sulfaméthoxazole, streptomycine, chloramphénicol, acide fusidique, tiamuline, rifampicine et quinupristin/dalfopristine).

Les Pays-Bas est un des pays où la prévalence de SARM est la plus élevée chez les poulets à griller [145]. Une étude menée sur 405 poulets à griller, estime la prévalence de SARM chez ces oiseaux à 6,9% (28 oiseaux) [145]. Le typage du gène *spa* a permis de les classer parmi les groupes suivants: t011, t1430 et t108. Les groupes t011 et t108 correspondaient à la séquence type 398 et t1430 à la séquence type 9. Des résistances envers la clindamycine, la tétracycline, l'érythromycine, la néomycine, la gentamicine, le triméthoprime-sulfas et la ciprofloxacine ont été observées. La présence des toxines de Panton-Valentin n'a pas été détectée chez ces isolats. Étant donné que des LA-MRSA séquences types 398 et 9 ont été rapportées chez les oiseaux et des travailleurs en contact avec ces oiseaux, les chercheurs de l'étude suggèrent une colonisation des oiseaux et une possible transmission de la bactérie à l'humain. Une autre étude rapporte

que 8,0 % des élevages testés (4 sur 50) étaient contaminés par SARM [146]. Le typage du gène *spa* a permis d'associer les isolats testés aux types t011, t018 et t034, tous trois associés à la séquence type 398.

Des analyses ont aussi été effectuées en Suisse pour déterminer la prévalence des SARM chez le poulet [108]. Aucun SARM n'a été isolé des échantillons lors de cette étude alors qu'une autre étude polonaise a permis d'estimer la colonisation par SARM des poulets à 2,9 %. Tous les isolats testés appartenaient à la séquence type 398 et présentaient les patrons de multirésistances aux antibiotiques suivant: tétracycline, clindamycine, gentamicine, érythromycine, ciprofloxacine et norfloxacine [9].

### **2.9.1.2 Études asiatiques**

Une étude effectuée à Hong-Kong, Chine, rapporte que 0,2% (1/660) des poulets testés étaient colonisés par SARM [147]. Le typage de l'unique isolat retrouvé a révélé la présence du type *spa* t899, appartenant à la séquence type 9 et portant une *SCCmec* de type IV. Cet isolat présentait de la multirésistance aux antibiotiques suivants: chloramphénicol, ciprofloxacine, gentamicine, tétracycline, érythromycine et clindamycine. Une étude parue au Japon n'a pas révélé la présence de SARM chez le poulet à griller[8].

## **2.9.2 SARM dans la viande de poulet**

### **2.9.2.1 Études européennes**

Entre mai et décembre 2009, une équipe de recherche allemande a étudié la présence de SARM dans la viande de poulet et de produits transformés à base de poulet provenant de marchés allemands [14]. En tout, 24 échantillons de viande de poulet ont

été testés pour la présence de SARM. Des 24 échantillons de viande, 6 (25,0%) étaient positifs pour la recherche de SARM. Les typages moléculaires des SARM isolés de la viande les classaient dans le complexe clonal 398 *SCCmec V*. Ces isolats présentaient tous des résistances aux bêta-lactamines et à la tétracycline et, selon l'isolat, aux triméthoprimes, macrolides, lincosamides, streptogramine B, gentamicine, kanamycine, apramycine, spectinomycine, tiamulin, et à la quinupristine/dalfopristine. Aucun de ces isolats ne portait de gènes codant pour des entérotoxines ou la toxine de Panton-Valentin. Une étude néerlandaise rapporte aussi la présence de SARM dans la viande de poulet trouvée aux Pays-Bas [148]. Sur 520 échantillons testés, 83 (16,0%) étaient contaminés par du SARM et 75 des 86 échantillons appartenaient au type *spa t11* (55), *t34* (7), *t108* (3), *t779*(1), *t899* (3), *t1255* (1), *t1456* (2), *t3015* (1), *t3119* (1) ou *t4208*(1), tous reliés à la séquence type 398. Les autres SARM appartenaient à des types *spa* reliés à d'autres séquences types: *t2* (2), *t426* (1), *t1430* (5) et l'équipe de chercheurs suggéra qu'il pourrait s'agir d'une contamination humaine, car ces types sont plus souvent rencontrés chez l'homme.

Une étude espagnole rapporte aussi la présence de SARM dans la viande de poulet [149]. Sur 148 échantillons de viande de poulet, 1 (0,68%) échantillon était positif pour la recherche de SARM. Le typage moléculaire de cet isolat le classait comme ST125 *SCCmec IVa* type *spa t067*. De plus, il s'est révélé résistant aux antibiotiques suivants: tobramycine, kanamycine et ciprofloxacine. Les gènes de résistances *ant(4')-Ia* (amikacine, kanamycine, néomycine, tobramycine) et *aph(3')* (amikacine, kanamycine, néomycine) ont été retrouvés. Il s'agit d'un clone d'origine humaine impliqué dans des cas d'infection, suggérant encore une fois une contamination de la viande par l'homme.



Une équipe turque a détecté 18 isolats (30%) de *S. aureus* résistant à la méthicilline parmi 60 échantillons provenant de carcasses et d'abats de poulet prélevés dans des supermarchés de la Turquie [150]. La recherche du gène *mecA* n'a pas été effectuée dans cette étude et les SARM présomptifs n'ont donc pas été confirmés. Une étude récente publiée en Angleterre rapporte la présence de SARM dans la viande de poulet récupérée aux supermarchés dans ce pays [16]. Sur un total de 30 échantillons de viande de poulet, 3 échantillons (10%) contenaient du SARM avec les types *spa* t032 ( $n=2$ ) et t1939 ( $n=1$ ). Le type *spa* t032 appartient au complexe clonal 22 et est associé au clone EMRSA-15, d'origine hospitalière. Le type *spa* t1939 est associé à la séquence type 9, un clone d'origine animale. Les 2 lignées présentaient différents profils de résistance aux antibiotiques où le clone EMRSA-15 présentait des résistances à l'oxacilline, au ciprofloxacine et à l'érythromycine et le clone ST9, lui, présentait des résistances à la pénicilline, à l'oxacilline, à la ciprofloxacine, à l'érythromycine, à la clindamycine et à la tétracycline. L'isolat ST9 portait également une cassette *SCCmec* de type 4 ainsi que plusieurs gènes de résistance (*blaZ*, *mecA*, *erm(B)*, *aad(D)*, et *tet*) ainsi que des gènes codant pour des entérotoxines (G, I, M, N, O, U). Encore une fois, la présence de certains isolats suggère une origine humaine. Il s'agit du premier article rapportant la présence de SARM ST9 dans la viande de poulet au Royaume-Uni. Cependant l'origine de ce clone n'est pas encore élucidée.

Une étude polonaise rapporte aussi la présence de 0,8% de SARM dans la viande de poulet [9]. Après une recherche sur 125 morceaux de viande, la présence de SARM a été observée dans un échantillon (0,8%). Cet isolat possédait une cassette *SCCmec* de type IV associée à une séquence type 398 et un type *spa* t899. Cet isolat présentait aussi

des résistances à l'oxacilline, la pénicilline, le céfoxitin, la tétracycline, la clindamycine, la gentamicine et l'érythromycine. La présence de SARM a aussi été étudiée en Autriche [151]. Sur un total de 50 poulets à griller, aucun SARM n'a été isolé. Par contre, d'autres espèces de staphylocoque (*fleurettii*, *sciuri*, et *vitulinus*) portant le gène *mecA* ont été isolées de 5 (10%) morceaux de viande.

### 2.9.2.2 Études nord-américaines

À ce jour, une seule étude sur la prévalence des SARM de la viande de poulet a été effectuée au Canada [114] et aucun échantillon ne provenait du Québec. Sur 250 échantillons de viande de poulet testés, 3 (1,2%) étaient positifs pour la recherche de SARM. Tous les isolats retrouvés appartenaient au clone épidémique canadien 2 (CMRSA-2), mieux connu sous la nomenclature MRSA 'USA100', un clone d'origine hospitalière. L'équipe n'a pas effectué de MLST sur ces isolats, mais ce clone est généralement associé à la séquence type 5 et à la SCC*mec* II [152]. Le typage *spa* les classe parmi les types t24 et t242. Ce clone est la principale cause d'infection nosocomiale au Canada et l'équipe suppose une contamination potentielle de la viande par l'humain lors de sa préparation.

Plusieurs études du même genre ont été menées aux États-Unis dans les dernières années. Plusieurs d'entre elles ne rapportent aucune présence de SARM dans la viande de poulet retrouvée aux États-Unis (Arizona :  $n = 46$ ; Iowa:  $n = 45$ ; Dakota du Nord:  $n = 37$ ) [153-155]. Par contre, une étude menée dans la région de Détroit démontre que 3,9% (3/76) des échantillons de viande de poulet étaient contaminés par SARM [156]. Les 3 isolats retrouvés appartenaient au ST8 SCC*mec* IVa et au type *spa* t2031 (1) et t008 (2), ce qui les associe au clone USA300. L'isolat t2031 était résistant à la

tétracycline et les deux autres à l'érythromycine. Tous portaient les gènes codant pour les toxines de Panton-Valentin. Une autre étude menée en Oklahoma rapporte la présence de 1,8% (2/114) de SARM dans la viande de poulet [7]. Le typage moléculaire de ces isolats a permis de les classer parmi les clones USA300 et USA500, tous deux considérés comme des SARM communautaires, suggérant une contamination de la viande par l'humain. En plus des résistances envers toutes les bêta-lactamines testées, des résistances envers l'érythromycine, la ciprofloxacine, le triméthoprim/sulfaméthoxazole, la clindamycine et la kanamycine ont été observées. Ces isolats portaient aussi des gènes associés aux toxines de Panton-Valentin.

### **2.9.2.3 Études asiatiques**

Au Japon, une étude sur 444 échantillons de viande de poulet (165 poitrines, 148 ailes, 94 foies, 31 gésiers, 3 cœurs et 3 ovaires) a permis de détecter la présence de SARM dans 2 (0,4%) échantillons provenant de la cuisse d'un poulet et du foie d'un autre poulet [157]. Portant un SCC*mec* de type IV, ces deux isolats présentaient des profils de résistance aux antibiotiques différents. L'un d'eux présentait des résistances pour la benzylpénicilline, l'ampicilline, l'érythromycine, la gentamicine et la kanamycine tandis que l'autre isolat présentait des résistances au benzylpénicilline, à l'ampicilline et au céfazolin. De plus, l'un de ces isolats portait les gènes codant pour l'entérotoxine C et la toxine du choc toxique. Les expérimentations de cette équipe suggèrent qu'il s'agit d'une contamination de la viande par l'humain. Une autre étude japonaise rapporte une prévalence de 4% (4/100) de SARM dans la viande de poulet [8]. Les quatre isolats retrouvés étaient résistants à l'ampicilline, deux (50,0%) au

céfotaxime et à la gentamicine et un (25%) à l'érythromycine. L'équipe suggère également qu'il pourrait s'agir d'une contamination de la viande par l'humain.

Une étude sud-coréenne a permis d'estimer la prévalence de SARM à 0,22%, soit 2 échantillons positifs pour un total de quatre isolats [158]. Ces quatre isolats présentaient des caractéristiques phénotypiques et génotypiques ne permettant pas de les classer comme des SARM à part entière. L'un deux était porteur silencieux du gène *mecA* (smMSSA), ce qui implique qu'il n'exprimait aucune résistance pour la méthicilline ou l'oxacilline. Les trois autres isolats étaient considérés comme des pré-MRSA c'est-à-dire qu'ils portaient un gène *mecI* fonctionnel réprimant la résistance à la méthicilline, mais pouvant l'induire sous une pression sélective avec la méthicilline. L'analyse des cassettes et des séquences types de trois des quatre isolats ont permis de supposer une contamination de la viande via les travailleurs. Une autre étude sud-coréenne rapporte la présence de SARM dans la viande de poulet [159]. En tout, 913 échantillons de viandes de poulet ont été testés pour la présence de SARM et 0,3% (3/913) des échantillons étaient positifs. Ces trois isolats appartenaient à des ST692 avec un SCC*mec* IV. Ces isolats étaient tous résistants aux antibiotiques suivants: clindamycine, ciprofloxacine, tétracycline et érythromycine. De plus, aucun d'entre eux ne portait les gènes de la toxine de Panton-Valentin. L'équipe suggère une contamination de la viande lors de sa manipulation. La présence de 1,2% (33/2660) de SARM ST692 a aussi été observée dans une autre étude sud-coréenne, mais ces derniers portaient un SCC*mec* de type III [160]. Des résistances à la ciprofloxacine, à l'érythromycine, à la tétracycline ainsi qu'à la clindamycine ont été observées conjointement à la détection de différents

gènes de résistances venant confirmer ces résistances (*erm(B)*, *erm(C)*, *tet(L)*, *tet(S)*). La présence des gènes codant pour les toxines de Panton-Valentin a aussi été observée. Une étude chinoise rapporte la présence de 1,7% (20/1152) de SARM dans la viande de poulet [161]. Aucune autre information supplémentaire n'est disponible sur ces isolats. Une étude publiée à Hong-Kong rapporte, elle aussi, la présence de SARM dans la viande de poulet où sur 455 échantillons, 31 (6,8%) étaient positifs [162]. Le typage *spa* a permis de classer 17 de ces isolats parmi le groupe t899, six parmi le groupe t034, deux parmi le groupe t002, cinq parmi le groupe t6383, un parmi le groupe t1234 et deux parmi le groupe t3590. Le groupe t899 correspond au ST9. Les groupes t034 et t3590 correspondent au ST398. Le groupe t002 correspond à ST8. En tout, huit profils de résistance aux antibiotiques différents ont été observés, dont deux présentaient entre neuf et dix résistances, pour les antibiotiques suivants: gentamicine, chloramphénicol, érythromycine, clindamycine, tétracycline, pénicilline, tylosine, quinupristine-dalfopristine, ciprofloxacine et enrofloxacin. D'autres études chinoises rapportent la présence de SARM à des prévalences variant de 0% à 2,3% [163, 164].

### **3. ARTICLE SCIENTIFIQUE**

**Contribution à l'article:**

L'auteur de ce mémoire a effectué toutes les manipulations incluses dans cet article, à l'exception des puces à ADN, du PFGE et de l'étude des plasmides. L'auteur a réalisé les optimisations nécessaires aux techniques effectuées et a également participé activement à toutes les analyses de résultats, à la rédaction de l'article puis à sa révision.

**Prevalence and characteristics of Livestock-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (LA-MRSA) of chicken meat origin from the province of Quebec, Canada**

Jocelyn Bernier-Lachance<sup>1#</sup>, Valentine Usongo<sup>1#</sup>, Éric Parent<sup>1</sup>, Josée Labrie<sup>1</sup>, Julie Arsenault<sup>1,2</sup>, Mario Jacques<sup>1</sup>, François Malouin<sup>3</sup>, and Marie Archambault<sup>1</sup>

# both sharing first authorship

In preparation for PloS One

**Keywords:** Livestock-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (LA-MRSA), chicken meat, poultry, antimicrobial resistance, microarray, virulence genes, resistance genes, biofilm, MLST, SCC*mec* typing, plasmids, Quebec, Canada

<sup>1</sup> Centre de Recherche en Infectiologie Porcine et Aviaire (CRIPA), Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal, Saint-Hyacinthe, Canada, <sup>2</sup>Groupe de recherche en épidémiologie des zoonoses et santé publique (GREZOSP), Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal, Saint-Hyacinthe, Canada, <sup>3</sup>Département de Biologie, Faculté des Sciences, Centre d'Étude et de Valorisation de la Diversité Microbienne (CEVDM), Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Canada



## ABSTRACT

This study was conducted to characterize Livestock-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (LA-MRSA) isolates from retail chicken meat and broiler chickens from the Province of Quebec, Canada. A total of 309 chicken drumsticks and thighs were randomly selected from 43 retail stores between June and October 2013. In addition, nasal swabs and caeca samples were collected from 200 broiler chickens randomly selected from two slaughterhouses representing 38 different flocks between December 2013 and September 2014. LA-MRSA was not detected in broiler chickens but four (1.2%) of the 309 chicken meat samples were found to be LA-MRSA positive. Fifteen LA-MRSA isolates were recovered from these positive samples. Multi Locus Sequence Typing (MLST) and *SCCmec* typing revealed two profiles (ST398-MRSA-V and ST8-MRSA-IVa). Pulse-field gel electrophoresis (PFGE) analysis grouped these isolates into two distinct patterns. Antibiotic resistance was observed towards tetracycline (66%), spectinomycin (66%) and tobramycin (6%) in addition to beta-lactams resistance. Multi-resistance was observed in all MRSA ST398 isolates. Microarrays performed on all isolates confirmed the MLST results and also revealed that both profiles (ST398 and ST8) carried different antibiotic and virulence genes. Southernblot hybridization revealed that the resistance genes *aad(D)*, and *lnu(A)*, encoding resistances to aminoglycosides and lincosamides respectively, were located on plasmid. All isolates were able to produce biofilms and no correlation was observed between *hld* gene expression and biofilm production. In conclusion, our data

demonstrate that the presence of LA-MRSA in poultry in the province of Quebec is low. Our results also show the presence of two separate lineages of MRSA one of which is likely of human origin.

### **Introduction**

Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) is a global threat to public health. The bacteria is responsible for a wide range of diseases from superficial skin infections to life-threatening conditions [1]. MRSA are resistant to all beta-lactam antibiotics because the activity of antibiotic-inhibited penicillin binding proteins (PBPs) is replaced by the function of an acquired PBP (PBP-2a) with low affinity for these drugs. These low affinity proteins are encoded by the *mecA* or *mecC* (a *mecA* homologue) genes located on mobile genetic elements (MGEs) called staphylococcal chromosomal cassettes (*SCCmec*) [2]. Various categories of MRSA have been described based on epidemiological characteristics and these include community-associated MRSA (CA-MRSA), hospital-associated MRSA (HA-MRSA) and livestock-associated MRSA (LA-MRSA) [3]. LA-MRSA refers to MRSA of animal origin such as food producing animals who can serve as reservoirs for infection to humans. Recently a LA-MRSA of sequence type ST398 has emerged in food production animals [4, 5]. Pigs are considered as reservoirs of this MRSA lineage and its high prevalence in pigs has been documented by several reports [6-9]. In addition to pigs, colonization by ST398 has also been reported in poultry [10-12] and cattle [13]. The zoonotic potential of this lineage

has been elucidated by numerous studies which show that farm workers and others working in close contact with pigs are at significant risk for colonization by ST398 [5, 7, 14-16]. Moreover, human infections caused by MRSA ST398 have been reported [17-19].

There is an emergence of LA-MRSA in food producing animals [20]. This phenomenon raises questions regarding food safety. Studies were conducted worldwide to screen broiler chickens and their meat for the presence of LA-MRSA. European surveys from Switzerland [21], Belgium [10], The Netherlands [22], and Poland [23] have observed prevalence in broiler chickens ranging from 0 to 16% depending on the country of origin, whereas studies on chicken retail meat products in The Netherlands [24], Switzerland [21], Germany [25], and Poland [23] reported prevalence between 0% and 37.2%. Most of these LA-MRSA isolates were identified as ST398. These studies also revealed the presence in food of animal origin of other sequence types commonly found in humans. In Hong-Kong, 125 (10.5%) MRSA isolates from 1,190 food samples (pork, chicken, and beef) purchased at retail outlets belonged to ST9 while only one isolate was identified as ST398 [26]. In a Canadian study, MRSA was identified in 3 (1.2%) of 250 chicken meat samples tested [27]. They were classified as Canadian epidemic MRSA-2 (CMRSA-2) also known as USA 100 recognized as the most common cause of hospital-associated MRSA infection in Canada [28]. In Detroit, USA, MRSA was detected in 6 (2%) of 289 retail meat samples (beef, chicken and turkey)

[29]. They were identified as ST8 based on molecular typing and the presence of Panton-Valentine leucocidin [29]. Also in the USA, Pu et al. [30] identified MRSA in only two of 120 samples obtained from various grocery outlets. One of the positive isolate was a PVL positive USA300 isolate associated with CA-MRSA whereas the other was PVL-negative USA100 isolate associated with HA-MRSA in the US [30].

Though these studies clearly show various MRSA STs in retail meat worldwide, none of these studies looked at the ability of MRSA isolates to form biofilms. One major characteristic of *S. aureus* is their ability to form biofilms [31, 32]. Biofilms are adherent communities of bacteria embedded within a complex matrix that protects the bacteria community from environmental and antibiotic stresses [32-34]. Biofilm formation is a multi-stage process that involves several proteins and regulatory systems. These include the microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules (MSCRAMMs) involved in biofilm attachment and the polysaccharide adhesion molecule (PIA) encoded by the *icaABCD* operon [35] involved in biofilm maturation. The *agr* regulatory system plays a role in biofilm dispersal and the activation of this system can be evaluated by measuring *hld*-RNA III expression levels [36]. Genes involved in biofilm formation were recently identified in MRSA isolates of poultry origin though no studies were carried out to evaluate the capacity of these isolates to form biofilms [37].

The current study was conducted to estimate the prevalence of LA-MRSA in retail chicken meat and chicken broilers in Quebec and to characterize these isolates with particular reference to their genotypic, virulence, antimicrobial resistance patterns as well their ability to form biofilms.

## **Materials and methods**

### **Sample collection**

A two-stage sampling method was used for selecting samples from retail stores and slaughterhouses. Every week between June 2013 to November 2013, 43 retail stores located in the Monteregie region in the Province of Quebec were randomly selected from all retail stores listed in a business phone directory (Yellowpages<sup>TM</sup>) and Google Maps websites under the keywords *alimentation* (food), *marché* (market), *supermarché* (supermarket), *boucherie* (butchery), *épicerie* (grocery). Selected stores were visited at least three times and many of them were visited 5 to 6 times to reach the selected number of samples. The sample size for chicken meat was determined to 280 samples based on an expected prevalence of 3%, an accepted error of 2% and a 95% level of confidence. At time of the visit, we collected the first package of fresh chicken drumsticks and/or fresh thighs with skin, available at the front line of the shelf. The retail chicken samples were transported on ice to the laboratory where they were processed immediately.

During the period of March 2014 to December 2014, one (out of two) large slaughterhouse was visited once every two weeks. One or two Quebec broiler chicken lots were selected by the slaughterhouse workers. We asked them to collect five chickens in different cages to limit aggregation effects. The geographical locations of chicken barn providing the chickens to the slaughterhouses were collected. The sample size for broiler chicken was determined to 200 chickens based on an expected prevalence of 2%, an accepted error of 2% and a 95% level of confidence. These broiler chickens were transported live in ventilated cages to the Faculty of Veterinary Medicine, Université de Montréal. They were anesthetized with an intramuscular injection of a combination of ketamine (25 mg/kg) and xylazine (2,5 mg/kg), then euthanized using cervical dislocation and sampled. All chickens were handled according to the ethics guidelines stipulated by the Canadian Council on Animal Care prior to sample collection. For each chicken, a swab of the choana and caecum was carried out totalling 400 swabs. The protocol was approved by the *Université de Montréal* ethic and animal use committee.

### **Bacteria isolation**

MRSA isolation from retail chicken samples was conducted as previously described by Fessler et al [25]. Briefly, 25 g of chicken meat with skin were homogenized for two minutes with a stomacher<sup>®</sup> in 225 mL of Mueller-Hinton supplemented with 6.5% p/v of NaCl and incubated for 16 to 20 hours at 37°C. A volume of 1 mL of this culture was

add to 9 mL of Tryptic Soy Broth (Oxoid, Wessel, Germany) supplemented with 3,5 µg/mL of cefoxitin and 75 µg/mL of aztreonam and incubated 16 to 20 hours at 37°C with agitation for selective enrichment of MRSA. A volume of 10 µL of this culture was inoculated on MRSA select<sup>TM</sup> agar (Bio-Rad, Mississauga, Ontario, Canada) and incubated for 24 hours. Three to four colonies were kept for PCR confirmation. We used the same approach to process the swabs obtained from chicken with slight modifications. Swabs were inoculated in 10 mL of Mueller-Hinton supplemented with 6.5% p/v of NaCl. Colonies were confirmed as MRSA by multiplex polymerase chain reaction (PCR) detection of *nuc* and *mecA* as previously described with slight modifications [38, 39]. Master mixes were at a final concentration of 1X PCR buffer, 0.16 mM dNTPs, 2 mM of MgCl<sub>2</sub>, 0.12 µM of each primer, 1 U of Taq DNA polymerase (GE Healthcare) and 3 µL of DNA template. An isolate was considered as a MRSA if it carried both *nuc* and *mecA*. In addition, PCR for *mecC*, a *mecA* homologue was also carried out as previously described by Cuny *et al* [40] with the following condition: initial denaturation step of 2 min at 95 °C followed by 30 cycles of 94 °C for 30 s, 52 °C for 30s, and 72°C for 30 s, and a final extension at 72 °C for 4 min. Primers sequences used in this study can be found in Table VI.

### **Molecular typing of isolates**

MLST was performed according to the protocol of Enright *et al* [41]. SCC*mec* typing was done according to the method described by Zhang *et al* [42] with some

modifications. Each SCC*mec* type was tested with uniplex PCR instead of multiplex PCR. SCC*mec* types I, II, III, IVd were tested with 25 µL of master mix at a final concentration of 1X PCR buffer, 0.3 mM of each dNTPs, 0.6 mM of MgCl<sub>2</sub> and KCl, 0.8 µM of each primer, 1.5 U of Taq DNA polymerase (GE Healthcare) and 5 µL of DNA template. SCC*mec* types IVa, IVb, IVc, V were tested with 25 µL of master mix at a final concentration of 1X PCR buffer, 0.3 mM of each dNTPs, 0.6 mM of MgCl<sub>2</sub> and KCl, 0.28 µM of each primers, 2.0 U of Taq DNA polymerase and 5 µL of DNA template.

#### **PFGE typing of isolates**

Strain relatedness was analysed by PFGE of total DNA restricted with Cfr9I enzyme (Fermentas Life Sciences, Burlington, ON, Canada) using the protocol of Mulvey *et al* [43] with minor modifications being the choice of restriction enzyme, which in this case was *Cfr9I* instead of *SmaI* (because of the non-typeability of ST398 strains using *SmaI* enzyme due to a restriction/methylation system), and the incubation time of 4 h at 37 °C instead of 2 h at 37 °C.

#### **Antimicrobial susceptibility testing**

Antimicrobial susceptibility tests were performed using the broth microdilution method (plates GPN3F) with the ARIS automatic system of Sensititre™ (Trek™ Diagnostic System Ltd, Cleveland, Ohio, USA) except for fosfomicin, for which the agar dilution



method was used. The minimal inhibitory concentration (MIC) of 32 antimicrobial agents were determined using the interpretation breakpoints of the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) [11, 44]: amoxicillin,  $\geq 0.5 \mu\text{g/mL}$ ; ampicillin,  $\geq 0.5 \mu\text{g/mL}$ ; ceftriaxone,  $\geq 64 \mu\text{g/mL}$ ; clindamycin,  $\geq 4 \mu\text{g/mL}$ ; ciprofloxacin,  $\geq 4 \mu\text{g/mL}$ ; enrofloxacin,  $\geq 4 \mu\text{g/mL}$ ; erythromycin,  $\geq 8 \mu\text{g/mL}$ ; gatifloxacin,  $\geq 2 \mu\text{g/mL}$ ; gentamicin,  $\geq 16 \mu\text{g/mL}$ ; linezolid,  $\geq 8 \mu\text{g/mL}$ ; levofloxacin,  $\geq 4 \mu\text{g/mL}$ ; oxacillin,  $\geq 4 \mu\text{g/mL}$ ; penicillin,  $\geq 0.25 \mu\text{g/mL}$ ; rifampicin,  $\geq 4 \mu\text{g/mL}$ ; streptomycin,  $\geq 1000 \mu\text{g/mL}$ ; tetracycline,  $\geq 16 \mu\text{g/mL}$ ; trimethoprim/sulfamethoxazole,  $\geq 4/76 \mu\text{g/mL}$ ; quinupristin/dalfopristin,  $\geq 4 \mu\text{g/mL}$ ; ceftiofur,  $\geq 8 \mu\text{g/mL}$ ; oxytetracycline,  $\geq 16 \mu\text{g/mL}$ ; sulfathiazole,  $\geq 256 \mu\text{g/mL}$ ; sulfadimethoxime,  $\geq 256 \mu\text{g/mL}$ ; amikacin,  $\geq 64 \mu\text{g/mL}$ ; kanamycin,  $\geq 64 \mu\text{g/mL}$  and vancomycin,  $\geq 32 \mu\text{g/mL}$ . For Daptomycin, the previously published susceptibility breakpoint ( $\geq 2 \mu\text{g/mL}$ ) was used. For florfenicol, neomycin, novobiocin, and spectinomycin the breakpoints were taken from the manufacturer instructions manual. The previously published MIC of  $>128 \mu\text{g/mL}$  [45] was used as a guide for spectinomycin. Fosfomycine resistance ( $> 32 \mu\text{g/mL}$ ) was determined using the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing guidelines (EUCAST) [46]. The *S. aureus* ATCC 29213 was used as quality-control strain for antimicrobial susceptibility testing.

### **DNA microarrays**

Isolates were characterized by using the StaphType© array based on the Array-Tube platform (Alere technologies, Jena, Germany) [47-49]. This array used a set of probes that were able to detect *S. aureus* specific genes, accessory gene regulator (*agr*) alleles, genes coding for virulence factors (toxins, enterotoxins, putative toxins, hemolysins, proteases and biofilm formation molecules) microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules (MSCRAMMs), capsule type-specific genes, antimicrobial resistance genes as well as probes for the discrimination of MLST and *spa* types.

### **Plasmid DNA extraction**

Plasmid DNA was extracted by alkaline lysis using the plasmid midi-Kit (Qiagen) with minor modifications. Cells were grown overnight at 37 °C in tryptic soya broth (TSB) and diluted to an OD<sub>600nm</sub> of 0.01 in prewarmed medium. They were grown to an OD<sub>600nm</sub> of 3 at which time an aliquot of cells was recovered for plasmid extraction. Cells were pelleted by centrifugation and resuspended in buffer P1 supplemented with 100 µl lysostaphin 0.5 mg/ml and the cell suspension was incubated for 1 hr at 37 °C. Subsequent isolation steps were then followed according to the manufacturers recommendations.

### **Southernblot hybridization analysis**

Plasmid DNA was digested with 50 U of Hind III (New England Biolabs) for 1 hr at 37 °C and migrated for 3 h at 45 V in 0.8 % agarose. After migration, the digested plasmids were transferred to positively charged nylon membranes (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) using a vacuum blotter model 785 (Bio-Rad). The membranes were probed with digoxigenin labelled PCR products for the genes *aad(D)*, *lnu(A)*, *spc*, *tet(K)* and *tet(M)* [50] using the PCR DIG probe synthesis kit (Roche Diagnostics) (Table VI). Pre-hybridizations and hybridizations were carried out at 65°C for 30 min and 18 h, respectively, in hybridization buffer with subsequent washings, as recommended by the manufacturer. To detect the presence of digoxigenin-labelled probes, the colorimetric method (NBT/BCIP substrate solution, Roche Applied Science) was used. PCR products were used as hybridization control and control DNA dig-labelled as detection control.

### **Biofilm formation assay**

Biofilm formation was assayed in 96-well microtiter plates as described by Tremblay *et al* [51]. Briefly, isolates were streaked on Brain Heart Infusion (BHI) agar and incubated for 16-h at 35°C. Colonies were harvested and resuspended in BHI broth supplemented with glucose (0.25% w/v) to a 0.5 McFarland standard. A volume of 200 µL of this inoculum was transferred into 3 wells followed by incubation of the microtiter plate at 35°C for 24-h. After 24-h incubation, the growth medium was

aspirated and the planktonic cells were removed by washing the wells thrice with phosphate-buffered saline (PBS). The wells were air dried and then stained with 0.1% (w/v) safranin for 10 min. The wells were washed once with water and air dried at 35°C for 15 min. Safranin was then released with 200  $\mu$ L of destaining solution (50% (v/v) ethanol, 50% (v/v) glacial acetic acid) for 10 min and the amount of stain released was quantified by measuring the absorbance at 490 nm with a microplate reader (Powerwave, Bio-Tek, Instruments). *Staphylococcus epidermidis* ATCC35984 (a high biofilm producer) and ATCC12228 (a weak biofilm producer) were used as controls. Three in house laboratory strains were also tested: USA300 (CA-MRSA ST8-IVa) of human origin, MRSA COL (HA-MRSA) and 100N (LA-MRSA of porcine origin ST398-V).

### **Quantitative Expression of *hld* (qPCR)**

Quantitative expression of *hld* was performed as previously described [52] with minor modifications. Primers sequences can be found in Table 1. Briefly, overnight cultures of MRSA isolates were used to inoculate BHI broth to an OD<sub>600nm</sub> of 0.1. Planktonic cultures were then grown at 35°C until they reach OD<sub>600nm</sub> of 0.4. At this OD, 2.5 ml of the culture was harvested and treated with RNA protect (Qiagen, Mississauga, ON) followed by bacterial lysis with lysostaphin (200  $\mu$ g/ml) for 1 h at 35°C. RNA was then extracted from the lysed bacterial cells using the RNeasy extraction kit (Qiagen). One microgram of total RNA was reversed transcribed with 0.5mM of dNTP, 50 ng of

random hexamers, and 200 U of Invitrogen Superscript II reverse transcriptase [53]. RNA was hydrolyzed and the cDNAs were purified with QIAquick PCR purification kit (Qiagen). The Stratagene MX3000P Real-Time PCR (Stratagene, LaJolla, USA) was used to amplify one  $\mu\text{L}$  of cDNA with a published master mixed [53]. The following conditions were used for the Real-Time PCR reaction: denaturation 10 min at 95°C, followed by 35 cycles of 1 min at 60 °C, 1 min at 72 °C and finally a dissociation ramp from 55 °C to 95 °C. The level of expression of the *hld* gene was calculated with the expression fold ( $2^{-\Delta\text{Ct}}$ ) where  $\Delta\text{Ct}$  is the variation between Ct of each isolate and Ct of reference strain. The  $\Delta\text{Ct}$  of an isolate/reference strain corresponded to the difference between the Ct of the *hld* gene and the Ct of the *gyrB* gene of the same isolate. The *gyrB* gene was found to be constitutively expressed during growth up to early stationary phase and was thus used as a calibrator [54]. The strain 100N (porcine ST398 MRSA) was used as a reference standard for *hld* expression. It is a weak biofilm producer with high expression of *hld* gene.

### **Statistical analysis**

Prevalence with 95% confidence limits of MRSA-positive chicken meat and poultry samples were estimated. Estimates were adjusted for flock (chickens) or retail stores (meat) clustering. For chickens, estimates were also adjusted for sampling probabilities within flocks based on the flock size. In the absence of positive samples, 95% exact confidence limits (Clopper-Pearson) were estimated. For each positive meat or chicken

sample, the biofilm production of biological replicates (averaged over the 3 technical replicates) was compared between isolates using the exact Kruskal-Wallis test [55]. If no difference was observed, one isolate was randomly selected and kept as representative member of the sample. Difference in biofilm production (averaged across the 3 technical replicates) of biological replicates was compared between samples (based on one randomly selected isolate per sample) using the exact Kruskal-Wallis test. If the test was significant ( $p < 0.05$ ), post-hoc Nemenyi pairwise comparison tests were performed ( $\alpha = 0.05$ ). Difference in *hld* gene expression between these samples and reference strains was also evaluated using the same method. Correlation between biofilm production and *hld* gene expression of random isolates selected was evaluated with a Spearman correlation test. All statistical analyses were done in SAS software, version 9.4 (Cary, NC, USA).

## **Results**

### ***MRSA prevalence in chicken meat and broiler chickens***

A total of 309 retail chicken samples (274 drumsticks, 33 thighs and 2 drumsticks and thighs) were collected from 43 retail stores. MRSA was found in four samples out of the 309 retail chicken meat sampled (three drumsticks and one thigh) during this study for a total prevalence of 1.29% (CI 95%: 0.35% - 3.28%). Three to four isolates were kept per positive sample for a total of 15 MRSA isolates. All 4 positive samples were found

during the month of July 2013 and were collected from 4 different retail stores. MRSA was not detected within the 400 nasal and caecal swabs taken from 200 chicken broilers sampled at two slaughterhouses representing 38 farms, giving an estimated prevalence of positive chickens of 0% (CI 95%: 0.00-1.83%) for each type of sample. The geographical location of retail markets and farms that were sampled is illustrated in Figure 7.

### **Molecular typing of retail chicken meat MRSA isolates**

Multi Locus Sequence Typing (MLST) revealed the presence of two different sequence types among the isolates; ST398 ( $n=10$  isolates from three positive meat samples) and ST8 ( $n=5$  isolates from one positive meat sample) (Table VII). *SCC<sub>mec</sub>* typing identified two types of cassettes; V ( $n=10$ ) and IVa ( $n=5$ ). The following combinations were observed: ST398-V ( $n=10$ ) and ST8-IVa ( $n=5$ ). PFGE showed that all the ST398 isolates were non-typeable by PFGE using *SmaI* as a result, all isolates were typeable with PFGE using *Cfr9I*. All isolates were divided into two distinct pattern types: pulse-field type A (classified from A1 to A10; see Figure 8) representing all the ST398 isolates and type B (classified from B1 to B5) representing all the ST8 isolates (Fig. 8). Isolates in each pulse-field type displayed indistinguishable patterns.

### **Antimicrobial resistance phenotypes**

MICs of poultry MRSA isolates ( $n=15$ ) are presented in Table VIII. All isolates were susceptible to gentamicin, neomycin, streptomycin, amikacin, kanamycin, clindamycin, daptomycin, erythromycin, tylosin tartrate, ciprofloxacin, enrofloxacin, gatifloxacin, levofloxacin, florfenicol, linezolid, quinupristin/dalfopristin, rifampicin, novobiocin, trimethoprim/sulfamethoxazole, sulfathiazole, sulfadimethoxime, vancomycin and fosfomycin. Five isolates were resistant only to beta-lactam antibiotics (amoxicillin, ampicillin, oxacillin, penicillin, ceftiofur, and ceftriaxone) and these isolates belonged to ST8 (Table IX). Multidrug resistance, defined as intermediate or complete resistance to three or more classes of antimicrobials, was observed in all ST398 isolates ( $n=10$ ). Nine ST398 isolates were resistant to beta-lactams, tetracyclines and spectinomycin, whereas one isolate was resistant to beta-lactams, tetracyclines, spectinomycin and aminoglycosides (Table IX).

### **Microarray analysis**

To evaluate whether MRSA isolates of poultry origin were carrying virulence and antibiotic resistant genes, all 15 isolates were subjected to microarray analysis (Tables X and XI). This analysis revealed that there were similarities as well as significant differences in the virulence and antimicrobial resistance gene profiles. Overall, ST398 isolates possessed more antimicrobial resistance genes and less virulence determinants whereas ST8 isolates possessed more virulence genes and less antimicrobial resistance genes. The antimicrobial resistance genes carried by these isolates are presented in



Table 5. In addition to the *mecA* gene, ST398 isolates harboured several antibiotic resistance genes responsible for macrolides, lincosamides, tetracyclines, aminoglycosides, and spectinomycin resistances. Table XI summarizes their virulence genotypes. All isolates ( $n=15$ ) were positive for leucocidin toxins (*lukS*, *lukF*, *hlgA*, *lukE*, *lukX*, *lukY*), the superantigen-like genes (*setC* and *setB2*), *hla* and *hld* coding for  $\alpha$  and  $\delta$  hemolysins, genes indicative of capsule type 5, *sarA* as well *icaACD* genes that encode proteins involved in biofilm formation. In addition, all the isolates carried a similar set of genes for the microbial surface components recognizing adhesive molecules (MSCRAMMs) including *clfA* and *clfB* (encoding clumping factor A and B) *fnbA* and *fnbB* (encoding fibronectin proteins), *ebpS* (encoding elastin binding protein) among others. All isolates were negative for exfoliative toxin genes, the toxic shock syndrome toxin 1 *tst* alleles, and the enterotoxin gene cluster *egc*. Differences in the carriage of certain virulence genes were also observed among the isolates. Firstly, there were differences in the carriage of MSCRAMMs genes *cna* and *sasG*. All ST8 isolates were negative for *cna* (encoding collagen-binding protein) and positive for *sasG* (encoding a cell wall anchored surface protein) while ST398 isolates were positive for *cna* and negative for *sasG*. Secondly, all ST8 isolates carried the genes *entK* and *entQ* encoding enterotoxin B and K, the genes *arcA*, *arcB*, *arcC*, *arcD* of the ACME (arginine catabolic mobile element) locus, the genes *sak*, *chp* and *scn* of the immunoevasion cluster (IEC) encoding immune modulation proteins. In contrast, none of these gene families were detected in ST398 isolates. Thirdly, all ST8 isolates were positive

for the Panton-Valentine leukotoxin genes *lukf-PV*, *luks-PV*, *lukD*, and the superantigen-like genes *setB2* and *setB3*.

### **Plasmid and Southernblot hybridization analysis**

Plasmid extraction and analysis revealed that the resistance gene *lnu(A)* was located on a plasmid of approximately 2.2 kb in all ST398 isolates whereas the *aad(D)* gene was located on a plasmid of approximately 4.3 kb in one ST398 isolate (Fig. 9). The *spc*, *tet(K)*, and *tet(M)* genes were not located on plasmid (data not shown).

### **Biofilm formation**

Biofilm formation was quantified in all isolates ( $n=15$ ) using the microtiter plate assay. All isolates were able to form biofilm (Table 10 and supplemental Fig. 12). Because we found that there was no significant statistical difference (all  $p \geq 0.06$ ) between isolates that originated from the same positive sample with regards to biofilm formation (suppl. Fig. 12), four isolates (representative of the four positive samples) were randomly selected for further statistical analysis. Figure 4 shows that all representative isolates were able to form biofilm although to different extent. Biofilm formation was classified as high in isolates E154 and E452b, moderate in E272a and weak in isolate E372. Biofilm formation was classified as weak in all the reference strains tested, except for *S. epidermidis* ATCC 35984, a high biofilm producer (Fig. 10). Biofilm formation was significantly different between isolates ( $p=0.01$ ). However, according to post-hoc test,

no significant statistical difference between biofilm production of MRSA ST398 and ST8 isolates was observed. The molecular characterization, antimicrobial resistance and biofilm formation of retail chicken meat MRSA isolates ( $n=15$ ) of this study are summarized in Table 7.

### ***hld* gene expression**

To evaluate the role of the *agr* system in biofilm formation in retail chicken meat MRSA isolates, we measured the expression of the *hld* gene by quantitative real time PCR using the same isolates (MRSA E154, E452b, E272a and E372) that were used for the biofilm assay. Expression of the *hld* gene in these isolates was compared to expression in strain 100N, an ST398 MRSA strain of porcine origin (Fig. 10). No significant statistical difference ( $p=0.06$ ) in expression of the *hld* gene was seen in the isolates including reference strain and excluding reference strain ( $p=0.78$ ). No correlation was observed between biofilm production and *hld* gene expression (Spearman correlation coefficient=0.2,  $p=0.80$ ).

### **Discussion**

This study was conducted to document the presence of LA-MRSA in broilers and retail chicken meat in the province of Quebec and to characterize the isolates recovered. The LA-MRSA prevalence of 1.3 % in retail chicken meat in this study is similar to findings in Canada [27], the USA [29, 56, 57] and Poland [23]. Our results differ from the higher

prevalence obtained in The Netherlands [24] and Germany [25]. Also, in contrast to studies from Belgium [10, 12], the Netherlands [22] and Poland [23], we did not find LA-MRSA in broilers. Those differences could partly be explained by differences in anatomical sampling sites as well as in enrichment or isolation procedures of MRSA. Also, LA-MRSA has been found in other animal species such as pork and cattle, and it is possible that the high density population of Europe allowed transfer of LA-MRSA between those species.

Several molecular typing methods were used to characterize the LA-MRSA isolates reported in this study. MLST reveal that our isolates belonged to two distinct sequence types: ST398 and ST8. Studies investigating MRSA in retail meat products documented ST398 as the predominant MRSA [24, 58]. ST8 has also been found in retail meat products including chicken as well as pork, beef and turkey [29, 30, 57, 59]. *SCC<sub>mec</sub>* typing reveal that 10 (67%) isolates belonged to *SCC<sub>mec</sub>* type V and this *SCC<sub>mec</sub>* type has been found in retail meat samples worldwide [24-26, 56, 60-62]. The remaining 5 (33%) isolates belonged to *SCC<sub>mec</sub>* type IVa. This type has also been found in retail meat samples in the United States [29, 30, 57]. Even though MLST classified these isolates into two sequence types, it did not provide information on their genetic relatedness. To evaluate the genetic relatedness of isolates between themselves and within a positive meat sample PFGE was performed. PFGE is considered as the “gold standard” for molecular typing of *S. aureus*. It has been demonstrated that the discriminatory power of PFGE is greater than that of MLST [63] and the

standardization of the PFGE protocol has made this technique an important tool for epidemiological investigations [64]. All isolates within each sequence type demonstrated indistinguishable pulse-field pattern type reflecting clonality further confirming the MLST results.

Microarray data reveal that none of MRSA isolates in this study harbour genes encoding exfoliative toxin and toxic shock syndrome toxin 1. These toxins were not identified in MRSA isolates of retail chicken meat in Germany [25] in accordance with our findings. Moreover, these genes have been rarely detected in LA-MRSA ST398 isolates [47-49, 65]. Whereas all the ST8 isolates were positive in the microarray for the *pvl* gene, none of the ST398 isolates were positive for this gene. This is in accordance with studies in the United States that reported the *pvl* gene only in ST8 MRSA isolates [30, 57]. The presence of PVL producing genes is rare in LA-MRSA [25, 65]. Contrary to studies in Hong-Kong [26], none of the isolates carried the *egc* gene cluster (*seg-sei-sem-sen-seo-seu*) encoding staphylococcal enterotoxins. In addition, whereas all the ST8 isolates were positive for genes encoding enterotoxin K and Q, none of the ST398 isolates were positive for these enterotoxins. These genes are rarely detected in ST398 isolates [25, 65].

The antibiotic resistance profile of the LA-MRSA isolates in this study was mainly restricted to the  $\beta$ -lactams, tetracycline, spectinomycin, and aminoglycosides antibiotics. This profile was somewhat similar to findings in Germany [25] but different to findings in Hong-Kong [26]. All the ST398 isolates in this study were resistant to

tetracycline. This is in agreement with ST398 isolates from retail poultry products in Germany whereby 90% of ST398 isolates were resistant to tetracycline [25]. Resistance to tetracycline is commonly associated with ST398 isolates and only few tetracycline susceptible ST398 strains have been recovered [66, 67]. The tetracycline resistance phenotype observed in this study could be explained by the presence of the *tet(K)* and *tet(M)* genes in the microarray. The majority of isolates in this study were resistant to three different classes of antibiotics ( $\beta$ -lactams, tetracycline, and spectinomycin). In addition, one isolate was resistant to four different classes of antibiotics (beta-lactams, tetracycline, spectinomycin, and aminoglycosides). A multi-resistance phenotype was reported in LA-MRSA isolates from retail poultry products in Germany [25] in accordance with our findings. Aminoglycoside resistance was seen in one ST398 isolate and this isolate had a tobramycin MIC of  $\geq 16\mu\text{g/ml}$ . This resistance was conferred by *aad(D)* gene located on plasmid in agreement with previous findings [68]. With the exception of tobramycin, this isolate was sensitive to all the other aminoglycosides tested. This could be explained by the absence of the *aacA-aphD* gene in the microarray. This gene is known to mediate resistance to gentamicin, kanamycin and other related aminoglycosides [69]. The *lnu(A)* gene encoding resistance to lincosamide was detected on plasmid in all ST398 isolates. This is in agreement with previous findings that reported this gene on plasmids [70]. Phenotypic resistance to spectinomycin was observed in all ST398 isolates in this study. This resistance was shown to be conferred by the *spc* gene detected by PCR. Analysis of whole genome

sequence data from a spectinomycin resistance isolate (E154) indicated that the *spc* gene was linked to *erm(A)* (Usongo *et al*, unpublished). This was also observed with MRSA ST398 isolates from retail chicken products in Germany [25]. In this study, despite the carriage of the *erm(A)* gene, all the ST398 isolates were susceptible to erythromycin. This susceptibility to erythromycin could not be explained by the absence of the *msr(A)* gene (encoding macrolide efflux protein) in the microarray. Also, the absence of *msr(A)* gene in ST398 isolates from retail poultry products in Germany had no effect on susceptibility where these isolates were all resistant to erythromycin [25]. The *fos(B)* gene encoding resistance to fosfomycin was detected only in ST8 isolates. This is in accordance with a Belgian study that reported this gene only in non ST398 isolates [71]. Despite the presence of this gene, all the ST8 were susceptible to fosfomycin. Resistance to fosfomycin has mostly been reported in clinical settings owing to the high usage of this antibiotic in human medicine [72]. In staphylococci, *fos(B)* is the only gene known so far to confer resistance to fosfomycin [73, 74]. Resistance is achieved by the enzymatic modification of fosfomycin. Mutations in genes encoding these enzymes could result in fosfomycin susceptibility [75]. Interestingly, the *qac(C)* gene encoding resistance to antiseptics and disinfectants was detected in the ST398 isolates.

The microtiter plate assay for biofilm formation revealed that all the ST398 isolates demonstrated weak to high biofilm formation whereas the ST8 isolates demonstrated high biofilm formation. To our knowledge, this is the first report on biofilm formation

in poultry MRSA isolates. Nicholson et al. (2013) reported that swine LA-MRSA isolates of ST398, ST9 and ST5 and human clinical isolates formed similar biofilms using the microtiter plate assay [76]. However, in their study, the experimental conditions were slightly different and moreover, the strains used were of swine origin as opposed to poultry.

The relationship between *hld* gene expression and biofilm formation has been demonstrated. The *hld* gene plays a crucial role in biofilm dissemination and maintenance [77]. This relationship was recently evaluated by Veh et al. (2015). These authors found that in some strains of *S. aureus* from bovine mastitis, high *hld* expression did not lead to biofilm disruption [78]. In agreement with these authors, Spearman correlation test enabled us to conclude that there was no correlation between *hld* gene expression and biofilm production in our isolates (data not shown). Most of the genes encoding MSCRAMM and the *icaADBC* operon that were recently identified in chicken isolates of MRSA ST398 were identified with the microarray. The presence of these genes suggests that these MRSA isolates have a good genetic capacity for adhesion to the extracellular matrix of the host and also for intercellular adhesion involved in biofilm formation. This likely favors colonization, persistence and zoonotic potential.

In this study, the absence of LA-MRSA from broilers was somewhat surprising. This is unlikely due to the anatomical site chosen, as supported by Belgian study reporting that MRSA was isolated most frequently from nares and cloacae [79]. Moreover, the double



enrichment procedure used in this study has been demonstrated to amplify MRSA recovery [24, 80], and no statistical difference was observed using either the single or double enrichment procedure for the isolation of MRSA from poultry [81]. The identification of ST8, a human associated sequence type predominant in CA-MRSA [82] suggested possible contamination of retail chicken meat during processing or packaging as proposed previously [29, 30]. This mode of contamination can occur in slaughterhouses [24] and can serve as a source of contamination during packaging in retail outlets. However, because ST398 has previously been reported in broilers [10], and ST8 reported in live swine [7, 14, 83], slaughterhouse and food processing personnel may not necessarily be responsible for the presence of these strains in retail chicken meat. It is reasonable to hypothesize that ST8 could be present in broilers. Interestingly, ST5 was recently reported as a poultry adapted clone that originated from humans [84]. Whether this is the case for ST8 will require additional research.

In conclusion, these results show that MRSA isolates from retail chicken meat possess genes encoding antibiotic resistance and virulence factors. In addition, the ability of these MRSA isolates to form biofilm could lead to colonization and persistence of these strains within the retail meat processing environment and this could enhance their zoonotic potential. While the role of retail meat as a vehicle of transmission of MRSA is still unknown and debateable, the fact that potential virulent strains were isolated from retail meat implies that this mode of transmission requires serious attention.

### **Acknowledgements**

The work was financially supported in part by the Natural Sciences and Engineering Research Council (NSERC) of Canada (M. Archambault, RGPIN-191461; F. Malouin RGPIN-89758-2010; and M. Jacques (RGPIN-003428). M. Archambault and F. Malouin were supported by the Programme de Soutien à l'Innovation (PSI) of the Ministère de l'Agriculture et des Pêcheries et de l'Alimentation du Québec (MAPAQ). The 'Centre de Recherche en Infectiologie Porcine et Aviaire' (CRIPA) (FQRNT Regroupements stratégiques 111946) is also gratefully acknowledged. We would like to thank Claudia Duquette for technical assistance.

## References

1. Kehrenberg, C., et al., *Methicillin-resistant and -susceptible Staphylococcus aureus strains of clonal lineages ST398 and ST9 from swine carry the multidrug resistance gene cfr*. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 2009. **53**(2): p. 779-81.
2. Paterson, G.K., E.M. Harrison, and M.A. Holmes, *The emergence of mecC methicillin-resistant Staphylococcus aureus*. *Trends in Microbiology*, 2014. **22**(1): p. 42-7.
3. Crombe, F., et al., *Transmission Dynamics of Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus in Pigs*. *Frontiers in Microbiology*, 2013. **4**: p. 57.
4. Weese, J.S. and E. van Duijkeren, *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus and Staphylococcus pseudintermedius in veterinary medicine*. *Veterinary Microbiology*, 2010. **140**(3-4): p. 418-29.
5. Vanderhaeghen, W., et al., *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) in food production animals*. *Epidemiology and Infection*, 2010. **138**(5): p. 606-25.
6. de Neeling, A.J., et al., *High prevalence of methicillin resistant Staphylococcus aureus in pigs*. *Veterinary Microbiology*, 2007. **122**(3-4): p. 366-72.
7. Khanna, T., et al., *Methicillin resistant Staphylococcus aureus colonization in pigs and pig farmers*. *Veterinary Microbiology*, 2008. **128**(3-4): p. 298-303.

8. van Duijkeren, E., et al., *Transmission of methicillin-resistant Staphylococcus aureus strains between different kinds of pig farms*. Veterinary Microbiology, 2008. **126**(4): p. 383-9.
9. Smith, T.C., et al., *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) strain ST398 is present in midwestern U.S. swine and swine workers*. PLoS One, 2009. **4**(1): p. e4258.
10. Persoons, D., et al., *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus in poultry*. Emerging Infectious Diseases, 2009. **15**(3): p. 452-3.
11. Verheghe, M., et al., *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) ST398 in pig farms and multispecies farms*. Zoonoses and Public Health, 2013. **60**(5): p. 366-74.
12. Nemati, M., et al., *Antimicrobial resistance of old and recent Staphylococcus aureus isolates from poultry: first detection of livestock-associated methicillin-resistant strain ST398*. Antimicrobial Agents Chemotherapy, 2008. **52**(10): p. 3817-9.
13. Hasman, H., et al., *Spa type distribution in Staphylococcus aureus originating from pigs, cattle and poultry*. Veterinary Microbiology, 2010. **141**(3-4): p. 326-31.
14. Dressler, A.E., et al., *Prevalence, antibiotic resistance and molecular characterisation of Staphylococcus aureus in pigs at agricultural fairs in the USA*. Veterinary Record, 2012. **170**(19): p. 495.

15. Garcia-Graells, C., et al., *Livestock veterinarians at high risk of acquiring methicillin-resistant Staphylococcus aureus ST398*. *Epidemiology and Infection*, 2012. **140**(3): p. 383-9.
16. Lewis, H.C., et al., *Pigs as source of methicillin-resistant Staphylococcus aureus CC398 infections in humans, Denmark*. *Emerging Infectious Diseases*, 2008. **14**(9): p. 1383-9.
17. Smith, T.C. and N. Pearson, *The emergence of Staphylococcus aureus ST398*. *Vector Borne and Zoonotic Diseases*, 2011. **11**(4): p. 327-39.
18. Rasigade, J.P., et al., *Lethal necrotizing pneumonia caused by an ST398 Staphylococcus aureus strain*. *Emerging Infectious Diseases*, 2010. **16**(8): p. 1330.
19. Ekkelenkamp, M.B., et al., *Endocarditis due to methicillin-resistant Staphylococcus aureus originating from pigs*. *Nederlands Tijdschrift voor Geneeskunde*, 2006. **150**(44): p. 2442-7.
20. Wulf, M. and A. Voss, *MRSA in livestock animals-an epidemic waiting to happen?* *Clinical Microbiology and Infection*, 2008. **14**(6): p. 519-21.
21. Huber, H., et al., *Prevalence and characteristics of methicillin-resistant Staphylococcus aureus in humans in contact with farm animals, in livestock, and in food of animal origin, Switzerland, 2009*. *EuroSurveillance*, 2010. **15**(6): p. pii: 19542.

22. Mulders, M.N., et al., *Prevalence of livestock-associated MRSA in broiler flocks and risk factors for slaughterhouse personnel in The Netherlands*. *Epidemiology and Infection*, 2010. **138**(5): p. 743-55.
23. Krupa, P., et al., *Genotypes and oxacillin resistance of Staphylococcus aureus from chicken and chicken meat in Poland*. *Poultry Science*, 2014. **93**(12): p. 3179-86.
24. de Boer, E., et al., *Prevalence of methicillin-resistant Staphylococcus aureus in meat*. *International Journal of Food Microbiology*, 2009. **134**(1-2): p. 52-6.
25. Fessler, A.T., et al., *Characterization of methicillin-resistant Staphylococcus aureus isolates from food and food products of poultry origin in Germany*. *Applied Environmental Microbiology*, 2011. **77**(20): p. 7151-7.
26. Boost, M.V., et al., *Isolation of methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) from retail meats in Hong Kong*. *Foodborne Pathogens and Diseases*, 2013. **10**(8): p. 705-10.
27. Weese, J.S., B.P. Avery, and R.J. Reid-Smith, *Detection and quantification of methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) clones in retail meat products*. *Letters in Applied Microbiology*, 2010. **51**(3): p. 338-42.
28. Christianson, S., et al., *Comparative genomics of Canadian epidemic lineages of methicillin-resistant Staphylococcus aureus*. *Journal of Clinical Microbiology*, 2007. **45**(6): p. 1904-11.

29. Bhargava, K., et al., *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus in retail meat, Detroit, Michigan, USA*. *Emerging Infectious Diseases*, 2011. **17**(6): p. 1135-7.
30. Pu, S., F. Han, and B. Ge, *Isolation and characterization of methicillin-resistant Staphylococcus aureus strains from Louisiana retail meats*. *Applied Environmental Microbiology*, 2009. **75**(1): p. 265-7.
31. Otto, M., *Staphylococcal biofilms*. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 2008. **322**: p. 207-28.
32. Jacques, M., V. Aragon, and Y.D. Tremblay, *Biofilm formation in bacterial pathogens of veterinary importance*. *Animal Health Research Reviews*, 2010. **11**(2): p. 97-121.
33. Davey, M.E. and A. O'Toole G, *Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2000. **64**(4): p. 847-67.
34. Stoodley, P., et al., *Biofilms as complex differentiated communities*. *Annual Review of Microbiology*, 2002. **56**: p. 187-209.
35. O'Neill, E., et al., *Association between methicillin susceptibility and biofilm regulation in Staphylococcus aureus isolates from device-related infections*. *Journal of Clinical Microbiology*, 2007. **45**(5): p. 1379-88.
36. Novick, R.P., *Autoinduction and signal transduction in the regulation of staphylococcal virulence*. *Molecular Microbiology*, 2003. **48**(6): p. 1429-49.

37. Nemati, M., et al., *Screening of genes encoding adhesion factors and biofilm formation in Staphylococcus aureus isolates from poultry*. Avian Pathology, 2009. **38**(6): p. 513-7.
38. Mehrotra, M., G. Wang, and W.M. Johnson, *Multiplex PCR for detection of genes for Staphylococcus aureus enterotoxins, exfoliative toxins, toxic shock syndrome toxin 1, and methicillin resistance*. Journal of Clinical Microbiology, 2000. **38**(3): p. 1032-5.
39. Barski, P., et al., *Rapid assay for detection of methicillin-resistant Staphylococcus aureus using multiplex PCR*. Molecular and cellular probes, 1996. **10**(6): p. 471-475.
40. Cuny, C., et al., *Rare occurrence of methicillin-resistant Staphylococcus aureus CC130 with a novel mecA homologue in humans in Germany*. PLoS One, 2011. **6**(9): p. e24360.
41. Enright, M.C., et al., *Multilocus sequence typing for characterization of methicillin-resistant and methicillin-susceptible clones of Staphylococcus aureus*. Journal of Clinical Microbiology, 2000. **38**(3): p. 1008-15.
42. Zhang, K., et al., *Novel multiplex PCR assay for characterization and concomitant subtyping of staphylococcal cassette chromosome mec types I to V in methicillin-resistant Staphylococcus aureus*. Journal of Clinical Microbiology, 2005. **43**(10): p. 5026-33.



43. Mulvey, M.R., et al., *Development of a Canadian standardized protocol for subtyping methicillin-resistant Staphylococcus aureus using pulsed-field gel electrophoresis*. Journal of Clinical Microbiology, 2001. **39**(10): p. 3481-5.
44. Moore, D.J., et al., *Methods for studying naturally occurring human pain and their analogues*. Pain, 2013. **154**(2): p. 190-9.
45. Overesch, G., et al., *The increase of methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) and the presence of an unusual sequence type ST49 in slaughter pigs in Switzerland*. BMC Veterinary Research, 2011. **7**: p. 30.
46. EUCAST, *EUCAST Clinical Breakpoint Table v. 5.0*. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, 2013.
47. Monecke, S., et al., *DNA microarray-based genotyping of methicillin-resistant Staphylococcus aureus strains from Eastern Saxony*. Clinical Microbiology and Infection, 2008. **14**(6): p. 534-45.
48. Monecke, S., et al., *Microarray based study on virulence-associated genes and resistance determinants of Staphylococcus aureus isolates from cattle*. Veterinary Microbiology, 2007. **125**(1-2): p. 128-40.
49. Fessler, A., et al., *Characterization of methicillin-resistant Staphylococcus aureus ST398 from cases of bovine mastitis*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2010. **65**(4): p. 619-25.

50. Lina, G., et al., *Distribution of genes encoding resistance to macrolides, lincosamides, and streptogramins among staphylococci*. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 1999. **43**(5): p. 1062-6.
51. Tremblay, Y.D., et al., *Characterization of the ability of coagulase-negative staphylococci isolated from the milk of Canadian farms to form biofilms*. *Journal of Dairy Science*, 2013. **96**(1): p. 234-46.
52. Veh, K.A., et al., *Genotypic and phenotypic characterization of Staphylococcus aureus causing persistent and nonpersistent subclinical bovine intramammary infections during lactation or the dry period*. *Journal of Dairy Science*, 2015. **98**(1): p. 155-68.
53. Allard, M., et al., *Transcriptional modulation of some Staphylococcus aureus iron-regulated genes during growth in vitro and in a tissue cage model in vivo*. *Microbes and Infection*, 2006. **8**(7): p. 1679-90.
54. Goerke, C., et al., *Direct Quantitative Transcript Analysis of the agr Regulon of Staphylococcus aureus during Human Infection in Comparison to the Expression Profile In Vitro*. *Infection and immunity*, 2000. **68**(3): p. 1304-1311.
55. AC, E. and H. LS, *A SAS Macro implementation of a Multiple Comparison post hoc test for a Kruskal-Wallis analysis*. *Computer Methods and Programs in Biomedicine*, 2011. **102**: p. 75-80.

56. Buyukcangaz, E., et al., *Molecular typing of Staphylococcus aureus and methicillin-resistant S. aureus (MRSA) isolated from animals and retail meat in North Dakota, United States*. Foodborne Pathogens and Diseases, 2013. **10**(7): p. 608-17.
57. Hanson, B.M., et al., *Prevalence of Staphylococcus aureus and methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) on retail meat in Iowa*. Journal of Infection and Public Health, 2011. **4**(4): p. 169-74.
58. Weese, J.S., et al., *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) contamination of retail pork*. Canadian Veterinary Journal, 2010. **51**(7): p. 749-52.
59. Waters, A.E., et al., *Multidrug-Resistant Staphylococcus aureus in US Meat and Poultry*. Clinical Infectious Diseases, 2011. **52**(10): p. 1227-30.
60. Agnoletti, F., et al., *First reporting of methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) ST398 in an industrial rabbit holding and in farm-related people*. Veterinary Microbiology, 2014. **170**(1): p. 172-177.
61. Benito, D., et al., *Genetic Lineages, Antimicrobial Resistance, and Virulence in Staphylococcus aureus of Meat Samples in Spain: Analysis of Immune Evasion Cluster (IEC) Genes*. Foodborne Pathogens and Disease, 2014. **11**(5): p. 354-356.
62. O'Brien, A.M., et al., *MRSA in conventional and alternative retail pork products*. PLoS One, 2012. **7**(1): p. e30092.

63. Malachowa, N., et al., *Comparison of multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis with pulsed-field gel electrophoresis, spa typing, and multilocus sequence typing for clonal characterization of Staphylococcus aureus isolates.* Journal of Clinical Microbiology, 2005. **43**(7): p. 3095-100.
64. Strommenger, B., et al., *Assignment of Staphylococcus isolates to groups by spa typing, SmaI macrorestriction analysis, and multilocus sequence typing.* Journal of Clinical Microbiology, 2006. **44**(7): p. 2533-40.
65. Kadlec, K., et al., *Diversity of antimicrobial resistance pheno- and genotypes of methicillin-resistant Staphylococcus aureus ST398 from diseased swine.* Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2009. **64**(6): p. 1156-64.
66. Davies, P.R., E.A. Wagstrom, and J.B. Bender, *Lethal necrotizing pneumonia caused by an ST398 Staphylococcus aureus strain.* Emerging Infectious Diseases, 2011. **17**(6): p. 1152-3; author reply 1153.
67. Zarfel, G., et al., *Virulence and antimicrobial resistance genes in human MRSA ST398 isolates in Austria.* Epidemiology and Infection, 2013. **141**(4): p. 888-92.
68. Jensen, S.O. and B.R. Lyon, *Genetics of antimicrobial resistance in Staphylococcus aureus.* Future Microbiology, 2009. **4**(5): p. 565-82.
69. Rouch, D.A., et al., *The aacA-aphD gentamicin and kanamycin resistance determinant of Tn4001 from Staphylococcus aureus: expression and nucleotide sequence analysis.* Journal of General Microbiology, 1987. **133**(11): p. 3039-52.

70. Luthje, P., M. von Kockritz-Blickwede, and S. Schwarz, *Identification and characterization of nine novel types of small staphylococcal plasmids carrying the lincosamide nucleotidyltransferase gene lnu(A)*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2007. **59**(4): p. 600-6.
71. Nemeghaire, S., et al., *Epidemiology and molecular characterization of methicillin-resistant Staphylococcus aureus nasal carriage isolates from bovines*. BMC Veterinary Research, 2014. **10**: p. 153.
72. Karageorgopoulos, D.E., et al., *Fosfomycin: evaluation of the published evidence on the emergence of antimicrobial resistance in Gram-negative pathogens*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2012. **67**(2): p. 255-68.
73. Rigsby, R.E., et al., *Fosfomycin resistance proteins: a nexus of glutathione transferases and epoxide hydrolases in a metalloenzyme superfamily*. Methods in Enzymology, 2005. **401**: p. 367-79.
74. Etienne, J., et al., *Characterization of staphylococcal plasmids hybridizing with the fosfomycin resistance gene fosB*. FEMS Microbiology Letters, 1991. **68**(1): p. 119-22.
75. Roberts, A.A., et al., *Mechanistic studies of FosB: a divalent-metal-dependent bacillithiol-S-transferase that mediates fosfomycin resistance in Staphylococcus aureus*. Biochemical Journal, 2013. **451**(1): p. 69-79.

76. Nicholson, T.L., et al., *Livestock-associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus (LA-MRSA) isolates of swine origin form robust biofilms*. PLoS One, 2013. **8**(8): p. e73376.
77. Periasamy, S., et al., *How Staphylococcus aureus biofilms develop their characteristic structure*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2012. **109**(4): p. 1281-6.
78. Veh, K., et al., *Genotypic and phenotypic characterization of Staphylococcus aureus causing persistent and nonpersistent subclinical bovine intramammary infections during lactation or the dry period*. Journal of Dairy Science, 2015. **98**(1): p. 155-168.
79. Pletinckx, L.J., et al., *Screening of poultry-pig farms for methicillin-resistant Staphylococcus aureus: sampling methodology and within herd prevalence in broiler flocks and pigs*. Infection, Genetics and Evolution, 2011. **11**(8): p. 2133-7.
80. van Loo, I.H., et al., *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus in meat products, the Netherlands*. Emerging Infectious Diseases, 2007. **13**(11): p. 1753-5.
81. Nemeghaire, S., et al., *Characterization of methicillin-resistant Staphylococcus aureus from healthy carrier chickens*. Avian Pathology, 2013. **42**(4): p. 342-6.

82. Gonzalez, B.E., et al., *Community-associated strains of methicillin-resistant Staphylococcus aureus as the cause of healthcare-associated infection*. Infection Control and Hospital Epidemiology, 2006. **27**(10): p. 1051-6.
83. Osadebe, L.U., et al., *Prevalence and characteristics of Staphylococcus aureus in Connecticut swine and swine farmers*. Zoonoses and Public Health, 2013. **60**(3): p. 234-43.
84. Lowder, B.V., et al., *Recent human-to-poultry host jump, adaptation, and pandemic spread of Staphylococcus aureus*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2009. **106**(46): p. 19545-50.

**Table VI.** Primers sequences used in this study

Gene	Oligonucleotide primer (5'-3')	PCR product (bp)	Reference
PCR			
<i>mecA</i> -F	ACTGCTATCCACCCTCAAAC	163	[38]
<i>mecA</i> -R	CTGGTGAAGTTGTAATCTGG		
<i>nuc</i> -F	GCGATTGATGGTGATACGGTT	267	[86]
<i>nuc</i> -R	AGC CAA GCC TTG ACG AAC TAA AGC		
<i>mecC</i> -F	GCTCCTAATGCTAATGCA	304	[40]
<i>mecC</i> -R	TAAGCAATAATGACTACC		
<i>spc</i> -F	AATGGTGGTTTACGCATTAACAGCG	450	[87]
<i>spc</i> -R	ATTCTGCAGCGACATCTTTCGAGG		
qPCR			
<i>gyrB</i> -F	GGTGCTGGGCAAATACAAGT	N/A	[54]
<i>gyrB</i> -R	TCCCACACTAAATGGTGCAA		
<i>hld</i> -F	TAATTAAGGAAGGAGTGATTCAATG	N/A	[54]
<i>hld</i> -R	TTTTTAGTGAATTTGTTCACTGTGTC		
Southernblot hybridization			
<i>aadD</i> -F	GGAAGTGAATTTTGATAGCG	438	[88]
<i>aadD</i> -R	CTCAGAGTCGGAAAGTTGAC		
<i>lnuA</i> -F	GGTGGCTGGGGGTAGATGTATTAAGTGG	323	[51]
<i>lnuA</i> -R	GCTTCTTTTCAAATACATGGTATTTTTCGATC		
<i>tet</i> (K)-F	GATCAATTGTAGCTTTAGGTGAAGG	155	[89]
<i>tet</i> (K)-R	TTTGTGATTTACCAGGTACCATT		
<i>tet</i> (M)-F	TGGTGGAAATGATAGCCCATT	406	[89]
<i>tet</i> (M)-R	CAGGAATGACAGCACGCTAA		



**Table VII.** Molecular profil, antimicrobial resistance and biofilm formation of retail chicken meat MRSA isolates ( $n=15$ )<sup>a</sup>.

MLST and SCCmec <sup>b</sup>	MRSA isolate number	Biofilm formation <sup>c</sup>	Antibiotic resistance phenotype <sup>d</sup>	Antibiotic resistance genotype <sup>f</sup>	PFGE profil <sup>g</sup>
ST398-V	E3721, E3722, E3723, E3724	Weak	TET, OXY, SPE	<i>mecA</i> , <i>blaZ</i> , <i>erm(A)</i> , <i>tet(M)</i> , <i>tet(K)</i> , <i>lin(A)</i> , <i>qacC</i> , <i>spc</i>	A
	E272a1, E272a3, E272a4, E272a5	High	TET, OXY, SPE	<i>mecA</i> , <i>blaZ</i> , <i>erm(A)</i> , <i>tet(M)</i> , <i>tet(K)</i> , <i>lin(A)</i> , <i>qacC</i> , <i>spc</i>	A
	E272a2,	moderate	TET, OXY, SPE	<i>mecA</i> , <i>blaZ</i> , <i>erm(A)</i> , <i>tet(M)</i> , <i>tet(K)</i> , <i>lin(A)</i> , <i>qacC</i> , <i>spc</i>	A
	E154	High	TET, OXY, SPE	<i>mecA</i> , <i>blaZ</i> , <i>erm(A)</i> , <i>tet(M)</i> , <i>tet(K)</i> , <i>lin(A)</i> , <i>qacC</i> , <i>spc aad(D)</i>	A
ST8-IVa	E452b1, E452b2, E452b3, E452b4, E452b5	High	-	<i>mecA</i> , <i>blaZ</i> , <i>fosB</i>	B

<sup>a</sup> StaphyType array (Alere technologies, Germany)

<sup>b</sup> Microarray identifies an overall hybridization pattern that is in accordance to a CC or ST and carries probes for the discrimination of selected SCCmec types.

<sup>c</sup> Refer to the biofilm formation assay of this study

<sup>d</sup> Other than resistance to beta-lactams; CLI, clindamycin; DPT, daptomycin; ERY, erythromycin; and TET, tetracycline

<sup>e</sup> SCCmec type using the method of Zhang *et al.* (2005)

<sup>f</sup> Refer to microarray assay of this study

<sup>g</sup> Refer to PFGE assay of this study

<sup>h</sup> Refer to plasmid digestion assay of this study

**Table VIII.** Antibiotic resistance of retail chicken meat MRSA isolates ( $n = 15$ ) based on MIC's.

Class	Agent <sub>a,b</sub>	0.06	0.12	0.25	0.5	1	2	2.5	4	5	8	10	16	20	32	64	128	256	500	512	1000	1024	% of resistance (isolates)	
Beta-lactams	AMP			-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	15									100 (15)	
	CEF												9		6									100 (15)
	OXA											15												100 (15)
	PEN	-	-									15												100 (15)
Tetracyclines	AMOX													15										100 (15)
	TET		2		3										10									67 (10)
	OXY			1	4								10											67 (10)
Spectinomycin	SPE <sup>c</sup>															3	2					10		67 (10)
	TOB							14																7 (1)
Aminoglycosides	GEN				15																			0 (0)
	NEO <sup>d</sup>					15																		0 (0)
	STR									15														0 (0)
	AMI											15												0 (0)
Lincosamides	CLI			10																				0 (0)
	DAP		15																					0 (0)
Lipopeptide	ERY																							0 (0)
Macrolides	TYLT						15																	0 (0)
Fluoroquinolones	CIP			15																				0 (0)
	GAT				15																			0 (0)
	LEVO		15																					0 (0)
Phenicols	ENRO	15																						0 (0)
	FFN <sup>d</sup>								15															0 (0)
Linezolid	LZD						15																	0 (0)
	SYN			6	9																			0 (0)
Streptogramins	RIF			15																				0 (0)
	NOV <sup>d</sup>				15																			0 (0)
Potentiated sulfas	TMT/S				15																			0 (0)
	XT <sup>c</sup>																							0 (0)
	SDM										10	5												0 (0)
Glycopeptides	STZ										10	5												0 (0)
	VAN				15																			0 (0)
Fosfomycin	FOS						10				5													0 (0)

<sup>a</sup> AMP, ampicillin; CEF, ceftriaxone; OXA, oxacillin; PEN, penicillin; AMOX, amoxicillin; TET, tetracycline; OXY, oxytetracycline; SPE, spectinomycin; TOB, tobramycin; GEN, gentamicin; STR, streptomycin; AMI, amikacin; KAN, kanamycin; CLI, clindamycin; DAP, daptomycin; ERY, erythromycin; CIP, ciprofloxacin; GAT, gatifloxacin; LEVO, levofloxacin; ENRO, enrofloxacin; FFN, florfenicol; LZD, linezolid; SYN, quinupristin/dalfopristin; RIF, rifampin; NOV, novobiocin; TMT/SXT, trimethoprim/sulfamethoxazole; SDM, sulphadimethoxine; STZ, sulphathiazole; TYLT, tylosin tartrate; VAN, vancomycin; Fos, fosfomycin.

- <sup>b</sup> Full line, MIC breakpoint; bold numbers, numbers of resistant isolates; darker full line, susceptible breakpoint; dot line, intermediate breakpoint; unshaded areas, range of dilutions tested; numbers in the left shaded area, isolates with MICs greater than the highest tested concentrations; numbers in the right shaded area, isolates with MICs lower or equal to the lower tested concentrations
- <sup>c</sup> The MIC values of trimethoprim/sulfamethoxazol (0.5/9.5) are given as trimethoprim MIC values
- <sup>d</sup> No breakpoint available
- <sup>e</sup> Unofficial breakpoint

**Table IX.** Retail chicken meat MRSA isolates ( $n = 15$ ) antibiotic resistance phenotypes.

<b>Resistance phenotype<sup>a</sup></b>	<b>Number of resistant isolates (%)</b>
$\beta$	5 (33)
$\beta$ , TET	0 (0)
$\beta$ , TET, OXY	0 (0)
$\beta$ , TET, OXY, SPE	9 (60)
$\beta$ , TET, OXY, SPE, TOB	1 (7)

<sup>a</sup>  $\beta$ , beta-lactams, TET, tetracycline; OXY, oxytetracycline; SPE, spectinomycine; TOB, tobramycin

**Table X.** Antimicrobial resistance genotypes of retail chicken meat MRSA isolates ( $n=15$ ) using microarrays<sup>a</sup>.

<b>MLST and SCC<i>mec</i> (<i>n</i>)</b>	<b>AMR gene (<i>n</i>)</b>	<b>Expected resistance<sup>b</sup></b>
<b>ST8-IVa (5)</b>	<i>mecA</i> (5)	Beta-lactams
	<i>blaZ</i> (5)	Beta-lactamase
	<i>fosB</i> (5)	Fosfomycin, Bleomycin
<b>ST398-V (10)</b>	<i>mecA</i> (10)	Beta-lactams
	<i>blaZ</i> (10)	Beta-lactams
	<i>erm(A)</i> (10)	MLS
	<i>tet(M)</i> (10)	Tetracyclines
	<i>tet(K)</i> (10)	Tetracyclines
	<i>lin(A)</i> (10)	Lincosamides <sup>c</sup>
	<i>qacC</i> (10)	Quaternary ammonium
	<i>spc</i> (10)	Spectinomycin
	<i>aad(D)</i> (1)	Aminoglycosides (Tobramycin, Neomycin)

<sup>a</sup> StaphyType array (Alere technologies, Germany); Microarray identifies an overall hybridization pattern that is in accordance to a CC or ST and carries probes for the discrimination of selected SCC*mec* types.

<sup>b</sup> MLS, macrolides, lincosamides and streptogramins resistances;

<sup>c</sup> Lincosamides, pleuromutilins and streptogramin A

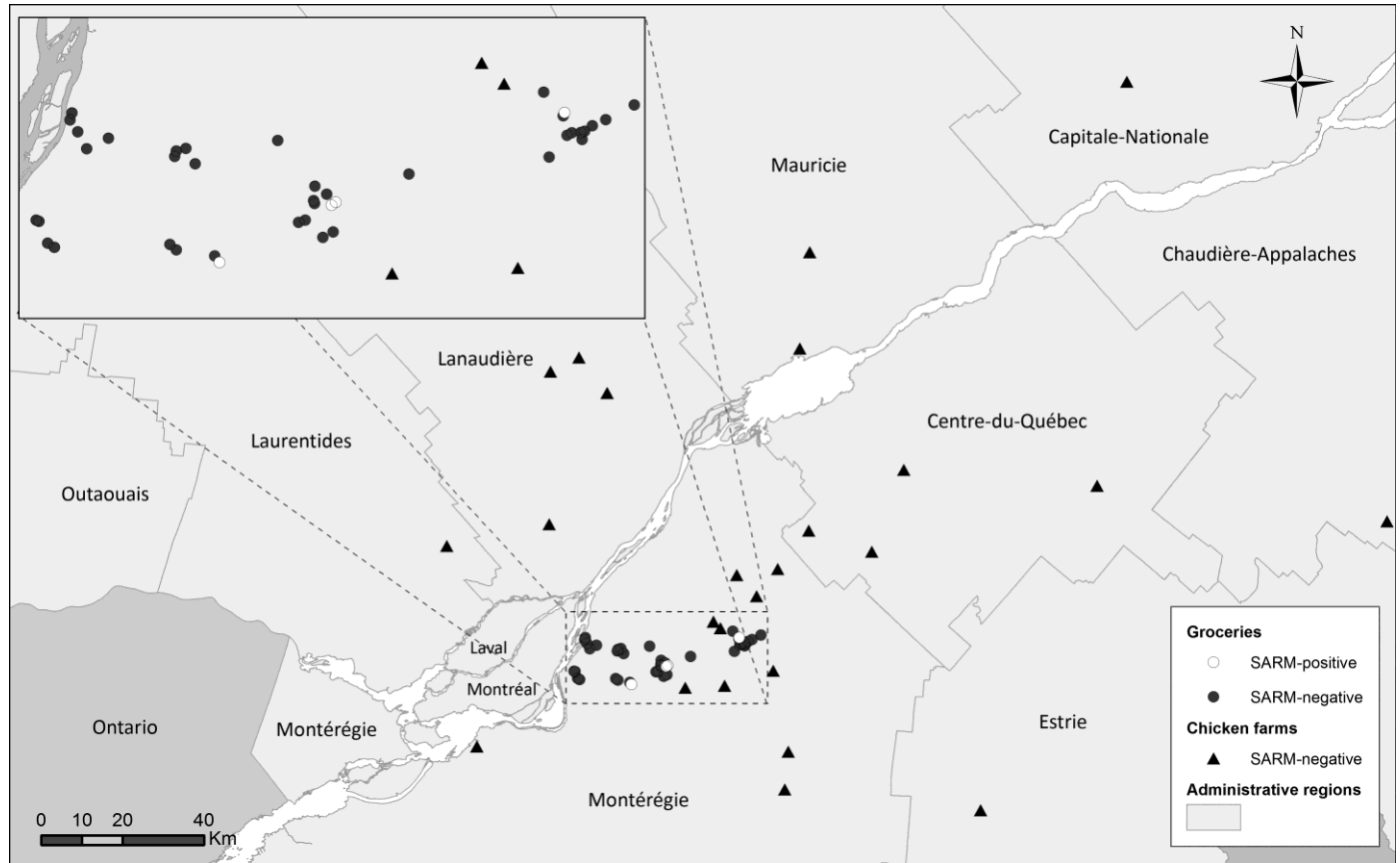
**Table XI.** Virulence genotypes of retail chicken meat MRSA isolates ( $n=15$ ) using microarrays<sup>a</sup>.

MLST/SCC <i>mec</i>	Virulence gene <sup>b</sup>	Virulence factor <sup>c</sup>
ST8-IVa (5)	<i>lukS, lukF, hlgA, <b>lukf-PV, luks-PV, lukD, lukE,</b> lukX, lukY, hla, hlb, aur <b>entK, entQ</b> <i>isdA, sak, chp, scn</i> <b>arcA, arcB, arcC, arcD</b> <i>agrI, agrB-I, agrC-I, agrD-I, hld</i> <i>icaA, icaC, icaD</i> <i>setC, setB1, <b>setB2, setB3</b></i> <i>bbp, clfA, clfB, ebpS, fib, fnbA, fnbB, map, sdrC,</i> <b><i>sasG, sdrD, vwb</i></b></i>	Leukocidin/hem/aur  Enterotoxins Immuno evasion ACME locus Regulatory gene Adherence/biofilm Superantigen-like proteins MSCRAMMs <sup>c</sup> /Adhesion
ST398-V (10)	<i>lukS, lukF, hlgA, lukE, lukX, lukY, hla, hlb, aur</i> <i>isdA</i> <i>agrI, agrB-I, agrC-I, agrD-I, hld</i> <i>icaA, icaC, icaD</i> <i>setC, setB1</i> <i>bbp, clfA, clfB, <b>cna, ebpS, fib, fnbA, fnbB, map,</b></i> <i>sdrC, sdrD, vwb</i>	Leukocidin/hem/aur Immuno evasion Regulatory gene Adherence/biofilm Superantigen-like proteins MSCRAMMs/Adhesion

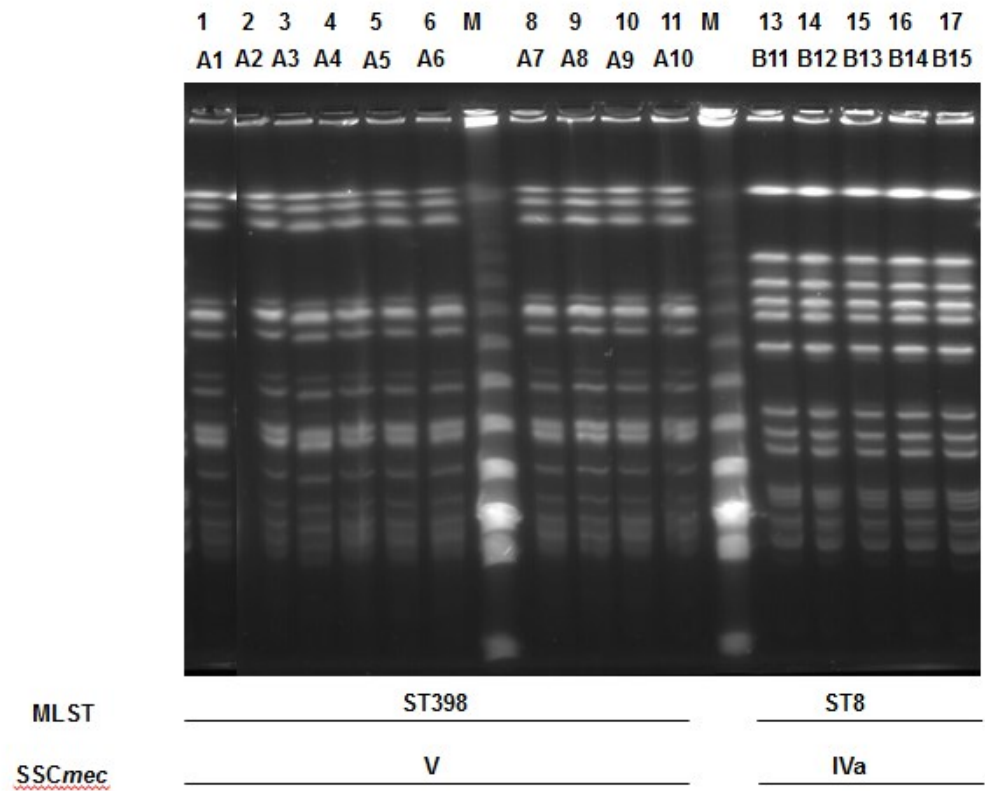
<sup>a</sup> StaphyType array (Alere technologies, Germany); Microarray identifies an overall hybridization pattern that is in accordance to a CC or ST and carries probes for the discrimination of selected SCC*mec* types.

<sup>b</sup> Genes in bold are different in each clones

<sup>c</sup> MSCRAMM, microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules; hem, hemolysins; aur, aureolysins.

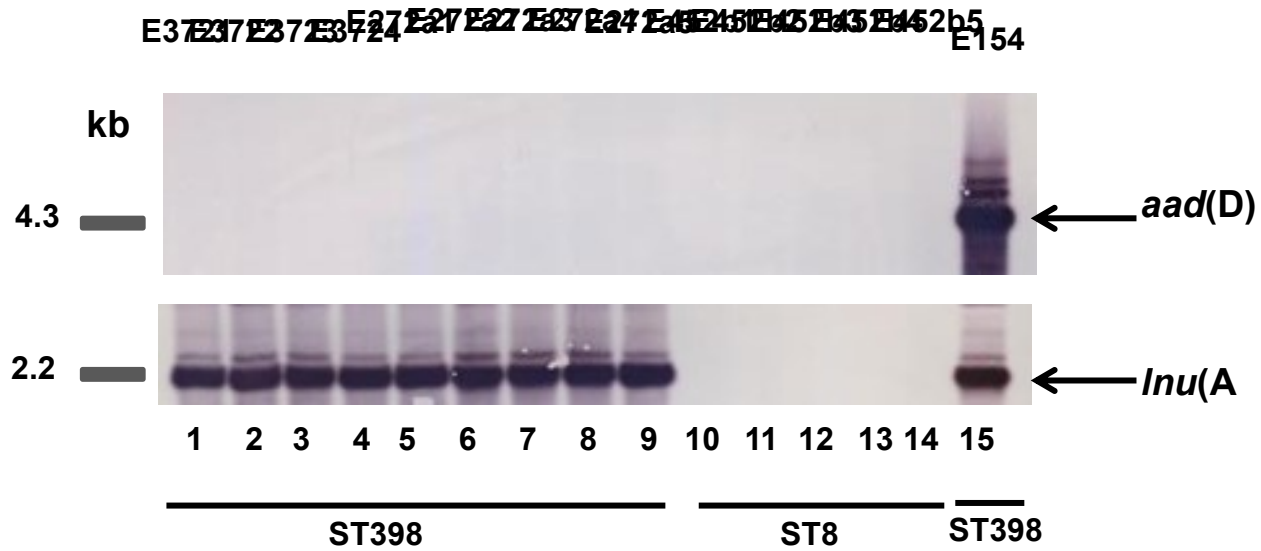


**Figure 7.** Geographical location of retail markets and farms sampled during the project via slaughterhouses.

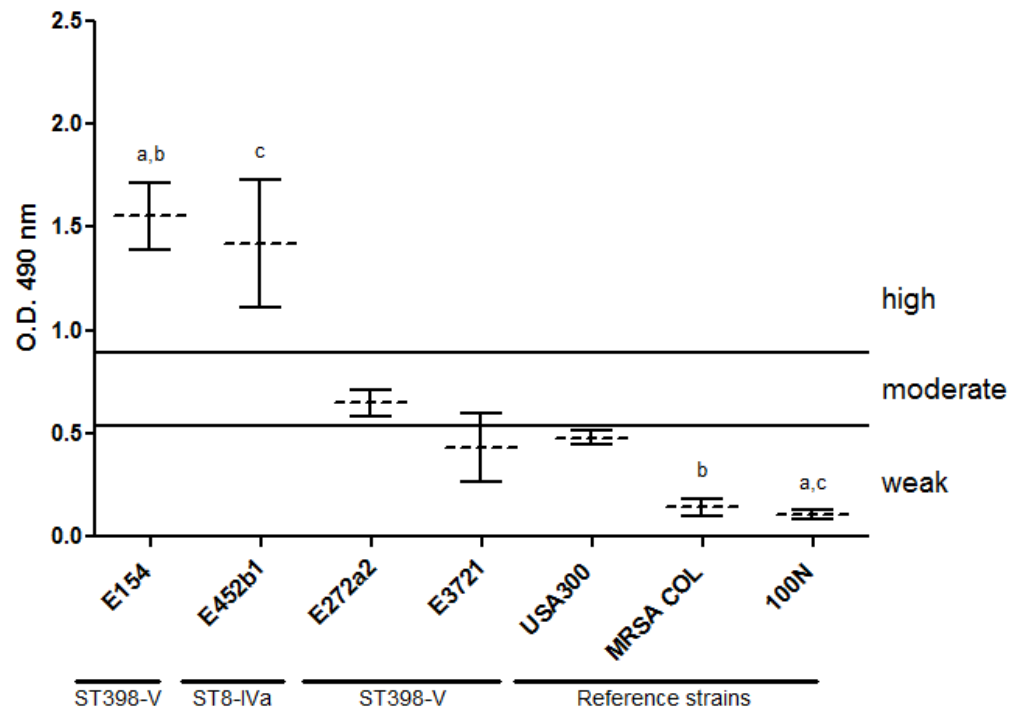


**Figure 8.** Pulse-field gel electrophoresis following *Cfi9I* digestion. E154(A1), lane 1: E272A1(A2), lane 2: E272A2 (A3), lane 3: E272A3 (A4), lane 4: E272A4 (A5), lane 5: E272A5 (A6), lane 6: (Pulse-field gel type A) M: lambda DNA marker, lane 7: E3721 (A7), lane 8: E3722 (A8), lane 9: E3723 (A9), lane 10: E3724 (A10), lane 11 (Pulse-field gel type A): M: lambda DNA marker, lane 12: E452B1 (B1), lane 13: B452B2 (B2), lane 14: E452B3 (B3), lane 15: E452B4 (B4), lane 16: E452B5 (B5), lane 17. (Pulse-field gel type B).

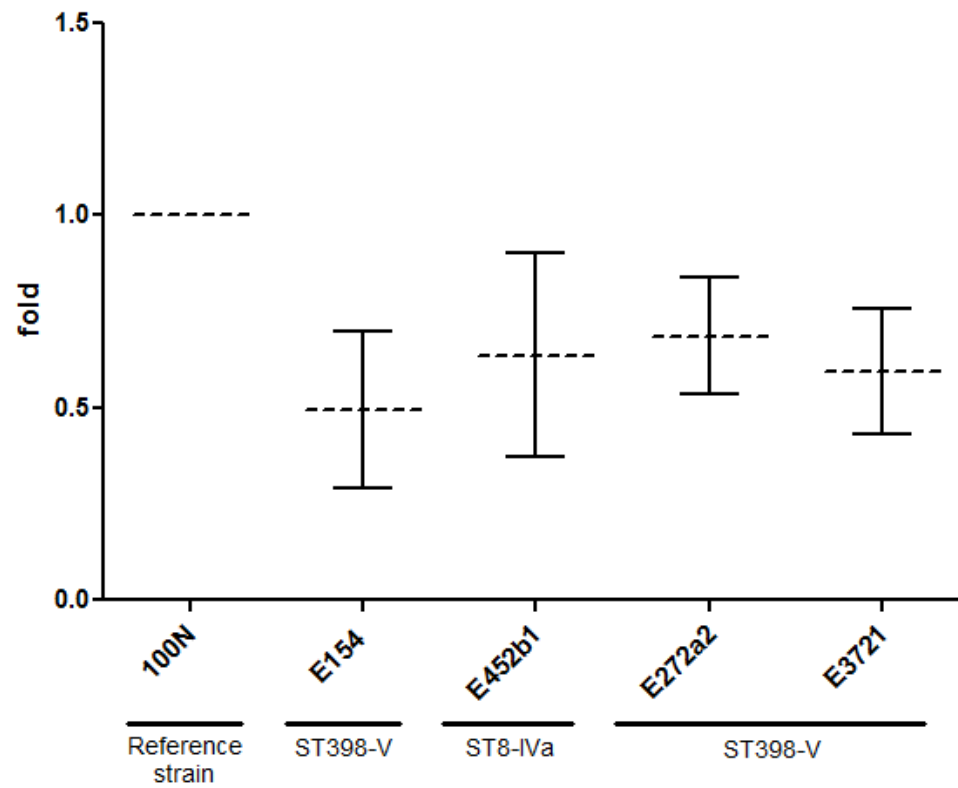




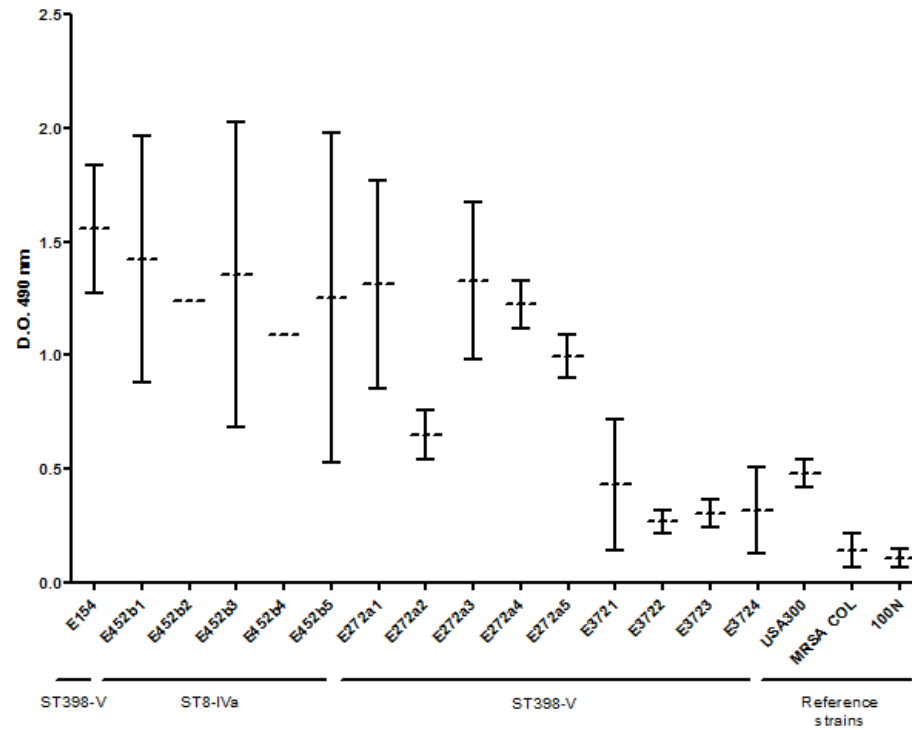
**Figure 9.** Plasmid location of *aad(D)* and *lnu(A)*: Southernblot hybridization of plasmid DNA with DIG labelled probes for *aad(D)* top panel and *lnu(A)* bottom panel. Kb represents kilobase pairs.



**Figure 10.** Biofilm production in representatives retail chicken meat MRSA isolates and reference strains. Results are given as O.D.<sub>490 nm</sub> mean of three biological replicates with SD. Classification breakpoints are also represented. <sup>a</sup>Statistical differences between E154 and 100N ( $p < 0.05$ ). <sup>b</sup>Statistical differences between E154 and MRSA COL ( $p < 0.05$ ). <sup>c</sup>Statistical differences between E452b and 100N ( $p < 0.05$ ).



**Figure 11.** *hld* gene expression of representative retail chicken meat MRSA isolates. Strain 100N is used as reference strain. Results are given as mean fold of three biological replicate for each isolate with SD.



**Figure 12.** Biofilm production in retail chicken meat MRSA isolates ( $n=15$ ) and reference strains. Results are given as O.D.<sub>490</sub> nm mean of three biological replicates with SD

## **4. DISCUSSION GÉNÉRALE**

Les SARM d'origine animale ont été retrouvés un peu partout à travers le monde [6, 114, 162]. Ici même au Québec, notre étude a permis de mettre en évidence pour la première fois la présence de SARM dans la viande de poulet disponible dans les marchés de la province. La seule autre étude du genre publiée au Canada rapporte une prévalence de 1,2% de SARM lors d'une collecte d'échantillon provenant de plusieurs provinces, dont le Québec était absent [114]. Plusieurs études américaines rapportent aussi la présence de SARM dans la viande de poulet [7, 156]. Les prévalences observées en Amérique du Nord sont assez similaires entre elles et relativement basses (0% à 3,9%) comparativement à certaines prévalences observées aux Pays-Bas et en Allemagne (16% et 25%) [7, 14, 114, 148, 153, 156]. Cependant, les prévalences observées dans certains pays d'Europe sont aussi faibles que celles évaluées en Amérique du Nord [9, 149, 151]. Certains pays d'Asie rapportent aussi des taux de prévalence dans la viande de poulet variant de 0% à 4%, chiffre similaire à ce qui est observé au Canada et aux États-Unis [8, 157-164]. Les SARM isolés de la viande de poulet dans les autres provinces canadiennes appartenaient à un clone d'origine hospitalière (USA100) alors que ceux retrouvés au Québec dans notre étude sont divisés en deux clones (ST8 et ST398). Les SARM ST8, aussi retrouvés dans certaines études américaines sont associés au clone USA300, le SARM d'origine communautaire le plus répandu et le plus virulent retrouvé en Amérique du Nord [7, 45, 100, 156]. Les SARM ST398, eux, appartiennent à un clone d'origine animale retrouvé un peu partout à travers le monde dans la viande de poulet, et considéré comme le plus répandu [148, 162, 165]. À notre connaissance, aucune autre étude ne relate la présence de SARM

ST398 dans la viande de poulet en Amérique du Nord (excepté la présente étude). Cette différence peut s'expliquer par le faible nombre d'échantillon analysé dans certaines études américaines comparativement à la nôtre. Il est probable qu'avec plus d'échantillons, leur résultats auraient pu être différents.

Les profils de résistance aux antibiotiques observés dans notre étude varient entre les deux clones. Les isolats ST398 étaient multirésistants (bêta-lactamines, tétracyclines, aminoglycoside/aminocyclitol), ceci étant défini par des résistances à au moins trois classes d'antibiotiques différentes. Plusieurs SARM ST398 multirésistants aux antibiotiques ont été isolés de la viande de poulet un peu partout à travers le monde [9, 14, 162]. Contrairement aux autres études, les isolats ST398 de notre étude ne présentaient pas de résistance à l'érythromycine [9, 14]. Par contre, nos isolats ST398 étaient porteurs du gène *erm(A)*, codant pour une résistance à l'érythromycine. Des analyses préliminaires effectuées au laboratoire démontrent la présence de mutations dans la séquence du gène *ermA*, ce qui pourrait expliquer que ce gène ne soit pas exprimé dans notre étude. Ceci a été également observé pour le gène *lun(A)* et *fosB* codant respectivement pour des résistances aux lincosamides et à la fosfomycine [166]. Tous les isolats ST398 de notre étude présentaient des résistances contre plusieurs tétracyclines, ce qui est en accord avec la littérature [9, 14, 162]. Ces résistances peuvent être expliquées par les gènes *tet(M)* et *tet(K)*. Une résistance à la spectinomycine a aussi été observée parmi les isolats ST398. Cette résistance leur est conférée par le gène *spc*. Il est intéressant de constater qu'un des SARM ST398 de cette étude exprimait une résistance plasmidique supplémentaire envers la tobramycine, ce

qui n'a pas été observé dans d'autres études où des SARM ST398 furent isolés [9, 14, 162]. Aucune multirésistance aux antibiotiques n'a été observée chez les isolats ST8 de notre étude où ceux-ci étaient résistants aux bêta-lactamines seulement. Contrairement à notre étude, plusieurs études américaines rapportent, chez les SARM ST8, des résistances à des antibiotiques autres que les bêta-lactamines [7, 156].

Les profils de gènes de virulence des deux clones, soit ST8 et ST398, se sont révélés assez différents l'un de l'autre. Les SARM ST8 portaient plusieurs gènes codant pour des toxines alors qu'un nombre plus restreint de ces gènes ont été retrouvés chez les SARM ST398. Les gènes codant pour les toxines de Panton-Valentin ont déjà été observés chez les SARM ST8 isolés dans certaines études américaines [7, 156]. Les toxines de Panton-Valentin entraînent la lyse des leucocytes polymorphonucléaires et la nécrose tissulaire, ce qui permet à la bactérie de fuir le système immunitaire tout en lui causant de graves dommages [1, 167, 168]. Il semble y avoir une forte association entre les SARM communautaires et les toxines de Panton-Valentin [1]. En effet, une étude française portant sur 593 isolats de *S. aureus* rapporte que tous les isolats classés comme des SARM communautaires possédaient la toxine de Panton-Valentin comparativement à tous ceux répertoriés comme étant des HA-MRSA [169]. Des gènes associés à la colonisation, tel le locus ACME, et aux infections, comme le complexe d'immunoévasion, chez l'humain ont aussi été retrouvés chez les ST8 isolés dans la présente étude, ce qui laisse supposer une origine humaine pour ce ST. Des gènes associés aux toxines de Panton-Valentin ont aussi été retrouvés chez des SARM ST398 isolés dans la viande de poulet en Chine [162]. À notre connaissance, cette étude est la



première en Amérique du Nord à rapporter la présence des gènes codant pour les toxines de Panton-Valentin chez des SARM ST398 de viande de poulet. Même si plusieurs différences ont été observées chez les SARM ST398 et ST8 isolés dans cette étude, des gènes associés à la production de biofilm ont été détectés chez les deux clones.

L'étude qualitative sur la capacité de production de biofilm de ces isolats de SARM d'origine aviaire du Québec a révélé de faibles et de forts producteurs de biofilm. À notre connaissance, cette étude est la première à démontrer la capacité des SARM d'origine aviaire à produire du biofilm. Une telle capacité avait déjà été démontrée chez les SARM d'origine porcine [170]. Par contre, d'un point de vue statistique, aucune variation significative de production de biofilm n'a été démontrée parmi nos isolats. Tous nos isolats portaient le locus *ica* et l'analyse de sa séquence n'a révélé aucune mutation. Il existe aussi différents types de système Agr, dont l'influence sur la production de biofilm varie en fonction du type [171-173]. Tous les isolats portaient le type Agr I. La régulation du biofilm est un processus complexe impliquant différents gènes (*sarA*,  $\sigma^B$ , *lytSR*) et une mutation pourrait influencer le phénotype du biofilm observé chez certains isolats [22, 60, 68, 70].

Lors d'une étude pancanadienne sur la mammite bovine, l'équipe de Veh et *al.* a étudié la relation entre la production de biofilm et l'activité du gène *hld*, régulateur du système Agr, chez des souches d'une collection provenant de mammite sous-clinique [64]. Chez certains types *spa* rencontrés, une relation inverse entre la production de biofilm et l'expression du système Agr a été observée. L'équipe suggère une certaine adaptation

de certaines lignées de *S. aureus* pour la glande mammaire, ce qui favoriserait la persistance de ces dernières chez la vache. Dans notre étude, aucune relation n'a été observée entre la production de biofilm et l'expression du gène *hld*. Il serait intéressant d'étudier cette relation sur un plus grand nombre d'isolats ST8 et ST398 afin de comprendre son implication dans l'adaptation de ces SARM.

L'absence de SARM chez les poulets à griller de notre étude laisse supposer une possible contamination de la viande de poulet par une autre espèce animale ou par l'humain. Bien que les SARM ST398 et ST8 aient déjà été retrouvés chez le poulet et le porc [15, 139, 174, 175], le principal réservoir de SARM ST398 au Canada demeure le porc. Une étude effectuée par notre laboratoire a permis d'évaluer la prévalence de SARM ST398 chez le porc à environ 25% au Québec [117]. Il n'est donc pas impossible qu'une contamination croisée entre de la viande de porc contaminée par du SARM et de la viande de poulet ait eu lieu lors de leur manipulation. Une étude publiée récemment évalue le taux de contamination par SARM des ustensiles et surfaces ayant servi à manipuler de la viande de porc entre 17 et 42 %. [176]. À notre connaissance, aucune étude du même genre n'a été effectuée avec de la viande de poulet. Il est également possible que le nombre d'oiseaux récoltés ait été trop faible pour détecter la prévalence de SARM. Plusieurs études rapportent avec succès l'isolement de SARM dans des échantillons nasaux et fécaux de poulets [9, 15]. En fait, une étude comparative a permis de classer ces deux sites comme les plus fréquemment colonisés par SARM [177]. De plus, un double enrichissement comme celui utilisé dans la présente étude augmente le recouvrement des SARM dans l'échantillon [148, 178]. Il serait aussi

possible qu'un travailleur en industrie alimentaire porteur (nasal, buccal, ou cutané) de SARM ST8 ou ST398 ait contaminé la viande de poulet de cette étude. Pour ST8, la présence de facteur de virulence associée aux infections chez l'humain appuie cette hypothèse. Plusieurs études démontrent aussi qu'un contact fréquent avec des animaux de production comme le porc, le bœuf ou le poulet augmente la colonisation par SARM (dont ST398) chez l'humain [105, 145, 179-181]. Le rôle de la viande dans la transmission de SARM chez l'humain est encore mal compris et sujet à discussion. Cependant, la découverte de souches de SARM portant plusieurs gènes de virulence associés à des infections chez l'humain dans la viande mérite de porter une plus grande attention à ce mode de transmission.

## **5. CONCLUSION ET PERSPECTIVES**

Cette étude est la première à démontrer la présence de SARM dans la viande de poulet et son absence chez le poulet à griller dans la province de Québec. C'est aussi la première étude à rapporter la présence de SARM ST398 et ST8 dans la viande de poulet au Canada. Deux clones différents (ST8 et ST398) ont été retrouvés dans cette étude. Ceux-ci possèdent des profils de gènes de virulence et de résistance aux antibiotiques qui diffèrent de ceux isolés dans le reste du Canada. Les SARM de cette étude se sont révélés des producteurs de biofilm, phénomène participant à la virulence impliqué dans la colonisation des surfaces biotiques et abiotiques. De nombreux gènes de virulence associés à la colonisation et à l'infection chez l'humain ont été identifiés par biopuce à ADN. Les SARM ST398 portaient moins de gènes de virulence associés à des infections chez l'humain et sont donc potentiellement moins virulents comparativement au SARM ST8. Mais ceci reste à être démontré. Cependant, les ST398 étaient multirésistants à plusieurs antibiotiques appartenant aux classes I, II et III de la classification des antibiotiques basés sur leur importance en médecine humaine du gouvernement du Canada. La classe I représente les antibiotiques de très haute importance en médecine humaine; la classe II représente ceux de haute importance; la classe III représente ceux de moyenne importance et la classe IV représente ceux de faible importance. Cette multirésistance pourrait potentiellement compliquer le traitement des infections causées par ces bactéries. Certains gènes de résistance aux antibiotiques ont été retrouvés sur des plasmides. Il serait intéressant d'évaluer la capacité de ces SARM à transférer ce matériel génétique à d'autres bactéries, dont des souches SARM communautaires et hospitalières, et ce, sous formes planctonique et

biofilm. Les SARM ST8 isolés lors de ce projet pourraient possiblement être d'origine humaine et représentent alors un risque pour la santé publique lors de la manipulation de la viande. Ces souches se sont révélées plus sensibles aux antibiotiques que les ST398. Il est également possible que les ST398 soient d'origine humaine, mais ceci est moins probable étant donné que la littérature a identifié le porc comme étant le réservoir principal de ce type de ST. Par contre, l'humain (un boucher par exemple) pourrait être un vecteur de transmission entre la viande de porc et la viande de poulet, mais ceci reste à être démontré. Il serait donc intéressant d'évaluer le taux de colonisation par SARM des travailleurs à l'abattoir et en industrie alimentaire, car il s'avère, grâce à cette étude, que la contamination de la viande par ces travailleurs, par un porteur de la bactérie ou encore par un instrument de cuisine contaminé, soit possible.

## BIBLIOGRAPHIE

1. Gordon, R.J. and F.D. Lowy, *Pathogenesis of methicillin-resistant Staphylococcus aureus infection*. Clinical Infectious Diseases, 2008. **46**(Supplement 5): p. S350-S359.
2. Corne, P., *Staphylococcus aureus dans un service de réanimation: étude génétique, phénotypique et épidémiologique*. thèse. 2004, Montpellier 1.
3. Xia, J., et al., *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus antibiotic resistance and virulence*. Bioscience Trends, 2013. **7**(3).
4. CDC, *Active Bacterial Core Surveillance Report, Emerging Infections Program Network, Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus, 2012*. 2014.
5. Weese, J.S., *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus in animals*. Institute for Laboratory Animal Research journal, 2010. **51**(3): p. 233-244.
6. Nemeghaire, S., et al., *Characterization of methicillin-resistant Staphylococcus aureus from healthy carrier chickens*. Avian Pathology, 2013. **42**(4): p. 342-346.
7. Abdalrahman, L.S., et al., *Isolation, Virulence, and Antimicrobial Resistance of Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus (MRSA) and Methicillin Sensitive Staphylococcus aureus (MSSA) Strains from Oklahoma Retail Poultry Meats*. International Journal of Environmental Research and Public Health, 2015. **12**(6): p. 6148-6161.
8. Hiroi, M., et al., *Antibiotic resistance in bacterial pathogens from retail raw meats and food-producing animals in Japan*. Journal of Food Protection, 2012. **75**(10): p. 1774-1782.

9. Krupa, P., et al., *Genotypes and oxacillin resistance of Staphylococcus aureus from chicken and chicken meat in Poland*. Poultry Science, 2014. **93**(12): p. 3179-3186.
10. van Loo, I., et al., *Emergence of methicillin-resistant Staphylococcus aureus of animal origin in humans*. Emerging Infectious Diseases, 2007. **13**(12): p. 1834-9.
11. Golding, G.R., et al., *Livestock-associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus sequence type 398 in humans, Canada*. Emerging Infectious Diseases 2010. **16**(4): p. 587-94.
12. Monaco, M., et al., *Livestock-associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus responsible for human colonization and infection in an area of Italy with high density of pig farming*. BMC Infectious Diseases, 2013. **13**(1): p. 258.
13. Koyama, H., et al., *A fatal infection caused by sequence type 398 methicillin-resistant Staphylococcus aureus carrying the Panton-Valentine leukocidin gene: A case report in Japan*. Journal of Infection and Chemotherapy, 2015.
14. Fessler, A.T., et al., *Characterization of Methicillin-resistant Staphylococcus aureus Isolates from Food and Food Products of Poultry Origin in Germany*. Applied and Environmental Microbiology, 2011.
15. Persoons, D., et al., *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus in poultry*. Emerging Infectious Diseases, 2009. **15**(3): p. 452-3.
16. Dhup, V., et al., *First report of identification of livestock-associated MRSA ST9 in retail meat in England*. Epidemiology and infection, 2015: p. 1-4.



17. Burns, A., et al., *A longitudinal study of Staphylococcus aureus colonization in pigs in Ireland*. Veterinary Microbiology, 2014. **174**(3): p. 504-513.
18. Porrero, M.C., et al., *Carriage of Staphylococcus aureus by free-living wild animals in Spain*. Applied and Environmental Microbiology, 2014. **80**(16): p. 4865-4870.
19. Wertheim, H.F., et al., *The role of nasal carriage in Staphylococcus aureus infections*. Lancet Infectious Diseases, 2005. **5**(12): p. 751-762.
20. Jenkins, A., et al., *Differential Expression and Roles of Staphylococcus aureus Virulence Determinants during Colonization and Disease*. mBio, 2015. **6**(1): p. e02272-14.
21. Kobayashi, S.D., N. Malachowa, and F.R. DeLeo, *Infectious Disease Theme Issue: Pathogenesis of Staphylococcus aureus Abscesses*. The American Journal of Pathology, 2015.
22. Lister, J.L. and A.R. Horswill, *Staphylococcus aureus biofilms: recent developments in biofilm dispersal*. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 2014. **4**.
23. Sevin, E., O. Larmaraud-Sevin, and P. Legrand, *Approche moléculaire de la résistance à la méticilline de Staphylococcus aureus*. Revue Française des Laboratoires, 1999. **1999**(315): p. 25-31.
24. Ligon, B.L., *Penicillin: its discovery and early development*. Seminars of Pediatric Infectious Diseases, 2004. **15**(1): p. 52-7.

25. Pei, Z., et al., *Cloning, Expression, and Purification of a New Antibacterial Substance Gene From Larvae of Musca domestica (Diptera: Muscidae)*. Journal of Insect Science, 2014. **14**(1): p. 253.
26. Couture, B., *Bactériologie médicale troisième édition*. 1997: Décarie éditeur Québec.
27. Creech, C.B., et al., *Vaccination as infection control: a pilot study to determine the impact of Staphylococcus aureus vaccination on nasal carriage*. Vaccine, 2009. **28**(1): p. 256-260.
28. BioMérieux, *api-Staph*. 2002: Marcy l'étoile, France.
29. Bystron, J., et al., *Genotypes and enterotoxin gene content of S. aureus isolates from poultry*. Veterinary Microbiology, 2010. **144**(3-4): p. 498-501.
30. Cho, J.-I., et al., *Detection of methicillin resistance in Staphylococcus aureus isolates using two-step triplex PCR and conventional methods*. Journal of Microbiology and Biotechnology, 2007. **17**(4): p. 673.
31. Martineau, F., et al., *Species-specific and ubiquitous-DNA-based assays for rapid identification of Staphylococcus aureus*. Journal of Clinical Microbiology, 1998. **36**(3): p. 618-23.
32. Klaassen, C.H., H.A. de Valk, and A.M. Horrevorts, *Clinical Staphylococcus aureus isolate negative for the Sa442 fragment*. Journal of Clinical Microbiology, 2003. **41**(9): p. 4493.
33. Heilmann, F., et al., *Identification of 2,600 clinical methicillin-resistant Staphylococcus aureus strains in The Netherlands yielded sporadic cases of*

- strains negative for the species-specific Sa442 gene fragment.* Journal of Clinical Microbiology, 2004. **42**(5): p. 2350-2350.
34. Chua, K.Y., et al., *Population genetics and the evolution of virulence in Staphylococcus aureus.* Infection, Genetics and Evolution, 2014. **21**: p. 554-562.
  35. Alibayov, B., et al., *Staphylococcus aureus mobile genetic elements.* Molecular Biology Reports, 2014: p. 1-14.
  36. Moon, B.Y., et al., *Phage-mediated horizontal transfer of a Staphylococcus aureus virulence-associated genomic island.* Scientific Reports, 2015. **5**.
  37. Ferry, T., et al., *Virulence determinants in Staphylococcus aureus and their involvement in clinical syndromes.* Current Infectious Disease Reports, 2005. **7**(6): p. 420-428.
  38. Sabat, A.J., et al., *Genome-wide analysis reveals two novel mosaic regions containing an ACME with an identical DNA sequence in the MRSA ST398-t011 and MSSA ST8-t008 isolates.* Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2015: p. dku531.
  39. Thurlow, L.R., G.S. Joshi, and A.R. Richardson, *Virulence strategies of the dominant USA300 lineage of community-associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus (CA-MRSA).* FEMS Immunology & Medical Microbiology, 2012. **65**(1): p. 5-22.
  40. Cuny, C., et al., *Prevalence of the immune evasion gene cluster in Staphylococcus aureus CC398.* Veterinary Microbiology, 2015. **177**(1): p. 219-223.

41. Verkaik, N., et al., *Immune evasion cluster-positive bacteriophages are highly prevalent among human Staphylococcus aureus strains, but they are not essential in the first stages of nasal colonization*. *Clinical Microbiology and Infection*, 2011. **17**(3): p. 343-348.
42. Hwang, S.Y., et al., *Novel multiplex PCR for the detection of the Staphylococcus aureus superantigen and its application to raw meat isolates in Korea*. *International Journal of Food Microbiology*, 2007. **117**(1): p. 99-105.
43. Novick, R.P. and E. Geisinger, *Quorum sensing in staphylococci*. *Annual Review of Genetics*, 2008. **42**: p. 541-64.
44. Sahukhal, G.S. and M.O. Elasri, *Identification and characterization of an operon, msaABCR, that controls virulence and biofilm development in Staphylococcus aureus*. *BMC Microbiology*, 2014. **14**(1): p. 154.
45. Lindsay, J.A., *Genomic variation and evolution of Staphylococcus aureus*. *International Journal of Medical Microbiology*, 2010. **300**(2-3): p. 98-103.
46. Xia, G. and C. Wolz, *Phages of Staphylococcus aureus and their impact on host evolution*. *Infection, Genetics and Evolution*, 2014. **21**: p. 593-601.
47. Lina, G., F. Vandenesch, and J. Etienne, *A brief history of Staphylococcus aureus Panton Valentine leukocidin*. *Antimicrobial Therapy and Vaccines: Microbes*, 2006. **1**.
48. Boyle-Vavra, S. and R.S. Daum, *Community-acquired methicillin-resistant Staphylococcus aureus: the role of Panton-Valentine leukocidin*. *Laboratory Investigators*, 2007. **87**(1): p. 3-9.

49. Bokarewa, M.I., T. Jin, and A. Tarkowski, *Staphylococcus aureus: Staphylokinase*. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 2006. **38**(4): p. 504-509.
50. Sarrou, S., et al., *Dissemination of Methicillin-Susceptible CC398 Staphylococcus aureus Strains in a Rural Greek Area*. PloS One, 2015. **10**(4): p. e0122761.
51. Malachowa, N. and F.R. DeLeo, *Mobile genetic elements of Staphylococcus aureus*. Cellular and Molecular Life Sciences, 2010. **67**(18): p. 3057-3071.
52. Snyder, L. and W. Champness, *Molecular genetics of bacteria*. 1997, Washington, D.C.: ASM Press. xxii, 504 p.
53. Lindsay, J.A., *Genomic variation and evolution of Staphylococcus aureus*. International Journal of Medical Microbiology, 2010. **300**(2): p. 98-103.
54. Murphy, E., L. Huwyler, and M.d.C. de Freire Bastos, *Transposon Tn554: complete nucleotide sequence and isolation of transposition-defective and antibiotic-sensitive mutants*. The EMBO Journal, 1985. **4**(12): p. 3357.
55. Kadlec, K., et al., *Novel and uncommon antimicrobial resistance genes in livestock-associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus*. Clinical Microbiology and Infection, 2012. **18**(8): p. 745-55.
56. Gardete, S. and A. Tomasz, *Mechanisms of vancomycin resistance in Staphylococcus aureus*. The Journal of clinical investigation, 2014. **124**(7): p. 2836.

57. Solano, C., M. Echeverz, and I. Lasa, *Biofilm dispersion and quorum sensing*. *Current Opinion in Microbiology*, 2014. **18**: p. 96-104.
58. Abdallah, M., et al., *Biofilm formation and persistence on abiotic surfaces in the context of food and medical environments*. *Archives of Microbiology*, 2014: p. 1-20.
59. Archer, N.K., et al., *Staphylococcus aureus biofilms: properties, regulation, and roles in human disease*. *Virulence*, 2011. **2**(5): p. 445-459.
60. Arciola, C., et al., *Polysaccharide intercellular adhesin in biofilm: structural and regulatory aspects*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2015. **5**(7).
61. Høiby, N., et al., *Antibiotic resistance of bacterial biofilms*. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 2010. **35**(4): p. 322-332.
62. Horswill, A.R., et al., *The effect of the chemical, biological, and physical environment on quorum sensing in structured microbial communities*. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2007. **387**(2): p. 371-80.
63. Vuong, C., et al., *Impact of the agr quorum-sensing system on adherence to polystyrene in Staphylococcus aureus*. *Journal of Infectious Diseases*, 2000. **182**(6): p. 1688-93.
64. Veh, K., et al., *Genotypic and phenotypic characterization of Staphylococcus aureus causing persistent and nonpersistent subclinical bovine intramammary infections during lactation or the dry period*. *Journal of Dairy Science*, 2015. **98**(1): p. 155-168.

65. Foster, T.J., et al., *Adhesion, invasion and evasion: the many functions of the surface proteins of Staphylococcus aureus*. Nature Reviews Microbiology, 2014. **12**(1): p. 49-62.
66. Rode, T.M., et al., *Different patterns of biofilm formation in Staphylococcus aureus under food-related stress conditions*. International Journal of Food Microbiology, 2007. **116**(3): p. 372-383.
67. Le, K.Y., et al., *Molecular determinants of staphylococcal biofilm dispersal and structuring*. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 2014. **4**.
68. Mrak, L.N., et al., *saeRS and sarA act synergistically to repress protease production and promote biofilm formation in Staphylococcus aureus*. PloS One, 2012. **7**(6): p. e38453.
69. Atwood, D.N., et al., *Comparative impact of diverse regulatory loci on Staphylococcus aureus biofilm formation*. Microbiology Open, 2015.
70. Rice, K.C. and K.W. Bayles, *Molecular control of bacterial death and lysis*. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 2008. **72**(1): p. 85-109.
71. Cerca, N., J.L. Brooks, and K.K. Jefferson, *Regulation of the intercellular adhesin locus regulator (icaR) by SarA,  $\sigma$ B, and IcaR in Staphylococcus aureus*. Journal of Bacteriology, 2008. **190**(19): p. 6530-6533.
72. Wilson, B.A. and A.A. Salyers, *Bacterial pathogenesis : a molecular approach*. 3rd ed. 2011, Washington, DC: ASM Press. xiv, 526 p.
73. Garg, N., G. Manchanda, and A. Kumar, *Bacterial quorum sensing: circuits and applications*. Antonie van Leeuwenhoek, 2014. **105**(2): p. 289-305.

74. Oscarsson, J., K. Tegmark-Wisell, and S. Arvidson, *Coordinated and differential control of aureolysin (aur) and serine protease (sspA) transcription in Staphylococcus aureus by sarA, rot and agr (RNAIII)*. International Journal of Medical Microbiology, 2006. **296**(6): p. 365-380.
75. Allard, M., et al., *Transcriptional modulation of some Staphylococcus aureus iron-regulated genes during growth in vitro and in a tissue cage model in vivo*. Microbes and Infection, 2006. **8**(7): p. 1679-1690.
76. Pruneau, M., et al., *Transcriptional analysis of antibiotic resistance and virulence genes in multiresistant hospital-acquired MRSA*. FEMS Immunology & Medical Microbiology, 2011. **63**(1): p. 54-64.
77. Mootz, J.M., et al., *Rot is a key regulator of Staphylococcus aureus biofilm formation*. Molecular Microbiology, 2015.
78. Vuong, C., et al., *Impact of the agr quorum-sensing system on adherence to polystyrene in Staphylococcus aureus*. Journal of Infectious Diseases, 2000. **182**(6): p. 1688-93.
79. Enright, M.C., et al., *The evolutionary history of methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA)*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2002. **99**(11): p. 7687-92.
80. Rehm, S.J. and A. Tice, *Staphylococcus aureus: methicillin-susceptible S. aureus to methicillin-resistant S. aureus and vancomycin-resistant S. aureus*. Clinical Infectious Diseases, 2010. **51 Suppl 2**: p. S176-82.



81. Enright, M.C., et al., *Multilocus sequence typing for characterization of methicillin-resistant and methicillin-susceptible clones of Staphylococcus aureus*. Journal of Clinical Microbiology, 2000. **38**(3): p. 1008-1015.
82. Manton, B., L. Cavalié, and M.-F. Prère, *Evaluation of an immunochromatographic assay for detection of PBP2a on non-Staphylococcus aureus clinical isolates*. Journal of Microbiological Methods, 2015. **112**: p. 46-48.
83. Fishovitz, J., et al., *Penicillin-binding protein 2a of methicillin-resistant Staphylococcus aureus*. IUBMB Life, 2014. **66**(8): p. 572-577.
84. Dumitrescu, O., et al., *Résistance aux antibiotiques chez Staphylococcus aureus: les points-clés en 2010*. Médecine sciences, 2010. **26**(11): p. 943-949.
85. *Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals, Approved Standard-Third Edition*. CLSI document M31-A3, Clinical and Laboratory Standards Institute 2008. **Vol. 28**(No. 8).
86. García-Álvarez, L., et al., *Meticillin-resistant Staphylococcus aureus with a novel mecA homologue in human and bovine populations in the UK and Denmark: a descriptive study*. The Lancet Infectious Diseases, 2011. **11**(8): p. 595-603.
87. Monecke, S., et al., *Detection of mecC-Positive Staphylococcus aureus (CC130-MRSA-XI) in Diseased European Hedgehogs (Erinaceus europaeus) in Sweden*. PloS One, 2013. **8**(6): p. e66166.

88. Laurent, F., et al., *MRSA harboring mecA variant gene mecC, France*. Emerging Infectious Diseases, 2012. **18**(9): p. 1465.
89. Lim, D. and N.C. Strynadka, *Structural basis for the  $\beta$  lactam resistance of PBP2a from methicillin-resistant Staphylococcus aureus*. Nature Structural & Molecular Biology, 2002. **9**(11): p. 870-876.
90. Nikolaidis, I., S. Favini-Stabile, and A. Dessen, *Resistance to antibiotics targeted to the bacterial cell wall*. Protein Science, 2014.
91. Kelley, W.L., et al., *Missense mutations in PBP2A affecting ceftaroline susceptibility detected in epidemic Staphylococcus aureus HA-MRSA clonotypes ST228 and ST247 in Western Switzerland archived since 1998*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2015: p. AAC. 04068-14.
92. Mun, S.-H., et al., *Curcumin Reverse Methicillin Resistance in Staphylococcus aureus*. Molecules, 2014. **19**(11): p. 18283-18295.
93. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Approved Standard- Twentieth Informational Supplement*. CLSI document M 100-S20, Clinical and Laboratory Standards Institute 2010. **Vol. 30**(No. 1).
94. Lindsay, J.A., *Hospital-associated MRSA and antibiotic resistance—What have we learned from genomics?* International Journal of Medical Microbiology, 2013. **303**(6): p. 318-323.
95. Stefani, S., et al., *Meticillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA): global epidemiology and harmonisation of typing methods*. International Journal of Antimicrobial Agents, 2012. **39**(4): p. 273-282.

96. Hallin, M., et al., *Evolutionary relationships between sporadic and epidemic strains of healthcare-associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus*. *Clinical Microbiology and Infection*, 2008. **14**(7): p. 659-669.
97. Portillo, B.C., et al., *Molecular epidemiology and characterization of virulence genes of community-acquired and hospital-acquired methicillin-resistant Staphylococcus aureus isolates in Colombia*. *International Journal of Infectious Diseases*, 2013. **17**(9): p. e744-e749.
98. Schlievert, P.M., et al., *Secreted virulence factor comparison between methicillin-resistant and methicillin-sensitive Staphylococcus aureus, and its relevance to atopic dermatitis*. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2010. **125**(1): p. 39-49.
99. Bubeck Wardenburg, J., et al., *Panton-Valentine Leukocidin Is Not a Virulence Determinant in Murine Models of Community-Associated Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus Disease*. *Journal of Infectious Diseases*, 2008. **198**(8): p. 1166-1170.
100. Uhlemann, A.-C., et al., *Evolution of community-and healthcare-associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus*. *Infection, Genetics and Evolution*, 2014. **21**: p. 563-574.
101. Millar, B.C., et al., *Proposed definitions of community-associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus (CA-MRSA)*. *Journal of Hospital Infections*, 2007. **67**(2): p. 109-13.

102. Diep, B.A. and M. Otto, *The role of virulence determinants in community-associated MRSA pathogenesis*. Trends in Microbiology, 2008. **16**(8): p. 361-369.
103. Chen, C.J. and Y.C. Huang, *New epidemiology of Staphylococcus aureus infection in Asia*. Clinical Microbiology and Infection, 2014. **20**(7): p. 605-623.
104. Muileboom, J., et al., *Community-associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus in northwest Ontario: A five-year report of incidence and antibiotic resistance*. The Canadian Journal of Infectious Diseases & Medical Microbiology, 2013. **24**(2): p. e42.
105. Graveland, H., et al., *Livestock-associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus in animals and humans*. International Journal of Medical Microbiology, 2011. **301**(8): p. 630-634.
106. De Neeling, A., et al., *High prevalence of methicillin resistant Staphylococcus aureus in pigs*. Veterinary Microbiology, 2007. **122**(3): p. 366-372.
107. Cuny, C., R. Köck, and W. Witte, *Livestock associated MRSA (LA-MRSA) and its relevance for humans in Germany*. International Journal of Medical Microbiology, 2013. **303**(6): p. 331-337.
108. Huber, H., et al., *Prevalence and characteristics of methicillin-resistant Staphylococcus aureus in humans in contact with farm animals, in livestock, and in food of animal origin, Switzerland, 2009*. Eurosurveillance 2010. **15**(6): p. pii: 19542.

109. Morcillo, A., et al., *Descriptive Analysis of Antibiotic-Resistant Patterns of Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus (MRSA) st398 Isolated from Healthy Swine*. International Journal of Environmental Research and Public Health, 2015. **12**(1): p. 611-622.
110. Silva, N.C., et al., *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus of lineage ST398 as cause of mastitis in cows*. Letters in Applied Microbiology, 2014.
111. Wulf, M. and A. Voss, *MRSA in livestock animals—an epidemic waiting to happen?* Clinical Microbiology and Infection, 2008. **14**(6): p. 519-521.
112. Price, L.B., et al., *Staphylococcus aureus CC398: host adaptation and emergence of methicillin resistance in livestock*. mBio, 2012. **3**(1): p. e00305-11.
113. Nemati, M., et al., *Antimicrobial resistance of old and recent Staphylococcus aureus isolates from poultry: first detection of livestock-associated methicillin-resistant strain ST398*. Antimicrobial Agents Chemotherapy, 2008. **52**(10): p. 3817-9.
114. Weese, J., B. Avery, and R. Reid-Smith, *Detection and quantification of methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) clones in retail meat products*. Letters in Applied Microbiology, 2010. **51**(3): p. 338-342.
115. Chuang, Y.-Y. and Y.-C. Huang, *Livestock-associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus in Asia: An emerging issue?* International Journal of Antimicrobial Agents, 2014.

116. Casey, J.A., et al., *High-density livestock production and molecularly characterized MRSA infections in Pennsylvania*. Environmental Health Perspectives, 2014. **122**: p. 464-470.
117. Pelletier-Jacques, G., *Étude de la virulence et de la résistance aux antibiotiques des Staphylococcus aureus résistants à la méthicilline chez le porc à l'abattoir au Québec*. mémoire, papyrus. 2012.
118. Jamrozny, D., et al., *Identification of a novel plasmid-associated spectinomycin adenylyltransferase gene spd in methicillin-resistant Staphylococcus aureus ST398 isolated from animal and human sources*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2014. **69**(5): p. 1193-1196.
119. Wendlandt, S., et al., *Two different erm(C)-carrying plasmids in the same methicillin-resistant Staphylococcus aureus CC398 isolate from a broiler farm*. Veterinary Microbiology, 2014. **171**(3-4): p. 382-387.
120. Shore, A.C. and D.C. Coleman, *Staphylococcal cassette chromosome mec: Recent advances and new insights*. International Journal of Medical Microbiology, 2013. **303**(6): p. 350-359.
121. Ito, T., et al., *Guidelines for reporting novel mecA gene homologues*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2012. **56**(10): p. 4997-4999.
122. IWG-SCC, *Classification of staphylococcal cassette chromosome mec (SCCmec): guidelines for reporting novel SCCmec elements*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2009. **53**(12): p. 4961-4967.

123. Shore, A.C., et al., *Detection of staphylococcal cassette chromosome mec type XI carrying highly divergent mecA, mecI, mecR1, blaZ, and ccr genes in human clinical isolates of clonal complex 130 methicillin-resistant Staphylococcus aureus*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2011. **55**(8): p. 3765-3773.
124. Milheiriço, C., D.C. Oliveira, and H. de Lencastre, *Multiplex PCR strategy for subtyping the staphylococcal cassette chromosome mec type IV in methicillin-resistant Staphylococcus aureus: 'SCCmec IV multiplex'*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2007. **60**(1): p. 42-48.
125. Hiramatsu, K., et al., *The emergence and evolution of methicillin-resistant Staphylococcus aureus*. Trends in Microbiology, 2001. **9**(10): p. 486-493.
126. Paterson, G.K., E.M. Harrison, and M.A. Holmes, *The emergence of mecC methicillin-resistant Staphylococcus aureus*. Trends in Microbiology, 2014. **22**(1): p. 42-47.
127. Petersen, A., et al., *Epidemiology of methicillin-resistant Staphylococcus aureus carrying the novel mecC gene in Denmark corroborates a zoonotic reservoir with transmission to humans*. Clinical Microbiology and Infection, 2013. **19**(1): p. E16-E22.
128. Cuny, C., et al., *Rare occurrence of methicillin-resistant Staphylococcus aureus CC130 with a novel mecA homologue in humans in Germany*. PloS One, 2011. **6**(9): p. e24360.

129. Zhang, K., et al., *Novel multiplex PCR assay for characterization and concomitant subtyping of staphylococcal cassette chromosome mec types I to V in methicillin-resistant Staphylococcus aureus*. *Journal of Clinical Microbiology*, 2005. **43**(10): p. 5026-33.
130. Oliveira, D.C. and H. de Lencastre, *Multiplex PCR strategy for rapid identification of structural types and variants of the mec element in methicillin-resistant Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2002. **46**(7): p. 2155-2161.
131. Milheirico, C., D.C. Oliveira, and H. de Lencastre, *Update to the multiplex PCR strategy for assignment of mec element types in Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2007. **51**(9): p. 3374-7.
132. Kondo, Y., et al., *Combination of multiplex PCRs for staphylococcal cassette chromosome mec type assignment: rapid identification system for mec, ccr, and major differences in junkyard regions*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2007. **51**(1): p. 264-274.
133. Maiden, M.C., et al., *Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1998. **95**(6): p. 3140-3145.
134. Deurenberg, R.H. and E.E. Stobberingh, *The evolution of Staphylococcus aureus*. *Infection, Genetics and Evolution*, 2008. **8**(6): p. 747-763.



135. Frenay, H., et al., *Molecular typing of methicillin-resistant Staphylococcus aureus on the basis of protein A gene polymorphism*. European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 1996. **15**(1): p. 60-64.
136. Koreen, L., et al., *spa typing method for discriminating among Staphylococcus aureus isolates: implications for use of a single marker to detect genetic micro- and macrovariation*. Journal of Clinical Microbiology, 2004. **42**(2): p. 792-799.
137. Weese, J.S. and E. van Duijkeren, *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus and Staphylococcus pseudintermedius in veterinary medicine*. Veterinary Microbiology, 2010. **140**(3-4): p. 418-29.
138. Wulf, M. and A. Voss, *MRSA in livestock animals-an epidemic waiting to happen?* Clinical Microbiology and Infection, 2008. **14**(6): p. 519-21.
139. Khanna, T., et al., *Methicillin resistant Staphylococcus aureus colonization in pigs and pig farmers*. Veterinary Microbiology, 2008. **128**(3-4): p. 298-303.
140. van Cleef, B.A., et al., *Prevalence of livestock-associated MRSA in communities with high pig-densities in The Netherlands*. PLoS One, 2010. **5**(2): p. e9385.
141. Van Wamel, W., et al., *Short term micro-evolution and PCR-detection of methicillin-resistant and-susceptible Staphylococcus aureus sequence type 398*. European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases, 2010. **29**(1): p. 119-122.
142. Tavakol, M., et al., *Bovine-associated MRSA ST398 in the Netherlands*. Acta Veterinaria Scandinavica, 2012. **54**: p. 28.

143. Liu, D., et al., *Formation and transmission of Staphylococcus aureus (including MRSA) aerosols carrying antibiotic-resistant genes in a poultry farming environment*. Science of the Total Environment, 2012. **426**: p. 139-45.
144. Hanning, I., et al., *Characterization of Staphylococcus aureus isolates from retail chicken carcasses and pet workers in Northwest Arkansas*. Journal of Food Protection, 2012. **75**(1): p. 174-8.
145. Mulders, M.N., et al., *Prevalence of livestock-associated MRSA in broiler flocks and risk factors for slaughterhouse personnel in The Netherlands*. Epidemiology and Infection, 2010. **138**(5): p. 743-55.
146. Geenen, P., et al., *Prevalence of livestock-associated MRSA on Dutch broiler farms and in people living and/or working on these farms*. Epidemiology and Infection, 2013. **141**(05): p. 1099-1108.
147. Ho, P.-L., et al., *Clonality and antimicrobial susceptibility of Staphylococcus aureus and methicillin-resistant S. aureus isolates from food animals and other animals*. Journal of Clinical Microbiology, 2012. **50**(11): p. 3735-3737.
148. de Boer, E., et al., *Prevalence of methicillin-resistant Staphylococcus aureus in meat*. International Journal of Food Microbiology, 2009. **134**(1-2): p. 52-6.
149. Lozano, C., et al., *Detection of methicillin-resistant Staphylococcus aureus ST398 in food samples of animal origin in Spain*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2009. **64**(6): p. 1325-1326.

150. Gundogan, N., et al., *A note on the incidence and antibiotic resistance of Staphylococcus aureus isolated from meat and chicken samples*. Meat Science, 2005. **69**(4): p. 807-810.
151. Zarfel, G., et al., *Multiresistant Bacteria Isolated from Chicken Meat in Austria*. International Journal of Environmental Research and Public Health, 2014. **11**(12): p. 12582-12593.
152. *Surveillance for Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus: Principles, Practices, and Challenges; A Report*. CLSI document X07-R, Clinical and Laboratory Standards Institute 2010. **Vol. 30**(No. 5).
153. Hanson, B.M., et al., *Prevalence of Staphylococcus aureus and methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) on retail meat in Iowa*. Journal of Infection and Public Health, 2011. **4**(4): p. 169-74.
154. Buyukcangaz, E., et al., *Molecular Typing of Staphylococcus aureus and Methicillin-Resistant S. aureus (MRSA) Isolated from Animals and Retail Meat in North Dakota, United States*. Foodborne Pathogens and Disease, 2013. **10**(7): p. 608-617.
155. Waters, A.E., et al., *Multidrug-Resistant Staphylococcus aureus in US Meat and Poultry*. Clinical Infectious Diseases, 2011. **52**(10): p. 1227-30.
156. Bhargava, K., et al., *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus in retail meat, Detroit, Michigan, USA*. Emerging Infectious Diseases, 2011. **17**(6): p. 1135.

157. Kitai, S., et al., *Characterization of methicillin-resistant Staphylococcus aureus isolated from retail raw chicken meat in Japan*. Journal of Veterinary Medical Science, 2005. **67**(1): p. 107-10.
158. Kwon, N.H., et al., *Characteristics of methicillin resistant Staphylococcus aureus isolated from chicken meat and hospitalized dogs in Korea and their epidemiological relatedness*. Veterinary Microbiology, 2006. **117**(2-4): p. 304-12.
159. Lim, S.-K., et al., *Prevalence and characterization of methicillin-resistant Staphylococcus aureus in raw meat in Korea*. Journal of Microbiology and Biotechnology, 2010. **20**(4): p. 775-778.
160. Moon, D.C., et al., *Identification of Livestock-Associated Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus Isolates in Korea and Molecular Comparison Between Isolates from Animal Carcasses and Slaughterhouse Workers*. Foodborne Pathogens and Disease, 2015. **12**(4): p. 327-334.
161. Wang, X., et al., *Staphylococcus aureus and methicillin-resistant Staphylococcus aureus in retail raw chicken in China*. Food Control, 2013. **29**(1): p. 103-106.
162. Boost, M.V., et al., *Isolation of methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) from retail meats in Hong Kong*. Foodborne Pathogens and Disease, 2013. **10**(8): p. 705-710.
163. He, W., et al., *Food-Animal Related Staphylococcus aureus Multidrug-Resistant ST9 Strains with Toxin Genes*. Foodborne pathogens and disease, 2013. **10**(9): p. 782-788.

164. Wang, X., et al., *Antimicrobial susceptibility and molecular typing of methicillin-resistant staphylococcus aureus in retail foods in Shaanxi, China*. Foodborne Pathogens and Disease, 2014. **11**(4): p. 281-286.
165. Weese, J.S., et al., *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) contamination of retail pork*. Canadian Veterinary Journal, 2010. **51**(7): p. 749-52.
166. Roberts, M.C., S. Schwarz, and H.J. Aarts, *Erratum: Acquired antibiotic resistance genes: an overview*. Frontiers in Microbiology, 2012. **3**.
167. Sanchini, A., et al., *DNA microarray-based characterisation of Pantone-Valentine leukocidin-positive community-acquired methicillin-resistant Staphylococcus aureus from Italy*. European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases, 2011. **30**(11): p. 1399-1408.
168. Özekinci, T., et al., *Panton-Valentine leukocidin in community and hospital-acquired Staphylococcus aureus strains*. Biotechnology & Biotechnological Equipment, 2014. **28**(6): p. 1089-1094.
169. Dufour, P., et al., *Community-acquired methicillin-resistant Staphylococcus aureus infections in France: emergence of a single clone that produces Pantone-Valentine leukocidin*. Clinical Infectious Diseases, 2002. **35**(7): p. 819-24.
170. Nicholson, T.L., et al., *Livestock-associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus (LA-MRSA) isolates of swine origin form robust biofilms*. PloS One, 2013. **8**(8): p. e73376.

171. Lina, G., et al., *Bacterial competition for human nasal cavity colonization: role of Staphylococcal agr alleles*. Applied and Environmental Microbiology, 2003. **69**(1): p. 18-23.
172. Hellmark, B., et al., *Comparison of Staphylococcus epidermidis isolated from prosthetic joint infections and commensal isolates in regard to antibiotic susceptibility, agr type, biofilm production, and epidemiology*. International Journal of Medical Microbiology, 2013. **303**(1): p. 32-39.
173. Melchior, M., et al., *Biofilm formation and genotyping of Staphylococcus aureus bovine mastitis isolates: Evidence for lack of penicillin-resistance in Agr-type II strains*. Veterinary Microbiology, 2009. **137**(1): p. 83-89.
174. Osadebe, L., et al., *Prevalence and characteristics of Staphylococcus aureus in Connecticut swine and swine farmers*. Zoonoses and Public Health, 2013. **60**(3): p. 234-243.
175. Dressler, A., et al., *Prevalence, antibiotic resistance and molecular characterisation of Staphylococcus aureus in pigs at agricultural fairs in the USA*. Veterinary Record, 2012. **170**(19): p. 495-495.
176. Snyder, H.L., S.E. Niebuhr, and J.S. Dickson, *Transfer of methicillin-resistant Staphylococcus aureus from retail pork products onto food contact surfaces and the potential for consumer exposure*. Journal of Food Protection, 2013. **76**(12): p. 2087-2092.
177. Pletinckx, L., et al., *Screening of poultry-pig farms for methicillin-resistant Staphylococcus aureus: Sampling methodology and within herd prevalence in*

- broiler flocks and pigs*. Infection, Genetics and Evolution, 2011. **11**(8): p. 2133-2137.
178. Van Loo, I.H., et al., *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus in meat products, the Netherlands*. Emerging Infectious Diseases, 2007. **13**(11): p. 1753.
179. Liu, W., et al., *The prevalence and influencing factors of methicillin-resistant Staphylococcus aureus carriage in people in contact with livestock: A systematic review*. American Journal of Infection Control, 2015. **43**(5): p. 469-475.
180. Voss, A., et al., *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus in pig farming*. Emerging Infectious Diseases, 2005. **11**(12): p. 1965-1966.
181. Vandendriessche, S., et al., *Prevalence, risk factors and genetic diversity of methicillin-resistant Staphylococcus aureus carried by humans and animals across livestock production sectors*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2013: p. dkt047.

## **Publications et communications**



## **Publications**

Bernier-Lachance J., Évaluer la présence de *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline dans la volaille au Québec, AMQ-info, 2015 (article en préparation)

Bernier-Lachance J., V. Usongo, É. Parent, J. Labrie, J. Arsenault, M. Jacques, F. Malouin, and M. Archambault, *Prevalence and characteristics of Livestock-Associated Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus (LA-MRSA) from chicken meat and poultry from the province of Quebec, Canada*, 2015 (article en préparation)

## **Présentations scientifiques**

Bernier-Lachance J., V. Usongo, J. Labrie, É. Parent, J. Arsenault, M. Jacques, F. Malouin, and M. Archambault, *Prevalence and antibiotic resistance of livestock-associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus (LA-MRSA) from chicken meat and poultry from the Province of Quebec*, 8<sup>e</sup> Symposium du CRIPA, 2015, Saint-Hyacinthe, Qc, Canada

Bernier-Lachance J., V. Usongo, J. Labrie, É. Parent, J. Arsenault, M. Jacques, F. Malouin, and M. Archambault. *Prevalence and antibiotic resistance of livestock-associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus (LA-MRSA) from chicken meat and poultry from the Province of Quebec*, 4th ASM Conference on Antimicrobial Resistance in Zoonotic Bacteria and Foodborne Pathogens, 2015, Washington D.C., United States

Bernier-Lachance J., J. Labrie, M. Boulianne, J. Arsenault, M. Jacques, F. Malouin, and M. Archambault. *Prevalence and antibiotic resistance of livestock-associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus from chicken meat*. 7<sup>e</sup> Symposium du CRIPA, 2014, Saint-Hyacinthe, Qc, Canada