

Université de Montréal

**ÉTUDE SUR LE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* RÉSISTANT À LA
MÉTHICILLINE CHEZ LE PORC À L'ABATTOIR AU QUÉBEC,
CANADA**

par

MICHAEL BEAUDRY-FERLAND

Département de pathologie et 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

Août, 2011

© Michael Beaudry Ferland, 2011

Université de Montréal
Faculté de Médecine Vétérinaire

Ce mémoire intitulé :

**ÉTUDE SUR LE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* RÉSISTANT À LA
MÉTHICILLINE CHEZ LE PORC À L'ABATTOIR AU QUÉBEC,
CANADA**

présenté par :

Michael Beaudry-Ferland

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes:

Dr. Daniel Dubreuil, président-rapporteur

Dr. Marie Archambault, directrice de recherche

Dr. Ann Letellier et Dr. François Malouin, codirecteurs

Dr. Daniel Perron, membre du jury

RÉSUMÉ

Le *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline (SARM) est un pathogène important qui a été identifié comme agent d'infection chez les animaux d'élevage et les travailleurs exposés à ces animaux. Au Canada, très peu d'informations sont disponibles concernant les SARMs d'origine porcine. L'objectif de cette étude était de déterminer la prévalence des SARMs provenant de porcs à l'abattoir, de caractériser leur résistance aux antibiotiques ainsi que d'évaluer le niveau de séroconversion des porcs envers le *S. aureus* chez les animaux porteurs ou non du SARM. Un total de 107 isolats ont été identifiés positifs aux SARMs sur 660 échantillons. La prévalence de SARMs à l'abattoir A était de 30,8% et de 23,8% à l'abattoir B. La susceptibilité aux antibiotiques a été déterminée en utilisant la méthode de micro-dilution de Sensititre. Tous les isolats ont démontré une sensibilité envers la ciprofloxacine, la gatifloxacine, la gentamicine, la lévofloxacine, le linézolide, la quinupristine/dalfopristine, la rifampicine, la streptomycine, le triméthoprime/sulfaméthoxazole et la vancomycine. De la résistance a été observée envers la daptomycine (0,93%), l'érythromycine (29%), la clindamycine (29%), la tétracycline (98,1%). De plus, 30% des SARMs isolés étaient résistants à plus de deux antibiotiques autres que les β -lactamines. Par typage, deux clones prédominants ont été obtenus ainsi que deux types de SCCmec (type V et possiblement un nouveau type comprenant les cassettes III et IVb). 15 clones ont été identifiés par typage MLVA, comprenant les clones prédominants VI (40.1%; 43/107) et XI (17.7%; 19/107). Deux souches de SARMs ont été caractérisées par biopuce à ADN et des gènes d'antibiorésistance, de typage (SCCmec et MLST) et de virulence ont été identifiés. Sans considération pour le site de colonisation, les porcs SA-/MRSA- ($n=34$) et les porcs SA+ ($n=194$) montrent, respectivement, des taux de séroconversion de 20.6% et 32.5%. Les porcs colonisés par un SARM à un site de

prélèvement et non colonisés par un SA à l'autre site ($n=18$) montrent une séroconversion (5.6%) significativement ($P < 0.05$) plus faible comparativement aux porcs colonisés par SA à un ou deux sites de prélèvement et n'ayant pas de SARM. Nos résultats démontrent que les porcs provenant d'abattoir peuvent être colonisés par des SARMs multi-résistants aux antibiotiques. De plus, ces SARMs sont possiblement capable de coloniser leurs hôtes sans stimuler la production d'anticorps et ce par l'atténuation de la réponse immunitaire ou par la colonisation de porcs qui sont moins immunocompétents.

Mots-clés: *Staphylococcus aureus* Résistant à la méthicilline (SARM), porc, typage, MLVA, SCCmec, antibiotique, abattoir, multi-résistance, Canada

SUMMARY

Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) found in food producing animals is a major public health concern. Transmission to humans has been reported and MRSA represents a reservoir of antimicrobial resistance genes. Little is known on how MRSA successfully establishes colonization and how it is able to persist in the host. This study was conducted to determine the occurrence and the antimicrobial resistance profile of MRSA from abattoir pigs and their level of seroconversion toward *S. aureus* (SA). A total of 107 isolates were identified as MRSA from 660 samples. Antimicrobial susceptibilities were determined by broth microdilutions. Fifteen clones were identified by MLVA with clones VI (40.1%; 43/107) and XI (17.7%; 19/107) being the most predominant. All MRSA isolates were *pvl*-, *tst*-, *eta*- and *etb*-negative. Most isolates were SCC mec type V (70.1%; 75/107). All MRSA isolates were susceptible to ciprofloxacin, gatifloxacin, gentamicin, levofloxacin, linezolid, quinupristin/dalfopristin, rifampin, streptomycin, trimethoprim/sulfamethoxazole and vancomycin. However, resistance was observed toward clindamycin (29%), daptomycin (0.9%), erythromycin (29%) and tetracycline (98.1%). Multi-resistance was confirmed in MRSA since 28% of all isolates were resistant toward three antimicrobials other than β -lactams. The effect of MRSA carriage on seroconversion was examined to see whether the host responded differently to MRSA or SA colonization. The presence of SA-specific antibodies in pig serums was measured for each animal using indirect ELISA and a mixture of two widespread SA antigens (IsdH [HarA] and IsdB). Regardless of the colonization site, SA-/MRSA- pigs ($n=34$) and SA+ pigs ($n=194$) showed 20.6% and 32.5% seroconversion, respectively. Notably, pigs colonized by MRSA at one body site and no SA at the other sampling site ($n=18$) showed a significantly lower (5.6%) seroconversion ($P < 0.05$) compared to pigs colonized by SA at one or both

sites without MRSA. The findings of the study show that the nares and axillae of abattoir pigs can harbor MRSA strains with multiple antimicrobial resistances. In addition, these MRSA were possibly able to colonize the host either without stimulating antibody production, by attenuating the immune response or by colonizing pigs that are less immunocompetent. This may explain the success of MRSA colonization and persistence in pigs. Further studies are required to better elucidate MRSA colonization in abattoir pigs and their public health risk.

Key-word: Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), pig, antimicrobial, typing, MLVA, SCC*mec*, abattoirs, multi-resistance, Canada

TABLE DES MATIÈRES

RESUME	iii
SUMMARY	v
LISTE DES TABLEAUX.....	ix
LISTE DES FIGURES	x
LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS	xi
REMERCIEMENTS.....	xii
1. INTRODUCTION	1
2. RECENSION DES ÉCRITS.....	4
2.1 <i>Staphylococcus aureus</i>	5
2.1.1 Caractéristiques du genre et de l'espèce	5
2.1.2 Facteurs de virulence.....	7
2.2 <i>Staphylococcus aureus</i> résistant à la méthicilline (SARM).....	13
2.2.1 Caractéristiques générales	13
2.2.2 Méthodes de typage moléculaire.....	19
2.2.3 Séroconversion de l'hôte.....	23
2.3 SARM chez les animaux.....	26
2.3.1 SARM chez le porc à la ferme	28
2.3.2 SARM chez le porc d'abattoir, dans la viande et les produits alimentaires.....	40
2.3.3 Antibiotiques et antibiorésistances.....	46
ARTICLES SCIENTIFIQUES	56
Antimicrobial Resistance and Microarray-Based Characterization of Methicillin-Resistant <i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA) Strains from Nasal and Axillary Skin Samples from Abattoir pigs in Québec, Canada	

3. DISCUSSION GÉNÉRALE85

4. CONCLUSION ET PERSPECTIVES96

5. SOURCES DOCUMENTAIRES xiv

6. PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS xxvii

LISTE DES TABLEAUX

Recension de la littérature

Tableau I : Les SARMs retrouvés dans des fermes porcines de différent pays. (page 39)

Tableau II : Les SARMs retrouvés dans certaines viandes et produits alimentaires de différent pays. (page 45)

Tableau III : Les résistances phénotypiques et génotypiques rapportées chez les SARMs d'origine porcine (page 55)

Article Scientifique

Table 1. Antimicrobial resistance of our isolates based on MICs for pig MRSA ($n = 107$) with the MIC₅₀ and the MIC₉₀ for each antimicrobial. (page 78)

Table 2. Pig MRSA antimicrobial resistance phenotypes other than beta-lactams (page 79)

Table 3. Associations between the two predominant MLVA clones in porcine MRSA with abattoirs, SCC*mec* types and antimicrobial resistance other than beta-lactams. (page 80)

LISTE DES FIGURES

Recension de la littérature

Figure 1: Schématisation des quelques facteurs de virulence de *S. aureus*. (page 7)

Figure 2: Schéma de l'action des pénicillines se liant au site de transpeptidation d'une PBP inactivant ainsi l'enzyme. (page 15)

Article Scientifique

Fig. 1. MLVA patterns were analysed using BioNumerics software with Dice correlation (optimization 0.6%, band filtering tolerance 1%, cut-off 80%) (page 81)

Fig. 2. Presence of genes encoding antimicrobial resistance, enterotoxins, leukocidins, hemolysins, aureolysins, serine protease, staphopains, capsule and biofilm among the two MRSA strains examined by DNA microarray analysis. A grey box indicates presence of the gene (page 82)

Fig. 3. Percentage of positive serums in animal groups colonized by MRSA compared to others. (page 83)

LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

aa : Acide aminé

ADN : Acide désoxyribonucléique

CMI: Concentration Minimale Inhibitrice

ETA: Toxine Exfoliative A

ETB: Toxine Exfoliative B

Ig: Immunoglobuline

LA-MRSA : SARM associés aux animaux

MLST: ‘Multiple-Locus Sequence Typing’

MLVA: ‘Multiple-Locus Variable-Number Tandem Repeat Analysis’

NaCl: Chlorure de Sodium

PCR: ‘Polymerase Chain Reaction’

PBP: ‘Penicilline Binding Protein’ (protéine liant la pénicilline)

PFGE : ‘Pulsed Field Gel Electrophoresis’ (Électrophorèse à champs pulsé)

PVL: ‘Panton-Valentine Leukocidine’

SARM : *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline

SCC*mec*: ‘Staphylococcal Cassette Chromosome *mec*’

SE: ‘Staphylococcal Enterotoxins’

SSSS: ‘Staphylococcal Scalded Skin Syndrome’

TST: Toxine du Choc Toxique

VNTR : ‘Variable-Number Tandem Repeat’

REMERCIEMENTS

Merci à Dre. Marie Archambault, ma directrice de maîtrise, de m'avoir accueilli dans son laboratoire et de m'avoir épaulé tout au long de ma maîtrise.

Merci à mon co-directeur et ma co-directrice, Dr. François Malouin et Dre. Ann Letellier, pour leur supervision, leurs conseils et pour avoir été présents lorsque j'en avais besoin.

Merci à Cindy-Love Tremblay, Audrey Charlebois et Geneviève Pelletier-Jacques pour votre aide, vos conseils et votre patience.

Merci aux membres de mon comité conseil et aux membres du jury d'évaluation de ce mémoire.

Merci aux professeurs, aux étudiants et aux membres du personnel du GREMIP pour leurs soutiens, leur aide scientifique et leurs commentaires.

Merci au Centre de Recherche en Infectiologie porcine (CRIP) et au Canadian Pork Council (CPC) pour leur contribution financière au projet.

1. INTRODUCTION

Les *Staphylococcus aureus* résistants à la méthicilline (SARM) sont des bactéries qui ont une grande importance en médecine humaine. Les souches de SARM sont résistantes à tous les antibiotiques de la famille des bêta-lactamines. De plus, les SARM sont souvent résistants à un grand nombre d'autres antibiotiques. Étant des pathogènes nosocomiaux et communautaires, les SARMs sont la cause de plusieurs inquiétudes pour les agences de santé publique. Le traitement des infections à SARM est beaucoup plus onéreux que celui d'une infection à *S. aureus*. Des études ont démontré qu'aux États-Unis le coût d'hospitalisation d'un patient atteint d'un SARM est deux fois plus élevé que celui d'un patient ayant du *S. aureus* susceptible à la méthicilline (89). Au Canada, une étude a également démontré que le coût annuel associé à SARM dans les hôpitaux varie entre 42 et 59 millions de dollars (75).

Plusieurs recherches démontrent la présence de SARM chez des animaux d'élevage, principalement chez le porc et les veaux de boucherie (23, 85, 140, 143). Des SARMs ont également été détectés chez des animaux de compagnie et le cheval, des transmissions entre des humains et des animaux colonisés ont été rapportées (23, 36, 59, 144). Il a par ailleurs été démontré que les personnes en contact avec des animaux de fermes, spécialement les porcs, sont plus fréquemment porteurs de SARM que celles n'ayant pas de contact avec ces animaux (145, 150). Dans plusieurs pays, le contact avec des porcs est d'ailleurs considéré comme un facteur de risque pour la colonisation des humains par SARM (23, 138). Des études ont également démontré la possibilité de transmission de SARM entre des porcs, des éleveurs de porcs et les membres de la famille de ceux-ci (9, 23). Plusieurs cas d'éleveurs de porcs porteurs de SARM ont été

rapportés ces dernières années et ce dans différents pays que ce soit dans des études de cas cliniques ou de prévalence des SARM (31, 51, 86, 104, 110, 138).

Les SARMs d'origine porcine ont également été retrouvés dans des cas d'infections humaines, comme des infections de la peau (10, 23) et des infections beaucoup plus préoccupantes telles que les infections des tissus mous (36), des otomastoïdites destructives (144) et des pneumonies sévères (59).

Le présent travail vise à déterminer la prévalence des SARMs provenant de porcs à l'abattoir, ainsi que de caractériser leur résistance aux antibiotiques et d'évaluer le niveau de séroconversion des porcs envers les SARMs.

2. RECENSION DES ÉCRITS

2.1 *Staphylococcus aureus*

2.1.1 Caractéristiques du genre et de l'espèce

Les staphylocoques ont été décrits pour la première fois dans les années 1880, en Écosse, par un chirurgien nommé Sir Alexander Ogston, qui créa le genre *Staphylococcus* (26, 91). Ce genre comprend des coques à Gram positif de 0,8 à 1 micromètre de diamètre (114). En microscopie, ces bactéries peuvent être observées isolées, en paires ou en tétrades, mais le plus souvent ce sont des amas ressemblant à des grappes (114). Les staphylocoques sont non-mobiles, ne forment pas de spores et sont généralement anaérobies facultatifs (114, 131). Les *Staphylococcus* sont également de forts producteurs de catalase, cette caractéristique permet de les différencier facilement des *Streptococcus* qui sont catalase négatifs (26, 131). Ils sont résistants à la bacitracine et aux conditions adverses telles que la concentration en NaCl, la chaleur, les désinfectants et la présence de lysozyme. Ces caractéristiques jouent un rôle important dans la pathogénicité de ces bactéries (26, 114, 131, 136).

Sir Alexander Ogston fut le premier, vers 1880, à décrire des infections à staphylocoques plus précisément des septicémies et la formation d'abcès (91). Louis Pasteur observa également ce type d'infection durant cette même période (26). Cependant, c'est en 1884 qu'un autre chirurgien, le Dr. Rosenbach, nommera les tous premiers *Staphylococcus aureus* d'après la pigmentation dorée des colonies en culture pure obtenues d'isolats de lésions purulentes. Il est probablement le premier à avoir isolé *S. aureus* en culture pure (26).

Les *S. aureus* font partie de la flore commensale d'environ le tiers de la population américaine (130). Ils colonisent principalement le nez, mais peuvent se retrouver sur la peau et dans le système gastro-intestinal (131). Ces bactéries sont présentes dans divers environnements et sont différenciées des autres *Staphylococcus* par le fait qu'elles sont catalase positifs et provoquent une double zone d'hémolyse lorsque cultivées sur gélose sang (26, 114). Les *S. aureus* sont des bactéries anaérobies facultatives ayant une meilleure croissance dans des conditions aérobiques (26, 131). Les souches vont croître à des températures très variables allant de 6,5 à 46°C et des pH entre 4,5 et 9,3. La température optimale de croissance se situe entre 30 et 37°C et le pH entre 7,0 et 7,5 (26, 131). La plupart des souches vont croître en présence de concentrations en chlorure de sodium allant jusqu'à 15% (26, 131).

Les staphylocoques sont une part non négligeable de la flore normale nasale, mucoale, cutanée et digestive des humains et des animaux. Par contre, certaines espèces peuvent être des pathogènes opportunistes. Ils sont généralement associés à la formation d'abcès et de lésions suppuratives. Ils sont également une cause importante de toxi-infections alimentaires (26, 114). En médecine vétérinaire, les staphylocoques causent d'importantes mammites bovines (26, 119). En médecine humaine, les *S. aureus* sont associés à plusieurs infections, dont des infections cutanées (plaies), des intoxications alimentaires, des septicémies, des endocardites, des pneumonies et des complications post-opératoires importantes telles des ostéomyélites (80, 122). Ils causent également

plusieurs types d'infections en médecine vétérinaire notamment des abcès, des mammites, des infections cutanées, des otites et des infections urinaires (80).

2.1.2 Facteurs de virulence

Les *S. aureus* ont la capacité d'infecter un humain ou un animal d'une multitude de façons. Un des gènes importants dans la régulation de la virulence est le gène accessoire (*agr*) qui est un régulateur global des virulons, incluant des facteurs sécrétés comme des hémolysines et des facteurs de surface comme des coagulases et protéines de liaison (137). La diversité dans le pouvoir pathogène des *S. aureus* provient du fait qu'ils peuvent avoir plusieurs facteurs de virulence (Fig. 1)

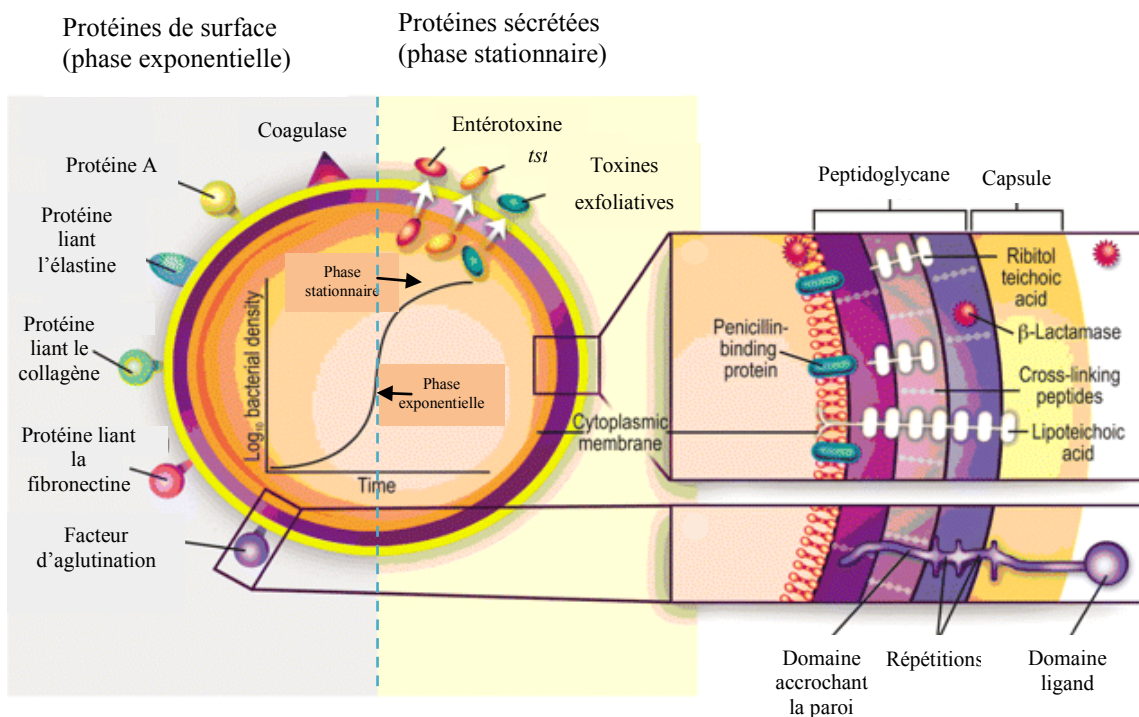


Figure 1: Schématisation des quelques facteurs de virulence de *S. aureus*.

Adaptée de Gordon et Lowy, 2008, Clin. Infects. Dis. (54)

Un de ces facteurs de virulence est la protéine A située dans la paroi de la bactérie. Cette protéine fixe les immunoglobulines G (IgG) par leur extrémité Fc empêchant ainsi l'interaction du complément avec les IgG fixées (91, 114, 122). Cette bactérie peut également posséder des enzymes appelés coagulases. Celles-ci ont la capacité de faire coaguler le fibrinogène dans le plasma. Le caillot ainsi formé protège la bactérie contre la phagocytose et l'isole des autres défenses du corps (114, 131). Deux types de coagulase peuvent être présentes chez *S. aureus*, soit la coagulase libre (staphylocoagulase) qui réagit positivement au test de coagulation en tube et la coagulase liée (clumping factor) qui réagit au test de coagulation sur lame (131). Les staphylocoagulases sont sécrétées dans le milieu environnant tandis que les coagulases liées se retrouvent à la surface de la bactérie. Les *S. aureus* peuvent également posséder la staphylokinase, une protéine qui se fixe au plasminogène et active la production de plasmine qui digère la fibrine des caillots, permettant ainsi aux bactéries de quitter la zone du caillot (114, 131). Plusieurs facteurs d'attachement peuvent également être présents dont des protéines liant le collagène (collagen-binding protein), d'autres liant la fibronectine (fibronectin-binding protein) ou encore liant l'élastine (elastin-binding protein) (122). Toutes ces protéines ont pour but l'attachement de la bactérie aux protéines tissulaires de l'hôte.

Plusieurs souches de *S. aureus* ont également la possibilité de produire des superantigènes, dont la toxine du choc toxique (TSST ou Tst) et des entérotoxines (Staphylococcal enterotoxins, SEs). Si elles sont ingérées, ces dernières peuvent

causer des symptômes d'empoisonnement alimentaire à staphylocoque. Il existe un grand nombre d'entérotoxines produites par *S. aureus*. Les plus connues sont celles dites prototypiques, c'est-à-dire les plus représentatives ou celles rencontrées les plus couramment. Ce sont les entérotoxines A, B, C, D et E (SEA, SEB, SEC, SED et SEE) (5, 122). La toxine C peut être présente sous trois formes qui se distinguent par leurs points isoélectriques et leur antigénicité (C₁, C₂ et C₃) (122, 131). Les entérotoxines produites par *S. aureus* sont codées par des gènes appelés *ent* (pour entérotoxines). Ces toxines, lorsque ingérées et présentes dans l'estomac vont stimuler les nerfs des réflexes vomitifs (122). Des douleurs abdominales ainsi que des vomissements sont les symptômes les plus fréquemment associés aux empoisonnements alimentaires à *S. aureus* (122). Ces empoisonnements ne sont généralement pas fatals, mais les symptômes apparaissent rapidement après l'ingestion de nourriture contaminée, habituellement quelques heures et persistent un jour ou deux (122). Le gène codant pour l'entérotoxine A, *entA*, est porté par un bactériophage tandis que les autres gènes codants pour les SEs sont situés sur des plasmides (122). Le gène *tst*, codant pour la toxine TSST est quant à lui, situé sur un bactériophage comme le gène *entA*. Lorsque la toxine TSST est dans la circulation sanguine, elle se lie à toutes les régions variables des cellules T β 2-positives, causant une expansion des cellules T clonales indépendamment de leur spécification antigénique et de ce fait, un relâchement massif de cytokines (TNF α , β , IL-1, 6, IFN- γ) par les macrophages et les cellules T causant ainsi un choc toxique pouvant entraîner même la mort (91, 122).

Quelques souches peuvent également produire des toxines exfoliatives (ETs) qui ont pour cible l'épiderme (clivage intradermique). Il existe plusieurs ETs, mais ce sont les toxines ETA et ETB qui sont responsables de la majorité des cas humains (83). Les toxines ETA et ETB peuvent agir ensemble ou indépendamment pour produire le syndrome d'exfoliation généralisé (syndrome de la peau ébouillantée chez l'enfant ou syndrome de Ritter chez le nouveau-né) (Staphylococcal scalded skin syndrome, SSSS) (99, 122). Environ 5% des souches de *S. aureus* produiraient des toxines exfoliatives (83). Ces toxines sont des exoprotéines qui favoriseraient la dissémination de la bactérie en créant des dommages à l'épiderme protecteur permettant à la bactérie de se propager et d'envahir les tissus plus profonds (83, 122). La cible de ces toxines semblerait être la desmogléine-1, une glycoprotéine exprimée par les kératinocytes de la couche granuleuse de l'épiderme, qui joue un rôle important dans le maintien de l'adhésion cellule à cellule dans l'épiderme superficiel (83, 122). La sévérité des lésions de la peau varie de simples cloques localisées à une exfoliation généralisée affectant tout le corps dépendant de la présence ou de l'absence d'anticorps protecteurs antitoxines (83). Les cas de SSSS sont le plus souvent observés chez de jeunes enfants, mais peuvent également être associés aux adultes qui ont des problèmes médicaux comme une immunodéficience ou une défaillance rénale (mauvaise élimination des toxines par les reins) (83). Chez l'enfant, le taux de mortalité est relativement bas (5%) mais ce taux peut atteindre 50% chez l'adulte malgré les traitements aux antibiotiques (83).

Les *S. aureus* peuvent également sécréter des hémolysines. Les *Staphylococcus* peuvent produire au moins quatre différentes hémolysines, soit l'alpha, la bêta, la gamma et la delta (26, 131). Pour ce qui est des *S. aureus*, la plupart des souches vont sécréter les hémolysines (toxines) alpha, bêta et delta (26). Elles vont former des pores au niveau de la membrane des globules rouges et autres types cellulaires et ainsi rendre disponibles plusieurs nutriments pour la bactérie (131). L'alpha toxine est une exoprotéine qui peut être présente chez les *S. aureus*. Elle peut détruire les neutrophiles ou diminuer leur capacité à attaquer la bactérie (122). Cette toxine est une protéine sécrétée ayant des propriétés hémolytiques, cytotoxiques, dermonécrotiques et létales pour les plaquettes sanguines, les monocytes et les cellules épithéliales (16). Elle est responsable de la zone claire de l'hémolyse bêta lorsque la bactérie est cultivée sur gélose sang (16). L'alpha toxine forme des pores dans la membrane cellulaire des cellules humaines et favorise la dissémination des bactéries à distance. En causant ainsi des dommages à la cellule, elle déclenche la production de cytokines et contribue ainsi au choc toxique lors de l'infection (122). Elle est considérée comme l'un des agents bactériens toxiques le plus largement rencontré par l'organisme humain (16). Les gènes codant pour cette toxine sont quant à eux situés sur le chromosome bactérien (16).

Une autre toxine extracellulaire formant des pores est la leucocidine ou leucocidine de panton-valentin (PVL). Elle endommage la membrane des cellules de mammifères et est capable de détruire les leucocytes (55, 122). Elle a donc une

action leucotoxique et dermonécrotique. La présence des gènes codant pour PVL est associée avec des syndrômes de lésions nécrotiques de la peau (furuncles) et des pneumonies nécrosantes sévères (55). La leucocidine est constituée de deux composantes, S et F. La composante S se lie au ganglioside G_{m1} et a une activité enzymatique d'ADP-ribosylante de protéines impliquées dans le métabolisme des phospholipides (55). La composante F a également une activité enzymatique d'ADP-ribosylante d'une protéine qui contrôle le métabolisme du phosphatidylinositol (55). Le phosphatidylinositol étant une molécule signal importante dans les cellules eucaryotes contrôlant plusieurs processus cellulaires, l'action de la leucocidine semble altérer le métabolisme des phospholipides et cause ainsi un dysfonctionnement de l'activité cellulaire normale (55).

2.2 *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline (SARM)

2.2.1 Caractéristiques générales

Les céphalosporines et les pénicillines font partie de la classe des antibiotiques de types bêta-lactamines, qui a été la première famille d'antibiotiques découvertes vers les années 1930. Ces dernières ont été largement utilisées particulièrement durant la seconde guerre mondiale. Les bêta-lactamines inhibent l'activité de la transpeptidase et des autres enzymes qui catalysent la formation des liens entre les polymères glycopeptides qui forment la paroi cellulaire (44). Ces enzymes sont appelés "penicillin-binding proteins" (PBPs) (Figure 2). Les bêta-lactamines sont bactéricides, mais causent seulement la lyse des cellules bactériennes en croissance (115). L'efficacité des différentes bêta-lactamines dépend de l'affinité des différentes PBPs envers ces antibiotiques, de la quantité de PBPs, de la quantité de peptidoglycan présent, de l'habileté des bêta-lactamines à pénétrer la membrane externe des bactéries à Gram négatif et de la résistance de ces antibiotiques aux différentes bêta-lactamases (115).

Suite à l'utilisation massive des pénicillines, l'apparition de plusieurs bactéries résistantes à ces antibiotiques a été observée. En 1942, la résistance à la pénicilline a été découverte chez une souche de *S. aureus*. En 1953, entre 64% et 80% des souches de *S. aureus* isolées étaient résistantes à la pénicilline (50). La principale cause de résistance est la production de bêta-lactamase qui est médiée par la présence d'un plasmide ou d'un bactériophage. Les *S. aureus* sont des bactéries possédant de

nombreuses résistance aux bêta-lactamines par les bêta-lactamases qu'ils sécrètent (115). Ces enzymes avec une sérine au site actif, peuvent être codés par le gène *bla* et hydrolysent l'anneau bêta-lactamine (91). La résistance aux pénicillines est largement répandue et c'est pourquoi plusieurs bêta-lactamines résistantes aux bêta-lactamases ont été développées ou bien utilisés en combinaison avec des inhibiteurs de bêta-lactamases (115). Malgré le fait que plusieurs bêta-lactamines soient résistantes aux bêta-lactamases, telle la méthicilline, la résistance envers ces antibiotiques a été observée, et ce, en particulier chez *S. aureus* (24). En 1959, la méthicilline devient disponible pour le traitement des infections au *S. aureus* résistant à la pénicilline. Environ un an plus tard, des souches de *S. aureus* résistantes font leur apparition (39, 102). La résistance à la méthicilline confère également une résistance à toutes les pénicillines pénicillinase-résistantes ainsi qu'aux céphalosporines (91). En 1968, la première infection à un *S. aureus* résistant à la méthicilline (SARM) a été décrite (50). De nos jours, les SARMs sont omniprésents dans les hôpitaux, la communauté, les animaux de compagnie ou les animaux d'élevage (50, 154, 161).

Les souches de SARM ont acquis la faculté de croître en présence de méthilpénicilline et de ces dérivés, incluant la méthicilline, l'oxacilline et la nafcilline (50). Cette résistance est encodée par le gène *mec* qui code pour une PBP modifiée, la PBP2a ou PBP2'(91) (Fig. 2). La résistance est médiée par l'acquisition et l'expression de cette protéine altérée ayant une faible affinité pour toutes les bêta-lactamines (25, 50). Les PBP(s), enzymes essentiels qui catalysent la transpeptidation des liens entre les peptidoglycanes de la paroi cellulaire, sont la cible des bêta-lactamines chez les

souches sensibles de *S. aureus* (50). La liaison de méthicilline, ou autre β -lactamine, aux PBPs inhibe la réaction de transpeptidation de celle-ci, ce qui entraîne un arrêt de la biosynthèse de la paroi conduisant à la mort de la bactérie (115). Chez les SARM(s) la PBP2a est soit constitutionnellement présente ou induite lorsque la bactérie est en présence d'une bêta-lactamine. La PBP2a, ayant une faible affinité pour les bêta-lactamines, n'est pas affectée par ces antibiotiques et permet ainsi à la bactérie de continuer la biosynthèse de sa paroi (50).

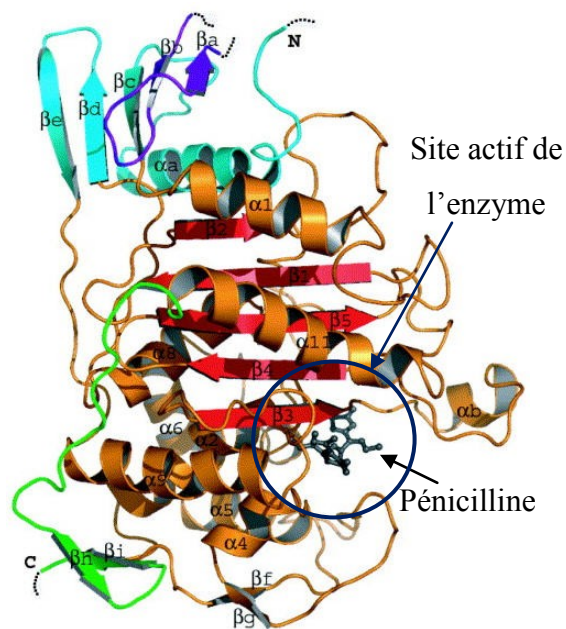


Figure 2: Schéma de l'action des pénicillines se liant au site de transpeptidation d'une PBP inactivant ainsi l'enzyme. Schéma modifié de Contreras-Martel, 2006 (27)

Cette résistance est située sur un élément mobile de résistance, la cassette *SCCmec* (39) (Fig. 3). La *SCCmec* est une séquence d'ADN de 21 à 67-kb qui est toujours située près de l'origine de répllication du chromosome de la bactérie. Cette séquence contient les complexes de gènes *mec* et *ccr* (4). Le complexe *ccr* est composé des gènes *ccr* entourés de cadres de lecture ouverts qui n'ont pour la plupart aucune fonction connue (4). Le complexe *mec* contient le gène *mecA* qui code pour la PBP2a (24, 122). L'expression de la PBP2a est contrôlée par deux ensembles de gènes régulateurs qui contrôlent l'expression de *mecA*. Le premier ensemble inclus *mecR1* et *mecI* qui sont situés dans le segment d'ADN *mec* immédiatement avant *mecA* (122, 160). L'autre ensemble de gènes régulateurs est constitué de *blaR1* et *blaI* et sont situés sur le chromosome. Ils servent également à réguler *blaZ* codant pour une pénicillinase (penicillinase staphylococcique) (122). Les protéines MecI et BlaI sont deux répresseurs agissant sur *mecA* et *blaZ*. Les protéines MecR1 et BlaR1 sont des molécules de type transducteur senseur spécifiques pour leur répresseur correspondant (122). Ce sont des protéines transmembranaires avec un domaine senseur extracellulaire et un domaine métalloprotéase intracellulaire. En présence de β -lactamine, ces protéines vont respectivement inhiber l'action de MecI et BlaI permettant ainsi la traduction de *mecA* et la synthèse de PBP2a (122). L'origine du gène *mecA* est incertaine. L'hypothèse la plus probable est que ce gène proviendrait d'un homologue du gène *mecA* présent chez *Staphylococcus sciuri* qui a 88% de similarité au niveau des acides aminés (39, 160). Cet homologue aurait subi des mutations, car *S. sciuri* n'est pas résistant à la méthicilline et l'introduction du gène

provenant de cette bactérie dans une souche de *S. aureus* sensible, ne rend pas cette souche résistante (160).

Les cassettes *mec* sont composées de plusieurs éléments situés dans la région X (*orfX*). Ces cassettes comprennent plusieurs gènes dont le complexe de gènes *mec*, le complexe de gènes *ccr* ainsi qu'une région J (4). Ces complexes et régions, selon leurs arrangements et compositions, servent à différencier les cassettes *mec*. Les représentations des différents arrangements correspondant aux différents SCC*mec* sont présentées à la figure 3.

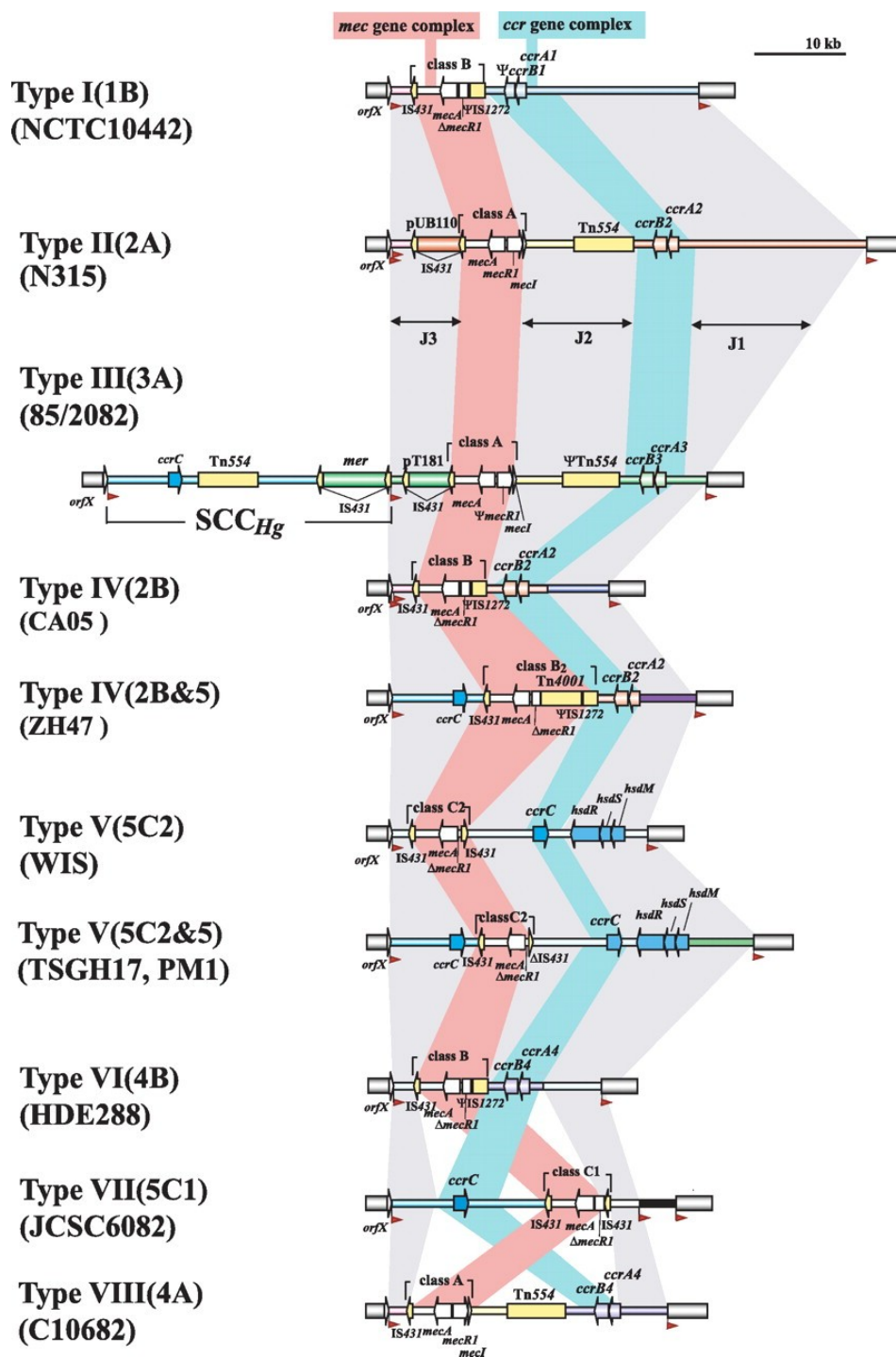


Figure 3 : Représentation de l'arrangement de différentes cassettes *SCCmec* tirée de : Classification of staphylococcal cassette chromosome *mec* (*SCCmec*): guidelines for reporting novel *SCCmec* elements. Antimicrob Agents Chemother (4)

2.2.2 Méthodes de typage moléculaire

Pour développer des stratégies de contrôle de la dissémination des SARMs, une connaissance de leur évolution moléculaire est nécessaire. Les techniques de typage moléculaire les plus communément utilisées sont l'électrophorèse à champs pulsés (pulsed-field gel electrophoresis, PFGE), le typage multi-locus de séquences (multilocus sequence typing, MLST), le typage par le gène *spa* (*spa* typing), l'analyse des séquences en tandem répétées de nombres variables de plusieurs locus (Multiple-Locus Variable-Number Tandem-Repeat Analysis, MLVA) et le typage de la cassette *mec* (SCC*mec* typing) (39, 93).

Le MLST est basé sur l'analyse des séquences de gènes conservés (housekeeping genes) de *S. aureus*, soit les gènes *arcC*, *aroE*, *glpF*, *gmk*, *pta*, *tpi* et *yqiL* (93). Pour chaque gène, un allèle distinct est assigné à chaque séquence différente. Les allèles des sept gènes définissent la lignée de la souche et résulte en un profil allélique désigné séquence type (sequence type, ST). L'évolution de cette méthode a mené à l'apparition des complexes clonaux (clonal complex, CCs) et repose sur le même principe avec un nombre de variants de locus simple plus élevé (93). Le grand désavantage de cette méthode est qu'elle est relativement coûteuse et laborieuse étant donné qu'elle nécessite des séquençages de gènes. Plusieurs ST sont retrouvés chez les porcs. Le ST398 est le plus étroitement associé aux porcs et aux humains en contact avec ceux-ci. On le retrouve plus rarement chez d'autres animaux et chez des humains n'ayant pas eu de contact avec des porcs (4, 23, 62). Les ST1, ST5, ST8, ST9, ST30,

ST97, ST221 et ST912 ont également été rapportés chez le porc mais semblent être également présents chez l'humain (9, 11, 14, 23, 31, 62, 113).

Le PFGE est l'une des méthodes les plus discriminantes pour le typage des *S. aureus*. Elle est considérée comme la méthode normalisée pour le typage des SARMs (39). Lors de cette méthode de typage, l'ADN chromosomique des *S. aureus* est digéré avec l'enzyme de restriction *SmaI*. Cet enzyme est le plus utilisé dans la classification des souches d'origine humaine. Les fragments d'ADN résultants sont séparés sur gel d'agarose soumis à un champ électrique ayant un gradient de voltage alternatif. Le schéma de bandes qui en résulte est ensuite analysé par un logiciel. Les souches ainsi typées peuvent porter différents noms dépendamment du pays. Aux États-Unis, elles portent le nom de USA suivi d'un numéro, en Europe, EMRSA suivi d'un numéro et au Canada, C-MRSA suivi d'un numéro (74, 93). Certaines souches ne sont pas typables par cette méthode et sont donc indifférenciables les unes des autres par cette méthode (103). Ces souches sont principalement celles associées aux animaux. Les SARMs ST398 sont cependant non-typables par *SmaI*. Par contre, ils le sont par un autre enzyme nommé *Apal*. Il existe plusieurs méthodes de typages par PFGE pour les souches non-typables par *SmaI* dont celles utilisant les enzymes *BstZI* et *SacII* mais c'est l'enzyme *Apal* qui est le plus utilisé (118). Certaines souches présentes chez le porc sont cependant typables avec *SmaI*, par exemple les SARMs ST9 (152).

Le typage par le gène *spa* est basé sur le séquençage d'un seul locus de *S.*

aureus. Il vise à déterminer la variation de la séquence de la région polymorphique X du locus de la protéine A (*spa*) (46, 93). La diversité du gène *spa* consiste principalement en un nombre de répétition de 24 pb. Le pouvoir discriminant du ‘*spa* typing’ se situe entre ceux du PFGE et du MLST (93). Le partage d’information entre institutions pour cette méthode est relativement simple étant donné la mise en place d’un site de référence sur internet. Les souches typées portent le nom de type (t) suivi d’un numéro correspondant. Plusieurs types de *spa* ont été identifiés chez le porc dont le t899 en Chine (152), t002 au Japon (11), t011, t034, t108, t1451 et t2510 en Allemagne (79). Au Pays-Bas, une étude a démontré une prédominance des souches t108 chez le porc (9), ces mêmes t108 ont été retrouvés lors de plusieurs études (35, 64). Plusieurs autres types de *spa* ont été retrouvés chez le porc et ce, à travers le monde (60, 104) (57, 141)

Le typage par MLVA est basé sur la détection de courtes séquences répétées ayant un nombre de copies variables, comme les répétitions en tandem variables en nombre (variable number tandem repeats, VNTR) (103). Ces VNTRs sont parfois hautement polymorphiques avec des variations dans le nombre d’unités répétées. Des variations dans plusieurs des gènes suivants peuvent être observées : *sspA* (sérine protéase), *spa* (protéine A), *sdr C, D et E* (protéine Sdr), *clfA* (facteur d’agglutination A), *clfB* (facteur d’agglutination B) et *coa* (protéine liant le collagène) (121). Les fragments correspondants aux VNTRs de ces gènes sont amplifiés par PCR (121). Suite à cette amplification, le poids moléculaire des fragments est évalué après une migration sur gel d’agarose et les données sont analysées avec un logiciel de type

bionumériques. Cette méthode est plus rapide que les autres et moins coûteuse, car elle ne nécessite aucun séquençage. Elle est cependant légèrement moins discriminante que le PFGE (93). Pour remédier à cette lacune, une méthode de MLVA utilisant huit loci a été mise au point par l'équipe de Schouls (123). En se référant à la séquence complète de *S. aureus*, cinq nouveaux VNTRs en plus de ceux des gènes *coa*, *spa* et *sspA* (123) ont été identifiés. Cette technique a maintenant un pouvoir discriminant supérieur au PFGE.

La cassette staphylococcal *mec* chromosomique, mieux connue sous le nom de Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* (SCC*mec*) est un élément génétique mobile. Elle se caractérise par la présence de deux composants génétiques essentiels: le complexe *mec* qui contient le gène *mecA* et ces éléments régulateurs (*mecRI* et *mecI*), ainsi que le complexe *ccr*, responsable de la mobilité du SCC*mec* (148, 163). Il est possible de distinguer les variants de ce complexe par leur composition structurale. Il existe plusieurs classes de complexe *mec* (soit A, B et C) ainsi que plusieurs types de complexe *ccr* (types 1, 2, 3 et 5). Le reste de la cassette *mec* est composé de régions nommées J1, J2 et J3 qui sont situées entre et autour des complexes *mec* et *ccr*. Ces régions contiennent une variété de gènes ou de pseudo-gènes qui ne semblent pas essentiels à la bactérie (162). Les différentes combinaisons de ces complexes génèrent différents types SCC*mec* (163). Les éléments SCC*mec* sont normalement classés de type I à type V. Les régions J sont également très variables entre les types SCC*mec* et même à l'intérieur d'un même type donnant ainsi des sous-types (148). Le typage se fait par PCR grâce à des amorces spécifiques à chacun des arrangements. Un des

désavantages de cette technique est qu'elle a été élaborée afin de détecter les types de *SCCmec* présents chez l'humain. Des études ont démontré que cette méthode ne parvenait pas à identifier certains éléments *SCCmec* présent chez les souches de SARM d'origine animale (148). Il semblerait cependant qu'il y ait une association entre les SARMS du porc et les *SCCmec* III et V bien que celles-ci soient également présentes chez des souches humaines (14, 31, 104). Certains de ces types ont pu être identifiés mais ne sont pas inclus dans les méthodes de typage courantes (61, 109, 162). Cette méthode demeure un outil important de typage des SARMS.

2.2.3 Séroconversion de l'hôte

Peu de données sont disponibles sur la réponse immunitaire lors d'une infection à *S. aureus* et encore moins pour les infections causées par les SARMS. L'effet pathogénique de *S. aureus* est largement dû à la production de toxines qui sont régulées par une molécule d'ARN, soit l'ARNIII (12). Lors d'une étude en vaccinologie portant sur la protéine activatrice de l'ARNIII (RAP) et sur le peptide inhibiteur (RIP) de l'ARNIII de *S. aureus*, les chercheurs ont démontré que les souris vaccinées avec RAP purifiée avaient moins de lésions et un meilleur taux de survie lors d'infection à *S. aureus* (12). De plus, celles qui étaient traitées avec RIP avant ou durant l'infection avaient également un meilleur taux de survie. Un grand nombre de protéines de *S. aureus* semblent immunogènes chez l'homme (42). Une soixantaine de ces protéines ont été identifiées à la surface de la bactérie ou secrétées dans l'environnement (42). L'efficacité d'un vaccin multigène comprenant un plasmide de gènes codant pour le facteur de coagulation A (*clfA*), la protéine liant la fibronectine A (*fnbA*) et l'enzyme sortase (*srt*) a

été démontrée chez la souris lors d'une étude de protection contre l'infection à *S. aureus* par une réponse cellulaire de types Th1 et Th2 (49). Quatre structures immuno-dominantes exprimées lors de septicémies causées par *S. aureus* ont été identifiées chez l'humain: une protéine de 29 kDa ayant 29% d'identité avec un précurseur de la protéine sécrétée SceA de *Staphylococcus carnosus*, une protéine inconnue de 17 kDa désignée IsaB, une protéine majeure du choc froid CspA, et un phosphotransporteur, la protéine Hpr (90).

Les protéines IsdB et IsdH(HarA) sont des protéines de surface régulée par le fer. Elles sont spécialisées dans l'acquisition du fer provenant des protéines hème (127). La protéine IsdH capture l'hémoglobine associée avec l'haptoglobine et IsdB est un récepteur d'hémoglobine. Le système d'acquisition du fer est suspecté d'être d'une importance majeure dans la pathogénicité des *S. aureus* et est fortement exprimé dans lors de la colonisation de mammifères (7, 95). IsdH(HarA) et IsdB sont également relativement bien conservés parmi les lignées de *S. aureus* et de SARM qui colonisent une grande variété d'espèces animales et démontrent de faibles variations intra-lignée (96). Avec de telles caractéristiques, IsdH(HarA) et IsdB représentent des cibles intéressantes pour des études de séropositivité chez plusieurs espèces animales.

La vaccination de souris avec un vaccin de type vecteur exprimant une région interne de la transpeptidase du domaine de la PBP2a s'est avéré protecteur envers une infection à SARM (125). En effet, une réponse humorale significative a été notée ainsi qu'une diminution de trois logarithmes du nombre de bactéries localisées dans les reins des souris immunisées (125). L'immunisation de souris avec un vaccin de type

plasmidique exprimant une séquence du gène *mecA* a été protectrice envers une infection à SARM et, encore une fois, une réduction du nombre de bactéries localisées dans les reins a été observée lors de l'étude (108).

Il est clair que nous avons un grand besoin de traitements thérapeutiques plus efficaces afin de lutter contre les infections aux *S. aureus*. Il est fort probable que les antibiotiques ne peuvent pas résoudre la forte augmentation des cas d'infections à *S. aureus* avec toutes ces nouvelles souches résistantes aux antibiotiques et ces nouveaux types qui se répandent dans les populations. Il semble que le développement d'un vaccin ou d'une immunothérapie efficace s'avèrent être les alternatives les plus prometteuses. Malgré les récents progrès dans la compréhension des mécanismes de virulence des staphylocoques et l'application de nouvelles stratégies, le développement clinique de protections vaccinales ou de thérapies immunes passives n'est pas encore un succès. En fait, plusieurs essais cliniques ont échoués et un grand nombre de questions restent sans réponse, tel que le rôle général des anticorps dans les mécanismes de défense immunitaires lors d'une infection à staphylocoque (107).

2.3 SARM chez les animaux

Le contact avec des animaux d'élevages représente un risque pour le transfert de bactéries résistantes aux antibiotiques, de l'animal vers l'humain (139). En effet, le transfert de bactéries résistantes de l'animal au fermier a été démontré à plusieurs occasions (9, 23). Des SARMs ont commencé à être isolés sporadiquement chez les animaux à partir des années 1970 jusqu'au début des années 2000 et ce chez les bovins, les petits animaux de compagnie et les chevaux. Tous ces isolats, sauf ceux retrouvés chez les équins, ont suggéré une origine humaine, sans dissémination majeure de ces souches (85). Jusque là, les scientifiques considéraient les cas de SARMs d'origine animale comme étant reliés à l'utilisation d'antibiotiques en médecine humaine et que ceux-ci étaient rarement la cause de maladies chez l'homme (23). Depuis ce temps, la situation a évolué et on rapporte maintenant un nombre sans cesse croissant de cas de SARMs chez les animaux, spécialement chez les porcs et les vaches laitières avec transmission entre humains et animaux (85). Des souches de SARM ont alors été désignées comme étant associées aux animaux (livestock-associated-MRSA, LA-MRSA) (23, 150) et plusieurs souches d'origine humaine ont également été identifiées chez des animaux (23).

C'est en 1988 que le premier cas impliquant un animal de compagnie, un chat, dans la transmission de SARM à des humains a été identifié (124). Depuis ce temps, les cas de SARM chez les animaux de compagnie ont augmenté. Plusieurs études semblent cependant démontrer que les SARMs retrouvés chez les animaux de

compagnie sont d'origine humaine (23). Ces animaux semblent jouer un rôle de porteur transitoire et pourraient cependant être impliqués de façon importante dans la dissémination et la persistance des SARM dans une famille (23).

Des SARMs ont été également isolés chez des chevaux à plusieurs endroits dans le monde que ce soit en Europe, en Asie ou en Amérique du nord (23). Plusieurs études démontrent que les SARMs isolés chez les chevaux et les personnes travaillant avec ceux-ci sont de même origine clonale et que ce clone ne se retrouve pas dans la population humaine en général (23). En Autriche, lors d'une étude, 3.1% (24/768) des échantillons cliniques se sont avérés positifs à SARMs, ST254 et SCC*mec* IVc et IVd. Ces chercheurs ont estimé un ratio de 4.8 cas de SARMs par 1000 chevaux admis dans la clinique (33). En Belgique, 10.9% des 110 chevaux admis dans une clinique étaient porteurs de SARMs (140) (23). Aux Pays-Bas, une étude a montré que le pourcentage de cas de SARMs isolés dans les échantillons cliniques de chevaux est passé de 0% en 2002 à 37% en 2008 (143). Toujours aux Pays-Bas, une autre étude révèle qu'aucun SARM n'a été isolé d'échantillons provenant de 200 chevaux sains (22). Des résultats similaires ont été obtenus chez 300 chevaux en Slovénie (149). Dans une étude menée au Canada et aux Etats-Unis, 4.7% des chevaux provenant de fermes étaient colonisés par des SARMs (155). Cette même équipe a démontré que 5.3% des chevaux d'une école vétérinaire canadienne étaient porteurs de SARM (156). Une autre étude effectuée dans l'ouest canadien a révélé l'absence de SARM chez les 497 chevaux sains testés (21). Il faut toutefois être prudent avec ces données car une augmentation de la détection des SARMs peut également être le résultat d'une augmentation du nombre

d'étude de prévalence. De plus, la prévalence semble varier grandement d'une étude à l'autre.

2.3.1 SARM chez le porc à la ferme

C'est vers 2004 que des chercheurs ont commencé à s'intéresser aux porcs comme porteurs de SARM(s) suite à la découverte de plusieurs cas d'éleveurs de porcs porteurs de cette bactérie (9). En France, les résultats d'une recherche ont supporté l'hypothèse qu'il pouvait y avoir transfert de souches spécifiques de *S. aureus* entre les porcs et les étaient similaire aux isolats provenant des porcs et ce, dans trois types MLST différents (ST9, ST398 et ST433) (9). De ces isolats, cinq ce sont avérés être des SARMs ST5, ST8 et ST398. Les chercheurs ont également observé des différences de susceptibilité envers les antibiotiques outre la méthicilline. Tous leurs isolats étaient résistants aux pénicillines, 17 l'étaient à la lincomycine et à l'érythromycine (macrolide) et cinq à la pristinamycine (streptogramine). Il y avait également une souche résistante à la kanamycine (aminoglycoside) et au pefloxacin (fluoroquinolone) (9). Cette première étude a donc démontré que les porcs pouvaient représenter un réservoir de souches de SARMs et par conséquent, le contact avec les porcs serait un risque pour la transmission de ces bactéries à l'humain.

Plusieurs études subséquentes démontrant la présence de SARMs chez des porcs ont été rapportées dans plusieurs pays (Tableau I), dont le Danemark (57, 60, 86), Singapour (126), la Chine (31, 152), le Japon (11), aux Pays-Bas (35, 64, 141, 142,

145, 150), en Allemagne (67, 72, 79, 97), en Belgique (38), en Italie (14, 110), en Malaisie (104) aux États-Unis (130) et au Canada (74).

Au Danemark, une recherche menée sur 100 porcs, provenant de trois fermes différentes, a permis de détecter dix porcs porteurs de SARMs dont neuf provenant de la même ferme (57). Lors d'une étude plus récente dans ce même pays, quatre des cinq fermes à l'étude ont présenté des porcs porteurs de SARM ST398 pour un total de 23 positifs sur 50 porcs testés (86). Deux lignées ST398 ont été détectées lors de l'étude de 2007, soit neuf souches de type t034 et une de type t1793. La souche t1793 étant cependant très près des souches t034 puisqu'une seule insertion de répétition simple les séparent (57). Les souches isolées se sont avérées résistantes à l'érythromycine, la clindamycine, la tétracycline et la pénicilline (57).

En Belgique, 37,8% (48/127) du personnel travaillant sur des fermes porcines étaient porteurs de SARM ainsi que 44,2% (663/1500) des porcs de ces fermes (50 fermes) (38). La prévalence de SARMs chez les employés a été établie à 50% pour les fermes ayant des porcs porteurs de SARMs et 3% pour les fermes où aucun porc positif n'a été détecté (38). Les souches d'origine humaine de cette étude possédaient une cassette *SCCmec* de type IVa ou de type V et certaines étaient non-typables (38). Chez ces souches, trois types *spa* ont été trouvés, soit les t011 (45 souches), t034 (2 souches) et t567 (1 souche). L'étude a également démontré que dans la majorité des fermes (17 sur 24), les souches de SARMs d'origine humaine et porcine présentaient les mêmes génotypes suggérant une transmission animal à humain (38). De plus, des résistances aux tétracyclines, aux triméthoprime-sulfas, aux macrolides-lincosamides, aux

aminoglycosides et à la ciprofloxacine ont été observées. Pratiquement toutes les souches se sont avérées susceptibles à l'acide fusidique, au mupirocin, au linézolid, au rifampicin et aux glycopeptides (38). Plusieurs profils de résistances ont été observés, les deux principaux étant gentamicine-tobramycine-érythromycine-clindamycine-tétracycline-triméthoprime-sulfas et ciprofloxacine-clindamycine-tétracycline-triméthoprime-sulfas (38). Plusieurs gènes de résistance ont été détectés : *aac(6')*-*aph(2'')* et *ant(4')* pour la résistance aux aminoglycosides, *ermC* pour la résistance aux lincosamides, *tetM* et *tetK* pour la résistance aux tétracyclines (38).

La première étude où des SARMs ont été détectés dans des fermes porcines en Chine a été réalisée par l'équipe de Wagenaar et associés (152). Lors de cette recherche, des échantillons de poussière environnementale (air, murs, ventilateurs) ont été analysés afin de détecter la présence de SARMs. Les chercheurs sont parvenus à isoler des SARMs dans cinq des neuf (55,6%) fermes à l'étude pour un total de 43 isolats (152). La totalité des souches se sont avérées être de type *spa* t899 et ST9 sauf pour les souches provenant d'une des fermes qui étaient ST1376, un clone très près de ST9 (152). Les chercheurs ont également procédé à des tests de sensibilité aux antibiotiques sur dix souches de SARMs et neuf se sont révélées multi-résistantes avec des résistances à l'amikacin, au ciprofloxacine, à la clindamycine, à l'érythromycine, à la gentamicine, à la néomycine et aux tétracyclines (152). L'autre souche s'est avérée résistante à l'amikacin, à la gentamicine et aux tétracyclines. Par contre, toutes les souches étaient sensibles à l'acide fusidique, au linézolide, à la mupirocine, au rifampicin et au triméthoprime/sulfaméthoxazole (152). Dans une autre étude menée en

chine, la prédominance des souches ST9 chez le porc a également été démontrée (31). Pour effectuer cette recherche, des écouvillonnages nasaux ont été prélevés de 509 porcs, 107 travailleurs d'abattoir et 13 travailleurs de fermes porcines. Un total de 60 SARMs ont été isolés, 58 (11,3%) provenant des porcs et deux (15,4%) de travailleurs à la ferme (31). Treize des 31 (41,9%) fermes visitées ainsi que deux des trois abattoirs se sont avérés avoir des porcs positifs aux SARMs (31). Ces souches ont été caractérisées comme étant toutes de type *spa* t899 avec la cassette *mec* de type III. De ces isolats, le MLST a révélé que 46 étaient de type ST9, 13 de type ST912 et un de type ST1297, ces deux derniers types étant différents de ST9 par une seule mutation (31). Des antibiogrammes ont révélé que toutes ces souches étaient résistantes au ciprofloxacine, à la clindamycine et au tétracycline mais susceptibles au linézolide, au nitrofurantoin, au teicoplanin, à la tigecycline, au triméthoprim/sulfaméthoxazole et à la vancomycine (31). Quatre patrons de multi-résistance ont été observés dont deux patrons prédominants: ciprofloxacine-clindamycine-érythromycine-gentamicine-tétracycline-chloramphénicol pour 42 souches et ciprofloxacine-clindamycine-érythromycine-gentamicine-tétracycline pour 16 souches (31).

Une étude japonaise menée dans 23 fermes porcines où 115 écouvillons nasaux et fécaux ont été prélevés a révélé un seul isolat de SARM provenant d'un écouvillon nasal. Tous les autres échantillons se sont avérés négatifs (11). Cette souche était de type ST221 et de type *spa* t002. L'isolat a également démontré de la résistance à la dihydrostreptomycine (11).

En Malaisie, 360 porcs ainsi que 90 travailleurs en contact avec des porcs provenant de 30 fermes ont été échantillonnés (104). Chez les porcs, la prévalence de SARMs était 1,38% (5/360) et chez les humains 5,5% (5/90). Des SARMs ont été trouvés chez au moins un porc dans 30% (9/30) des fermes. Les types ST9 avec type *spa* t4358 ont été retrouvés chez le porc et ST1 avec type *spa* t1784 chez les travailleurs. Toutes les souches ont cependant révélé une cassette *mec* de type V (104). Lors de test de sensibilité aux antibiotiques, 100% des souches se sont avérées résistantes à l'érythromycine, au ciprofloxacine, à la gentamicine, à la tétracycline, au triméthoprim/sulfaméthoxazole, à la clindamycine et à la quinupristin/dalfopristine. Alors que 80% et 20% des souches ont respectivement présenté des résistances à la tigecycline et à l'acide fusidique (104). Aucune résistance au mupirocin, à l'amikacin, au linézolide, à la vancomycine et au netilmicin n'a été observée (104). En Italie, une étude a été menée suite à l'admission dans un hôpital, d'un patient travaillant dans une ferme porcine et présentant de la fièvre et de la douleur intense au fessier droit (110). Les spécialistes ont découvert que le patient présentait des abcès à la fesse droite. Suite à une ponction du liquide contenu dans ceux-ci ainsi qu'une prise de sang, ils ont pu isoler des SARMs sensibles aux glycopeptides, au rifampin, au linézolide, à la gentamicine et au mupirocin (110). La souche était cependant résistante au triméthoprim/sulfaméthoxazole, aux macrolides, à la clindamycine et aux fluoroquinolones (110). Suite à cet incident, une étude épidémiologique a été mise en place incluant la famille du patient et trois collègues de travail et leur famille. De plus, des écouvillons de poussière ont été prélevés à la ferme (110). Un seul collègue de travail et sept échantillons de poussière ont été positifs pour SARM. L'isolat provenant

du patient s'est avéré de type *spa* t899 et ST398 avec la cassette *mec* de type Iva. Deux des échantillons de poussière présentaient également le même type de SARM (110). Chez l'autre travailleur de la ferme positif au SARM, le type *spa* t108 a été identifié, celui-ci faisant également partie du clone ST398 mais présentant une cassette de type V. Les six autres échantillons de poussière présentaient également ces mêmes SARMS (110).

Pour ce qui est des Pays-Bas, de nombreuses études sur la présence de SARMS chez les porcs ont été publiées. Dépendamment de l'étude, il y aurait entre 11% et 80% des porcs qui seraient porteurs de SARMS (64, 141). Les résultats d'une de ces recherches ont par ailleurs démontré que dans ce pays, la fréquence de porteurs de SARMS était beaucoup plus élevée chez les éleveurs de porcs que chez le reste de la population (>760 X plus élevée) (150). Une recherche a porté sur l'étude des SARMS chez les porcs avec des lésions épidermiques exsudatives, lésions normalement causées par *Staphylococcus hyicus* (142). Suite à l'analyse d'un échantillon d'une lésion, *S. aureus* a été détecté mais aucun *S. hyicus*. Après l'observation d'une multirésistance aux antibiotiques, la présence d'un SARM a été confirmée par le gène *mecA* par PCR. Les chercheurs ont par la suite isolé des SARMS d'échantillons provenant d'autres porcelets avec des lésions exsudatives, de porcelets sans signes cliniques, d'un étudiant vétérinaire ayant participé au premier échantillonnage, et de porcelets sans signes cliniques et d'un fermier provenant d'une autre ferme qui fournit des porcs (142). Il semble que ce soit la première étude rapportant l'isolement de SARMS de porcs présentant des signes cliniques d'infection. Lors d'une autre étude, la présence de

SARMs a été détectée dans sept élevages sur trente et un dont trois fermes de finitions, trois maternités et une intégration de maternité à finition. Aucune différence significative n'a été établie entre les différents types de fermes et l'âge des porcs en association avec la prévalence des SARMs. Au total, 11% des porcs échantillonnés se sont avérés positifs (141). L'étude de van Loo et associés semble démontrer qu'il y a une forte prédominance de souche ST398 aux Pays-Bas (72, 126, 130, 145). L'étude de Voss *et al.* a démontré également que le *spa*-type t108 (ST398) semblait être le plus prévalent et le plus répandu des types de SARM (150). Ces résultats ont été confirmés par une autre équipe de recherche dont tous les isolats se sont avérés être du *spa*-type t108 et ST398 (64). Toutes les souches d'une étude plus récente se sont également avérées être des ST398. Par contre, des *spa* types variés tels t011, t108, t567, t899 et t1939 ont été détectés (141). Des souches ST398 appartenant au *spa* type t011 ont également été isolées précédemment (142). Ces souches se sont révélées négatives aux gènes codants pour la toxine leucocidine Panton Valentin (PVL), la toxine du syndrome du choc toxique et les toxines exfoliatives A et B (141).

Les résistances aux tétracyclines, à la gentamicine, à la kanamycine, à la clindamycine, à l'érythromycine, à la lincomycine, à la tobramycine et au tylosin ont toutes été observées chez les isolats de SARMs aux Pays-Bas (35, 141, 142). Plusieurs souches ont également démontré de la multi-résistance à la tétracycline, à l'érythromycine, à la lincomycine, à la gentamicine et à la kanamycine (141). Dans leur étude, six des 10 fermes faisant usage d'antibiotiques de façon standard se sont avérées positives aux SARMs, Par contre, seulement une des 21 fermes n'utilisant pas

d'antibiotiques a été positive à SARM (141). Avec ces résultats, les auteurs proposent que l'utilisation des antibiotiques soit un risque favorisant la présence de SARMs à la ferme.

Lors d'une vaste étude allemande menée dans 40 fermes porcines chez 1600 porcelets, 169 (10,6%) SARMs ont été isolés et ce dans 28 (70%) des fermes à l'étude (79). Tous ces isolats étaient des ST398 mais plusieurs types de *spa* ont été identifiés dont le t011 pour 75% des souches, t034 pour 5,3% des souches, t108 pour 0,6% des souches, t1451 pour 3,6% des souches et t2510 pour 15,4% des souches (79). Tous les isolats présentaient une cassette *SCCmec* de type V à l'exception d'une souche t011 avec un type IV (79). Tous les isolats étaient résistants à la tétracycline, 52% l'étaient à l'érythromycine et à la clindamycine, 26% à la gentamicine et 8% au triméthoprime/sulfaméthoxazole (79). Les souches de cette recherche se sont cependant avérées négatives pour la présence des gènes codants pour la toxine PVL, les entérotoxines, les toxines exfoliatives et la toxine du choc toxique (79). Lors d'une autre étude allemande, des SARMs provenant de lésions chez des porcs à la nécropsie ont été isolés (97). Lors du typage moléculaire de ces isolats, 95% (57/60) se sont avérés des ST398 et 5% (3/60) des ST97 (97). La majorité des souches présentaient une cassette *SCCmec* de type V (80%) comprenant des souches de types *spa* t011, t108, t1451 et t034. Il y avait également 17% des souches qui possédaient une cassette *SCCmec* de type III comprenant des souches de type t034 (97). Lors de cette étude, plusieurs résistances aux antibiotiques ont été observées dont les résistances à l'érythromycine (77%), à la clindamycine (77%), au ciprofloxacine (33%), à la

gentamicine (12,5%), à la kanamycine (12,5%), au triméthoprième/sulfaméthoxazole (3,4%) et à la quinupristine/dalfopristine (1,7%) (97). Aucune résistance au rifampin, à l'acide fusidique, au mupirocin, à la vancomycine, au teicoplanin et au linézolide n'a été observée (97). Lors d'une autre étude allemande portant sur la résistance aux antibiotiques des SARMs ST398 provenant de porcs malades, 54 isolats de plusieurs régions ont été analysés (67). De ces isolats, 98% (53/54) étaient des SCC*mec* de type V. Plusieurs types *spa* ont été observés : t034, t1451, t2510, t571, t1197, t1250 et t1456 (67). Un total de 22 patrons d'antibiorésistance ont été observés lors de cette étude (67). Les résistances prédominantes étaient envers les tétracyclines, les tétracyclines-triméthoprième, et les tétracyclines-macrolides-lincosamides (67). Toutes les souches étaient résistantes aux tétracyclines et celle-ci était médiée par les gènes *tet(M)*, *tet(K)* et *tet(L)*. D'autres gènes de résistance ont également été détectés comme *dfpK* et *dfpG* codant pour la résistance au triméthoprième, *erm(A)*, *erm(B)* et *erm(C)* pour la résistance aux macrolides/lincosamides, *fexA* pour de la résistance au chloramphénicol/florfenicol et *aacA/aphD* pour la résistance à la gentamicine (67). Les souches de cette étude se sont avérées négatives pour la présence de gènes codant pour la toxine PVL mais une souche était positive pour le gène de l'entérotoxine B et trois étaient positives pour les gènes des entérotoxines K et Q (67). Lors d'une étude sur 846 porcs provenant de 367 fermes en Allemagne, un SARM ayant le gène de multi-résistance *cfr* a été identifié pour la première fois. Ce gène code pour des résistances à l'oxazolidinones, aux pleuromutilines, aux phénicols, aux lincosamides et aux streptogramines grâce à une méthyltransférase (72). Les auteurs ont également détecté la présence de plusieurs autres gènes de résistance, soit *fexA* (exportation des

phénicoles, pompe à efflux), *erm(A)* (macrolide, lincosamides et streptogramine B, altération du ribosome) et *tet(M)* (tétracyclines, protéine de protection du ribosome) (72).

Une étude menée au Portugal, a révélée que tous les échantillons prélevés sur les porcs lors de cette recherche se sont avérés positifs pour les SARMs et ce sur les deux fermes testées (113). Le vétérinaire de la ferme A de cette étude, a également testé positif, mais s'est avéré être un porteur temporaire car un échantillon prélevé une semaine plus tard est apparu négatif pour les SARMs. Tous les isolats d'une des fermes étaient des ST398 (*spa* type t011, t034, t108, t539 et t1793) et ceux d'une autre ferme ST30 (*spa* type t021). Les chercheurs de cette étude ont donc identifié pour la première fois des souches ST30 chez des porcs (113). Les isolats du Portugal se sont avérés résistants aux tétracyclines et les isolats de la ferme B de l'étude étaient également résistants à l'érythromycine. Les gènes de résistance *tet(M)*, *tet(K)* et *erm(C)* ont par ailleurs été détecté (113). Aux États-Unis, il est rapporté qu'environ 48% des porcs seraient porteurs de SARMs ainsi que 45% des travailleurs du porc (130). Les souches identifiées sont en général des ST398. Des résistances aux tétracyclines et à la clindamycine ont été détectées chez les isolats de SARM d'origine humaine et porcine. De plus, des résistances à l'érythromycine, à la clindamycine et à la quinupristine-dalfopristin ont été identifiées chez les souches porcines (72, 126, 130, 145). (130). Au Canada, une étude ontarienne décrit que 24,9% des porcs et 20% des fermiers étaient porteurs de SARMs (74). Le génotypage de ces isolats, par PFGE et *spa* typing, a révélé que la souche prédominante (59,2%) était ST398 de *spa* type t539 chez le porc

et l'humain. Une souche épidémique humaine (CMRSA-2, CC5) a également été trouvée chez le porc et l'homme. Les résultats démontrent également que pour chacune des fermes où un humain a été trouvé porteur de SARM, une souche non différenciable de celle-ci est retrouvée chez les porcs de ces fermes (74).

Les porcs sont parfois utilisés en recherche humaine sur le diabète dans des modèles *in vivo*. Des scientifiques, localisés à Singapour, ont récemment isolé trois souches de SARMS provenant de ces types de porc et une souche d'un chercheur en contact avec ces porcs (126). Ces souches étaient de types ST22 et ST398 et présentaient de la résistance au ciprofloxacine et à la clindamycine. Certaines souches étaient résistantes à l'érythromycine et à la tétracycline (126).

Tableau I : Les SARMs retrouvés dans des fermes porcines de différent pays.

Pays	Prévalence en %	Typage moléculaire*	Références
France	Fermier: 6.3%	ST5, ST8 et ST398	(9)
Pays-Bas	Fermier : 23% Porc : 3.3%	<i>spa</i> t108, t567 et t943	(150)
Pays-Bas	Fermier : 3 membre de famille et 3 co-travailleur Porc : 80%	ST398 <i>Spa</i> : t108	(64)
Pays-Bas	Porc: 39%	ST398 <i>Spa</i> : t011, t101 et t1254, SCCmec : III, Iva et V	(35)
Danemark	Porc: 10%	N.D.	(57)
Pays-Bas	Porc: 11%	ST398 SCCmec: IV et V	(141)
États-Unis	Fermier: 45% Porc: 49%	ST398	(130)
Canada	Fermier: 20% Porc: 24.9%	<i>spa</i> t034, t1255, t002, t067, t653, t571	(74)
Danemark	Porc : 46%	ST398	(86)
Allemagne	N.A.	ST398	(72)
Allemagne	Porc: 10.6%	ST398 <i>Spa</i> : t011, t034, t108, t1451, t2510 SCCmec : V et IV	(79)
Portugal	Vétérinaire : 33,3% Porc : 100%	ST398, ST30 <i>Spa</i> : t011, t021 SCCmec : V	(113)
Italie	Porc : 38%	ST398, ST9, ST97, ST1 <i>spa</i> : t899, t4794, t4795, t4838, t1730, t1476, t2922 SCCmec: V, IVb	(14)
Malaysie	Fermier: 5.5% Porc: 1,4%	ST398, ST9, ST1 SCCmec: V	(104)
Chine	Fermier: 25.4% Porc: 11.4%	ST9, ST912, ST1297 <i>spa</i> : t899 SCCmec: III	(31)
Belgique	Fermier: 37.8%	ST398 <i>spa</i> : t011, t034, t567 SCCmec: V, IVa	(38)

Donc, tous ces résultats nous permettent de constater que ce sont les souches de type ST398 qui sont les prédominantes chez les porcs et ces mêmes souches semblent être celles qui sont transmises le plus fréquemment à l'humain (64, 110, 126, 130, 142, 145). Cette transmission a par ailleurs, été démontrée lors de plusieurs études. Une étude à même démontrée la transmission de SARMs entre les animaux et les humains (porcs et éleveurs), entre membres d'une famille (éleveur de porcs et sa famille) et entre les infirmières et leurs patients à l'hôpital (150). Lors d'une étude aux Pays-Bas, il est ressorti qu'il semble y avoir une association entre les cas de personnes porteuses de SARMs non-typables (MLST 398) et le contact de celles-ci avec des porcs ou des vaches (145). Ces études tendent à démontrer que les porcs représentent un réservoir de SARMs pouvant être transmis à l'humain. De plus, il semble que le contact avec des porcs représente un facteur de risque pour la transmission des SARMs.

2.3.2 SARM chez le porc d'abattoir, dans la viande et les produits alimentaires

La haute prévalence de SARMs chez le porc à l'abattoir a également été observée aux Pays-Bas (35). Les chercheurs ont échantillonné 540 porcs provenant de neuf abattoirs. Des SARMs ont été détectés dans 209 échantillons, ce qui représente 39% des prélèvements de l'étude. De plus, tous les abattoirs visités par les chercheurs se sont avérés avoir des porcs porteurs de SARMs. Des résistances comme celles à la clindamycine, à l'érythromycine, à la lincomycine, à la tobramycine et au tylosin ont été détectées chez ces porcs. Les isolats de porc étaient tous des ST398, mais plusieurs *spa* types ont été détectés : t011, t034, t108, t567, t943, t1254 et t1255. Les gènes codants

pour la toxine PVL étaient absents de ces isolats. Dans une étude portant sur les travailleurs de trois abattoirs des Pays-Bas, 5,6% (14/249) des travailleurs se sont avérés porteurs de SARMs (138). Seuls les employés en contact avec des porcs vivants étaient des porteurs de SARMs, soit neuf personnes travaillant au transport des porcs (22%, 9/41), deux vétérinaires (15%, 2/13) et trois autres employés en contact étroit avec les porcs (1,5%, 3/195). Le principal type de *spa* observé était le t011, les types secondaires étant les t108, t034 et t145. Aucun des isolats ne possédait de gène codant pour la toxine PVL, mais tous étaient résistants à la tétracycline. De la résistance à l'érythromycine, à la clindamycine, au triméthoprime/sulfaméthoxazole, à la gentamicine et à la tobramycine ont été observées. Les isolats étaient tous sensibles au ciprofloxacine, à la rifampicine, à l'acide fusidique, au linezolid, au mupirocin, à la vancomycine et au nitroflurantoin.

En Allemagne, une étude portant sur cinq abattoirs et 1 026 porcs a révélé que 60% (616/1026) des porcs étaient porteurs de SARMs (134). Plusieurs types de *spa* ont été détectés dont le t011 chez 34,4% (212/616) des souches comprenant des isolats avec des cassette *mec* de type III (3/212), de type IVa (8/212), de type V (195/212) et des non-typables (6/212) (134). Le type *spa* t034 a également été retrouvé chez plusieurs isolats (56,1%, 346/616). Ces souches présentaient également plusieurs cassette *mec* dont la III (158/346), la V (121/346) et des non-typables (67/346) (134). D'autres types de *spa* (t108, t145, t571, t1250, t1255, t1451, t1580, t1928, t1985, t2011, t2346, t2576, t2970 et des non-typables) ont également été détectés mais en plus faible nombre (134). Tous les isolats de cette recherche étaient résistants à la

tétracycline, 80,5% à l'érythromycine, 80,7% à la clindamycine, 2,4% à la gentamicin et 3,7% à la kanamycine. Dans un abattoir italien, des porcs provenant de 118 fermes ont été échantillonnés et au total 45 des 118 (38,1%) élevages comprenaient au moins un porc positif (14). Lors du typage moléculaire, 11 types de *spa* ont été identifiés (t011, t034, t108, t127, t899, t1730, t2510, t2922, t4794, t4795 et t4838) avec une prédominance de t899. Le typage par MLST a révélé que ces souches étaient des ST398, ST1, ST9, ST97 et ST1476 avec une prédominance de ST398. Le type de souche le plus prédominant était des t899, ST398 avec une prévalence de 49%. Dans cette étude, une souche t127, ST1 a été positive pour la présence des gènes codant pour la toxine PVL. Plusieurs patrons de résistance ont été observés dont le profil tétracyclines-macrolides-fluoroquinolones chez toutes les souches t127, ST1 et la plupart des t1730, ST1476 (14). Différents pourcentages de résistance ont été observés envers la tétracycline (100%), la clindamycine (70,9%), l'érythromycine (60,9%), le triméthoprim (42,0%), la streptomycine (39,0%), le ciprofloxacine (35,9%), les sulfamides (34,4%) et la kanamycine et la gentamicine (29,7%). Toutes les souches étaient cependant sensibles au linézolide, à la quinupristine/dalfopristine et à la vancomycine (14).

Une étude espagnole a révélé que des porcs adultes à l'abattoir et les porcelets reliés à leurs fermes d'origine pouvaient être positifs à SARMs. En effet, 26 des 53 porcelets (49%) et 11 des 53 porcs adultes reliés à un abattoir ont testés positifs pour SARMs (53). De plus, certains porcs possédaient plus d'une souche de SARM. Différent types de *spa* ont été trouvés dont une majorité de t011 (33/44, 75%), les

autres étant de type *spa* t108, t1197, t2346, t3992. Une bonne proportion des souches avait une cassette *mec* de type V (66%) et les autres étaient de type IVa. Tous ces isolats étaient résistants à la tétracycline. Des résistances à plusieurs autres antibiotiques ont également été détectées soit celles à l'érythromycine, à la clindamycine, à la gentamicine, à la tobramycine, à la streptomycine, au triméthoprim/sulfaméthoxazole et à la kanamycine. De plus, huit patrons de multi-résistance ont été observés dont un de hexarésistance aux tétracyclines-érythromycine-clindamycine-gentamicine-tobramycine-kanamycine. Plusieurs gènes ont été identifiés tels les *tet* (K, M et L) associés à la résistance aux tétracyclines, *erm* (A, C et T) et *msr*(A) codant pour la résistance aux macrolides et lincosamides, *aacA/aphD* associé à la résistance à la gentamicine, *aadD* et *aphA3* reliés à la résistance à la fanamycine et à la tobramycine, *str* et *aadA* associés à la résistance à la streptomycine et finalement une combinaison de gènes *dfrA*, *dfrG*, et *dfrK* codant pour la résistance au triméthoprim/sulfaméthoxazole (53).

Au cours des dernières années, les SARMs ont été également retrouvés dans certaines viandes et produits alimentaires de différent pays et ce à plusieurs reprises (Tableau I). En effet, les SARMs ont été retrouvés dans des proportions de 0,18% à 1,2% des échantillons de lait (71, 81, 82, 106), de 0% à 10,6% dans la viande de boeuf (117, 146, 153), de 0% à 16% dans les viandes de poulet et de porc (34, 56, 76, 81, 84, 117, 146, 153), et autour de 35% dans la viande de dinde (34). Une variabilité est présente dans la prévalence et les types de SARMs dans les viandes et les produits alimentaires (Tableau I). Il est également important de noter qu'il ne semble pas y

avoir de donné sur la présence de SARMS dans des abcès qui pourraient contaminer la viande lors de la découpe.

Tableau II : Les SARMs retrouvés dans certaines viandes et produits alimentaires de différent pays.

Pays	Viande et produit alimentaire (Prévalence en %)	Typage moléculaire*	Références
Coré	Lait de vache (0,18%)	ST5- SCCmecIVg	(82)
Coré	Viande de porc (0%), boeuf (0%) et poulet (0,3%)	ST5-SCCmecIII	(81)
Coré	Viande de chèvre (0%), lait de chèvre (1.2%) viande de porc (0%), viande de poulet (1%)	N.D.	(84)
France	Divers aliments de cas d'empoisonnement, (1,1% des échantillons)	N.D.	(73)
Japon	Viande de poulet (0,45%)	SCCmecIV	(76)
Hongrie	Nourriture diverse (0,26% provenant tous d'échantillons de lait)	N.D.	(71)
Italie	Nourriture diverse (0,37% provenant d'échantillons de lait et fromage)	N.D.	(106)
Pays-Bas	Viande de porc (3,1%) et viande de chèvre (0%)	ST398-t108	(146)
Pays-Bas	Viande de bœuf (10,6%), viande de veau (15,2%), viande d'agneau et mouton (6,2%), viande de porc (10,4%), viande de poulet (16%), viande de dinde (35,3%), volaille (3,4%), viande de gibier (2,2%)	ST398 (85% des isolats)	(34)
Espagne	Viandes diverses (1,6% des échantillons)	ST398-SCCmecV-t011 (porc) ST398-SCCmecV-t1197 (veau) ST125-SCCmecIVa-t067 (poulet et lapin) ST217-SCCmecIVa-t032 (sanglier)	(92)
États-Unis	Viande de poulet (0%), viande de bœuf (3,3%), viande de porc (5,5%), viande de lapin (0%), viande d'agneau (0%)	ST8-SCCmecIVa-t008 (porc) ST5-SCCmecII-t002 (porc et bœuf)	(117)
Chine (Hong Kong)	Viande de Porc (16%)	ST9-SCCmecIVb-t899 ST9-SCCmecV-t899	(56)
Canada	Viande de porc (9,6%), viande de bœuf (5,6%) et viande de poulet (1,3%)	t242	(153)

*MLST et typage de SCCmec et du gène *spa*

2.3.3 Antibiotiques et antibiorésistances

Plusieurs antibiotiques peuvent être utilisés dans la lutte contre les SARMs. Cette section présente un résumé des mécanismes d'action et de résistance de ces principaux antibiotiques. Les résistances phénotypiques et génotypiques rapportées chez les SARMs d'origine porcine sont également résumées au Tableau III.

L'acide fusidique est un antimicrobien sphéroïdal originalement produit lors de la croissance de certaines souches de *Fusideum coccineum* (157). Elle forme un complexe stable avec un facteur d'élongation G (EF-G) associé à une translocation et avec une guanosine triphosphate (GTP), qui fournit l'énergie pour le processus de translocation. Après une ronde de translocation avec hydrolyse de la GTP, le complexe acide fusidique-EF-G-GDP bloque l'élongation et laisse le peptidyl-ARNt dans le site P du ribosome (44). Le spectre d'action de cet antibiotique est restreint aux bactéries à Gram positif dont les staphylocoques, puisqu'il pénètre faiblement dans les bactéries à Gram négatif et les cellules de mammifères (44). Plusieurs mécanismes de résistance ont été décrits. Des mutations chromosomales menant à la modification du facteur d'élongation G et la diminution de la perméabilité de la membrane envers l'antibiotique sont deux des principaux mécanismes de résistance (157). De la résistance phénotypique à l'acide fusidique a été observée chez des SARMs isolés du porc (56, 104).

Les aminoglycosides sont généralement des agents bactéricides dont l'activité est limitée aux bactéries aérobies et mycoplasmes (44, 115). Ces antibiotiques vont

agire sur les ribosomes des bactéries, plus particulièrement, ils se fixent de façon irréversible à la sous unité 30S du ribosome. Pour entrer dans les cellules, ces antibiotiques vont traverser la membrane cytoplasmique en utilisant un système de transport actif, système de transport des électrons, qui les prend en charge. Ils vont également pénétrer la cellule de façon passive (115). Une fois fixés aux ribosomes, ils gênent la traduction de l'ARN messager (ARNm) et provoquent une lecture incorrecte du code génétique de l'ARN de transfert (ARNt) menant à une synthèse de protéines anormales (44, 66, 115). Il y a alors déstabilisation de l'homéostasie de la cellule, une augmentation de perméabilité membranaire s'en suit et finalement il y a mort de la bactérie (44). Cette famille comprend plusieurs antibiotiques comme la streptomycine, la néomycine, la gentamicine, la tobramycine, l'amikacine, la kanamycine et la nétilmicine. Ces antibiotiques sont principalement utilisés en médecine vétérinaire étant donné leur potentiel néphrotoxique et ototoxique. On les utilise pour soigner les petits animaux ayant des infections gastro-intestinales, intra-abdominales, respiratoires ou urinaires (115). Ils sont parfois utilisés pour traiter les diarrhées d'origine bactérienne chez les porcs. La résistance vis-à-vis les aminoglycosides peut être le résultat d'une réduction intracellulaire de la concentration de l'antibiotique par une pompe à efflux, d'une altération de la molécule cible ou d'une inactivation de l'antibiotique par une activité enzymatique (66). Chez les SARMs du porc on retrouve les gènes *aacA/aphD* et *ant(4')* qui inactivent certains aminoglycosides par des activités enzymatiques (38, 51, 67, 120); (10, 38). De la résistance à la kanamycine et à la tobramycine lié au gène *aadD*, codant également pour un enzyme, également été détecté chez des SARMs du porc (51).

Les fluoroquinolones sont des antibiotiques totalement synthétiques (115). Ils ont été considérés longtemps comme les antibiotiques idéaux étant donné leur spectre large d'action, leur pharmacocinétique et leur faible toxicité (115). Les premières générations de fluoroquinolones (acide nalidixique) étaient actives principalement contre les bactéries à Gram négatif. Par contre, les générations plus récentes (2^{ème} à 4^{ème} générations) le sont contre les bactéries à Gram positif et même les mycobactéries et les mycoplasmes (115). Ils sont bien absorbés par l'organisme après une administration orale et pénètrent pratiquement tous les tissus et les cellules du corps (115). Les fluoroquinolones vont agir sur le complexe ADN/ADN-gyrase (115). Ils vont ainsi empêcher le repliement de l'ADN, celui-ci est ainsi déstabilisé et la survie de la bactérie en est compromise. Les principaux antibiotiques de cette famille utilisés en médecine vétérinaire sont l'enrofloxacin, le ciprofloxacin, l'orbifloxacin, le difloxacin, le danofloxacin, et le marbofloxacin (115). Les bactéries ont développé plusieurs méthodes pour échapper à l'action des fluoroquinolones. Il y a la diminution de la perméabilité de la membrane causée par l'altération des pores hydrophiliques, la présence de pompes à efflux qui transportent l'antibiotique hors de la cellule et des mutations au niveau de l'ADN gyrase qui altèrent le site de liaison des molécules de fluoroquinolones (115). De la résistance phénotypique aux fluoroquinolones a été observée chez plusieurs souches d'origine porcine et ce dans plusieurs études (14, 31, 38, 56, 97, 104).

La vancomycine, la teicoplanine et l'avoparcine sont des antibiotiques appartenant à la famille des glycopeptides (115). Ces antibiotiques sont actifs contre

les bactéries à Gram positif (115). Ils inhibent la synthèse de peptidoglycane de la paroi cellulaire en liant le D-alanyl-D-alanine terminal du dipeptide muramyl (44, 115). De la résistance a été observée envers ces antibiotiques. Elle est associée principalement au gène *vanA* situé sur un transposon localisé sur un plasmide. Cette résistance étant le résultat d'un changement du D-alanine terminal en D-lactate prévenant ainsi la liaison de l'antibiotique (44, 115). Plusieurs autres gènes de résistance ont également été détectés dont *vanB* et *vanC* qui produisent une altération de la membrane en transformant un D-alanine terminal en D-lactate. Le gène *vanC* confère un faible niveau de résistance. Ces résistances n'ont pas encore été observées chez le porc. Par contre, elles semblent se répandre chez les souches de SARMs d'origine humaine (8, 53).

Les lincosamides sont des agents bactériostatiques qui inhibent la synthèse protéique en liant la sous-unité 50S du ribosome et en inhibant la peptidyl-transférase (115). Cette famille d'antibiotiques a un spectre d'action moyen en étant efficace contre les bactéries à Gram positif et les anaérobies, ils sont cependant peu efficaces contre les bactéries à Gram négatif. Les molécules sont en général bien absorbées par la paroi intestinale. Elle comprend la lincomycine, la clindamycine et la pirlimycine. De la résistance chromosomale a été observée, mais la résistance plasmidique est plus fréquente et plus stable (115). Les résistances plasmidiques sont le résultat d'une méthylation d'un résidu adénine dans l'ARN ribosomale 23S de la sous-unité 50S du ribosome, cela prévient la liaison de l'antibiotique à sa cible (115). Elles sont associées principalement aux gènes *ermA*, *ermB* et *ermC* qui confèrent également une résistance

aux macrolides et aux streptogramines (88). Ces gènes (*ermA*, *ermB* et *ermC*) ont d'ailleurs été observés chez les SARMs du porc (51, 67). Les SARMs porcins peuvent également avoir un plasmide, le pKKS825, qui contient le gène *vga(C)*. Ce gène code pour un transporteur ABC qui est responsable de la résistance, non seulement envers les lincosamides, mais également envers les streptogramines (70). Le gène *linA* quant à lui confère une résistance seulement aux lincosamides (88). Chez les SARMs porcins, de la résistance phénotypique aux lincosamides a été observée (31, 56, 79, 97, 104, 147).

Le mupirocin, ou l'acide pseudomonique, est produit par *Pseudomonas fluorescens* et est chimiquement différent de tous les autres antibiotiques (157). Cet antibiotique est constitué de courts acides gras liés à une plus grosse molécule, l'acide monique. Cet arrangement permet de mimer l'acide aminé isoleucine (44, 157). Il est par conséquent un inhibiteur de l'isoleucyl-ARNt synthétase (codé par le gène *ileS*), et en se liant à celle-ci dans la cellule bactérienne, il inhibe alors la synthèse protéique (44, 112). Cet antibiotique est efficace principalement contre les bactéries à Gram positif dont les staphylocoques incluant les SARMs et les streptocoques (157). La plupart des bactéries à Gram négatif ont une résistance intrinsèque conférée par la limitation de la pénétration intracellulaire de l'antibiotique dans la membrane externe. De hauts niveaux de résistance acquise ont également été observés chez certains *S. aureus*. Cette résistance serait médiée par le gène *mupA* localisé sur un plasmide conjugatif et serait responsable de la production d'une isoleucyl-ARNt synthétase différente de celle présente sur le chromosome de la bactérie (28, 157). La présence

d'un plasmide conjugatif associé au gène *iles-2* conduit également à une résistance élevée par l'addition d'une nouvelle isoleucyl-ARNt synthétase qui ne lie pas le mupirocin (112). Des mutations chromosomales ont également été décrites conférant une résistance modérée, mais plus stable (157). Cet antibiotique doit être administré de façon topique, car il est rapidement éliminé par l'organisme lors d'une administration systémique (157). Il est souvent utilisé en médecine humaine dans le traitement topique nasal afin de diminuer l'état de porteur de SARMs lors d'une intervention chirurgicale sur un patient positif (158). De la résistance au mupirocin a été observée chez des SARMs humains mais ne semble pas être présente chez les souches porcines (28, 112).

Les oxazolidinones sont un nouveau groupe d'antimicrobiens synthétiques. Le linézolide et l'épérezolide sont les principaux membres de cette famille. Ils sont actifs contre un large spectre de bactéries à Gram positif (19, 40). Le mode d'action de ces antibiotiques n'est pas encore complètement connu. On suppose une liaison à la sous-unité 50S des ribosomes. Plus précisément, les oxazolidinones inhiberaient la formation du complexe initial composé de la sous-unité 30S, de l'ARMm, de fMet-ARNt, et du GTP en plus des facteurs d'initiation (19). Cet antibiotique est utilisé dans les traitements contre les SARMs et les *S. aureus* résistants à la vancomycine retrouvés en médecine humaine (6). La résistance à ces antibiotiques a été observée et un de ces mécanismes entraîne une modification de la cible par mutation. En effet, la diminution de l'affinité du ribosome pour les oxazolidinones est due à une mutation dans l'ARNr 23S (19). Récemment, de la résistance à cet antibiotique a été observée chez des souches de SARMs retrouvées chez des humains ayant des contacts avec des porcs.

C'est le gène *cfi* qui serait responsable de cette résistance. Ce gène coderait également pour la résistance aux phénicoles, lincosamides, pleuromutilines et streptogramine A (72).

Les streptogramines sont des antibiotiques constitués d'au moins deux molécules structurellement non-relées, les streptogramines du groupe A (macrolactones) et les streptogramines du groupe B (hexadepsipeptides cycliques) (115). Ces molécules agissent en synergie afin de réduire l'émergence de bactéries résistantes à chacun des composants. Ils vont inhiber la synthèse protéique en interférant avec l'activité peptidyltransférase du ribosome (115). Ils sont actifs principalement contre les bactéries à Gram positif, mais également contre certaines à Gram négatif. Cette famille d'antibiotiques comprend la virginiamycine, la pristinamycine et la quinupristine/dalfopristine. Une résistance par modification de la cible sur le ribosome a été observée. Elle peut être codée par les gènes *ermA*, *ermB* et *ermC* qui confèrent également une résistance aux macrolides et aux lincosamides (10, 38, 51, 88, 159). Il peut également y avoir présence d'une pompe à efflux qui diminue les concentrations intracellulaires d'antibiotique et qui est codée par le gène *msrA*. Ce gène confère également une résistance aux macrolides (10, 88). Ce gène a déjà été détecté chez des SARMs du porc (51). La résistance aux streptogramines A résultant d'une pompe à efflux est codée par les gènes *vata* et *vatB*. Le gène *vgb* quant à lui code pour une lactonase qui inactive les streptogramines de type B (88).

Les sulfamides interfèrent avec la biosynthèse de l'acide folique dans les cellules bactériennes en entrant en compétition avec l'acide para-aminobenzoïque l'empêchant ainsi de s'incorporer à la molécule d'acide folique (122). Les sulfamides ont un large spectre d'action, mais leur utilisation est limitée par la grande variété de résistances qui sont apparues suite à près de 50 ans d'utilisation (122). Ces résistances peuvent être chromosomiques ou plasmidiques. Ce sont cependant les résistances plasmidiques qui sont les plus courantes. Elles sont le résultat d'une diminution de la pénétration de l'antibiotique dans la bactérie par diminution de la perméabilité de la paroi cellulaire, ou de la production additionnelle d'une enzyme dihydroptéroate synthétase résistante aux sulfamides (122). Pour combler ces résistances, on utilise souvent des combinaisons d'antibiotiques, particulièrement la combinaison triméthoprime-sulfaméthoxazole. Le triméthoprime appartient à la classe des diaminopyrimidines. Ces antibiotiques interfèrent également avec l'acide folique, mais cette fois en inhibant la dihydrofolate réductase (122). Chez *S. aureus*, une résistance au triméthoprime a été observé chez des souches ST398 provenant de porcs (51, 69). Cette résistance était codée par le gène *dfrK* qui était situé sur un plasmide et code pour une protéine dihydrofolate réductase de 163-aa (51, 69).

La chlortétracycline, l'oxytétracycline et la tétracycline sont à l'origine naturelles et produites par *Streptomyces* spp. La doxycycline et la minocycline sont des dérivés semi-synthétiques des tétracyclines (115). Elles ont un large spectre d'action grâce à leur activité contre les bactéries à Gram positif, Gram négatif, aérobies et anaérobies (115). Les tétracyclines sont des antibiotiques bactériostatiques qui inhibent

la synthèse protéique (44, 115). Pour entrer dans la cellule, elles diffusent au travers de la membrane cellulaire externe puis sont transportées activement dans le cytoplasme (44, 115). Dans la cellule, elles se lient à la sous-unité 30S du ribosome et empêchent la liaison de l'aminocyl-ARNt au site accepteur sur le complexe ribosome-ARN messenger. Cela empêche l'élongation des chaînes de peptides et inhibe la synthèse protéique (44, 115). Trois modes de résistance aux tétracyclines ont été observés, soit l'élimination des tétracyclines intracellulaires par efflux, la protection du ribosome par modification de la cible et la modification des tétracyclines par des enzymes (115, 132). Ces résistances sont codées par de nombreux gènes qui sont le plus souvent plasmidiques. Les gènes *tet* sont les plus fréquents, mais il peut également y avoir les gènes *otrA*, *otrB*, *otrC* et *trcC* (132). Chez les SARMs du porc, ce sont les gènes *tet(M)*, *tet(K)*, et *tet(L)* qui ont été observés jusqu'à présent (10, 38, 51, 67, 159).

Tableau III : Les résistances phénotypiques et génotypiques rapportées chez les SARMs d'origine porcine

Résistance phénotypique	Gènes de résistance	Mécanisme d'action	Référence
CLI, ERM, STR, TET	N.D.	N.D.	(57)
CIP, CLI, ERM, TET	N.D.	N.D.	(126)
CLI, DX, ERM, GEN, KAN, TET, TM	N.D.	N.D.	(35)
AMP, ERM, GEN, KAN, LIN, TET, TYL	N.D.	N.D.	(142)
CLI, ERM, Q/D, TET	N.D.	N.D.	(130)
ERM, GEN, KAN, LIN, TET	N.D.	N.D.	(141)
CHL, CLI, ERM, F, TET, TIA	<i>cfr, fexA, erm(A), tet(M),</i>	M-C, P-E	(72)
KAN, LIN, NEO, TET, TIA, TMP, VAL, VIR	<i>aadD, tet(L), dfrK, vga(C)</i>	P-E, M-C, P-E	(70)
TMP, TET	<i>tet(L), dfrK</i>	P-E, M-C	(69)
ERM, TET	<i>erm(C), tet(M), tet(K)</i>	M-C, P-E	(113)
CLI, ERM, GEN, KAN, STR, SXT, TET, TM	<i>tet(K), tet(M), tet(L), erm(A), erm(C), erm(T), msr(A), aacA/aphD, addD, str, dfrA, dfrG, dfrK</i>	P-E, M-C, I-A	(51)

Abréviations des antibiotiques : Ampicilline; AMP, Chlormaphénicol; CHL, Ciprofloxacine; CIP, Clindamycine; CLI, Doxycycline; DX, Érythromycine; ERM, Florfénicol; F, Gentamycine; GEN, Kanamycine; KAN, Lincomycine; LIN, Néomycine; NEO, Quinupristin-delfopristin; Q/D, Streptomycine; STR, Tétracycline; TET, Tiamuline; TIA, Tobramycine; TM, Triméthoprime; TMP, Triméthoprime/sulphaméthoxazole; SXT, Tylosin; TYL, Valnemuline; VAL, Virginiamycine M1; VIR

Mécanismes d'action : Information non disponible; N.D., Modification de la cible; M-C, Pompe à efflux; P-E, Inactivation de l'antibiotique; I-A,

Article scientifique

Running Head: Antimicrobial-Resistant MRSA in abattoir pigs

Characterization of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) Strains from
Abattoir Pigs and Association between Colonization and Low Seroconversion

Michael Beaudry-Ferland^{1Φ}, Geneviève Pelletier-Jacques^{1Φ}, Ann Letellier¹, Brian
Talbot², Héléna Monière-Wollank², Myriame Lafrance², François Malouin² and Marie
Archambault^{1*},

Φ Both sharing first authorship

Keywords: Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), pigs, antimicrobial
resistance, microarray, virulence genes, abattoir, Canada

¹Faculté de Médecine Vétérinaire, Département de Pathologie et Microbiologie, Centre
de Recherche en Infectiologie Porcine (CRIP), University of Montreal, 3 200 Sicotte
Street, Saint-Hyacinthe, J2S 7C6, Québec, Canada; ²Centre d'Étude et de Valorisation de
la Diversité Microbienne (CEVDM), Département de biologie, Faculté des sciences,
Université de Sherbrooke, Sherbrooke, QC, Canada J1K 2R1

*Corresponding author: Marie Archambault, tel: (1) 450-773-8521 ext 8679; Fax: (1)

450-778-8108

Abstract

Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) found in food producing animals is a major public health concern. Transmission to humans has been reported and MRSA represents a reservoir of antimicrobial resistance genes. Little is known on how MRSA successfully establishes colonization and how it is able to persist in the host. This study was conducted to determine the occurrence and the antimicrobial resistance profile of MRSA from abattoir pigs and their level of seroconversion toward *S. aureus* (SA). Nasal and axillary skin swabs and blood samples were randomly collected from 316 pigs from two abattoirs representing 43 farms located in the Province of Quebec, Canada. Also, 28 abscesses were sampled at the carcass inspection point. The swabs were inoculated into enrichment broth and selective MRSA chromogenic agar plates. A multiplex PCR was performed using the *nuc* and *mecA* genes to confirm MRSA identification. Antimicrobial susceptibilities were determined by broth microdilutions. A total of 107 isolates were identified as MRSA originating from the nasal or the axillary regions. No SA or MRSA were recovered from abscesses. Fifteen clones were identified by MLVA with clones VI (40.1%; 43/107) and XI (17.7%; 19/107) being the most predominant. All MRSA isolates were *pvl*-, *tst*-, *eta*- and *etb*-negative. Most isolates were SCC*mec* type V (70.1%; 75/107). A possibly new SCC*mec* elements, the III/IVb was observed in 29.9 % (32/107) of the isolates. All MRSA isolates were susceptible to ciprofloxacin, gatifloxacin, gentamicin, levofloxacin, linezolid, quinupristin/dalfopristin, rifampin, streptomycin, trimethoprim/sulfamethoxazole and vancomycin. However, resistance was observed toward clindamycin (29%), daptomycin (0.9%), erythromycin (29%) and tetracycline (98.1%). Multi-resistance was confirmed in MRSA since 28% of

all isolates were resistant toward three antimicrobials other than β -lactams. The effect of MRSA carriage on seroconversion was examined to see whether the host responded differently to MRSA or SA colonization. The presence of SA-specific antibodies in pig serums was measured for each animal using indirect ELISA and a mixture of two widespread SA antigens (IsdH [HarA] and IsdB). Serums (1:3000) were considered positive if A_{450} was >0.3 . Regardless of the colonization site, SA-/MRSA- pigs ($n=34$) and SA+ pigs ($n=194$) showed 20.6% and 32.5% seroconversion, respectively. Notably, pigs colonized by MRSA at one body site and no SA at the other sampling site ($n=18$) showed a significantly lower (5.6%) seroconversion ($P < 0.05$) compared to pigs colonized by SA at one or both sites without MRSA. The findings of the study show that the nares and axillae of abattoir pigs can harbor MRSA strains with multiple antimicrobial resistances. In addition, these MRSA were possibly able to colonize the host either without stimulating antibody production, by attenuating the immune response or by colonizing pigs that are less immunocompetent. This may explain the success of MRSA colonization and persistence in pigs. Further studies are required to better elucidate MRSA colonization in abattoir pigs and their public health risk.

Key-word: Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), pig, antimicrobial, abattoir, multi-resistance, seroconversion, Canada

1. Introduction

Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) is a critically important pathogen in human medicine responsible for a wide range of diseases from superficial skin infections to life-threatening conditions. MRSA strains are resistant to all beta-lactam antimicrobials through the activity of a penicillin binding protein (PBP2a) that has a low affinity for this class of antibiotics [1]. The protein is encoded by the *mecA* gene located on mobile genetic elements called staphylococcal chromosomal cassettes (*SCCmec*). Additionally, MRSA strains are often resistant to a wide range of other antimicrobials which adds to the burden of treatment efficacy. An increased number of reports have recently been published on MRSA in livestock, especially from swine and veal calves [2,3,4,5,6]. Different animal-specific lineages such as livestock-associated-MRSA (LA-MRSA) have been implicated, and also human-associated MRSA genotypes have been identified [2]. MRSA has also been found in companion animals and horses, and transmission between humans and colonized animals has been reported [2,7,8,9].

MRSA colonization in pigs was first reported in the Netherlands [10]. In later years, MRSA has been isolated from healthy pigs of various age groups in a number of countries at farms and at slaughterhouses [11,12,13,14,15,16]. Most of the isolates belong to the multilocus sequence type (MLST) ST398 and many of them showed antimicrobial resistance toward tetracycline [17]. Erythromycin and clindamycin resistances have also been reported [18]. Resistance to ciprofloxacin and trimethoprim-sulfamethoxazole seems to be less common [13,14,17,19]. However, these strains are usually susceptible to rifampin, vancomycin, and linezolid [11,14,17,20,21]. ST398 has been shown to be non-

typeable by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) using the restriction enzyme *SmaI* but is typeable after macrorestriction with *EagI* [22]. People who have had contact with farm animals, especially pigs, and also slaughterhouse workers have been found to be colonized by this MRSA type more often than people who have not had such contacts [10,23]. In many countries, pig exposure is now considered a significant risk factor for MRSA ST398 colonization in humans [2,17]. Reports have also documented apparent transmission of MRSA between pigs and pig farmers and their family members [2,23]. Many cases of colonized pig workers have been reported in the last 10 years in different countries [12,13,16,17,19,24]. MRSA of porcine origin has also been reported as the cause of human infections such as skin and soft tissue infections [2,8,25], destructive otomastoiditis [9] and severe pneumonia [7].

The potential role of food and food products in the spread of animal-associated MRSA is not clear. Reports from the Netherlands indicated that MRSA can be isolated from meat samples at retail stores but concluded that food is not likely a major factor contributing to the spread of MRSA from animals to humans [26,27]. In many surveys MRSA was found in retail meat in percentages ranging from 1.2% to 35% and in various meat types such as pork, beef, chicken, turkey, veal, lamb and mutton [26,27,28].

A Canadian study reported an MRSA prevalence of 24.9% in farm pigs in the province of Ontario. The predominant MRSA strain was of Spa type 539 (Ridom t034, clonal complex 398) [29]. To our knowledge, occurrence, genotypes and antimicrobial resistance of MRSA originating from nasal and axillary skin samples in pigs slaughtered

in Canada, is presently unknown. The aim of this study was thus to determine the prevalence of MRSA in abattoir pigs and to identify whether they can harbour multiple antimicrobial resistances. DNA microarray chip analysis was also performed to characterize the MRSA isolates by detecting the genes encoding for ST types, antimicrobial resistance, enterotoxins, virulence factors of the staphylococcal leukotoxin family, biofilm formation, exotoxins, and genes from accessory gene regulator systems. In addition, since little is known on how MRSA successfully establishes colonization and how it is able to persist in the host, we also evaluated the seroconversion of pigs to see if the host responds differently to *S. aureus* or MRSA colonization.

2. Materials and methods

2.1 Sample collection and bacterial isolation

Nasal swabs, skin swabs and blood samples were randomly collected from 316 pigs from two slaughterhouses (A and B) located in the province of Quebec, Canada, between November 2008 and February 2009. In addition, 28 abscesses were collected at the carcass inspection point. For each pig the batch and origin farms were noted. The swabs were inoculated into 5 mL of enrichment broth as previously described [29] and possible MRSA colonies were selected using MRSA *Select*TM agar (Bio-Rad, Canada). Blood samples were also collected from each pig at slaughter. After centrifugation, the serums were divided into 3 aliquots of 1.5 mL and frozen for further analysis.

2.2 Molecular testing

DNA extraction was performed with the Chelex 100 (Bio-Rad, Mississauga, Ontario, Canada), using the manufacturers protocol. MRSA isolates from pigs were confirmed by multiplex PCR using the *nuc* and *mecA* gene primer sets as previously described [30,31]. The presence of *pvl*, *eta*, *etb* and *tsst* genes was determined by a multiplex PCR [31]. Amplifications were performed in a Biometra PCR system Tpersonal or Tgradient Thermal Cycler (Applied Biosystems, Foster City, CA), Amplicons were visualized using a UV light box after electrophoresis on a 2% agarose gel containing 0.5 µg/ml of ethidium bromide. All MRSA isolates were selected for molecular typing. Multiple locus variable number of tandem repeats analysis (MLVA) was performed with primers and conditions previously described [32] with minor modifications. Briefly, three different MLVA were performed using the primer sets for the *sdr* (Sdr proteins), *clfA* (clumping

factor A) and *clfB* (clumping factor B) genes. The *spa* (protein A) and *sspA* (serine protease) genes were detected using one MLVA procedure. Each PCR mixture contained 10X PCR Buffer, 1.2 mM MgCl₂, 480 μM of dNTPs, 1 U of Taq DNA polymerase (GE Healthcare), 5 μL of the DNA template and respectively 1.6 μM of the primers *sdr*, *clfa* and *clfb*, and 600 nM of the primers *spa* and *sspA*, in a total volume of 25 μl. A TrackIt ladder 100 bp (Invitrogen) was used as the marker. The MLVA patterns were analysed using BioNumerics software with Dice correlation (optimization 0.6%, band filtering tolerance 1%, cut-off 80%; version 6.0, Applied Maths, Belgium). The SCC*mec* typing was performed by multiplex PCR with primers and conditions previously described [33] with the following modification: two multiplex PCR included five primer sets each: one including primers for SCC*mec* types and subtypes I, II, III, IVd and the internal control *mecA* gene, and the other including primers for SCC*mec* types and subtypes IVa, IVb, IVc, V with the internal control *mecA* gene. MRSA-COL (type I), MRSA CCRI-9214 (type II), MRSA CCRI-1317 (type III), CA-MRSA sa220c (type IVa), MRSA 154N (types III and IVb), MRSA CCRI-9598 (type IVc), MRSA CCRI-9593 (type IVd), MRSA 97 (type V) were used as positive controls.

2.3 Antimicrobial susceptibility testing

Strains were tested for antimicrobial susceptibility by the broth microdilution method (plates GPN3F) with the ARIS automatic system of Sensititre™ (Trek™ Diagnostic System Ltd, Cleveland, Ohio, USA) with guidelines and breakpoints of the Clinical and Laboratory Standards Institute [34,35]. The minimal inhibitory concentration (MIC) of 18 antimicrobials were determined (Table 1) using the interpretation breakpoints indicated in

parenthesis: ampicillin (AMP, ≥ 0.5 $\mu\text{g/ml}$), ceftriaxone (CEF, ≥ 64 $\mu\text{g/ml}$), ciprofloxacin (CIP, ≥ 4 $\mu\text{g/ml}$), clindamycin (CLI, ≥ 4 $\mu\text{g/ml}$), daptomycin (DPT, > 1 $\mu\text{g/ml}$), erythromycin (ERY, ≥ 8 $\mu\text{g/ml}$), gatifloxacin (GAT, ≥ 2 $\mu\text{g/ml}$), gentamicin (GEN, ≥ 16 $\mu\text{g/ml}$), levofloxacin (LEV, ≥ 4 $\mu\text{g/ml}$), linezolid (LIZ, ≥ 8 $\mu\text{g/ml}$), quinupristin/dalfopristin (Q/D, ≥ 4 $\mu\text{g/ml}$), oxacillin (OXA, ≥ 4 $\mu\text{g/ml}$), penicillin (PEN, ≥ 0.25 $\mu\text{g/ml}$), rifampin (RIF, ≥ 4 $\mu\text{g/ml}$), streptomycin (STR, ≥ 1000 $\mu\text{g/ml}$), tetracycline (TET, ≥ 16 $\mu\text{g/ml}$), trimethoprim/sulfamethoxazoles (TMS, $\geq 4/76$ $\mu\text{g/ml}$) and vancomycin (VAN, ≥ 16 ou 32 $\mu\text{g/ml}$). Strains *S. aureus* ATCC 29213 and *Escherichia coli* ATCC 25922 were used as quality controls.

2.4 DNA Microarrays

Microarrays were performed on two representative strains (No. 97 and 154N) based on different abattoirs, phenotypic antimicrobial resistance, SCC*mec* types and MLVA lineages. These MRSA strains were characterized by the StaphType© array based on the Array-Tube platform (CLONDIAG Chip technologies, Jena, Germany) [36] with a set of probes covering species markers of *S. aureus*, antimicrobial resistance determinants, toxins and other virulence factors, as well as probes for the discrimination of MLST and *spa* types. This system detects genes encoding for various virulence factors such as staphylococcal enterotoxins (*entA-entE*, *entG-entO*, *entQ*, *entR*, *entU*), leukocidins (*lukD*, *lukE*, *lukF*, *lukM*, *lukS*, *lukX*, *lukY*), Panton-Valentine leukocidin (PVL) (*lukF-PV*, *lukS-PV*), hemolysins (*hla*, *hly*, *hlgA*, *hly*), and accessory gene regulator system (*agrB-I-IV*, *agrC-I-IV*, *agrD-I-III* and *sarA*). The second array consists of 182 oligonucleotides corresponding to 166 different acquired antimicrobial resistance gene targets, covering

most of the resistance genes found in both Gram-negative and -positive bacteria [37]. All probes have been previously described and evaluated [36,37,38].

2.5 Production of recombinant *S. aureus* antigen proteins

The *isdH(harA)* and *isdB* genes were cloned from *S. aureus* ATCC 25904 into pQE30 plasmid (Qiagen Inc., Mississauga, ON, Canada), according to the manufacturer's recommendations [39]. Recombinant proteins were produced in *Escherichia coli* M15 with pREP-4 plasmid after isopropyl β -d-1-thiogalactopyranoside (IPTG) induction (Qiagen). Protein purification was performed under native conditions using a nickel-nitrilotriacetic acid resin (Qiagen). Recombinant proteins were dialyzed and concentrated.

2.6 Antibody detection

The presence of antibodies against some *S. aureus* surface proteins was determined by an indirect ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay). Each well of flat bottom 96-well plates was coated with 5 μ g/ml of antigen (either IsdH(HarA), IsdB or a mixture of both) diluted in carbonate/bicarbonate 0.1 M buffer pH 9.6 (100 μ l/well). After an overnight incubation at 4°C, the plates were washed twice with PBS-0.05% Tween®20 using an automated plate washer (Asys Atlantis Microplate Washer, PRS Scientific LLC, Walkersville, MD). Plates were then filled with a blocking solution (PBS-5% milk (w/v)). After one hour at 37°C, plates were washed twice and filled (100 μ l/well in triplicate) with the test serum diluted 1/3000 in PBS-4% milk (w/v). After 2h at 37°C and two washes, the plates were filled (100 μ l/well) with the secondary antibody solution (rabbit anti-pig

IgG coupled to peroxidase (Sigma-Aldrich, St -Louis, MO) diluted 1/1000 in PBS-3% milk (w/v). After another 1h at 37°C and two washes, the plates were filled (100 µl/well) with the TMB substrate solution (KPL, Gaithersburg, MD) for 10 min at room temperature. The reaction was then stopped by the addition of 100 µl HCl 1N. Absorbance at 450 nm (A_{450}) was recorded with a Power Wave 200 plate reader (Bio-tek Instruments, Winooski, VT). A serum was considered positive for *S. aureus* antibodies (seroconversion) when the A_{450} was greater than 0.3 for a serum diluted 1/3000.

3. RESULTS

3.1 MRSA prevalence in swine

Nasal swabs, axillary skin swabs and blood samples were taken from 316 swine from two slaughterhouses (A and B) representing 43 farms (A: 35 and B: 8 farms). A total of 107 MRSA *isolates* were recovered from both nasal and skin samples (107/632). MRSA prevalence in swine varied based on sampling site. MRSA were found on either nasal swab only (9.8%; 31/316), skin swab only (11.4%; 36/316), or nasal and skin (6.3%; 20/316) for a total prevalence (skin or nasal or both) of 27.5% (87/316). No MRSA was isolated from abscesses (0/28). Prevalence of MRSA positive pigs at the slaughterhouse A was numerically higher (30.8%; 52/169) than the one observed at the slaughterhouse B (23.8%; 35/147).

3.2 Antimicrobial susceptibility

Percentages of antimicrobial resistance based on MICs for MRSA ($n = 107$) are presented in Table 1 with the MIC₅₀ and the MIC₉₀ for each antimicrobial. All strains were susceptible to ciprofloxacin, gatifloxacin, gentamicin, levofloxacin, linezolid, quinupristin/dalfopristin, rifampin, streptomycin, trimethoprim/sulfamethoxazole and vancomycin. Low, intermediate and high frequencies of antimicrobial resistance were observed to specific antimicrobials. Only a small number of isolates were resistant to daptomycin (0.9%) while more resistance was observed toward clindamycin (29%) and erythromycin (29%). Most of the isolates were resistant to tetracycline (98.1%) in addition to the expected beta-lactam resistances (ampicillin, ceftriaxone, oxacillin and penicillin). In view of the resistance to oxacillin and ceftriaxone, despite harboring the

mecA gene, four of the characterized strains were phenotypically susceptible to oxacillin and ceftriaxone, whereas all strains were resistant to ampicillin and penicillin. Many strains, 28% (30/107), were resistant toward representatives of 4 classes of antimicrobials namely, oxacillin (but also ampicillin, penicillin and ceftriaxone), clindamycin, tetracycline, and erythromycin (Table 2). Of those, 41.9% (26/62) were from the abattoir A and 8.8% (4/45) from the abattoir B.

3.3 Molecular typing and DNA microarray

Fifteen clones were identified by MLVA. Clones VI (40.1%; 43/107) and XI (17.7%; 19/107) were predominant (Fig. 1). Most isolates of clone VI were from abattoir B (69.8%; 30/43) while most isolates of clone XI were from abattoir A (73.7%; 14/19) (Table 3). All MRSA isolates were *pvl*-, *tst*-, *eta*- and *etb*-negative. Most isolates were SCC*mec* type V (70.1%; 75/107). A possibly new SCC*mec*, the III/IVb, was observed in 29.9 % (32/107) of the isolates (Table 3). DNA microarray analysis (Fig. 2) of the two examined MRSA strains (No. 97 with resistance phenotype AMP-OXA-PEN-TET and intermediate phenotype CEF-CLI-ERY; and No. 154N with resistance phenotype AMP-CLI-ERY-OXA-PEN-TET, and intermediate phenotype CEF-Q/D) revealed the presence of genes encoding for MLST types, antimicrobial resistance (*linA*, *ermA*, *tetK*, *ermC*, *tetEfflux*, *tetL*, *aadD*, *fosB* and *vgaA*) enterotoxins (*entG*, *entI*, *entM*, *entN*, *entN_1*, *entO*, *entU*), leukocidins and hemolysins (*hlgA*, *hla*, *hly*, *hlIII*, *lukF*, *lukS*, *lukX*, *hlgA*, *hla*, *hly*, *hlIII*, *lukD*, *lukE*, *lukF*, *lukS*, *lukX*), aureolysins (*aur*, *aur-OtherThan252*, *aur-MRSA252*), serine protease (*splA*, *splB*), staphopains (*sspA*, *sspB*, *sspP*), and capsule/biofilm (*capsule-5*, *capH5*, *capJ5*, *capK5*, *icaA*, *icaC*, *icaD*).

3.4 Seroconversion of pigs

The presence of antibodies against two *S. aureus* surface proteins in the serums of abattoir pigs was evaluated by ELISA. Overall, 27.6% of serums (87/315 serum tested) were considered positive (seroconversion) for the presence of antibodies against the mixture of *S. aureus* IsdB and IsdH(HarA) in ELISA plates. When antigens were tested individually, there were 7.3 times more positive serums against IsdB than against IsdH. Because the numbers of positive serums were small when divided into a variety of categories, we could not define any association between seroconversion and the origin of serums (farm or slaughterhouse), the characteristics of MRSA isolates (SCC*mec*, MLVA clones) or the site of colonization (nasal, skin). However, the percentage of positive serums differed depending on the presence of MRSA. Figure 3 shows the percentage of positive serums in animal groups colonized by MRSA compared to others. Interestingly, the 34 pigs for which *S. aureus* was not detected at any site showed a relatively high seroconversion compared to pigs colonized by MRSA (Fig. 3). This indicates that the *S. aureus*-negative group may still have had a previous or undetected colonization by *S. aureus*. Analysis of all ELISA A_{450} data (two independent experiments with duplicate tests performed in both) revealed that the positivity of serums from 18 pigs colonized by MRSA at one site (but negative for *S. aureus* at the other site) was significantly lower ($P < 0.05$) than the seropositivity of serums collected from 194 pigs colonized by *S. aureus* at one or two sites and negative for MRSA, as evaluated by a one-way analysis of variance followed by Tukey's multiple comparison test. These results indicate that there may be a higher level of seroconversion in pigs colonized by non-MRSA strains.

4. Discussion

This study is one of the first to document the presence of MRSA ST398 in Canadian abattoir pigs, and to our knowledge, the first in Canada to report on their antimicrobial resistance. Interestingly, MRSA prevalence in swine was dependent on the site of colonization and the abattoir. This indicated that swine may harbour MRSA in their nares and/or on their skin axillary region and suggests that more than one site should be sampled to establish carriage. The total prevalence (27.5%, skin or nasal or both) we report here is a little higher compared to that previously published in farm pigs in Canada (24.9%) [29]. The MRSA isolated in our study were resistant to tetracycline (98.1%), and thus, could have been selected and maintained in the swine population by antimicrobial pressure on the farms. Production systems that were sampled at both abattoirs employed similar antimicrobial prophylactic and therapeutic protocols, including tetracycline. We can speculate that there is a link between swine MRSA carriage and tetracycline use. The tetracycline resistance phenotype was explained by the *tetE* efflux, *tetK*, or *tetL* genes. These genes encode for efflux pumps [40]. These results demonstrate that abattoir pigs are an important reservoir of tetracycline-resistant MRSA in Canada as it has been previously reported in other countries [14,16,19,20,21,41].

In addition to tetracycline resistance, we found a macrolide-lincosamide resistance phenotype among a subset of isolates (erythromycin, 29.9%; clindamycin 29.0%). The macrolide-lincosamide resistance phenotype was explained by the presence of *linA*, *ermA*, or *ermC* genes. These genes encode for either efflux pumps or ribosomal protection proteins [42,43]. These resistances were previously reported in other countries

[14,16,19,20,21,41]. Multi-resistance was also identified since many strains, 28% (30/107), were resistant toward seven antimicrobials namely, ampicillin, ceftriaxone, clindamycin, oxacillin, penicillin, tetracycline, and erythromycin, *i.e.*, four different classes of antimicrobials. Of those, 41.9% (26/62) were from the abattoir A and 8.8% (4/45) from the abattoir B. These two slaughterhouses received animals from production systems which operate with important differences. Firstly, they raise different breeds of swine. Secondly, abattoir B deals with only one well-established operation (out of eight farms) that has tight antimicrobial use guidelines under the surveillance of one veterinarian, this compares to many (out of 35 farms) in abattoir A.

Only one isolate (No. 96), which was from abattoir A, was resistant to daptomycin with a MIC of 2 µg/ml, and to our knowledge, this is the first daptomycin resistance report in MRSA from pigs. In humans, MRSA daptomycin resistance has previously been reported [44,45]. Daptomycin is a novel antibiotic and was the first agent of the cyclic lipopeptide class. The use of this antimicrobial is indicated for complicated human skin and skin structure infections caused by susceptible isolates of *S. aureus*, including MRSA isolates, and *S. aureus* bloodstream infections including right-sided infective endocarditis, caused by methicillin-susceptible and MRSA isolates. This resistance is difficult to explain as daptomycin is not labeled for agriculture use. In addition, its mechanism of action is distinct from other classes of antimicrobials as it binds to bacterial cell membranes, causes rapid depolarization of membrane potential and inhibition of macromolecular synthesis which results in cell death without lysis [46]. To our knowledge, genes encoding for daptomycin resistance have not yet been described and there are no known

transferable elements that confer resistance to daptomycin. However, a correlation between reduced daptomycin susceptibility and vancomycin resistance in vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* (VISA) has been described previously [46]. This correlation was related to cell wall thickening, suggesting that, similar to the case with vancomycin resistance in VISA, the physical barrier of a thickened cell wall may contribute to daptomycin resistance in *S. aureus* [46]. This is the only mechanism of resistance toward daptomycin identified thus far. Interestingly, a vancomycin MIC value of 2 ug/ml was measured for the daptomycin-resistant strain No.96. Although the vancomycin intermediate breakpoint is 8-16 µg/ml, this MIC is the highest value recorded for this antimicrobial in our study. Analysis of the cell wall thickness of this strain is currently underway.

Additional genes, *aadD*, *fosB* and *vgaA*, were identified by microarrays and encode respectively for aminoglycosides (amikacine, tobramycine, neomycine), fosfomycine (bleomycine) and streptogramin resistances. Interestingly, the presence of the *vgaA* gene was linked to an intermediate resistance phenotype toward streptogramin. This result was also observed for *linA* and *ermA* genes. Phenotypic antimicrobial resistances toward aminoglycosides (amikacine, tobramycine, neomycine) and fosfomycine (bleomycine) were not observed. These results are in agreement with what was previously found in other studies where microarrays have been used [47,48]. Resistance genes toward lincosamide (*linA*), streptogramin (*vgaA*), aminoglycosides (*aadD*) and fosfomycin (*fosB*) are infrequently reported.

Most of our isolates were of SCC*mec* type V, which has been previously reported to be

associated with MRSA from pigs [49,50]. The remaining strains were positive to both *SCCmec* type III and type IVb by PCR. Also, the sequences of the two amplified regions corresponded to both *SCCmec* III and IVb. Previous reports on *SCCmec* elements have suggested that certain sub-types of *SCCmec* may result from the fusion of two *SCCmec* followed by deletion [51,52]. Further studies are needed to determine whether there is a fusion of the elements III/IVb or two different *SCCmec* types in these strains.

In addition, this is, to our knowledge, the first study where *entG*, *entI*, *entM*, *entN*, *entN_1*, *entO*, *entU*, and *lukX* genes were found in MRSA from swine. It could be possible that strains with genes encoding for enterotoxins represent a higher risk of virulence for pig workers and pork consumers. According to other studies, genes encoding for PVL, TST, ETA or ETB toxins were not detected [14,17,53]. This is also the first description of MLVA strain typing for swine MRSA and our results confirm MLVA studies on MRSA from other species where large numbers of isolates were identified with some isolates containing one strain and others with many strains [32,54]. We also like to think that MLVA is a useful method to discriminate MRSA strains. However, in our hands, the method was optimized with four PCRs for greater visual discrimination instead of only one multiplex PCR as previously described [55].

IsdB and IsdH(HarA) are iron-regulated surface proteins specialized in the acquisition of iron from the heme proteins [56]. The protein IsdH captures hemoglobin associated with haptoglobin whereas IsdB is a hemoglobin receptor. The Isd iron-acquisition system is

thought to be of major importance for *S. aureus* pathogenesis [57] and is strongly expressed in the mammalian environment [58]. IsdH(HarA) and IsdB are also relatively well conserved across unrelated *S. aureus* and MRSA lineages colonizing a variety of animal species in addition to showing little intra-lineage variations [59]. With such characteristics, IsdH(HarA) and IsdB thus represent suitable target antigens for studying seropositivity in many animal species including pigs. This also suggests that the significantly lower seroconversion rate we observed in pigs only colonized with MRSA at one site cannot be attributed to inadequate detection of strain-specific antibodies. Overall, our results suggest three possibilities that will need to be further investigated. Firstly, MRSA could colonize the host without stimulating antibody production. This idea is supported by evidence showing that MRSA produce relatively fewer immunostimulating toxins than non-MRSA strains [60]. Secondly, MRSA could, on the contrary, actively attenuate the immune response. For example, toxins such as leukocidins have the ability to kill neutrophils, macrophages and dendritic cells, thus disrupting the priming of the adaptive immune response against *S. aureus* [61]. Finally, MRSA could simply preferentially colonize pigs that are less immunocompetent, a situation similar to that found in hospitals where immunosuppression is a major risk factor for human MRSA infections [62]. Overall, the observed low seroconversion rate in pigs colonized by MRSA suggests an inadequate immune response against the pathogen and this may possibly explain the relatively high prevalence of MRSA in pig farms and abattoirs in Canada and around the world. Further studies are needed to adequately test hypothesis linking MRSA colonization to lower seroconversion.

In conclusion, these results show that the nares and axillary skin of abattoir pigs can harbor MRSA isolates that possess genes encoding antimicrobial resistance, enterotoxins, leukocidins, hemolysins, aureolysins, serine protease, staphopains, capsule and biofilm. In addition, a low seroconversion rate suggests an inadequate immune response against these MRSA and this may favor colonization, dissemination and persistence of MRSA in swine production systems.

5. ACKNOWLEDGEMENTS

The work was financially supported in part by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (M. Archambault, RGPIN-191461; F. Malouin RGPIN-89758-2010; A. Letellier RGPIN-110911). The Swine Infectiology Research Center (CRIP) (FQRNT Regroupements stratégiques 111946) and the Canadian Pork Council are both also gratefully acknowledged.

Table 1. Antimicrobial resistance of pig MRSA isolates (*n* = 107) based on MICs.

Antimicrobial agent	Number of isolates with MIC (µg/ml) of:																				CMI50	CMI90						
	≤0.12	≤0.25	0.25	≤0.5	0.5	≤1	1	≤2	2	≤4	4	≤8	8	>8	≤0.5/9.5	16	>16	32	64	4/76			500	>500	≤1000	>1000		
AMP	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	23	84	-	-	-	-	-	-	-	-	>16	>16	
CEF	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4	-	-	84	-	12	7	-	-	-	-	-	-	16	32	
CIP	-	-	-	102	-	-	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	≤0.5	≤0.5	
CLI	2	-	6	-	64	-	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	64	>2		
DPT	-	87	-	-	17	-	2	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	≤0.25	0.5	
ERY	-	34	-	-	39	-	-	-	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.5	>4	
GAT	-	-	-	-	-	107	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	≤1	≤1	
GEN	-	-	-	-	-	-	106	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	≤2	≤2	
LEV	-	103	-	-	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	≤0.25	≤0.25	
LIZ	-	-	-	-	-	-	67	-	37	-	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	2	
OXA	-	-	-	-	3	-	1	-	-	-	-	-	1	102	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	>8	>8	
PEN	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	107	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	>8	>8	
Q/D	-	-	66	-	12	-	9	-	20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.25	1	
RIF	-	-	-	106	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	≤0.5	≤0.5	
STR	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	107	≤1000	≤1000
TET	-	-	-	-	-	-	-	2	-	-	-	-	-	-	-	-	105	-	-	-	-	-	-	-	-	>16	>16	
TMS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	107	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	≤0.5/9.5	≤0.5/9.5
VAN	-	-	-	-	-	106	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	≤1	≤1	

Table 2. Pig MRSA antimicrobial resistance phenotypes other than beta-lactams.

Resistance phenotype	Number of isolates (%)
-	2 (1.9)
TET	72 (67.3)
TET, CLI	1 (0.9)
TET, DPT	1 (0.9)
TET, ERY	1 (0.9)
TET, CLI, ERY	30 (28.0)

Table 3. Associations between the two predominant MLVA clones in porcine MRSA with abattoirs, *SCCmec* types and antimicrobial resistance other than beta-lactams.

MLVA clone	Abattoir	<i>SCCmec</i> type	Resistance phenotype	Number of Isolates
VI	A	V	CLI, TET	1
			DPT, TET	1
			TET	11
			CLI, ERY, TET	3
			TET	27
XI	A	III/IVb	CLI, ERY, TET	14
			-	1
			TET	3
			CLI, ERY, TET	1

Fig. 1. MLVA dendrogram representing the clonal relationship among porcine MRSA isolates.

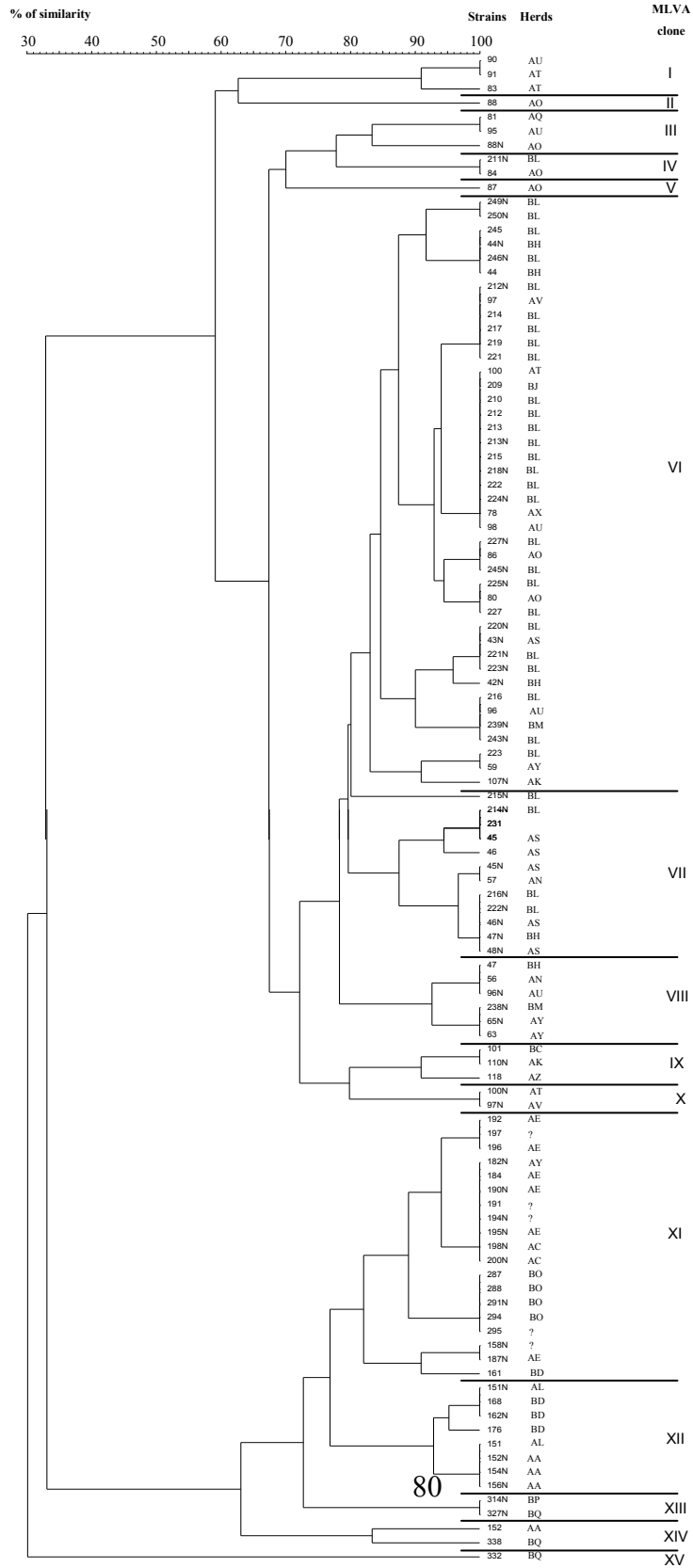
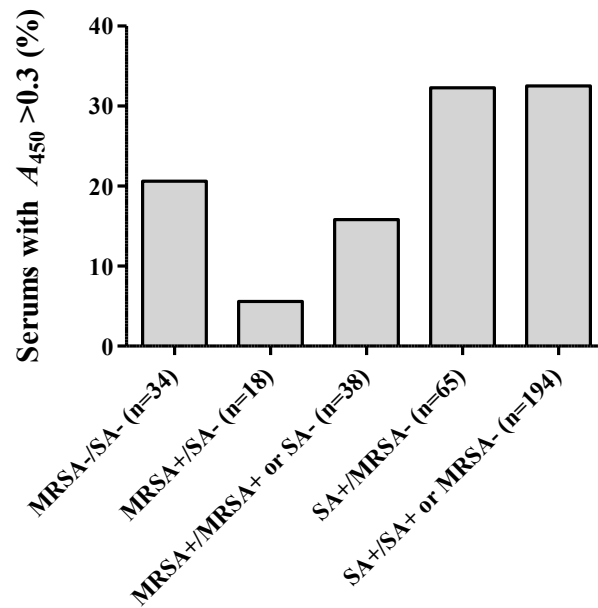


Fig. 2. Presence of genes encoding antimicrobial resistance, enterotoxins, leukocidins, hemolysins, aureolysins, serine protease, staphopains, capsule and biofilm among the two MRSA strains examined by DNA microarray.

Genes	Strain number*	
	97	154N
Antimicrobial resistance		
<i>mecA</i>	Grey	Grey
<i>blaZ</i>	Grey	Grey
<i>blaI</i>	Grey	Grey
<i>blaR</i>	Grey	Grey
<i>ermA</i>	Grey	White
<i>ermC</i>	White	Grey
<i>linA</i>	Grey	White
<i>vgaA</i>	White	Grey
<i>aadD</i>	White	Grey
<i>tetK</i>	Grey	White
<i>tetL</i>	White	Grey
<i>tetM</i>	Grey	White
<i>tetEfflux</i>	Grey	Grey
<i>fosB</i>	White	Grey
Enterotoxins		
<i>entG</i>	White	Grey
<i>entI</i>	White	Grey
<i>entM</i>	White	Grey
<i>entN</i>	White	Grey
<i>entN_1</i>	White	Grey
<i>entO</i>	White	Grey
<i>entU</i>	White	Grey
<i>egc-cluster</i>	White	Grey
Leukocidins		
<i>lukF</i>	White	Grey
<i>lukS</i>	White	Grey
<i>hlgA</i>	White	Grey
<i>lukD</i>	White	Grey
<i>lukE</i>	White	Grey
<i>lukX</i>	White	Grey
<i>lukY-var1</i>	White	Grey
Hemolysins		
<i>hl</i>	White	Grey
<i>hla</i>	White	Grey
<i>hld</i>	White	Grey
<i>hIII</i>	White	Grey
<i>hl_III_Other than RF122</i>	White	Grey
<i>hIb</i>	White	Grey
<i>un-truncated hIb</i>	White	Grey
Aureolysins		
<i>aur</i>	White	Grey
<i>aur - OtherThan252</i>	White	Grey
<i>aur-MRSA252</i>	White	Grey
Serin Protease		
<i>splA</i>	White	Grey
<i>splB</i>	White	Grey
Staphopains		
<i>sspA</i>	White	Grey
<i>sspB</i>	White	Grey
<i>sspP</i>	White	Grey
Capsule/Biofilm		
<i>capsule-5</i>	White	Grey
<i>capH5</i>	White	Grey
<i>capJ5</i>	White	Grey
<i>capK5</i>	White	Grey
<i>icaA</i>	White	Grey
<i>icaC</i>	White	Grey
<i>icaD</i>	White	Grey
Accessory gene regulator		
<i>agrI</i>	White	Grey
<i>agrII</i>	White	Grey

*A grey box indicates presence of the gene.

Fig. 3. Percentage of positive serums in animal groups colonized by MRSA compared to others. An ELISA result of $A_{450} > 0.3$ was considered positive (seroconversion). MRSA-/SA- ($n=34$), animals with no *S. aureus* or MRSA detected at any body site (nares or skin); MRSA+/SA- ($n=18$), animals with MRSA found at one body site and no *S. aureus* present at the other site; MRSA+/MRSA+ or SA- ($n=38$), MRSA found at one or two body sites but no *S. aureus* found at the other site; SA+/MRSA- ($n=65$), *S. aureus* found at one body site and no MRSA present at the other site; SA+ /SA+ or MRSA- ($n=194$), *S. aureus* found at one or two body sites but no MRSA was present.



REFERENCES

1. Berger-Bachi B, Rohrer S (2002) Factors influencing methicillin resistance in staphylococci. *Arch Microbiol* 178: 165-171.
2. Catry B, Van Duijkeren E, Pomba MC, Greko C, Moreno MA, et al. (2010) Reflection paper on MRSA in food-producing and companion animals: epidemiology and control options for human and animal health. *Epidemiol Infect* 138: 626-644.
3. Leonard FC, Markey BK (2008) Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in animals: a review. *Vet J* 175: 27-36.
4. Van den Eede A, Martens A, Lipinska U, Struelens M, Deplano A, et al. (2009) High occurrence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 in equine nasal samples. *Vet Microbiol* 133: 138-144.
5. van Duijkeren E, Moleman M, Sloet van Oldruitenborgh-Oosterbaan MM, Multem J, Troelstra A, et al. (2009) Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in horses and horse personnel: an investigation of several outbreaks. *Vet Microbiol* 141: 96-102.
6. Garcia-Alvarez L, Holden MT, Lindsay H, Webb CR, Brown DF, et al. (2011) Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with a novel *mecA* homologue in human and bovine populations in the UK and Denmark: a descriptive study. *Lancet Infect Dis* 11: 595-603.
7. Hartmeyer GN, Gahrn-Hansen B, Skov RL, Kolmos HJ (2010) Pig-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: family transmission and severe pneumonia in a newborn. *Scand J Infect Dis* 42: 318-320.
8. Declercq P, Petre D, Gordts B, Voss A (2008) Complicated community-acquired soft tissue infection by MRSA from porcine origin. *Infection* 36: 590-592.
9. Van Hoecke H, Piette A, De Leenheer E, Lagasse N, Struelens M, et al. (2009) Destructive otomastoiditis by MRSA from porcine origin. *Laryngoscope* 119: 137-140.
10. Voss A, Loeffen F, Bakker J, Klaassen C, Wulf M (2005) Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in pig farming. *Emerg Infect Dis* 11: 1965-1966.
11. Wagenaar JA, Yue H, Pritchard J, Broekhuizen-Stins M, Huijsdens X, et al. (2009) Unexpected sequence types in livestock associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): MRSA ST9 and a single locus variant of ST9 in pig farming in China. *Vet Microbiol*.
12. Lewis HC, Mølbak K, Reese C, Aarestrup FM, Selchau M, et al. (2008) Pigs as Source of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* CC398 Infections in Humans, Denmark. *Emerg Infect Dis* 14: 1383-1384.
13. Pan A, Battisti A, Zoncada A, Bernieri F, Boldini M, et al. (2009) Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 infection, Italy. *Emerg Infect Dis* 15: 845-847.
14. Kock R, Harlizius J, Bressan N, Laerberg R, Wieler LH, et al. (2009) Prevalence and molecular characteristics of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) among pigs on German farms and import of livestock-related MRSA into hospitals. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 28: 1375-1382.
15. Denis O, Suetens C, Hallin M, Catry B, Ramboer I, et al. (2009) Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 in Swine Farm Personnel, Belgium. *Emerg Infect Dis* 15.
16. Neela V, Arif MZ, Nor Shamsudin M, van Belkum A, Khoon LY, et al. (2009) Prevalence Of St-9 Mrsa Among Pigs And Pig Handlers In Malaysia. *J Clin Microbiol*.
17. Van Cleef BA, Broens EM, Voss A, Huijsdens XW, Zuchner L, et al. (2010) High prevalence of nasal MRSA carriage in slaughterhouse workers in contact with live pigs in The Netherlands. *Epidemiol Infect* 138: 756-763.
18. Tenhagen BA, Fetsch A, Stuhrenberg B, Schleuter G, Guerra B, et al. (2009) Prevalence of MRSA types in slaughter pigs in different German abattoirs. *Vet Rec* 165: 589-593.
19. Gomez-Sanz E, Torres C, Lozano C, Fernandez-Perez R, Aspiroz C, et al. (2010) Detection, Molecular Characterization, and Clonal Diversity of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* CC398 and CC97 in Spanish Slaughter Pigs of Different Age Groups. *Foodborne Pathog Dis*.
20. Meemken D, Blaha T, Tegeler R, Tenhagen BA, Guerra B, et al. (2009) Livestock Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (LaMRSA) Isolated from Lesions of Pigs at Necropsy in Northwest Germany Between 2004 and 2007. *Zoonoses Public Health*.
21. Battisti A, Franco A, Merialdi G, Hasman H, Iurescia M, et al. (2009) Heterogeneity among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from Italian pig finishing holdings. *Vet Microbiol*.
22. Smith TC, Male MJ, Harper AL, Kroeger JS, Tinkler GP, et al. (2009) Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strain ST398 is present in midwestern U.S. swine and swine workers. *PLoS One* 4: e4258.
23. Armand-Lefevre L, Ruimy R, Andremont A (2005) Clonal comparison of *Staphylococcus aureus* isolates from healthy pig farmers, human controls, and pigs. *Emerg Infect Dis* 11: 711-714.
24. Cui S, Li J, Hu C, Jin S, Li F, et al. (2009) Isolation and characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from swine and workers in China. *J Antimicrob Chemother*.
25. Aspiroz C, Lozano C, Vindel A, Lasarte JJ, Zarazaga M, et al. (2010) Skin lesion caused by ST398 and ST1 MRSA, Spain. *Emerg Infect Dis* 16: 157-159.
26. van Loo IH, Diederer BM, Savelkoul PH, Woudenberg JH, Roosendaal R, et al. (2007) Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in meat products, the Netherlands. *Emerg Infect Dis* 13: 1753-1755.
27. de Boer E, Zwartkruis-Nahuis JT, Wit B, Huijsdens XW, de Neeling AJ, et al. (2009) Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in meat. *Int J Food Microbiol* 134: 52-56.
28. Kluytmans JA (2010) Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in food products: cause for concern or case for complacency? *Clin Microbiol Infect* 16: 11-15.
29. Khanna T, Friendship R, Dewey C, Weese JS (2008) Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* colonization in pigs and pig farmers. *Vet Microbiol* 128: 298-303.
30. Barski P, Piechowicz L, Galinski J, Kur J (1996) Rapid assay for detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* using multiplex PCR. *Mol Cell Probes* 10: 471-475.

31. Mehrotra M, Wang G, Johnson WM (2000) Multiplex PCR for detection of genes for *Staphylococcus aureus* enterotoxins, exfoliative toxins, toxic shock syndrome toxin 1, and methicillin resistance. *J Clin Microbiol* 38: 1032-1035.
32. Tenover FC, Vaughn RR, McDougal LK, Fosheim GE, McGowan JE, Jr. (2007) Multiple-locus variable-number tandem-repeat assay analysis of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. *J Clin Microbiol* 45: 2215-2219.
33. Zhang K, McClure JA, Elsayed S, Louie T, Conly JM (2005) Novel multiplex PCR assay for characterization and concomitant subtyping of staphylococcal cassette chromosome *mec* types I to V in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* 43: 5026-5033.
34. (Clinical and Laboratory Standards Institute 2008) Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals; Approved Standard-Third Edition. CLSI document M31-A3 Vol. 28 No.8.
35. (Clinical and Laboratory Standards Institute 2010) Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Approved Standard- Twentieth Informational Supplement. CLSI document M 100-S20 Vol. 31 No. 1.
36. Fessler A, Scott C, Kadlec K, Ehricht R, Monecke S, et al. (2010) Characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 from cases of bovine mastitis. *J Antimicrob Chemother* 65: 619-625.
37. Garneau P, Labrecque O, Maynard C, Messier S, Masson L, et al. (2010) Use of a bacterial antimicrobial resistance gene microarray for the identification of resistant *Staphylococcus aureus*. *Zoonoses Public Health* 57 Suppl 1: 94-99.
38. Monecke S, Kuhnert P, Hotzel H, Slickers P, Ehricht R (2007) Microarray based study on virulence-associated genes and resistance determinants of *Staphylococcus aureus* isolates from cattle. *Vet Microbiol* 125: 128-140.
39. Ster C, Beaudoin F, Diarra MS, Jacques M, Malouin F, et al. (2010) Evaluation of some *Staphylococcus aureus* iron-regulated proteins as vaccine targets. *Vet Immunol Immunopathol* 136: 311-318.
40. Bishburg E, Bishburg K (2009) Minocycline--an old drug for a new century: emphasis on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and *Acinetobacter baumannii*. *Int J Antimicrob Agents* 34: 395-401.
41. Pomba C, Hasman H, Cavaco LM, da Fonseca JD, Aarestrup FM (2009) First description of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) CC30 and CC398 from swine in Portugal. *Int J Antimicrob Agents*.
42. Lina G, Quaglia A, Reverdy ME, Leclercq R, Vandenesch F, et al. (1999) Distribution of genes encoding resistance to macrolides, lincosamides, and streptogramins among staphylococci. *Antimicrob Agents Chemother* 43: 1062-1066.
43. Denis O, Magdalena J, Deplano A, Nonhoff C, Hendrickx E, et al. (2002) Molecular epidemiology of resistance to macrolides-lincosamides-streptogramins in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) causing bloodstream infections in patients admitted to Belgian hospitals. *J Antimicrob Chemother* 50: 755-757.
44. Mangili A, Bica I, Snyderman DR, Hamer DH (2005) Daptomycin-resistant, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia. *Clin Infect Dis* 40: 1058-1060.
45. Skiest DJ (2006) Treatment failure resulting from resistance of *Staphylococcus aureus* to daptomycin. *J Clin Microbiol* 44: 655-656.
46. Cui L, Tominaga E, Neoh HM, Hiramatsu K (2006) Correlation between Reduced Daptomycin Susceptibility and Vancomycin Resistance in Vancomycin-Intermediate *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 50: 1079-1082.
47. Huber H, Koller S, Giezendanner N, Stephan R, Zweifel C (2010) Prevalence and characteristics of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* on humans in contact with farm animals, in livestock, and in food of animal origin, Switzerland, 2009. *Eurosurveillance* 15.
48. Kadlec K, Ehricht R, Monecke S, Steinacker U, Kaspar H, et al. (2009) Diversity of antimicrobial resistance phenotypes and genotypes of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 from diseased swine. *J Antimicrob Chemother*.
49. de Neeling AJ, van den Broek MJ, Spalburg EC, van Santen-Verheul MG, Dam-Deisz WD, et al. (2007) High prevalence of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in pigs. *Vet Microbiol* 122: 366-372.
50. Smith TC, Male MJ, Harper AL, Kroeger JS, Tinkler GP, et al. (2008) Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strain ST398 is present in midwestern U.S. swine and swine workers. *PLoS ONE* 4: e4258.
51. Li S, Skov RL, Han X, Larsen AR, Larsen J, et al. (2011) Novel types of staphylococcal cassette chromosome *mec* elements identified in CC398 methicillin resistant *Staphylococcus aureus* strains. *Antimicrob Agents Chemother*.
52. Hanssen AM, Ericson Sollid JU (2006) SCCmec in staphylococci: genes on the move. *FEMS Immunol Med Microbiol* 46: 8-20.
53. van Duijkeren E, Ikawaty R, Broekhuizen-Stins MJ, Jansen MD, Spalburg EC, et al. (2008) Transmission of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains between different kinds of pig farms. *Vet Microbiol* 126: 383-389.
54. Patel M, Waites KB, Hoesley CJ, Stamm AM, Canupp KC, et al. (2008) Emergence of USA300 MRSA in a tertiary medical centre: implications for epidemiological studies. *J Hosp Infect* 68: 208-213.
55. Sabat A, Krzyszton-Russjan J, Strzalka W, Filipek R, Kosowska K, et al. (2003) New method for typing *Staphylococcus aureus* strains: multiple-locus variable-number tandem repeat analysis of polymorphism and genetic relationships of clinical isolates. *J Clin Microbiol* 41: 1801-1804.
56. Skaar EP, Schneewind O (2004) Iron-regulated surface determinants (Isd) of *Staphylococcus aureus*: stealing iron from heme. *Microbes Infect* 6: 390-397.
57. Mazmanian SK, Skaar EP, Gaspar AH, Humayun M, Gornicki P, et al. (2003) Passage of heme-iron across the envelope of *Staphylococcus aureus*. *Science* 299: 906-909.
58. Allard M, Moisan H, Brouillette E, Gervais AL, Jacques M, et al. (2006) Transcriptional modulation of some *Staphylococcus aureus* iron-regulated genes during growth in vitro and in a tissue cage model in vivo. *Microbes Infect* 8: 1679-1690.
59. McCarthy AJ, Lindsay JA (2010) Genetic variation in *Staphylococcus aureus* surface and immune evasion genes is lineage associated: implications for vaccine design and host-pathogen interactions. *BMC Microbiol* 10: 173.
60. Pruneau M, Mitchell G, Moisan H, Dumont-Blanchette E, Jacob CL, et al. (2011) Transcriptional analysis of antibiotic resistance and virulence genes in multiresistant hospital-acquired MRSA. *FEMS Immunol Med Microbiol*.
61. Dumont AL, Nygaard TK, Watkins RL, Smith A, Kozhaya L, et al. (2011) Characterization of a new cytotoxin that contributes to *Staphylococcus aureus* pathogenesis. *Mol Microbiol* 79: 814-825.
62. Boucher H, Miller LG, Razonable RR (2010) Serious infections caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clin Infect Dis* 51 Suppl 2: S183-197.

3. Discussion générale

Le projet de recherche avait comme objectif l'isolement et la caractérisation des isolats de SARM provenant d'abcès, de la cavité nasale et de la peau des porcs à l'abattoir. L'antibiorésistance de ces isolats et l'évaluation de la séroconversion envers le *S. aureus* chez les porcs d'abattoir porteurs ou non du SARM a également été déterminé. Afin de réaliser ces objectifs, nous avons échantillonné 316 porcs provenant de deux abattoirs du Québec. Nous avons donc prélevé des écouvillons nasaux et de la peau de chacun de ces porcs. Nous avons également récolté 28 abcès qui, pour des raisons de logistique lors de l'échantillonnage, proviennent de porcs autre que ceux échantillonnés dans les nasaux et la peau.

L'isolement de SARM à partir des échantillons a été facilité par une méthode d'enrichissement préliminaire en bouillon (74). Cet enrichissement a été suivi par une inoculation sur géloses sélectives MRSAselect. Cette méthode de sélection s'est également avérée très spécifique, car tous les isolats potentiels ont été identifiés comme étant des SARM lors de la confirmation par PCR multiplex.

Cette étude décrit pour la première fois la découverte de SARM provenant de porcs au Québec. Malgré un échantillonnage limité par rapport au volume de porcs présents au Québec, les résultats obtenus donnent un bon aperçu de la prévalence de SARM dans la population porcine québécoise. Nos résultats indiquent clairement la présence de SARM chez les porcs au Québec. Malgré le faible nombre d'abcès prélevé, il est intéressant de

constater qu'aucun SARM n'a été isolé de ceux-ci. Il serait cependant plus représentatif de faire une étude complémentaire avec un plus grand nombre d'abcès.

Lors de cette recherche, 16.9% (107/632) de nos échantillons se sont avérés positifs au SARM. Par contre, considérant les porcs avec au moins un échantillon positif (nasaux et/ou peau) une prévalence de 27.5% (87/316) a été observée, représentant un pourcentage similaire à l'autre étude canadienne (74). Cette étude rapporte une prévalence de 25% (71/285) de SARM provenant d'échantillons rectaux et nasaux.

L'une des inquiétudes associée aux SARM porcins est sa possible transmission aux humains. De plus, si cette souche est résistante aux antibiotiques et possède des facteurs de virulence, elle pourra causer une infection difficile à traiter. Afin de déterminer les risques associés à une telle transmission, notre étude portait sur la détection de la présence de quatre gènes codant pour des toxines; la toxine du choc toxique (*tst*), la toxine Leucocidine Penton-Valentine (*pvl*) et deux toxines exfoliatives, la A et la B (*eta* et *etb*). Aucune de nos souches ne présentaient ces gènes reliés à ces toxines.

Nous avons également voulu déterminer les profils de résistance de nos isolats. Pour ce faire, nous avons utilisé la méthode de microdilution en plaque Sensititre. Avec cette méthode, nous avons été en mesure de tester la résistance de nos souches envers un grand nombre d'antibiotiques. Il est d'abord important de constater qu'aucune de nos souches ne présente de résistance envers la ciprofloxacine, la gatifloxacine, la gentamicine, la lévofloxacine, le linézolide, la quinupristine/dalfopristine, la rifampicine, la streptomycine,

le triméthoprim/sulfaméthoxazole et la vancomycine. Ce dernier résultat est d'autant plus encourageant car la vancomycine est l'un des antibiotiques de dernier recours contre les *S. aureus* multi-résistants. Tous ces résultats sont similaires à ceux obtenus dans d'autres études si nous considérons que les pourcentages de résistance se situaient à 0% pour la rifampicine et entre 0 et 100% pour le triméthoprim/sulfaméthoxazole et la ciprofloxacine respectivement (14, 35, 51, 57, 79, 97, 104, 113, 130, 142). Les résistances envers la lévofloxacine et à la streptomycine ont été évaluées dans une étude où les pourcentages de résistance étaient respectivement 0% et 9% (51, 130). Des niveaux de résistance allant d'intermédiaire à élevé ont été obtenus pour l'érythromycine (29.0%) et la clindamycine (29.0%). Ces pourcentages sont en accord avec la littérature scientifique. Nous avons observé un très haut niveau de résistance envers la tétracycline (98,1%), résistance qui est également de 100% dans toutes les études qui portent sur l'analyse de cette résistance (14, 35, 51, 57, 79, 97, 104, 113, 130, 134, 142). Ces résultats concordent bien avec la forte utilisation des tétracyclines en élevage porcin. Il serait possible que cette utilisation des tétracyclines sélectionne les souches résistantes. Une souche résistante à la daptomycine a également été détectée (souche #96 de l'abattoir A) avec une CMI de 2 µg/ml, à notre connaissance, il s'agit du premier cas de résistance à la daptomycine rapportée chez des SARM porcins. Cette résistance a cependant été décrite chez des souches humaines dans d'autres études (94, 128). La daptomycine est le premier agent d'une nouvelle classe d'antibiotiques que sont les lipopeptides cycliques. Cet antibiotique est utilisé chez les humains dans le traitement de cas d'infections graves de la peau et du système sanguin par des *S. aureus* incluant les SARM. Si l'on considère cette utilisation et le fait que cet antibiotique n'est pas utilisé en médecine vétérinaire, il est difficile d'expliquer cette

résistance chez le porc. Le mécanisme d'action de la daptomycine se distingue de celui des autres classes d'antibiotique car il se lie à la membrane cellulaire des bactéries et cause une dépolarisation rapide du potentiel membranaire ce qui conduit à une mort cellulaire sans lyse (29). À notre connaissance, les gènes codant pour la résistance à cet antibiotique ne sont pas encore décrits et il ne semble pas y avoir d'élément transférable conférant cette résistance. Il a cependant été démontré une corrélation entre la susceptibilité réduite à la daptomycine et la résistance à la vancomycine chez les souches de *S. aureus* ayant une résistance intermédiaire à la vancomycine (VISA) (29, 31). Cette corrélation serait reliée à une plus grande épaisseur de la paroi cellulaire chez les souches résistantes qui conférerait à la fois une protection contre la vancomycine et la daptomycine chez ces *S. aureus* (29, 30). Il est donc intéressant de constater que la souche résistante à la daptomycine de notre étude (souche #96) est également la souche présentant la plus haute CMI envers la vancomycine, soit 2 µg/ml (les souches ayant une résistance intermédiaire se situent entre 8-16 µg/ml). Notre laboratoire procédera donc à une comparaison de l'épaisseur de la paroi entre la souche résistante à la daptomycine et des souches sensibles afin de déterminer s'il y a une corrélation entre nos souches.

Si nous observons les patrons de résistances obtenus, il est possible de constater que la grande majorité (105/107, 98,1%) de nos souches sont multi-résistantes avec une résistance à au moins un antibiotique autre que les β-lactamines. Si nous observons l'ensemble des patrons de résistance obtenus, nous constatons que 29.3% (33/107) sont multi-résistantes et que 28.0% (30/107) des souches présentent une tri-résistance. Ces résultats correspondent également bien à ce que l'on peut retrouver dans la littérature (35,

57, 126, 130, 142) Ces multi-résistances sont inquiétantes quant à la possibilité d'un éventuel transfert de résistance des souches porcines vers des souches humaines. Si par contre, nous observons les résultats obtenus en fonction de l'abattoir de provenance, nous pouvons constater que ces résultats ne reflètent peut-être pas la réalité de l'ensemble du Québec. En effet, nous avons observé plus de résistance de la part des souches en provenance de l'abattoir A que de l'abattoir B. Si nous observons les souches qui sont résistantes à la tétracycline seulement, il est possible de constater une association avec l'abattoir B (38/45, 84.4%) tandis que seulement 54,84% (34/62) des souches de l'abattoir A sont résistantes à la tétracycline seulement. Chez les isolats de l'abattoir A, 45,2% (28/62) se sont avérés être multi-résistants alors que seulement 11,1% (5/45) des isolats de l'abattoir B étaient multi-résistants. Ces résultats démontrent donc qu'il ne faut pas généraliser nos résultats pour l'ensemble du Québec et qu'un effet régional est possible. Cela démontre également l'importance d'effectuer des prélèvements à plus d'un endroit afin d'avoir des résultats des plus représentatifs. Un plus large échantillonnage aurait peut-être permis de mieux discerner des différences entre les différentes régions de provenance des porcs et les différents réseaux de distributions des porcs, ce qui n'a pas été possible avec notre échantillonnage. Il est également intéressant de constater que 29.3% (33/107) présente de la résistance envers 2 ou 3 antibiotiques. Ces résultats sont similaires à ce que l'on retrouve aux États-Unis (130) mais les données provenant de l'Union Européenne semblent démontrer plus de multi-résistance (35, 141). La tri-résistance à la clindamycine-érythromycine-tétracycline que nous observons dans 28,0% (30/107) de nos isolats semble être fréquemment retrouvée dans la littérature à des pourcentages allant de 23% à 100% (20, 35, 72)

Afin de comparer nos isolats avec ceux d'autres études, nous avons effectué un typage des cassettes *SCCmec* de nos souches avec une méthode déjà décrite à laquelle quelques modifications ont été apportées (163). Nous avons donc séparé leur PCR multiplex en deux PCR multiplex afin d'avoir une meilleure discrimination entre les bandes correspondantes à chaque *SCCmec*. Chaque multiplex comprenait cinq paires d'amorces, soit les amorces spécifiques aux sous-types *SCCmec* I, II, III, IVd ainsi que celles du gène *mecA* servant de contrôle interne. L'autre PCR multiplex comprend également les amorces pour *mecA* et celles pour les sous-types de *SCCmec* IVa, IVb, IVc et V. Les résultats de ce typage moléculaire ont révélé que 70,1% (75/107) de nos souches avaient une cassette de type *SCCmec* V. Ces résultats concordent avec la littérature où il a été démontré à plusieurs reprises une association entre les SARM porcins et la cassette *mec* de type V (35, 130). Certains de nos isolats, soit 29,9% (32/107), étaient positifs simultanément aux cassettes *mec* de type III et de type IVb. Lors de nos PCR, les fragments correspondant aux types III et IVb étaient de poids moléculaire qui correspondaient à ce qui a été décrit précédemment (163). Nous avons procédé à un séquençage de ces fragments et avons obtenu des séquences correspondantes respectivement aux types III et IVb. À notre connaissance, cette étude est la première à décrire de tels résultats avec des SARM d'origine porcine. La détection simultanée de ces cassettes chez plusieurs souches par PCR multiplex et séquençage des amplicons n'est pas la preuve d'une fusion. Quoique cette nouvelle fusion soit possible, il s'agit peut-être d'une contamination d'ADN ou de souches possédant deux types différents de cassette. Des études tendent à démontrer que certains sous-types de *SCCmec* seraient composés de deux *SCCmec* fusionnés ayant subi des délétions (58, 65). Une autre étude

menée chez les staphylocoques en général, portant sur les cassettes SCC qui n'ont pas le gène *mec*, a démontré que certains *Staphylococcus epidermidis* hébergeaient plusieurs cassettes SCC (101). Lors de ces études, les chercheurs ont conclu que les régions comportant les cassettes SCC sont des points importants de recombinaison. Ceci indique la possibilité de présence de site de recombinaison avec ces types de cassettes chez nos souches.

Pour poursuivre le typage moléculaire des isolats, la méthode du MLVA a été utilisée ce qui a permis une plus grande discrimination entre nos souches. Avec cette méthode, nous avons obtenu 15 clones en utilisant le programme Bionumerics (version 6.0) en appliquant les conditions suivantes: Break point: 80%, Optimisation: 0,5%, Tolérance: 0,8% (103, 135). De ces 15 clones, deux se sont avérés être prédominants. Il s'agit des clones VI et XI avec respectivement 40,1% (43/107) et 17,7% (19/107) des souches. Il semble y avoir une certaine corrélation entre ces clones prédominants et les abattoirs. Le clone VI est effectivement constitué à 69,8% (30/43) de souches de l'abattoir B et le clone XI à 73,7% (14/19) de souches de l'abattoir A. Le fait qu'il y ait une association entre les résultats du typage par *SCCmec* et le typage par MLVA pour 13 des 15 clones démontre une certaine logique dans nos résultats. De plus, le pourcentage de corrélation entre les *SCCmec* pour les souches provenant d'un même porc est de 100% (20/20 paires). Si on regarde la corrélation entre les clones MLVA pour les souches provenant d'un même porc le pourcentage est de 55% (11/20 paires). Cette dernière différence pourrait être dû au fait qu'un porc pourrait très bien être colonisé par plus d'une souche. Il aurait en effet été surprenant de n'avoir observé aucune corrélation entre nos deux méthodes de typage. Aucun

gène codant pour des toxines (toxine Leukocidine Panton-Valentine, toxine du choc toxique et des toxines exfoliatives A et B) n'a été détecté.

Les résultats obtenus avec la technologie de CLONDIAG, utilisée sur deux souches (97 et 154N) ont démontré que la souche 97 comporterait une cassette *SCC_{mec}* de type V comme nous l'avions détectée avec notre PCR. Cette souche serait également une ST398, CC398, ce qui correspond à ce qui est généralement retrouvé chez les SARM porcins. La souche 154N quant à elle, comporterait une cassette *SCC_{mec}* qui n'a pu être identifiée avec la micropuce à ADN, cette souche ayant une cassette que nous avons détectée par PCR comme étant possiblement un nouveau type III/IVb.

De plus, avec les résultats obtenus grâce à cette technologie, la résistance à la tétracycline peut être expliquée par la présence des gènes *tetEfflux*, *tetK*, ou *tetL*, gènes qui codent pour des pompes à efflux. En plus de la résistance à la tétracycline, plusieurs de nos souches présentaient de la résistance phénotypique envers les macrolides-lincosamides (érythromycine, 29.9%; clindamycine 29.0%). La résistance phénotypique macrolide-lincosamide peut être expliquée par la présence des gènes *linA*, *ermA*, ou *ermC*. Ces résistances associées à ces gènes ont déjà été rapportées dans d'autres pays (14, 35, 51, 57, 79, 97, 104, 113, 130, 142).

Les gènes *aadD*, *fosB* et *vgaA*, ont également été identifiés avec la technologie des biopuces, ces gènes codent respectivement pour la résistance envers les aminoglycosides (amikacine, tobramycine, néomycine), fosfomycine (bléomycine) et streptogramine. Il est intéressant de remarquer que dans notre étude, le gène *vgaA* est associé à une souche qui ne présente qu'un niveau intermédiaire de résistance. Cette situation a également été observée

avec les gènes *linA* et *ermA*. Ces résultats nous suggèrent donc qu'il faudrait peut-être envisager de baisser le seuil de résistance (breakpoint) envers ces antibiotiques. Des gènes de résistance envers l'amikacine, la tobramycine, la néomycine, la fosfomycine et la bléomycine ont également été détectés mais nous n'avons pas de résultats de résistance phénotypique à comparer pour ces antibiotiques. Les résultats que nous avons obtenus avec les biopuces concordent bien avec ce qu'il est possible de retrouver dans d'autres études sur les SARM ou cette technologie a été utilisée (45, 62, 67). Avec les biopuces, nous avons également déterminé que la souche 97 présentait également des gènes codant pour des hémolysines (alpha, beta, delta, gamma), leukocidine, et les staphopaines A et B (cystéine protéase). La souche 154N quant à elle, avait des gènes codant pour des entérotoxines (G, I, M, N, O, U), des hémolysines (alpha, beta, delta, gamma, leukocidine, hémolysine putative III) et les staphopaines A et B (cystéine protéase). La présence de ces nombreux gènes reliés à des facteurs de virulences pourrait présenter un risque pour la santé humaine advenant la colonisation d'un humain par ces souches ou le transfert de gènes entre souche porcine et humaine.

Les essais ELISA ciblaient des protéines de surface impliquées dans la régulation du fer, soit IsdH (HarA) et IsdB, une protéine spécialisée dans l'acquisition du fer provenant des protéines hème de l'hôte (127). IsdH capture l'hémoglobine associée à l'haptoglobine et IsdB est un récepteur d'hémoglobine. Le système d'acquisition du fer Isd est considéré comme étant important dans la pathogénicité des *S. aureus* et est fortement exprimé lors de la colonisation d'un mammifère (7, 95). IsdH et IsdB sont également bien conservés parmi les *S. aureus* et les SARM qui colonisent une variété d'espèces animales et démontrent, de

plus, de légères variations au sein d'une même lignée cellulaire (96). Grâce à ces caractéristiques, IsdH et IsdB représentent des cibles adéquates pour des études de séropositivité chez plusieurs espèces animales incluant les porcs. Cela suggère que le faible taux de séroconversion observé chez les porcs colonisés seulement avec des SARM ne peut être attribué à une détection inadéquate par des anticorps spécifiques à des souches. Avec la méthode ELISA, nous avons démontré qu'il y a une plus forte séroconversion chez les porcs colonisés par des souches non-SARM et la colonisation par des SARM d'un site ou deux (nasal et/ou peau) diminue graduellement le taux de séroconversion. Cette observation suggère que les SARM pourraient coloniser les porcs sans activer, ou voir même, en diminuant la réponse immunitaire de l'hôte. Par contre, nous n'avons pu détecter de différence dans la séroconversion en se basant sur le site de colonisation.

4. Conclusion et Perspectives

Ces travaux visaient principalement à caractériser des isolats de SARM provenant d'abcès, de la cavité nasale et de la peau des porcs à l'abattoir. Nous avons aussi évalué la séroconversion envers le *S. aureus* chez les porcs à l'abattoir porteurs ou non du SARM. Nous avons isolé 107 souches de SARM et identifié 15 clones différents par la technique MLVA. Deux types de cassette SCC, soit le type V et possiblement, un nouveau types, le III/IVb ont été identifiés. L'une des deux souches testées par biopuce s'est avérée être de type ST398 ce qui correspond bien aux souches retrouvées chez le porc en général. Nous avons également détecté plusieurs résistances aux antibiotiques chez nos souches et déterminé la séroconversion des porcs échantillonnés envers certains antigènes de *S. aureus*. À notre connaissance, il s'agit de la première étude portant sur les SARM porcins au Québec et chez le porc à l'abattoir au Canada. Il s'agit également des premiers travaux à démontrer de la multi-résistance chez les SARM porcins au Canada. De plus, nous sommes les premiers, à notre connaissance, à étudier la séroconversion des porcs envers les SARM.

Des études sur l'antibiorésistance des SARM isolés chez le porc se poursuivront dans notre laboratoire afin de déterminer les gènes de résistance qui codent pour les résistances observées. Il sera également intéressant de savoir si ces gènes sont plasmidiques comme il a été observé à plusieurs reprises dans la littérature (69, 70). De plus, notre laboratoire tentera de déterminer si certains plasmides portent des gènes codant pour la multi-résistance et si ces plasmides sont potentiellement transférables à des souches humaines de SARM. Un éventuel transfert de résistance de souches porcines vers des souches humaines augmenterait considérablement les risques associés aux SARM porcins pour la santé humaine. Notre laboratoire tentera également de déterminer si la détection

simultanée de SCC*mec* III/IVb provient d'une fusion de deux cassettes ou s'il s'agit d'une contamination en ADN ou de deux cassettes distinctes. S'il s'agit d'une fusion, il sera également important de déterminer le risque potentiel que représente ces nouvelles souches pour l'humain. Nos recherches ont démontré que certaines souches étaient porteuses de plusieurs gènes reliés à des facteurs de virulence, ces souches pourraient donc présenter un plus grand risque pour l'humain. La capacité à moduler les défences immunitaires de l'hôte, démontrée par les résultats de séroconversion, pourrait jouer un rôle important dans la dissémination et la persistance des SARM en production porcine.

Les SARM d'origine porcine sont, depuis quelques années, des bactéries qui gagnent en importance dans le monde de la recherche en santé publique. Cette attention des chercheurs pour les SARM de différentes espèces animales est compréhensible étant donné l'apparition de «super» bactéries multi-résistantes tant en médecine humaine qu'en médecine vétérinaire. Ces bactéries constituent un risque pour la santé humaine et animale étant donné la faible quantité de nouveaux antibiotiques qui voient le jour. La recherche sur les bactéries multi-résistantes tel les SARM de différentes espèces animales est nécessaire à une meilleure compréhension du phénomène de l'antibiorésistance. Une meilleure connaissance du risque permettra de mettre en place de meilleure mesure de gestion.

5. Sources documentaires

1. !!! INVALID CITATION !!!
2. Clinical and Laboratory Standards Institute 2008. Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals; Approved Standard-Third Edition. CLSI document M31-A3 **Vol. 28 No.8**.
3. Clinical and Laboratory Standards Institute 2010. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Approved Standard- Twentieth Informational Supplement. CLSI document M 100-S20 **Vol. 31 No. 1**.
4. **(IWG-SCC), I. W. G. o. t. C. o. S. C. C. E.** 2009. Classification of staphylococcal cassette chromosome mec (SCCmec): guidelines for reporting novel SCCmec elements. *Antimicrob Agents Chemother* **53**:4961-7.
5. **Abe, J., Y. Ito, M. Onimaru, T. Kohsaka, and T. Takeda.** 2000. Characterization and distribution of a new enterotoxin-related superantigen produced by *Staphylococcus aureus*. *Microbiol Immunol* **44**:79-88.
6. **Alekshun, M. N., and S. B. Levy.** 2007. Molecular mechanisms of antibacterial multidrug resistance. *Cell* **128**:1037-50.
7. **Allard, M., H. Moisan, E. Brouillette, A. L. Gervais, M. Jacques, P. Lacasse, M. S. Diarra, and F. Malouin.** 2006. Transcriptional modulation of some *Staphylococcus aureus* iron-regulated genes during growth in vitro and in a tissue cage model in vivo. *Microbes Infect* **8**:1679-90.
8. **Appelbaum, P. C.** 2006. The emergence of vancomycin-intermediate and vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clin Microbiol Infect* **12 Suppl 1**:16-23.
9. **Armand-Lefevre, L., R. Ruimy, and A. Andremont.** 2005. Clonal comparison of *Staphylococcus aureus* isolates from healthy pig farmers, human controls, and pigs. *Emerg Infect Dis* **11**:711-4.
10. **Aspiroz, C., C. Lozano, A. Vindel, J. J. Lasarte, M. Zarazaga, and C. Torres.** 2010. Skin lesion caused by ST398 and ST1 MRSA, Spain. *Emerg Infect Dis* **16**:157-9.
11. **Baba, K., K. Ishihara, M. Ozawa, Y. Tamura, and T. Asai.** 2010. Isolation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) from swine in Japan. *Int J Antimicrob Agents* **36**:352-354.
12. **Balaban, N., T. Goldkorn, R. T. Nhan, L. B. Dang, S. Scott, R. M. Ridgley, A. Rasooly, S. C. Wright, J. W. Larrick, R. Rasooly, and J. R. Carlson.** 1998. Autoinducer of virulence as a target for vaccine and therapy against *Staphylococcus aureus*. *Science* **280**:438-40.
13. **Barski, P., L. Piechowicz, J. Galinski, and J. Kur.** 1996. Rapid assay for detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* using multiplex PCR. *Mol Cell Probes* **10**:471-5.
14. **Battisti, A., A. Franco, G. Merialdi, H. Hasman, M. Iurescia, R. Lorenzetti, F. Feltrin, M. Zini, and F. M. Aarestrup.** 2009. Heterogeneity among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from Italian pig finishing holdings. *Vet Microbiol.*
15. **Berger-Bachi, B., and S. Rohrer.** 2002. Factors influencing methicillin resistance in staphylococci. *Arch Microbiol* **178**:165-71.
16. **Bhakdi, S., and J. Trantum-Jensen.** 1991. Alpha-toxin of *Staphylococcus aureus*. *Microbiol Rev* **55**:733-51.
17. **Bishburg, E., and K. Bishburg.** 2009. Minocycline--an old drug for a new century:

- emphasis on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and *Acinetobacter baumannii*. *Int J Antimicrob Agents* **34**:395-401.
18. **Boucher, H., L. G. Miller, and R. R. Razonable.** 2010. Serious infections caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clin Infect Dis* **51 Suppl 2**:S183-97.
 19. **Bozdogan, B., and P. C. Appelbaum.** 2004. Oxazolidinones: activity, mode of action, and mechanism of resistance. *Int J Antimicrob Agents* **23**:113-9.
 20. **Broens, E. M., E. A. Graat, P. J. van der Wolf, A. W. van de Giessen, E. van Duijkeren, J. A. Wagenaar, A. van Nes, D. J. Mevius, and M. C. de Jong.** MRSA CC398 in the pig production chain. *Prev Vet Med* **98**:182-9.
 21. **Burton, S., R. Reid-Smith, J. T. McClure, and J. S. Weese.** 2008. *Staphylococcus aureus* colonization in healthy horses in Atlantic Canada. *Can Vet J* **49**:797-9.
 22. **Busscher, J. F., E. van Duijkeren, and M. M. Sloet van Oldruitenborgh-Oosterbaan.** 2006. The prevalence of methicillin-resistant staphylococci in healthy horses in the Netherlands. *Vet Microbiol* **113**:131-6.
 23. **Catry, B., E. Van Duijkeren, M. C. Pomba, C. Greko, M. A. Moreno, S. Pyorala, M. Ruzauskas, P. Sanders, E. J. Threlfall, F. Ungemach, K. Torneke, C. Munoz-Madero, and J. Torren-Edo.** 2010. Reflection paper on MRSA in food-producing and companion animals: epidemiology and control options for human and animal health. *Epidemiol Infect* **138**:626-44.
 24. **Chambers, H. F.** 1988. Methicillin-resistant staphylococci. *Clin Microbiol Rev* **1**:173-86.
 25. **Chambers, H. F.** 1997. Methicillin resistance in staphylococci: molecular and biochemical basis and clinical implications. *Clin Microbiol Rev* **10**:781-91.
 26. **Cohen, J. O.** 1972. *The Staphylococci*. John Wiley & Sons, Inc., Atlanta, Georgia.
 27. **Contreras-Martel, C., V. Job, A. M. Di Guilmi, T. Vernet, O. Dideberg, and A. Dessen.** 2006. Crystal structure of penicillin-binding protein 1a (PBP1a) reveals a mutational hotspot implicated in beta-lactam resistance in *Streptococcus pneumoniae*. *J Mol Biol* **355**:684-96.
 28. **Cookson, B. D.** 1998. The emergence of mupirocin resistance: a challenge to infection control and antibiotic prescribing practice. *J Antimicrob Chemother* **41**:11-8.
 29. **Cui, L., A. Iwamoto, J. Q. Lian, H. M. Neoh, T. Maruyama, Y. Horikawa, and K. Hiramatsu.** 2006. Novel mechanism of antibiotic resistance originating in vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* **50**:428-38.
 30. **Cui, L., E. Tominaga, H. M. Neoh, and K. Hiramatsu.** 2006. Correlation between Reduced Daptomycin Susceptibility and Vancomycin Resistance in Vancomycin-Intermediate *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* **50**:1079-82.
 31. **Cui, S., J. Li, C. Hu, S. Jin, F. Li, Y. Guo, L. Ran, and Y. Ma.** 2009. Isolation and characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from swine and workers in China. *J Antimicrob Chemother* **64**:680-683.
 32. **Cui, S., J. Li, C. Hu, S. Jin, F. Li, Y. Guo, L. Ran, and Y. Ma.** 2009. Isolation and characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from swine and workers in China. *J Antimicrob Chemother*.
 33. **Cuny, C., J. Kuemmerle, C. Stanek, B. Willey, B. Strommenger, and W. Witte.** 2006. Emergence of MRSA infections in horses in a veterinary hospital: strain

- characterisation and comparison with MRSA from humans. *Euro Surveill* **11**:44-7.
34. **de Boer, E., J. T. Zwartkruis-Nahuis, B. Wit, X. W. Huijsdens, A. J. de Neeling, T. Bosch, R. A. van Oosterom, A. Vila, and A. E. Heuvelink.** 2009. Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in meat. *Int J Food Microbiol* **134**:52-6.
 35. **de Neeling, A. J., M. J. van den Broek, E. C. Spalburg, M. G. van Santen-Verheuevel, W. D. Dam-Deisz, H. C. Boshuizen, A. W. van de Giessen, E. van Duijkeren, and X. W. Huijsdens.** 2007. High prevalence of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in pigs. *Vet Microbiol* **122**:366-72.
 36. **Declercq, P., D. Petre, B. Gordts, and A. Voss.** 2008. Complicated community-acquired soft tissue infection by MRSA from porcine origin. *Infection* **36**:590-2.
 37. **Denis, O., J. Magdalena, A. Deplano, C. Nonhoff, E. Hendrickx, and M. J. Struelens.** 2002. Molecular epidemiology of resistance to macrolides-lincosamides-streptogramins in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) causing bloodstream infections in patients admitted to Belgian hospitals. *J Antimicrob Chemother* **50**:755-7.
 38. **Denis, O., C. Suetens, M. Hallin, B. Catry, I. Ramboer, M. Dispas, G. Willems, B. Gordts, P. Butaye, and M. Struelens.** 2009. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 in Swine Farm Personnel, Belgium. *Emerg Infect Dis* **15**.
 39. **Deurenberg, R. H., and E. E. Stobberingh.** 2008. The evolution of *Staphylococcus aureus*. *Infect Genet Evol* **8**:747-63.
 40. **Diekema, D. J., and R. N. Jones.** 2001. Oxazolidinone antibiotics. *Lancet* **358**:1975-82.
 41. **Dumont, A. L., T. K. Nygaard, R. L. Watkins, A. Smith, L. Kozhaya, B. N. Kreiswirth, B. Shopsin, D. Unutmaz, J. M. Voyich, and V. J. Torres.** 2011. Characterization of a new cytotoxin that contributes to *Staphylococcus aureus* pathogenesis. *Mol Microbiol* **79**:814-25.
 42. **Etz, H., D. B. Minh, T. Henics, A. Dryla, B. Winkler, C. Triska, A. P. Boyd, J. Sollner, W. Schmidt, U. von Ahsen, M. Buschle, S. R. Gill, J. Kolonay, H. Khalak, C. M. Fraser, A. von Gabain, E. Nagy, and A. Meinke.** 2002. Identification of in vivo expressed vaccine candidate antigens from *Staphylococcus aureus*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**:6573-8.
 43. **Fessler, A., C. Scott, K. Kadlec, R. Ehricht, S. Monecke, and S. Schwarz.** 2010. Characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 from cases of bovine mastitis. *J Antimicrob Chemother* **65**:619-25.
 44. **Finch, R. G., D. Greenwood, S. R. Norrby, and R. J. Whitley.** 2003. *Antibiotics and chemotherapy*, 8th ed. Churchill Livingstone, London.
 45. **Franco, A., H. Hasman, M. Iurescia, R. Lorenzetti, M. Stegger, A. Pantosti, F. Feltrin, A. Ianzano, M. C. Porrero, M. Liapi, and A. Battisti.** 2011. Molecular characterization of spa type t127, sequence type 1 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from pigs. *J Antimicrob Chemother* **66**:1231-5.
 46. **Frénay, H. M. E., B. A.E., L. M. Schouls, W. J. van Leeuwen, C. M. J. E. Vandenbroucke-Grauls, J. Verhoef, and F. R. Mooi.** 1996. Molecular Typing of methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* on the Basis of Protein A Gene Polymorphism. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* **15**:60-64.

47. **Garcia-Alvarez, L., M. T. Holden, H. Lindsay, C. R. Webb, D. F. Brown, M. D. Curran, E. Walpole, K. Brooks, D. J. Pickard, C. Teale, J. Parkhill, S. D. Bentley, G. F. Edwards, E. K. Girvan, A. M. Kearns, B. Pichon, R. L. Hill, A. R. Larsen, R. L. Skov, S. J. Peacock, D. J. Maskell, and M. A. Holmes.** 2011. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with a novel *mecA* homologue in human and bovine populations in the UK and Denmark: a descriptive study. *Lancet Infect Dis* **11**:595-603.
48. **Garneau, P., O. Labrecque, C. Maynard, S. Messier, L. Masson, M. Archambault, and J. Harel.** 2010. Use of a bacterial antimicrobial resistance gene microarray for the identification of resistant *Staphylococcus aureus*. *Zoonoses Public Health* **57 Suppl 1**:94-9.
49. **Gaudreau, M. C., P. Lacasse, and B. G. Talbot.** 2007. Protective immune responses to a multi-gene DNA vaccine against *Staphylococcus aureus*. *Vaccine* **25**:814-24.
50. **Gilmore, K. S., M. S. Gilmore, and D. F. Sahn.** 2008. Methicillin Resistance in *Staphylococcus aureus*, p. 291-312. *In* R. G. Wax, K. Lewis, A. A. Salyers, and H. Taber (ed.), *Bacterial Resistance to Antimicrobials*, Second ed. CRC Press, Boca Raton.
51. **Gomez-Sanz, E., C. Torres, C. Lozano, R. Fernandez-Perez, C. Aspiroz, F. Ruiz-Larrea, and M. Zarazaga.** 2010. Detection, Molecular Characterization, and Clonal Diversity of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* CC398 and CC97 in Spanish Slaughter Pigs of Different Age Groups. *Foodborne Pathog Dis* **7**:1269-1277.
52. **Gomez-Sanz, E., C. Torres, C. Lozano, R. Fernandez-Perez, C. Aspiroz, F. Ruiz-Larrea, and M. Zarazaga.** 2010. Detection, Molecular Characterization, and Clonal Diversity of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* CC398 and CC97 in Spanish Slaughter Pigs of Different Age Groups. *Foodborne Pathog Dis*.
53. **Gonzalez-Zorn, B., and P. Courvalin.** 2003. VanA-mediated high level glycopeptide resistance in MRSA. *Lancet Infect Dis* **3**:67-8.
54. **Gordon, R. J., and F. D. Lowy.** 2008. Pathogenesis of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. *Clin Infect Dis* **46 Suppl 5**:S350-9.
55. **Gorwitz, R. J.** 2008. Understanding the success of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains causing epidemic disease in the community. *J Infect Dis* **197**:179-82.
56. **Guardabassi, L., M. O'Donoghue, A. Moodley, J. Ho, and M. Boost.** 2009. Novel lineage of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, Hong Kong. *Emerg Infect Dis* **15**:1998-2000.
57. **Guardabassi, L., M. Stegger, and R. Skov.** 2007. Retrospective detection of methicillin resistant and susceptible *Staphylococcus aureus* ST398 in Danish slaughter pigs. *Vet Microbiol* **122**:384-6.
58. **Hanssen, A. M., and J. U. Ericson Sollid.** 2006. SCCmec in staphylococci: genes on the move. *FEMS Immunol Med Microbiol* **46**:8-20.
59. **Hartmeyer, G. N., B. Gahrn-Hansen, R. L. Skov, and H. J. Kolmos.** 2010. Pig-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: family transmission and severe pneumonia in a newborn. *Scand J Infect Dis* **42**:318-20.
60. **Hasman, H., A. Moodley, L. Guardabassi, M. Stegger, R. L. Skov, and F. M.**

- Aarestrup.** 2010. Spa type distribution in *Staphylococcus aureus* originating from pigs, cattle and poultry. *Vet Microbiol* **141**:326-31.
61. **Higuchi, W., T. Takano, L. J. Teng, and T. Yamamoto.** 2008. Structure and specific detection of staphylococcal cassette chromosome mec type VII. *Biochem Biophys Res Commun* **377**:752-6.
62. **Huber, H., S. Koller, N. Giezendanner, R. Stephan, and C. Zweifel.** 2010. Prevalence and characteristics of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* on humans in contact with farm animals, in livestock, and in food of animal origin, switzerland, 2009. *Eurosurveillance* **15**:pii=19542.
63. **Huber, H., S. Koller, N. Giezendanner, R. Stephan, and C. Zweifel.** 2010. Prevalence and characteristics of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* on humans in contact with farm animals, in livestock, and in food of animal origin, switzerland, 2009. *Eurosurveillance* **15**.
64. **Huijsdens, X. W., B. J. van Dijke, E. Spalburg, M. G. van Santen-Verheuevel, M. E. Heck, G. N. Pluister, A. Voss, W. J. Wannet, and A. J. de Neeling.** 2006. Community-acquired MRSA and pig-farming. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* **5**:26-29.
65. **Ito, T., Y. Katayama, K. Asada, N. Mori, K. Tsutsumimoto, C. Tiensasitorn, and K. Hiramatsu.** 2001. Structural comparison of three types of staphylococcal cassette chromosome mec integrated in the chromosome in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* **45**:1323-36.
66. **Jana, S., and J. K. Deb.** 2006. Molecular understanding of aminoglycoside action and resistance. *Appl Microbiol Biotechnol* **70**:140-50.
67. **Kadlec, K., R. Ehricht, S. Monecke, U. Steinacker, H. Kaspar, J. Mankertz, and S. Schwarz.** 2009. Diversity of antimicrobial resistance pheno- and genotypes of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 from diseased swine. *J Antimicrob Chemother* **64**:1156-1164.
68. **Kadlec, K., R. Ehricht, S. Monecke, U. Steinacker, H. Kaspar, J. Mankertz, and S. Schwarz.** 2009. Diversity of antimicrobial resistance pheno- and genotypes of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 from diseased swine. *J Antimicrob Chemother*.
69. **Kadlec, K., and S. Schwarz.** 2009. Identification of a novel trimethoprim resistance gene, *dfrK*, in a methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 strain and its physical linkage to the tetracycline resistance gene *tet(L)*. *Antimicrob Agents Chemother* **53**:776-8.
70. **Kadlec, K., and S. Schwarz.** 2009. Novel ABC transporter gene, *vga(C)*, located on a multiresistance plasmid from a porcine methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 strain. *Antimicrob Agents Chemother* **53**:3589-91.
71. **Kaszanyitzky, E. J., Z. Egyed, S. Janosi, J. Keseru, Z. Gal, I. Szabo, Z. Veres, and P. Somogyi.** 2004. Staphylococci isolated from animals and food with phenotypically reduced susceptibility to beta-lactamase-resistant beta-lactam antibiotics. *Acta Vet Hung* **52**:7-17.
72. **Kehrenberg, C., C. Cuny, B. Strommenger, S. Schwarz, and W. Witte.** 2009. Methicillin-resistant and -susceptible *Staphylococcus aureus* strains of clonal lineages ST398 and ST9 from swine carry the multidrug resistance gene *cf*. *Antimicrob Agents Chemother* **53**:779-81.

73. **Kerouanton, A., J. A. Hennekinne, C. Letertre, L. Petit, O. Chesneau, A. Brisabois, and M. L. De Buyser.** 2007. Characterization of *Staphylococcus aureus* strains associated with food poisoning outbreaks in France. *Int J Food Microbiol* **115**:369-75.
74. **Khanna, T., R. Friendship, C. Dewey, and J. S. Weese.** 2008. Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* colonization in pigs and pig farmers. *Vet Microbiol* **128**:298-303.
75. **Kim, T., P. I. Oh, and A. E. Simor.** 2001. The economic impact of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Canadian hospitals. *Infect Control Hosp Epidemiol* **22**:99-104.
76. **Kitai, S., A. Shimizu, J. Kawano, E. Sato, C. Nakano, T. Uji, and H. Kitagawa.** 2005. Characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from retail raw chicken meat in Japan. *J Vet Med Sci* **67**:107-10.
77. **Klevens, R. M., M. A. Morrison, J. Nadle, S. Petit, K. Gershman, S. Ray, L. H. Harrison, R. Lynfield, G. Dumyati, J. M. Townes, A. S. Craig, E. R. Zell, G. E. Fosheim, L. K. McDougal, R. B. Carey, and S. K. Fridkin.** 2007. Invasive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in the United States. *Jama* **298**:1763-71.
78. **Kluytmans, J. A.** 2010. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in food products: cause for concern or case for complacency? *Clin Microbiol Infect* **16**:11-5.
79. **Kock, R., J. Harlizius, N. Bressan, R. Laerberg, L. H. Wieler, W. Witte, R. H. Deurenberg, A. Voss, K. Becker, and A. W. Friedrich.** 2009. Prevalence and molecular characteristics of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) among pigs on German farms and import of livestock-related MRSA into hospitals. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **28**:1375-82.
80. **Koreen, L., S. V. Ramaswamy, E. A. Graviss, S. Naidich, J. M. Musser, and B. N. Kreiswirth.** 2004. spa typing method for discriminating among *Staphylococcus aureus* isolates: implications for use of a single marker to detect genetic micro- and macrovariation. *J Clin Microbiol* **42**:792-9.
81. **Kwon, N. H., K. T. Park, W. K. Jung, H. Y. Youn, Y. Lee, S. H. Kim, W. Bae, J. Y. Lim, J. Y. Kim, J. M. Kim, S. K. Hong, and Y. H. Park.** 2006. Characteristics of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* isolated from chicken meat and hospitalized dogs in Korea and their epidemiological relatedness. *Vet Microbiol* **117**:304-12.
82. **Kwon, N. H., K. T. Park, J. S. Moon, W. K. Jung, S. H. Kim, J. M. Kim, S. K. Hong, H. C. Koo, Y. S. Joo, and Y. H. Park.** 2005. Staphylococcal cassette chromosome mec (SCCmec) characterization and molecular analysis for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and novel SCCmec subtype IVg isolated from bovine milk in Korea. *J Antimicrob Chemother* **56**:624-32.
83. **Ladhani, S.** 2003. Understanding the mechanism of action of the exfoliative toxins of *Staphylococcus aureus*. *FEMS Immunol Med Microbiol* **39**:181-9.
84. **Lee, J. H.** 2003. Methicillin (Oxacillin)-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from major food animals and their potential transmission to humans. *Appl Environ Microbiol* **69**:6489-94.
85. **Leonard, F. C., and B. K. Markey.** 2008. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in animals: a review. *Vet J* **175**:27-36.

86. **Lewis, H. C., K. Mølbak, C. Reese, F. M. Aarestrup, M. Selchau, M. Sørum, and R. L. Skov.** 2008. Pigs as Source of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* CC398 Infections in Humans, Denmark. *Emerg Infect Dis* **14**:1383-1384.
87. **Li, S., R. L. Skov, X. Han, A. R. Larsen, J. Larsen, M. Sorum, M. Wulf, A. Voss, K. Hiramatsu, and T. Ito.** 2011. Novel types of staphylococcal cassette chromosome mec elements identified in CC398 methicillin resistant *Staphylococcus aureus* strains. *Antimicrob Agents Chemother*.
88. **Lina, G., A. Quaglia, M. E. Reverdy, R. Leclercq, F. Vandenesch, and J. Etienne.** 1999. Distribution of genes encoding resistance to macrolides, lincosamides, and streptogramins among staphylococci. *Antimicrob Agents Chemother* **43**:1062-6.
89. **Lodise, T. P., Jr., and P. S. McKinnon.** 2007. Burden of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: focus on clinical and economic outcomes. *Pharmacotherapy* **27**:1001-12.
90. **Lorenz, U., K. Ohlsen, H. Karch, M. Hecker, A. Thiede, and J. Hacker.** 2000. Human antibody response during sepsis against targets expressed by methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *FEMS Immunol Med Microbiol* **29**:145-53.
91. **Lowy, F. D.** 1998. *Staphylococcus aureus* infections. *N Engl J Med* **339**:520-32.
92. **Lozano, C., M. Lopez, E. Gomez-Sanz, F. Ruiz-Larrea, C. Torres, and M. Zarazaga.** 2009. Detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 in food samples of animal origin in Spain. *J Antimicrob Chemother* **64**:1325-6.
93. **Malachowa, N., A. Sabat, M. Gniadkowski, J. Krzyszton-Russjan, J. Empel, J. Miedzobrodzki, K. Kosowska-Shick, P. C. Appelbaum, and W. Hryniewicz.** 2005. 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. *J Clin Microbiol* **43**:3095-100.
94. **Mangili, A., I. Bica, D. R. Snyderman, and D. H. Hamer.** 2005. Daptomycin-resistant, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia. *Clin Infect Dis* **40**:1058-60.
95. **Mazmanian, S. K., E. P. Skaar, A. H. Gaspar, M. Humayun, P. Gornicki, J. Jelenska, A. Joachmiak, D. M. Missiakas, and O. Schneewind.** 2003. Passage of heme-iron across the envelope of *Staphylococcus aureus*. *Science* **299**:906-9.
96. **McCarthy, A. J., and J. A. Lindsay.** 2010. Genetic variation in *Staphylococcus aureus* surface and immune evasion genes is lineage associated: implications for vaccine design and host-pathogen interactions. *BMC Microbiol* **10**:173.
97. **Meemken, D., T. Blaha, R. Tegeler, B. A. Tenhagen, B. Guerra, J. A. Hammerl, S. Hertwig, A. Kasbohrer, B. Appel, and A. Fetsch.** 2009. Livestock Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (LaMRSA) Isolated from Lesions of Pigs at Necropsy in Northwest Germany Between 2004 and 2007. *Zoonoses Public Health* **57**:143-148.
98. **Meemken, D., T. Blaha, R. Tegeler, B. A. Tenhagen, B. Guerra, J. A. Hammerl, S. Hertwig, A. Kasbohrer, B. Appel, and A. Fetsch.** 2009. Livestock Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (LaMRSA) Isolated from Lesions of Pigs at Necropsy in Northwest Germany Between 2004 and 2007. *Zoonoses Public Health*.

99. **Mehrotra, M., G. Wang, and W. M. Johnson.** 2000. Multiplex PCR for detection of genes for *Staphylococcus aureus* enterotoxins, exfoliative toxins, toxic shock syndrome toxin 1, and methicillin resistance. *J Clin Microbiol* **38**:1032-5.
100. **Monecke, S., P. Kuhnert, H. Hotzel, P. Slickers, and R. Ehricht.** 2007. Microarray based study on virulence-associated genes and resistance determinants of *Staphylococcus aureus* isolates from cattle. *Vet Microbiol* **125**:128-40.
101. **Mongkolrattanothai, K., S. Boyle, T. V. Murphy, and R. S. Daum.** 2004. Novel non-mecA-containing staphylococcal chromosomal cassette composite island containing pbp4 and tagF genes in a commensal staphylococcal species: a possible reservoir for antibiotic resistance islands in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* **48**:1823-36.
102. **Moodley, A., M. Stegger, A. F. Bagcigil, K. E. Baptiste, A. Loeffler, D. H. Lloyd, N. J. Williams, N. Leonard, Y. Abbott, R. Skov, and L. Guardabassi.** 2006. spa typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from domestic animals and veterinary staff in the UK and Ireland. *J Antimicrob Chemother* **58**:1118-23.
103. **Moser, S. A., M. J. Box, M. Patel, M. Amaya, R. Schelonka, and K. B. Waites.** 2009. Multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* discriminates within USA pulsed-field gel electrophoresis types. *J Hosp Infect* **71**:333-339.
104. **Neela, V., M. Z. Arif, M. Nor Shamsudin, A. van Belkum, L. Y. Khoon, and E. G. Rad.** 2009. Prevalence Of St-9 Mrsa Among Pigs And Pig Handlers In Malaysia. *J Clin Microbiol* **47**:4138-4140.
105. **Neela, V., M. Z. Arif, M. Nor Shamsudin, A. van Belkum, L. Y. Khoon, and E. G. Rad.** 2009. Prevalence Of St-9 Mrsa Among Pigs And Pig Handlers In Malaysia. *J Clin Microbiol*.
106. **Normanno, G., M. Corrente, G. La Salandra, A. Dambrosio, N. C. Quaglia, A. Parisi, G. Greco, A. L. Bellacicco, S. Virgilio, and G. V. Celano.** 2007. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in foods of animal origin product in Italy. *Int J Food Microbiol* **117**:219-22.
107. **Ohlsen, K., and U. Lorenz.** 2010. Immunotherapeutic strategies to combat staphylococcal infections. *Int J Med Microbiol* **300**:402-10.
108. **Ohwada, A., M. Sekiya, H. Hanaki, K. K. Arai, I. Nagaoka, S. Hori, S. Tominaga, K. Hiramatsu, and Y. Fukuchi.** 1999. DNA vaccination by mecA sequence evokes an antibacterial immune response against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Antimicrob Chemother* **44**:767-74.
109. **Oliveira, D. C., C. Milheirico, and H. de Lencastre.** 2006. Redefining a structural variant of staphylococcal cassette chromosome mec, SCCmec type VI. *Antimicrob Agents Chemother* **50**:3457-9.
110. **Pan, A., A. Battisti, A. Zoncada, F. Bernieri, M. Boldini, A. Franco, M. Giorgi, M. Iurescia, S. Lorenzotti, M. Martinotti, M. Monaci, and A. Pantosti.** 2009. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 infection, Italy. *Emerg Infect Dis* **15**:845-7.
111. **Patel, M., K. B. Waites, C. J. Hoesley, A. M. Stamm, K. C. Canupp, and S. A. Moser.** 2008. Emergence of USA300 MRSA in a tertiary medical centre: implications for epidemiological studies. *J Hosp Infect* **68**:208-13.
112. **Perez-Roth, E., F. Claverie-Martin, J. Villar, and S. Mendez-Alvarez.** 2001.

- Multiplex PCR for simultaneous identification of *Staphylococcus aureus* and detection of methicillin and mupirocin resistance. *J Clin Microbiol* **39**:4037-41.
113. **Pomba, C., H. Hasman, L. M. Cavaco, J. D. da Fonseca, and F. M. Aarestrup.** 2009. First description of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) CC30 and CC398 from swine in Portugal. *Int J Antimicrob Agents*.
 114. **Prescott, Harley, and Klein.** 2003. *Microbiologie, 2ime française ed.* De Boeck Université.
 115. **Prescott, J. F., J. D. Boggot, and R. D. Walker.** 2000. *Antimicrobial Therapy*, Third ed. Iowa State University Press / Ames, Danvers.
 116. **Pruneau, M., G. Mitchell, H. Moisan, E. Dumont-Blanchette, C. L. Jacob, and F. Malouin.** 2011. Transcriptional analysis of antibiotic resistance and virulence genes in multiresistant hospital-acquired MRSA. *FEMS Immunol Med Microbiol*.
 117. **Pu, S., F. Han, and B. Ge.** 2009. Isolation and characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains from Louisiana retail meats. *Appl Environ Microbiol* **75**:265-7.
 118. **Rasschaert, G., W. Vanderhaeghen, I. Dewaele, N. Janez, X. Huijsdens, P. Butaye, and M. Heyndrickx.** 2009. Comparison of fingerprinting methods for typing methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* sequence type 398. *J Clin Microbiol* **47**:3313-22.
 119. **Reyher, K. K., S. Dufour, H. W. Barkema, L. Des Coteaux, T. J. Devries, I. R. Dohoo, G. P. Keefe, J. P. Roy, and D. T. Scholl.** 2011. The National Cohort of Dairy Farms--a data collection platform for mastitis research in Canada. *J Dairy Sci* **94**:1616-26.
 120. **Rouch, D. A., M. E. Byrne, Y. C. Kong, and R. A. Skurray.** 1987. The *aacA-aphD* gentamicin and kanamycin resistance determinant of Tn4001 from *Staphylococcus aureus*: expression and nucleotide sequence analysis. *J Gen Microbiol* **133**:3039-52.
 121. **Sabat, A., J. Krzyszton-Russjan, W. Strzalka, R. Filipek, K. Kosowska, W. Hryniewicz, J. Travis, and J. Potempa.** 2003. New method for typing *Staphylococcus aureus* strains: multiple-locus variable-number tandem repeat analysis of polymorphism and genetic relationships of clinical isolates. *J Clin Microbiol* **41**:1801-4.
 122. **Salyers, A. A., and D. D. Whitt.** 2002. *Bacterial Pathogenesis, A Molecular Approach*, Second Edition ed. ASM Press, Washington, D.C.
 123. **Schouls, L. M., E. C. Spalburg, M. van Luit, X. W. Huijsdens, G. N. Pluister, M. G. van Santen-Verheuver, H. G. van der Heide, H. Grundmann, M. E. Heck, and A. J. de Neeling.** 2009. Multiple-locus variable number tandem repeat analysis of *Staphylococcus aureus*: comparison with pulsed-field gel electrophoresis and spa-typing. *PLoS ONE* **4**:e5082.
 124. **Scott, G. M., R. Thomson, J. Malone-Lee, and G. L. Ridgway.** 1988. Cross-infection between animals and man: possible feline transmission of *Staphylococcus aureus* infection in humans? *J Hosp Infect* **12**:29-34.
 125. **Senna, J. P., D. M. Roth, J. S. Oliveira, D. C. Machado, and D. S. Santos.** 2003. Protective immune response against methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in a murine model using a DNA vaccine approach. *Vaccine* **21**:2661-6.
 126. **Sergio, D. M., T. H. Koh, L. Y. Hsu, B. E. Ogden, A. L. Goh, and P. K. Chow.**

2007. Investigation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in pigs used for research. *J Med Microbiol* **56**:1107-9.
127. **Skaar, E. P., and O. Schneewind.** 2004. Iron-regulated surface determinants (Isd) of *Staphylococcus aureus*: stealing iron from heme. *Microbes Infect* **6**:390-7.
128. **Skiest, D. J.** 2006. Treatment failure resulting from resistance of *Staphylococcus aureus* to daptomycin. *J Clin Microbiol* **44**:655-6.
129. **Smith, T. C., M. J. Male, A. L. Harper, J. S. Kroeger, G. P. Tinkler, E. D. Moritz, A. W. Capuano, L. A. Herwaldt, and D. J. Diekema.** 2009. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strain ST398 is present in midwestern U.S. swine and swine workers. *PLoS One* **4**:e4258.
130. **Smith, T. C., M. J. Male, A. L. Harper, J. S. Kroeger, G. P. Tinkler, E. D. Moritz, A. W. Capuano, L. A. Herwaldt, and D. J. Diekema.** 2008. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strain ST398 is present in midwestern U.S. swine and swine workers. *PLoS ONE* **4**:e4258.
131. **Sneath, P. H. A.** 1986. *Bergey's manual of Systematic Bacteriology*, 1st ed, vol. 2. Williams & Wilkins, Baltimore.
132. **Speer, B. S., N. B. Shoemaker, and A. A. Salyers.** 1992. Bacterial resistance to tetracycline: mechanisms, transfer, and clinical significance. *Clin Microbiol Rev* **5**:387-99.
133. **Ster, C., F. Beaudoin, M. S. Diarra, M. Jacques, F. Malouin, and P. Lacasse.** 2010. Evaluation of some *Staphylococcus aureus* iron-regulated proteins as vaccine targets. *Vet. Immunol. Immunopathol* **136**:311-318.
134. **Tenhagen, B. A., A. Fetsch, B. Stuhrenberg, G. Schleuter, B. Guerra, J. A. Hammerl, S. Hertwig, J. Kowall, U. Kampe, A. Schroeter, J. Braunig, A. Kasbohrer, and B. Appel.** 2009. Prevalence of MRSA types in slaughter pigs in different German abattoirs. *Vet Rec* **165**:589-93.
135. **Tenover, F. C., R. R. Vaughn, L. K. McDougal, G. E. Fosheim, and J. E. McGowan, Jr.** 2007. Multiple-locus variable-number tandem-repeat assay analysis of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. *J Clin Microbiol* **45**:2215-9.
136. **Tortora, G. J., B. R. Funke, and C. L. Case.** 2003. *Introduction à la Microbiologie*, 7 ed. Éditions du Renouveau Pédagogique inc., Saint-Laurent, Québec.
137. **Traber, K. E., E. Lee, S. Benson, R. Corrigan, M. Cantera, B. Shopsin, and R. P. Novick.** 2008. *agr* function in clinical *Staphylococcus aureus* isolates. *Microbiology* **154**:2265-74.
138. **Van Cleef, B. A., E. M. Broens, A. Voss, X. W. Huijsdens, L. Zuchner, B. H. Van Benthem, J. A. Kluytmans, M. N. Mulders, and A. W. Van De Giessen.** 2010. High prevalence of nasal MRSA carriage in slaughterhouse workers in contact with live pigs in The Netherlands. *Epidemiol Infect* **138**:756-63.
139. **van Den Bogaard, A. E., N. London, and E. E. Stobberingh.** 2000. Antimicrobial resistance in pig faecal samples from the Netherlands (five abattoirs) and Sweden. *J Antimicrob Chemother* **45**:663-71.
140. **Van den Eede, A., A. Martens, U. Lipinska, M. Struelens, A. Deplano, O. Denis, F. Haesebrouck, F. Gasthuys, and K. Hermans.** 2009. High occurrence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 in equine nasal samples. *Vet Microbiol* **133**:138-44.

141. **van Duijkeren, E., R. Ikawaty, M. J. Broekhuizen-Stins, M. D. Jansen, E. C. Spalburg, A. J. de Neeling, J. G. Allaart, A. van Nes, J. A. Wagenaar, and A. C. Fluit.** 2008. Transmission of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains between different kinds of pig farms. *Vet Microbiol* **126**:383-9.
142. **van Duijkeren, E., M. D. Jansen, S. C. Flemming, H. de Neeling, J. A. Wagenaar, A. H. Schoormans, A. van Nes, and A. C. Fluit.** 2007. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in pigs with exudative epidermitis. *Emerg Infect Dis* **13**:1408-10.
143. **van Duijkeren, E., M. Moleman, M. M. Sloet van Oldruitenborgh-Oosterbaan, J. Multem, A. Troelstra, A. C. Fluit, W. J. van Wamel, D. J. Houwers, A. J. de Neeling, and J. A. Wagenaar.** 2009. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in horses and horse personnel: an investigation of several outbreaks. *Vet Microbiol* **141**:96-102.
144. **Van Hoecke, H., A. Piette, E. De Leenheer, N. Lagasse, M. Struelens, G. Verschraegen, and I. Dhooge.** 2009. Destructive otomastoiditis by MRSA from porcine origin. *Laryngoscope* **119**:137-40.
145. **van Loo, I., X. Huijsdens, E. Tiemersma, A. de Neeling, N. van de Sande-Bruinsma, D. Beaujean, A. Voss, and J. Kluytmans.** 2007. Emergence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* of animal origin in humans. *Emerg Infect Dis* **13**:1834-9.
146. **van Loo, I. H., B. M. Diederren, P. H. Savelkoul, J. H. Woudenberg, R. Roosendaal, A. van Belkum, N. Lemmens-den Toom, C. Verhulst, P. H. van Keulen, and J. A. Kluytmans.** 2007. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in meat products, the Netherlands. *Emerg Infect Dis* **13**:1753-5.
147. **Vanderhaeghen, W., T. Cerpentier, C. Adriaensen, J. Vicca, K. Hermans, and P. Butaye.** 2010. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) ST398 associated with clinical and subclinical mastitis in Belgian cows. *Vet Microbiol* **144**:166-171.
148. **Vanderhaeghen, W., K. Hermans, F. Haesebrouck, and P. Butaye.** 2010. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in food production animals. *Epidemiol Infect* **138**:606-25.
149. **Vengust, M., M. E. Anderson, J. Rousseau, and J. S. Weese.** 2006. Methicillin-resistant staphylococcal colonization in clinically normal dogs and horses in the community. *Lett Appl Microbiol* **43**:602-6.
150. **Voss, A., F. Loeffen, J. Bakker, C. Klaassen, and M. Wulf.** 2005. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in pig farming. *Emerg Infect Dis* **11**:1965-6.
151. **Wagenaar, J. A., H. Yue, J. Pritchard, M. Broekhuizen-Stins, X. Huijsdens, D. J. Mevius, T. Bosch, and E. Van Duijkeren.** 2009. Unexpected sequence types in livestock associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): MRSA ST9 and a single locus variant of ST9 in pig farming in China. *Vet Microbiol*.
152. **Wagenaar, J. A., H. Yue, J. Pritchard, M. Broekhuizen-Stins, X. Huijsdens, D. J. Mevius, T. Bosch, and E. Van Duijkeren.** 2009. Unexpected sequence types in livestock associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): MRSA ST9 and a single locus variant of ST9 in pig farming in China. *Vet Microbiol* **139**:405-409.
153. **Weese, J. S., B. P. Avery, and R. J. Reid-Smith.** 2010. Detection and

- quantification of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) clones in retail meat products. *Lett Appl Microbiol* **51**:338-342.
154. **Weese, J. S., H. Dick, B. M. Willey, A. McGeer, B. N. Kreiswirth, B. Innis, and D. E. Low.** 2006. Suspected transmission of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* between domestic pets and humans in veterinary clinics and in the household. *Vet Microbiol* **115**:148-55.
155. **Weese, J. S., J. Rousseau, J. L. Traub-Dargatz, B. M. Willey, A. J. McGeer, and D. E. Low.** 2005. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in horses and humans who work with horses. *J Am Vet Med Assoc* **226**:580-3.
156. **Weese, J. S., J. Rousseau, B. M. Willey, M. Archambault, A. McGeer, and D. E. Low.** 2006. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in horses at a veterinary teaching hospital: frequency, characterization, and association with clinical disease. *J Vet Intern Med* **20**:182-6.
157. **Werner, A. H., and D. Russell.** 1999. Mupirocin, fusidic acid and bacitracin: activity, action and clinical uses of three topical antibiotics. *Veterinary Dermatology* **10**:225-240.
158. **Wilcox, M. H., J. Hall, H. Pike, P. A. Templeton, W. N. Fawley, P. Parnell, and P. Verity.** 2003. Use of perioperative mupirocin to prevent methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) orthopaedic surgical site infections. *Journal of Hospital Infection* **54**:196-201.
159. **Witte, W., B. Strommenger, C. Stanek, and C. Cuny.** 2007. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 in humans and animals, Central Europe. *Emerg Infect Dis* **13**:255-8.
160. **Wu, S. W., H. de Lencastre, and A. Tomasz.** 2001. Recruitment of the *mecA* gene homologue of *Staphylococcus sciuri* into a resistance determinant and expression of the resistant phenotype in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* **183**:2417-24.
161. **Wulf, M., and A. Voss.** 2008. MRSA in livestock animals-an epidemic waiting to happen? *Clin Microbiol Infect* **14**:519-21.
162. **Zhang, K., J. A. McClure, S. Elsayed, and J. M. Conly.** 2009. Novel staphylococcal cassette chromosome *mec* type, tentatively designated type VIII, harboring class A *mec* and type 4 *ccr* gene complexes in a Canadian epidemic strain of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* **53**:531-40.
163. **Zhang, K., J. A. McClure, S. Elsayed, T. Louie, and J. M. Conly.** 2005. Novel multiplex PCR assay for characterization and concomitant subtyping of staphylococcal cassette chromosome *mec* types I to V in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* **43**:5026-33.

Liste des coauteurs de l'article de Michael Beaudry Ferland

- Michael Beaudry-Ferland
- Geneviève Pelletier-Jacques
- Ann Letellier
- Brian Talbot
- Hélène Monière-Wollank
- Myriame Lafrance
- François Malouin
- Marie Archambault

6. Publications et communications

Liste des publications et communications réalisées durant les études de maîtrise

Posters :

10-11 Mai 2010, Montréal, Canada;

M. Beaudry-Ferland¹, A. Letellier¹, F. Malouin², M. Archambault¹; ¹University of Montreal, Faculty of Veterinary Medicine, Saint-Hyacinthe, QC, CANADA, ²University of Sherbrooke, Sherbrooke, QC, CANADA; Caractérisation préliminaire de *Staphylococcus aureus* résistants à la méthicilline (SARM) présentant de la multi-résistance, provenant d'écouvillons naseaux et de peau, chez le porc à l'abattoir au Canada; ACFAS 2010;

10 Mai 2010, Montréal, Canada;

M. Beaudry-Ferland¹, A. Letellier¹, F. Malouin², M. Archambault¹; ¹University of Montreal, Faculty of Veterinary Medicine, Saint-Hyacinthe, QC, CANADA, ²University of Sherbrooke, Sherbrooke, QC, CANADA; Caractérisation préliminaire de *Staphylococcus aureus* résistants à la méthicilline (SARM) présentant de la multi-résistance, provenant d'écouvillons naseaux et de peau, chez le porc à l'abattoir au Canada; Congrès du Centre de Recherche en Infectiologie Porcine (CRIP) 2010;

June 8-11, 2010, Toronto, Canada;

M. Archambault¹, **M. Beaudry-Ferland¹**, A. Letellier¹, F. Malouin²; ¹University of Montreal, Faculty of Veterinary Medicine, Saint-Hyacinthe, QC, CANADA, ²University of Sherbrooke, Sherbrooke, QC, CANADA; Preliminary Characterisation of Multiple-Antibiotic Resistance of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) From Nasal and Axillary Skin Samples in Pigs Slaughtered in Canada; ASM Conferences, Antimicrobial Resistance in Zoonotic Bacteria and Foodborne Pathogens in Animals, Humans and Environment;

Article: Characterization of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) Strains from Abattoir Pigs and Association between Colonization and Lower Seroconversion

