

Université de Montréal

**ÉTUDE DE LA VIRULENCE ET DE LA RÉSISTANCE AUX
ANTIBIOTIQUES DES *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* RÉSISTANTS À
LA MÉTHICILLINE CHEZ LE PORC À L'ABATTOIR AU QUÉBEC**

par

GENEVIÈVE PELLETIER-JACQUES

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

Juin, 2012

© Geneviève Pelletier-Jacques, 2012

Université de Montréal
Faculté de médecine vétérinaire

Ce mémoire intitulé :

**ÉTUDE DE LA VIRULENCE ET DE LA RÉSISTANCE AUX
ANTIBIOTIQUES DES *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* RÉSISTANTS À
LA MÉTHICILLINE CHEZ LE PORC À L'ABATTOIR AU QUÉBEC**

Présenté par :

GENEVIÈVE PELLETIER-JACQUES

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes:

Dr John Fairbrother, président-rapporteur

Dre Marie Archambault, directrice de recherche

Dre Josée Harel, codirectrice

Dr Philippe Fravalo, membre du jury

RÉSUMÉ

Depuis quelques années et dans plusieurs pays, un nouveau type de *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline (SARM), le séquence type (ST) 398, a été fréquemment retrouvé chez les porcs et chez les fermiers en contact avec ces porcs. Au Canada, très peu d'informations sont disponibles concernant le SARM d'origine porcine. Une première étude dans notre laboratoire a permis de récolter 107 isolats de SARM provenant de deux abattoirs porcins du Québec. Le présent travail vise à caractériser les gènes de virulence et de résistance aux antibiotiques de ces SARM, d'étudier leur formation de biofilm en relation avec la spécificité du groupe *agr* et de vérifier la localisation plasmidique et la transférabilité de ces gènes à des souches de SARM d'origine humaine. Plusieurs souches ont démontré différents patrons phénotypiques de résistance aux antibiotiques. Vingt-quatre souches représentatives de ces isolats ont été soumises à une caractérisation plus approfondie par une étude génotypique en utilisant une biopuce à ADN et un grand nombre de gènes de virulence a été détecté codant pour des entérotoxines staphylococcales, des leucocidines, des hémolysines, des auréolysines, des facteurs d'immunoévasion, des superantigènes, des facteurs d'adhésion et des facteurs impliqués dans la formation de biofilm. Des gènes de résistance envers les aminoglycosides, les macrolides, les lincosamides, les tétracyclines et les biocides ont été également détectés par biopuce et leur localisation plasmidique a par la suite été déterminée. La transférabilité de ces gènes de souches porcines à des souches de SARM d'origine humaine a été démontrée par conjugaison bactérienne; ainsi le transfert horizontal de certains gènes de résistance aux antibiotiques et de virulence a été observé. Ces travaux de recherche apportent une meilleure connaissance de la résistance aux antibiotiques et de la virulence des SARM

d'origine porcine et de leur potentiel de contribution à l'émergence de certaines résistances et facteurs de virulence chez le SARM d'origine humaine.

Mots-clés: *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline (SARM), porc, résistance aux antibiotiques, biopuce, gènes de virulence, abattoir, Canada

SUMMARY

In recent years and in several countries, a new type of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), the sequence type (ST) 398, has been frequently found in pigs and in farmers in contact with these pigs. In Canada, little information is available concerning MRSA from pigs. A previous study in our laboratory identified 107 MRSA isolates from two pig slaughterhouses in Quebec. This study was conducted to determine antimicrobial resistance and virulence genes of MRSA from abattoir pig, to study their biofilm formation in relation with *agr* specificity groups and to evaluate horizontal transfer of genes to a MRSA of human clinical origin. Different phenotypic patterns of antimicrobial resistance were observed in these MRSA and a representative subset of these isolates was selected for further characterization. Twenty-four porcine MRSA were characterized by a DNA microarray, the StaphyType of CLONDIAG. Our results demonstrated that the MRSA strains from the abattoirs contain several antimicrobial resistance genes responsible for macrolide and tetracycline resistance and virulence genes encoding staphylococcal enterotoxins, hemolysins, leukocidins, aureolysin, superantigens, immunoevasion, adhesion, and biofilm development. This study presents the first evidence that horizontal transfer of some of these genes can occur between MRSA of porcine and human origin. We also report for the first time biofilm formation in Livestock Associated-MRSA of porcine origin associated with *agr* group II. It is possible that biofilm formation favors colonization, persistence as well as zoonotic potential. This research provides a better understanding of antimicrobial resistance and virulence of MRSA from pigs and their potential contribution to the emergence of some resistance and virulence factors in MRSA of human origin.

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

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ.....	iii
LISTE DES TABLEAUX.....	ix
LISTE DES FIGURES	x
LISTE DES SIGLES ET ABBRÉVIATIONS.....	xi
REMERCIEMENTS	xiii
1. INTRODUCTION.....	1
2. RECENSION DES ÉCRITS	4
2.1 Staphylococcus aureus résistant à la méthicilline (SARM).....	5
2.1.1 Caractéristiques générales	5
2.1.2 Les facteurs de virulence, pathogénie et pathogénicité	10
2.1.3 Le SARM d'origine porcine	14
2.1.3.1 Les SARM chez les porcs et chez les travailleurs en contact avec ces porcs	14
2.1.3.2 Les SARM dans les abattoirs	18
2.1.3.3 Les SARM dans les centres de recherche	20
2.1.3.4 Les infections humaines dues à des SARM d'origine porcine (SARM ST398)	20
2.1.3.5 Les infections porcines dues à des SARM ST398.....	22
2.1.3.6 La transmission des SARM.....	22
2.1.4 Transmission et diagnostic	24
2.1.5 Typage.....	27
2.1.5.1 Multilocus sequence typing (MLST)	27

2.1.5.2 Pulsed Field Gel Electrophoresis (Électrophorèse en champs pulsé ou PFGE).....	28
2.1.5.3 Le typage du gène <i>spa</i>	28
2.1.5.4 Le typage du gène <i>SCCmec</i>	29
2.1.5.5 Multiple locus variable number of tandem repeats (VNTR) analysis (MLVA)	29
2.1.6 Contrôle de l'infection à SARM	30
2.2 Résistance aux antibiotiques	30
2.2.1 Méthodes de détection phénotypiques.....	30
2.2.1.1 Concentration minimale inhibitrice (CMI)	30
2.2.1.2 La méthode Kirby-Bauer	32
2.2.2 Méthodes de détection génotypiques	33
2.2.3 Généralités sur la résistance aux antibiotiques de SARM	37
2.2.3.1 Le SARM d'origine porcine	37
2.2.3.2 Le SARM d'origine humaine	44
Articles scientifiques	44
Characterization of Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus (MRSA) isolates from Abattoir Pigs and Association between Colonization and Seroconversion ..	48
Microarray Characterization of Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus (MRSA) Isolates of Abattoir Pigs and Evaluation of their Capacity to Form Biofilms	86
3. DISCUSSION GÉNÉRALE.....	114
4. CONCLUSION ET PERSPECTIVES	122
Publications et communications.....	xiv
Annexe.....	xvi

LISTE DES TABLEAUX

Recension de la littérature

Tableau I : Différentes classifications et désignations pour les différents types de SARM (page 9)

Tableau II : Les facteurs de virulence de SARM (page 11)

Tableau III : Les résistances génotypiques envers les antibiotiques rapportées chez les SARM d'origine porcine (page 43)

Article Scientifique 1

Table 1: Antimicrobial resistance of pig MRSA isolates ($n = 107$) based on MICs (page 70).

Table 2: Pig MRSA antimicrobial resistance phenotypes other than beta-lactams (page 71).

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 72).

Article Scientifique 2

Table 1: List of isolates ($n=24$) selected for further characterization using a microarray^a (page 107).

Table 2: Relationship between MRSA origin, Agr type and degree of biofilm formation (page 108).

Table 3: Antimicrobial resistance genotypes of selected isolates ($n=24$) using a microarray (page 109).

Table 4: Virulence genotypes of selected isolates ($n=24$) using a microarray (page 110).

Table 5: Antimicrobial resistance and virulence genes detected by microarray^a in MRSA of porcine and human origins in Quebec (Canada) and two MRSA transconjugants. (page 111).

Table S1: Primers used in this study (page 120).

LISTE DES FIGURES

Recension de la littérature

Figure 1: Structure de base de l'élément *SCCmec*. (page 6)

Figure 2: Schématisation de la transmission (page 26)

Figure 3: Résultats d'une CMI faite par E-test (page 31)

Figure 4: Schématisation du principe de la puce à ADN (page 34)

Figure 5: Schématisation du principe de la puce à ADN StaphyType de CLONDIAG (page 35)

Figure 6 : Principe de la résistance aux antibiotiques (page 38)

Article Scientifique 1

Figure 1: MLVA dendrogram representing the clonal relationship among porcine MRSA isolates (page 73).

Figure 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 (page 74).

Figure 3: Percentage of positive serums in animal groups colonized by MRSA compared to others (page 75)

Article Scientifique 2

Figure 1: Biofilm formation of MRSA of porcine and human origin (page 119).

LISTE DES SIGLES ET ABBRÉVIATIONS

ADN	Acide désoxyribonucléique
Agr	Accessory gene regulator
CA-MRSA	Community-associated methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i>
CCR	Cassette chromosome recombinase
CLSI	Clinical Laboratory Standard Institute
CMI	Concentration Minimale Inhibitrice
HA-MRSA	Healthcare-associated methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i>
HRP	Peroxydase de Raifort
LA-MRSA	Livestock-associated methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i>
MLST	Multiple-Locus Sequence Typing
MLVA	Multiple-Locus Variable-Number Tandem Repeat Analysis
MSCRAMM	Microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules
PCR	Polymerase Chain Reaction
PBP	Penicilline Binding Protein (protéine liant la pénicilline)
PFGE	Pulsed Field Gel Electrophoresis (Électrophorèse en champs pulsé)
PSM-<i>mec</i>	Phenol-soluble moduline
PVL	Panton-Valentine Leukocidine
SARM	<i>Staphylococcus aureus</i> résistant à la méthicilline
SCC<i>mec</i>	Staphylococcal Cassette Chromosome <i>mec</i>
SCVs	Small-colony variants
SE	Staphylococcal Enterotoxins
ST	Séquence type

TST	Toxine du Choc Toxique
VIH	Virus de l'immunodéficience humaine

REMERCIEMENTS

Merci à ma directrice de maîtrise, le Dre Marie Archambault, pour m’avoir donné ma chance dans son laboratoire ainsi que pour son soutien et ses conseils.

Merci à ma co-directrice, le Dre Josée Harel, pour ses conseils et sa présence tout au long de ces deux années.

Merci aux membres de mon laboratoire, Audrey Charlebois et Cindy-Love Tremblay, d’avoir partagé vos connaissances avec moi.

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

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

Merci au 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; aussi connus sous le terme MRSA pour Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*) sont retrouvés dans les hôpitaux humains, la communauté en général et maintenant chez les animaux. Les SARM sont devenus un problème d'ordre mondial en médecine humaine et vétérinaire. Aux États-Unis, il y a annuellement 19 000 morts causées par infections aux SARM. C'est le même taux de mortalité que celui attribué au VIH, à la tuberculose et aux hépatites virales mis ensemble [1]. Dans la population en générale en 2010, environ 1,5% des individus étaient colonisés par SARM [2]. De plus, une étude faite en 2001 a démontré que le coût pour traiter une infection à SARM dans un hôpital au Canada est de 14 360 dollars par patient alors que le dépistage de SARM est de 1 363 dollars par patient. Le SARM coûte donc annuellement environ 50 millions de dollars aux hôpitaux canadiens [3].

Le SARM est également un problème en médecine vétérinaire. Il est maintenant retrouvé colonisant plusieurs espèces animales, comme les chevaux [4, 5], les vaches [6], les chiens, les chats [7, 8], les lapins [8], les poulets [9-11] et les porcs [12] où ils peuvent à l'occasion causer des pathologies. Depuis quelques années, au Canada, un nouveau type de SARM, le séquence type (ST) 398, a été retrouvé très souvent chez les porcs et chez les fermiers en contact avec ces porcs, mais sa dispersion dans la population générale demeure encore peu connue. Bien qu'il y ait un taux de colonisation par ce type de SARM (ST) 398 de 24,9% chez les porcs et de 20,0% chez les fermiers dans les fermes porcines en Ontario, au Canada, aucune infection humaine ou animale n'a été rapportée en Amérique du Nord [13]. Cependant, des mammites et des infections du tractus urinaire chez des animaux et des infections de la peau chez les humains ont été rapportées dans d'autres pays [12, 14-16]. Il n'y a pas encore d'information publiée sur la prévalence du SARM ST398 au Québec. Ainsi notre laboratoire a débuté un projet de recherche visant l'étude des SARM

provenant de porcs à l'abattoir. Des travaux préliminaires de notre laboratoire, ont permis de recueillir 107 souches de SARM d'origine porcine (51 d'origine nasale et 56 d'origine axillaire) venant d'abattoirs du Québec entre novembre 2008 et février 2009. Suite à l'identification et au typage de SARM, le patron phénotypique de résistance aux antibiotiques a été déterminé. Plusieurs souches ont alors démontré différents patrons phénotypiques de résistance aux antibiotiques. Nous voulons maintenant continuer de caractériser plus en profondeur ces souches.

Nous posons comme hypothèse que les gènes de virulence et de résistance aux antibiotiques des SARM d'origine porcine sont transférables à des souches de SARM d'origine humaine. Les objectifs de cette étude seront donc premièrement de caractériser les gènes de virulence et de résistance aux antibiotiques des SARM d'origine porcine. Deuxièmement, d'identifier les gènes de résistance retrouvés sur un même plasmide. Troisièmement, d'évaluer la transférabilité des gènes de virulence et de résistance aux antibiotiques à des SARMS d'origine humaine.

2. RECENSION DES ÉCRITS

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

2.1.1 Caractéristiques générales

Le genre *Staphylococcus* réfère à une bactérie à Gram positif de forme sphérique d'environ un micromètre de diamètre qui croît en grappe. Les *Staphylococcus* sont des microorganismes commensaux, c'est-à-dire qu'ils font partie de la flore bactérienne normale des mammifères. Ils peuvent aussi survivre dans une grande diversité d'environnement et à la dessiccation [17]. Il y a plus d'une trentaine d'espèces de *Staphylococcus*. L'espèce la plus pathogène pour l'humain et l'animal est majoritairement *Staphylococcus aureus* [18]. Cette bactérie se retrouve habituellement dans le nez, la gorge, les aisselles et le tractus intestinal. *S. aureus* a été découvert en 1880. Cette bactérie cause souvent des infections mineures de la peau et infecte les plaies post-opératoires [19]. Il est facile de la différencier en laboratoire des autres *Staphylococcus*, car *S. aureus* est coagulase positive et produit une double zone d'hémolyse sur gélose sang [17]. Durant les années 40, les infections à *S. aureus* ont commencé à être traitées avec de la pénicilline et vers les années 60, environ 80% des souches en étaient devenues résistantes à cette antibiotique. Ces bactéries résistantes hydrolysent l'antibiotique en synthétisant une enzyme, la pénicillinase, capable de rompre le cycle β -lactame. Une nouvelle classe de pénicilline, résistante à la pénicillinase, a ensuite été commercialisée, les pénicillines semi-synthétiques du groupe M, comme la méthicilline, l'oxacilline et la dicloxacilline [20]. Après deux ans d'utilisation de la méthicilline comme agent thérapeutique, une souche de *S. aureus* résistant à la méthicilline (SARM) fut découverte [19].

Les caractéristiques générales d'un SARM sont: premièrement, d'appartenir à l'espèce *S. aureus*; deuxièmement, d'être résistant à la méthicilline et à d'autres

pénicillines anti-staphylocoques semi-synthétiques (exemple, oxacilline, dicloxacilline et nafcilline); et troisièmement, d'avoir acquis le gène de résistance *mecA* [21].

Le gène *mecA* code pour une protéine de liaison modifiée ayant une basse affinité avec la pénicilline (PBP 2a; penicillin-binding protein). Il confère une résistance à la plupart des antibiotiques β -lactamines [21]. Les β -lactamines agissent en inhibant l'action des enzymes associées à la synthèse du peptidoglycane et en inhibant ainsi la formation des parois des cellules bactériennes [22]. Le gène *mecA* se retrouve sur un des nombreux éléments mobiles de grande taille, nommé SCC*mec* pour « staphylococcal cassette chromosome ». Ces éléments mobiles contiennent un site spécifique « cassette chromosome recombinase » (*ccr*) qui est responsable de la précision de l'excision et de l'intégration d'élément SCC*mec* dans le chromosome des *Staphylococcus* (Figure 1). Jusqu'à présent, 11 différents types SCC*mec* (I à XI) et plusieurs sous-types ont été décrits pour les SARM selon leur complexe *mec* et leurs gènes *ccr* [19, 23]. Tous les gènes de résistances *mecA* s'intègrent dans le chromosome au niveau du gène *orfX* dont le rôle est toujours inconnu [21, 24].

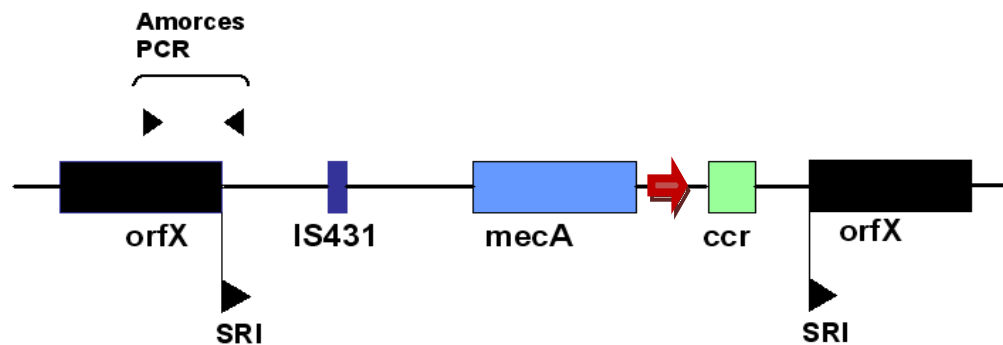


Figure 1 : Structure de base de l'élément SCC*mec*. *OrfX*, gène où s'intègre *mecA*; SRI, séquences inversées répétées; *IS431*, séquence d'insertion 431; Flèche rouge : phénol-soluble moduline (*PSM-mec*) [25]; *ccr*, chromosomal cassette recombinase; amorces PCR, pour la détection de SARM. (Adapté de CLSI, 2010)

Le système national de surveillance des infections nosocomiales (NNIS) aux États-Unis a démontré en 2004, une augmentation de l'incidence des infections nosocomiales causées par SARM chez les patients des soins intensifs dans les hôpitaux. Maintenant plus de 60% des isolats de *S. aureus* retrouvés chez les patients des soins intensifs sont des SARM [1]. Depuis quelques années, nous faisons face à une nouvelle problématique, car il y a émergence de nouveaux cas d'infections à SARM chez les travailleurs à la ferme et à l'abattoir, puisque les animaux qu'ils côtoient sont la plupart du temps porteurs asymptomatiques de SARM [26, 27]. En général, les SARM des animaux de compagnies diffèrent de ceux retrouvés chez les animaux de la ferme et à l'abattoir. Chez les animaux de compagnie, la transmission des SARM se ferait principalement du propriétaire à l'animal; tandis que chez le porc, les SARM semblent se propager des porcs aux humains ayant un étroit contact avec ceux-ci [28].

Le premier SARM d'origine humaine a été isolé en 1961 dans un hôpital du Royaume-Uni [29]. Depuis, les SARM ont été classifiés selon trois catégories. Les SARM d'origine hospitalière (healthcare-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*; HA-MRSA ou HA-SARM), les SARM d'origine communautaire (community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*; CA-MRSA ou CA-SARM) et les SARM d'origine animale (lifestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*; LA-MRSA ou LA-SARM). Les HA-SARM seraient dus à une trop grande utilisation des antibiotiques dans le milieu hospitalier [21]. En médecine humaine, les antimicrobiens dont les pénicillines stables β -lactamines sont les plus communément utilisées pour le traitement des infections. La résistance à ces antibiotiques limite donc les options thérapeutiques. Les CA-SARM sont acquis dans la communauté sans historique d'hospitalisation. Les LA-SARM sont quand à eux acquis lors de contact avec les animaux de la ferme [22]. Le

nombre d'infections dues aux CA-SARM semble en constante augmentation. De plus, ce type de SARM se retrouve maintenant également dans les hôpitaux et semble plus virulent que les HA-SARM. Les CA-SARM ont acquis un *SCCmecIV*, le plus petit des SCC qui confère la résistance à la méthicilline, et sont généralement susceptibles à plusieurs antibiotiques non β -lactamines. De plus, les CA-SARM semblent souvent contenir la toxine PVL (leucocidine de Panton-Valentine), un facteur de virulence important qui sera discuté plus loin [30]. Depuis les cinq dernières années, il y a émergence de LA-SARM dont le porc, la volaille et le bétail semble être les réservoirs. Les LA-SARM découverts chez le porc (le plus souvent ST398) sont de nouveaux clones de SARM. Ils sont non-typables par analyse sur gel d'électrophorèse en champs pulsés (PFGE) après restriction avec l'enzyme *SmaI* alors que les souches d'origine humaine sont couramment typées par cette méthode. Les LA-SARM ne sont pas, la plupart du temps, pathogènes pour les animaux. Ils les colonisent et ceux-ci deviennent porteurs asymptomatiques. Cependant, les travailleurs en contact avec ces animaux courent un plus grand risque de devenir porteurs [16, 26].

Les huit éléments *SCCmec* (type I à VIII) sont composés en général du gène *ccr*, du gène *mecA* et de marqueurs de résistance antimicrobienne comme Tn554 (spectinomycine et érythromycine) et pUB110 (kanamycine ou bléomycine) (Figure 1). Les types I et III ont été retrouvés chez les HA-SARM isolés dans les années 1960 en Europe et en Asie. Le type II a été omniprésent au Japon, en Corée et aux États-Unis. Les types IV, V et VI sont des CA-SARM ayant des *SCCmec* de plus petites tailles. Ils ne contiennent pas en général de marqueurs de résistance aux antibiotiques additionnels [21]. Les LA-SARM d'origine porcine possèdent le plus souvent le *SCCmec* de type V et ceux d'origine aviaire (poulet) possèdent les types II, IV et V [31]. Finalement, les types de SARM les plus souvent retrouvés chez l'humain sont, aux États-Unis le type IVa, plus précisément le USA300 et au

Canada les types II, IV et IVa soit le CMRSA-2, le CMRSA-7 et le CMRSA-10 [32, 33] (Tableau I). Il existe plusieurs façons de classifier les SARM selon les différentes techniques de typage et les pays d'origine car il n'y a pas de classification universelle (Tableau I). Les techniques de génotypage utilisées sont le MLST (multilocus sequence typing), le typage du gène *SCCmec*, le PFGE ou le typage du gène *spa*, gène codant pour la protéine A de *S. aureus*. Pour le PFGE, les profils sont désignés différemment selon qu'ils aient été produits aux États-Unis ou au Canada (Tableau I).

Tableau I : Différentes classifications et désignations pour les types de SARM.

MLST	SCC <i>mec</i>	PFGE (USA)	PFGE (Canada)	Type <i>spa</i>
1	IVa	USA 400	CMRSA-7	t128
5	II	USA 100	CMRSA-2	t002
5	IV	USA 800	CMRSA-2	t002
8	IVa	USA 300	CMRSA-10	t008
8	II, IV	USA 500	CMRSA-5	t064
8	VIII		CMRSA-9	t008
22	IV		CMRSA-8	t022
30	IV	USA 1100		t019
36	II	USA 200	CMRSA-4	t018
45	II	USA 600	CMRSA-1	t004
59	IV	USA 1000		t216
72	IVa	USA 700		t216
239	III		CMRSA-3/6	t037
398	V	Non-typable	Non-typable	t034

Dernièrement, des études ont démontré l'introduction de SARM dans la chaîne alimentaire via la contamination des carcasses à l'abattoir ou via les travailleurs des abattoirs [34]. Les infections alimentaires découlant de ce problème restent à être évaluées. Finalement, les patients contaminés par ces SARM pourraient introduire de nouvelles résistances aux antibiotiques dans les hôpitaux grâce à la transférabilité des résistances d'une souche à une autre [12].

2.1.2 Les facteurs de virulence, pathogénie et pathogénicité

Les SARM sont des microorganismes pathogènes ou commensaux. En tant que commensal, il colonise le nez, les aisselles, l'aïne ainsi que le tractus gastro-intestinal de l'hôte. La colonisation permet à la bactérie de s'introduire dans l'hôte lors de blessures et augmente ainsi le risque d'infection. La colonisation permet aussi la transmission à d'autres individus en parfaite santé dans la communauté. Les infections à SARM sont essentiellement les mêmes que les infections à toutes les souches de *S. aureus*, à la seule différence de la résistance aux antibiotiques causée par le gène *mecA*. Ainsi, les SARM peuvent causer des maladies, telles des abcès, des pneumonies, des arthrites, des méningites, des ostéomyélites, des endocardites et des septicémies lorsqu'ils entrent en contact avec une blessure chez les humains et les animaux [17, 18, 31]. De plus, les SARM sont le plus souvent multi-résistants [35] ce qui complique souvent le traitement. L'annexe I représente un résumé chronologique des publications reportant des cas de colonisations et d'infections par les SARM chez des animaux.

Plusieurs facteurs contribuent à la virulence de *S. aureus* (Tableau II). Deux grandes classes ont été étudiées plus attentivement, soit les adhésines et les toxines. Les adhésines sont des protéines associées à la surface, par exemple la protéine A et le facteur d'agglutination, qui interagissent avec des composants de l'hôte soit les anticorps, le fibrinogène et la fibronectine. Les toxines quand à elles, sont des protéines sécrétées par la bactérie qui vont directement endommager les tissus de l'hôte ou briser ses défenses. L'entérotoxine staphylococcique A, la toxine du choc toxique (TST) et la leucocidine de Panton-Valentine (PVL) en sont des exemples [21]. Les principaux facteurs de virulence de SARM et leur rôle respectif sont résumés dans le tableau II [36, 37].

Tableau II : Les facteurs de virulence de SARM.

Facteurs de virulence	Gènes	Rôle
Coagulase	<i>coa</i>	Réagit avec la prothrombine pour former un complexe qui peut cliver le fibrinogène et causer la formation d'un caillot de fibrine
Protéine A	<i>spa</i>	Liaison au fragment Fc de l'immunoglobuline G et inhibition de la phagocytose
Protéinases	<i>ssp</i>	Hydrolysent les protéines
Entérotoxines (A,B,C,D,E et F)	<i>ent</i>	Neurotoxine ayant une activité superantigène sur les lymphocytes T
Hémolysines (alpha, beta, delta et gamma)	<i>hla, hlb, hld et hlg</i>	Lyse les érythrocytes
Exfoliatines A et B	<i>eta, etb</i>	Toxine causant la perte des couches superficielles de la peau dans le syndrome de la peau ébouillantée
Lipases et phospholipases	<i>plc</i>	Activité enzymatique sur les lipides et les phospholipides
Déoxyribonucléase		Enzyme hydrolysant l'ADN
Staphylokinase	<i>sak</i>	Liaison au plasminogène et transformation en plasmine qui a une activité fibrinolytique et protéolytique. Aide à la dissémination
Toxine-1 du syndrome de choc (TSST-1)	<i>tst</i>	Activité superantigène
Facteur d'agglutination	<i>clfA</i>	Liaison aux fibrinogènes
Leucocidine (PVL)	<i>lukR, lukF et lukS</i>	Inhibe la phagocytose par les granulocytes et les macrophages tout en les détruisant
Protéines de surface	<i>fnbA, fnbB, cna</i>	Liaison à la fibronectine, au collagène, etc.
Capsule	<i>cap</i>	Inhibe la phagocytose et l'adhérence aux cellules épithéliales, endothéliales et aux monocytes
Staphyloferrine B	NWMN_2079-2082	Sidérophore
Bactériocines	<i>bsa</i>	Inhibe les bactéries à Gram négatif

S. aureus adhère aux cellules hôtes par des composants microbiens de surface qui reconnaissent les molécules adhésives de la matrice (MSCRAMMs; microbial surface

components recognizing adhesive matrix molecules), comme le collagène, la fibronectine et le fibrinogène. Après l'adhésion aux tissus hôtes, il est capable de croître et de persister de différentes façons : il peut former des biofilms, envahir les cellules épithéliales ou former des «small-colony variants» (SCV) [30]. Les SCV sont des *S. aureus* démontrant un dysfonctionnement du métabolisme oxydatif. Ce défaut cause une altération dans l'expression des facteurs de virulence, une croissance plus lente et une perte de la pigmentation des colonies. Ils sont appelés SCV à cause de la petite taille de leurs colonies quand il y a croissance sur agar. Les SCV possèdent une plus grande capacité d'adhésion, d'invasion et de persistance chez l'hôte [38].

Un biofilm est un amas de bactéries attachées entre elles ou à une surface de façon irréversible. Cet amas est englobé par une matrice d'exopolysaccharides. Lors de la formation d'un biofilm, les bactéries se fixent progressivement à une surface, elles adhèrent et synthétisent des substances qu'elles sécrètent et dont elles s'entourent pour se protéger et renforcer leur adhésion. Ces substances sont essentiellement des exopolysaccharides et également des protéines [11]. Les gènes *fnbA* et *fnbB* codent pour des protéines (fibrinogen- and fibronectin-binding protein) qui favorisent l'accumulation de biofilm induit par l'acide. Une étude a démontré que les SARM ayant ces deux gènes produisent un plus haut niveau de biofilm que les SARM sans un de ces gènes [39]. Il n'y a présentement aucune étude sur la formation de biofilm des souches de SARM provenant des porcs, mais récemment, des gènes codant pour des facteurs d'adhésion et de formation de biofilm (*icaD*, *cna*, *ebpS*, *eno*, *fnbA*, *fnbB*, *clfA* et *clfB*) ont été trouvés chez des souches de SARM ST398 provenant de poulet. Dans cette étude, aucun lien entre la présence de ces gènes et la formation de biofilm n'a pu être fait [11]. Dans deux autres études, les souches de SARM ayant un *agr* type II semblaient être reliées à un plus fort taux de formation de biofilm [40, 41]. Le type

agr est un système régulateur de gènes accessoires (*agr*) qui semble coordonner la pathogénèse de *S. aureus*. C'est un régulateur global basé sur un système à deux composantes, permettant la formation du peptide autoinducteur (AIP) et la transcription de gènes de virulence [40].

Selon plusieurs études, la PVL (Panton-Valentine Leucocidine) est un facteur de virulence important qui est le plus souvent retrouvé dans la catégorie des CA-SARM. La PVL est une protéine extracellulaire à deux composantes, soit la protéine S et la protéine F. Elle détruit les leucocytes en créant des pores dans la membrane plasmique des cellules eucaryotes. La PVL est codée par des bactériophages (ex: phiSLT) et leur insertion se fait sous forme de prophage dans le chromosome des SARM [42-44]. Les gènes codant pour PVL, *lukF-PVL* et *lukS-PVL*, sont non essentiels à la survie de la bactérie, car ils peuvent être perdus sans impact apparent sur la viabilité de la bactérie [30, 42-44]. Plus récemment, une étude a démontré qu'il n'y avait aucune corrélation entre la présence des gènes codant pour la PVL et les infections provenant d'abcès de la peau [45]. Bien qu'il ait été démontré qu'environ 85% des patients positifs à SARM avaient des infections de peaux associées à la présence des gènes *lukSF-PVL*, ce dernier n'a pas été corrélé avec la gravité des infections [45]. Cette étude incluait 92 centres hospitaliers de 15 pays différents. Ces travaux sont en accord avec les résultats expérimentaux provenant de deux autres études montrant que les gènes codants pour PVL ne jouent pas un rôle majeur dans les infections de la peau attribuables au CA-SARM [46, 47].

D'autres gènes spécifiques à SARM comme les gènes *femA*, *femB*, *femC* et *femD* sont des facteurs essentiels à la résistance à la méthicilline et peuvent être considérés comme des facteurs de virulence. Ces gènes ne sont pas responsables à eux seuls de la

résistance à la méthicilline mais peuvent augmenter le niveau de résistance des souches de SARM. Leur rôle précis reste encore à déterminer [20, 48].

Un nouveau facteur de virulence, l'élément mobile codant pour le gène de catabolisme de l'arginine (ACME), a été récemment identifié [49]. Cet élément semble avoir son origine dans l'espèce *S. epidermidis* et pourrait également contribuer à la virulence de SARM [21]. Puisque l'ACME est adjacent au SCCmec sur l'*orfX*, il y a possibilité de co-sélection pour ce facteur de virulence et pour la résistance aux antibiotiques. De plus, le transfert d'ACME et de SCCmec doit être modulé par la même recombinase *ccr*. Une étude a démontré que la délétion du SCCmec n'a aucun effet sur la virulence de la bactérie chez le lapin et donc que la résistance à la méthicilline n'a aucun rôle direct dans la virulence de *S. aureus*. Cependant, l'élimination de l'ACME a significativement réduit la virulence de la bactérie chez les lapins [49].

2.1.3 Le SARM d'origine porcine

2.1.3.1 Les SARM chez les porcs et chez les travailleurs en contact avec ces porcs

Les SARM d'origine porcine et ceux retrouvés chez les travailleurs en contact étroit avec les porcs ont été identifiés aux Pays-Bas, au Danemark, en France, au Canada, aux États-Unis et au Singapour [12, 27, 50-59]. L'équipe de Voss (2005) de la Hollande a, pour la première fois, fait une association entre les fermes porcines et un taux plus élevé de porteurs de SARM non-typable par analyse sur gel d'électrophorèse en champs pulsé (PFGE) chez l'humain. Leur étude démontre également la transmission de ce type de SARM des animaux aux humains ainsi qu'entre les humains eux-mêmes [50]. Ils ont débuté leur recherche après qu'une petite fille de 6 mois ait été testée positive par un SARM non-typable par PFGE, avant une opération thoracique dans un hôpital. L'étude a révélé que sa

famille habitait sur une ferme et travaillait avec des porcs et que ceux-ci étaient porteurs de SARM non-typable. De plus, d'autres prélèvements provenant de plusieurs fermes ont révélé que les fermiers, un vétérinaire et son fils ainsi que l'infirmière du fils étaient positifs à ce type de SARM. Bien que tous ces isolats de SARM ne soient pas reliés entre eux, ils ont tout de même plusieurs traits de similarités. En effet, dans tous ces cas, les SARM sont non-typable par PFGE avec l'enzyme *SmaI*. De plus, d'autres membres de la famille se sont révélés positifs à ce type de SARM et les essais de décolonisation ont tous été infructueux [50].

En France, l'équipe d'Armand-Lefèvre (2005) a observé 19 types différents de SARM par MLST chez les souches d'origine humaine et seulement trois de ceux-ci (ST433, ST9 et ST398) étaient communs entre les porcs et les fermiers et n'étaient pas retrouvés chez les personnes ne travaillant pas avec les porcs [51]. En Allemagne, l'équipe de Witte (2007) a isolé des SARM ST398 de chiens, de porcs, de chevaux et d'hommes travaillant en contact avec ceux-ci [52]. Toujours en Allemagne, Meemken et coll. (2007) ont réalisé une imposante étude de prévalence de SARM en prélevant 678 porcs dans 347 fermes et 86 personnes en contact avec les porcs. Leur recherche révèle une prévalence de SARM de 13% chez les porcs et de 23 % chez le personnel [53]. Au Pays-Bas, selon l'étude de Wulf et coll. (2008), il y aurait plus de 20% des fermiers s'occupant de porcs et 39% des porcs d'abattoirs qui seraient positifs au SARM ST398 [54]. De plus, certains isolats humains de SARM ST398 sont maintenant porteurs du gène codant pour la PVL (leucocidine de Pantón-Valentine) augmentant ainsi leur pouvoir de virulence [54, 60, 61]. De plus, une autre étude faite au Pays-Bas a montré une prévalence de 38% de SARM chez les fermiers et une prévalence de 16 % dans leur famille. Ils ont aussi montré que la prévalence de SARM était directement reliée au temps de contact des humains avec les

animaux et que la prévalence était réduite d'environ 58% lors d'absence de contact avec les animaux [62].

La première étude faite en Ontario, au Canada, en 2008 pour évaluer la présence de SARM chez les porcs et les fermiers a révélé la présence de SARM dans 45% des fermes, sur 24,9% des porcs et 20% des fermiers. Les SARM isolés étaient majoritairement des SARM ST398, spa-type t034. Il y avait aussi présence d'un SARM commun humain, le CMRSA-2 [55]. Köck (2009) a révélé la présence de SARM dans 70% des fermes en Allemagne. Les SARM étaient tous des ST398 SCC*mec* V sauf un qui était SCC*mec* IV. Les spa-types retrouvés étaient, 75% de t011; 5,3% de t034; 0,6% de t108; 3,6% de t1451 et 15,4% de t2510. Aucune des souches n'avait le gène codant pour la PVL (*lukS*-PV, *lukF*-PV), ni les gènes codant pour les entérotoxines (*sea*, *seb*, *sec*₁₋₃, *sed*, *seg*, *seh*, *sei*, *sej*, *sem*, *sen* et *seo*), ni pour la toxine du syndrome du choc toxique (*tst*), ni pour les inhibiteurs de différenciation des cellules épidermiques (*edinA*, *edinB* et *edinC*). Toutes les souches étaient résistantes à la tétracycline, 52% à l'érythromycine et à la clindamycine, 26% à la gentamicine et 8% au triméthoprime-sulfométhoxazole. De plus, 249 des patients d'un hôpital étaient positifs au SARM. Ces SARM avaient les mêmes spa-types que ceux retrouvés chez les porcs, dont 56% était le t011 [12]. Jusqu'à présent, le SARM ST398 provenant des porcs n'est pas reconnu pour avoir plusieurs gènes de virulence, comme les entérotoxines contrairement au SARM d'origine humaine [63, 64].

Récemment, en Allemagne en 2011, une équipe a démontré que 52 % (152/290) des fermes d'engraissement de porcs était positives aux SARM dans ce pays. Les souches étaient toutes résistantes à la tétracycline, 40% au triméthoprime-sulfométhoxazole et 32% à la quinupsitine/dalfopristine. De plus, tous les 'spa-type' retrouvés étaient associés au ST398. Cette étude a aussi permis de mettre en évidence par des analyses statistiques que la

taille de la ferme ainsi que les activités de production sont des facteurs de risque importants dans la prévalence de colonisation par SARM [65]. De plus, une autre étude au Pays-Bas en 2011, a démontré que la taille du troupeau était un facteur de risque important. Ils ont rapporté que 40% des petits troupeaux étaient positifs aux SARM tandis que ce chiffre montait à plus de 80% dans les gros troupeaux [66].

En Belgique, l'équipe de Denis (2009) a trouvé que 37,8% des employés d'une ferme porcine étaient colonisés par SARM ST398 et que 0,8% avait une infection de la peau. Cette étude a démontré que la colonisation par SARM chez les humains était hautement reliée à la colonisation par SARM chez les porcs. De plus, deux génotypes de SARM étaient prédominants. Pour 70% des fermes avec plusieurs porteurs de SARM, toutes les souches provenaient du même génotype. Cela suggère une transmission dans la ferme [56]. Une étude de van de Giesse [57] a déterminé la présence de SARM chez les rats vivant dans les fermes dans le sud des Pays-Bas et dans le nord de la Belgique. Cinq SARM ont été trouvés sur des rats noirs et non pas sur des rats bruns. Soixante-six pourcent des rats positifs aux SARM ont été retrouvés dans des fermes ayant des porcs. Tous les rats provenant des poulaillers et des fermes de chèvres étaient négatifs au SARM. Quatre des cinq SARM retrouvés étaient des SARM ST398 spa-type t011 et l'autre était un SARM ST97 et spa-type t1236. Il est probable que les rats positifs au SARM ont été en contact avec des porcs porteurs de SARM, soit par contact direct avec des fèces contaminées ou de la poussière ou par inhalation d'air contaminée. De plus, les rats se déplacent très facilement et peuvent couvrir de grande distance. Ils peuvent ainsi transmettre le SARM d'une ferme porcine à une autre [57].

L'équipe de Smith aux États-Unis en 2009 a observé la présence de SARM chez 49% des porcs et chez 45% des travailleurs de la ferme. Les SARM retrouvés étaient tous

non-typables par PFGE avec l'enzyme *SmaI*. Cependant, la digestion par l'enzyme *EagI* a révélé que les isolats étaient clonaux et n'étaient pas reliés aux SARM humains communs en Iowa (USA 100, USA300 et USA400). Les souches étaient toutes des SARM ST398. Cette étude était la première à documenter la présence de SARM dans les porcheries Américaines [58]. Selon l'étude de van Rijen, en 2008 dans les hôpitaux aux Pays-Bas, les patients exposés préalablement aux porcs ont plus de chance d'être porteurs de SARM. À l'hôpital d'Amphia, 32% des patients de ce groupe à risque étaient porteurs de SARM. Ce résultat démontre une augmentation de trois fois de l'incidence de SARM annuelle de ce pays [59]. Pour l'étude de Van Duijkeren et coll. (2007), des prélèvements ont été faits sur les porcs, les fermiers et le personnel de deux fermes en Hollande. Il y a eu plusieurs cas de colonisation par SARM découverts dans les deux fermes. La vente d'animaux entre les fermes en Hollande favoriserait la dispersion de SARM [27].

2.1.3.2 Les SARM dans les abattoirs

La présence de SARM a aussi été observée par plusieurs études dans les abattoirs. Plusieurs de ces études ont été effectuées en Hollande. De ce fait, une étude de Van Duijkeren et coll. (2007), montre que 39% des porcs dans les abattoirs hollandais sont positifs à SARM et qu'aucune précaution n'est prise par les abattoirs avec ces porcs positifs. Ces SARM sont des ST 398 et sont tous résistants à la tétracycline [27]. L'équipe de Neeling (2007) a observé une forte présence de SARM dans les abattoirs hollandais. Ils ont fait des prélèvements sur 540 porcs de 9 abattoirs où 63% des porcs d'Hollande avait été abattu en 2005. Ils ont trouvé que 39% des porcs avaient du SARM nasal. Tous les SARM étaient des ST398, spa-type t011, t08 et t1254 et de SCC*mec* III, IV et V [67]. L'équipe de van Belkum a collecté des souches de SARM ST398 de différents endroits en Hollande; de porcs de différents abattoirs, de fermiers s'étant rendus à l'hôpital et d'un

centre médical vétérinaire. Toutes les souches étaient ST398, de SCC*mec* III, IVa et V. Les spa-types étaient à plus de 75% les types t011 et t108. Cette étude a permis de constater que SARM ST398 était capable de causer de sérieuses infections chez les humains même si l'hôte principal est le porc [68].

En Allemagne, l'équipe de Tenhagen (2009) a fait deux études sur la présence de SARM chez les porcs d'abattoirs. Dans la première étude, 70.8% des porcs étaient positifs tandis que dans la deuxième étude, seulement 49% des porcs étaient positifs. Tous les SARM étaient des ST398 et tous étaient résistants à la tétracycline [69]. Une étude espagnole récente montrait que 21% des porcs à l'engraissement destinés à l'abattoir et 49% des porcelets en maternité étaient positifs aux SARM [70]. De plus, 91% de ces souches retrouvées étaient des SARM ST398 alors que les autres étaient des ST97. Le SARM ST97 n'avait jamais encore été retrouvé dans les souches provenant de porcs en Espagne. Cette souche se serait possiblement propagée chez les porcs suite à une transmission par les humains ou par les bovins. Par contre, aucun contact entre les porcs et les bovins à aucun moment de la chaîne de production n'a été répertorié. De plus, toutes les souches de SARM étaient résistantes à la tétracycline, mais seulement 50% des SARM provenant de porcs à l'engraissement avaient le gène *tetL* tandis qu'aucune souche des porcelets en maternité n'avait ce gène. Ce qui laisse supposer un autre gène expliquant cette résistance. Finalement, la plupart des souches avaient plusieurs résistances aux antibiotiques, mais avec des profils très différents. Les résistances aux macrolides-lincosamides-streptogramines, gentamicine, kanamycine-tobramycine et streptomycine ont été retrouvées chez ces souches [70]. Contrairement à toutes ces études, celle de Horgan et coll. (2011) en Irlande a démontré que la colonisation par SARM dans les abattoirs

irlandais était très peu répandue et que les quelques souches retrouvées étaient toutes de types ST22 et ST1307 et aucune de type ST398 [71].

2.1.3.3 Les SARM dans les centres de recherche

La présence de SARM chez les animaux dans les centres de recherches a été rapportée [72]. L'équipe de Sergio (2007) a isolé un SARM d'un porc servant à la recherche sur le diabète dans un centre hospitalier de Singapour. Le porc avait un abcès de la peau suite à une chirurgie et prenait de l'enrofloxacin (une fluoroquinolone) contre l'infection. Le traitement n'a pas fonctionné et le porc a développé subséquemment une septicémie. Il a perdu 20% de son poids et a dû être euthanasié. Il a été démontré que trois autres porcs ainsi qu'un scientifique étaient porteurs de SARM. Les souches de SARM retrouvées étaient de type ST398 pour deux porcs et de type ST22 pour un porc et le scientifique. Ainsi, le SARM d'origine porcine a été qualifié comme problème potentiel dans le domaine de la recherche médicale [72].

2.1.3.4 Les infections humaines dues à des SARM d'origine porcine (SARM ST398)

De plus en plus de cas d'infection chez les humains par le SARM de type ST398 sont rapportés Ruhlmann et coll. (2008) ont présenté les deux premiers cas d'infection humaine au SARM ST398 en Hollande. Ces infections semblaient être associées à des contacts avec les porcs. Le premier cas était une infection sévère d'une blessure chirurgicale du genou. L'autre cas était une infection superficielle de l'oreille. Dans les deux cas, les SARM étaient de type ST398, multi-résistants et de spa-type t034 [73]. L'équipe de Declercq (2008) a présenté un cas d'infection sévère des tissus mous attribuable à un SARM chez un homme de 53 ans s'étant fait mordre deux fois à l'avant-bras par un porc en Belgique. Les SARM étaient non-typable par PFGE avec l'enzyme

SmaI et étaient de spa-type t011 et t108, ce dernier étant le spa-type le plus souvent rencontré chez les porcs aux Pays-Bas [74]. Au Canada, l'équipe de Golding (2010) a isolé cinq souches de SARM ST398 provenant d'infection de la peau et des tissus mous chez des humains de la communauté de la province de la Saskatchewan. Il n'y a aucune mention de contact avec des porcs dans leur étude. Ces SARM étaient de type SCC*mec* V et ne possédaient pas le gène codant pour la PVL. Ces souches étaient très semblables lors d'une analyse par PFGE avec l'enzyme de restriction Cfr91. L'analyse de la séquence complète d'ADN des régions SCC*mec* a démontré dans 4 des 5 souches un nouveau sous-type de SCC*mec* V contenant des répétitions groupées de courts palindromes (ou CRISPR pour 'clustered regularly interspaced short palindromic repeats') espacés de façon régulière et des gènes associés [13]. L'équipe d'Aspiroz (2010) d'Espagne rapporte le cas d'une lésion cutanée chez une fillette de 12 ans habitant à proximité d'une ferme porcine où ses parents travaillaient [16]. Deux types de SARM ont été cultivés de cette lésion. Un des SARM était un ST398 spa-type t011 et l'autre, un ST1 spa-type 127. Les deux souches étaient résistantes à la tétracycline, à l'érythromycine, à la clindamycine et à la télithromycine. La souche ST1 possédait en plus les résistances envers la gentamicine, la tobramycine, la kanamycine, le ciprofloxacine, le lévofloxacine et le triméthoprime-sulfaméthoxazole. Des prélèvements nasaux des autres membres de la famille ont mis en évidence que la mère, le père et le frère de la jeune fille étaient tous porteurs des mêmes souches. La possibilité de contact avec des porcs suivi de contact entre humains serait un facteur de risque pour la colonisation par ST398 chez les humains [16]. Toujours en Espagne, l'équipe de Lozano [75] a rapporté le cas d'un fermier d'une porcherie ayant de graves lésions cutanées causées par le SARM ST398 de type SCC*mec* V, type agr I et résistant à la tétracycline, la

clindamycine et à l'érythromycine. Des prélèvements nasaux sur le frère du fermier et sur les porcs ont mis en évidence du SARM ST398 identique à celui des lésions cutanées.

2.1.3.5 Les infections porcines dues à des SARM ST398

Des cas cliniques porcins d'infections à SARM ST398 sont de plus en plus recensés dans la littérature. Van Duijkeren et coll. (2007) ont été les premiers à rapporter un cas de SARM provenant d'un porcelet malade de trois semaines d'âge ayant une épidermatite exudative. Habituellement, cette maladie est causée par *Staphylococcus hyicus*. Puisque le porcelet était très jeune, les auteurs supposent que ce soit la mère qui lui aurait transmis la bactérie [27]. L'équipe de Kadlec a travaillé en 2009 avec des souches de SARM ST398 provenant de porcs malades en Allemagne [15]. Ces souches provenaient d'infections des voies respiratoires, urinaires, génitales, de la peau, de septicémie, de polysérose, et d'entérite nécrotique. Toutes les souches étaient non-typables par PFGE avec l'enzyme SmaI. Au total, huit spa-types ont été trouvés (011, 1034, 1451, 2510, 571, 1197, 1250, 1456). Cinquante-trois des isolats étaient de type SCCmec V. L'analyse des souches a démontré 22 patrons différents de résistance aux antibiotiques. Cette étude a démontré par biopuce, la variabilité génétique des SARM ST398 chez les porcs ainsi que leur capacité d'acquérir de nouveaux gènes tels les gènes de résistance aux antibiotiques *erm(A)*, *erm(B)*, *erm(C)*, *tet(L)*, *tet(K)*, *tet(M)*, *dfrK*, *dfrG*, *aacA/aphD*, *aadD* et *fexA*.

2.1.3.6 La transmission des SARM

Plusieurs études visent la compréhension de la transmission de SARM d'animaux à animaux, d'animaux à humain et d'humain à humain. Broens et coll. (2011) ont fait deux expériences pour étudier la colonisation entre des porcs sains et des porcs positifs au SARM. Dans la première, des porcelets naïfs étaient mis en contact avec des porcs inoculés

oralement et les porcelets naïfs devenaient positifs à SARM en 15 jours. Dans la deuxième expérience, ces derniers porcelets étaient mis en présence d'autres porcelets naïfs qui devenaient à leur tour positifs à SARM en seulement 15 jours [76]. Une étude effectuée dans plusieurs fermes du Danemark, a démontré que les SARM ST398 retrouvés dans ces fermes étaient identiques lors d'analyse par PFGE avec l'enzyme Cfr9I. La dissémination des SARM ST398 dans les fermes danoises de cette étude serait due à une dissémination clonale d'une lignée de ST398 spécifique à une ferme [77]. Hartmeyer et coll. (2010) [78] au Danemark, ont présenté quand à eux un cas de transmission de SARM ST398 de porcs à une famille. Le premier SARM a été isolé d'une blessure superficielle d'un fermier de 40 ans s'occupant de porcs. Trois semaines après que le premier patient ait été testé positif à SARM, son fils d'un mois était hospitalisé. Son fils avait des problèmes cardiaques, des anomalies chromosomiques, de la fièvre, de la léthargie, une perte d'appétit et des frissons. Les SARM isolés chez le père et le fils étaient similaires étant de type ST398, de spa-type t034, et négatif pour le gène codant pour la PVL. Des prélèvements ont été faits sur les autres membres de la famille, mais seulement la mère s'est révélée positive à SARM. Dans la ferme, six porcs et trois échantillons de poussières étaient également positifs. Ces SARM étaient identiques à ceux retrouvés chez le père, la mère et le fils. Cette étude démontre que le SARM ST398 se transmet facilement d'animaux à humains et d'humains à humains. De plus, il peut être la cause de graves infections [78]. Au Pays-Bas, l'équipe de van Cleef en 2010 a fait une étude pour déterminer la prévalence de SARM chez des personnes n'étant pas en contact avec des porcs mais vivant dans une région à haute densité de porcherie. Des prélèvements nasaux chez 583 personnes de trois municipalités différentes des Pays-Bas ont été effectués. Une personne était colonisée par SARM sur les 542 répondants n'étant pas en contact avec des porcs et 13 personnes

porteuses de SARM sur les 49 répondants en contact avec des porcs. Tous les SARM retrouvés étaient de type ST398. L'étude a démontré que les personnes en contact direct avec les porcs étaient plus souvent porteuses, mais que la transmission ne s'était pas encore étendue à la communauté [79]. L'équipe de van Cleef a réalisé une autre étude pour évaluer la présence de SARM chez les travailleurs des abattoirs en contact avec des porcs vivants. Ils ont ainsi découvert que 5,6% des employés de trois abattoirs aux Pays-Bas étaient porteurs de SARM. Le fait de travailler avec des porcs vivants a été identifié comme un facteur de risque important dans la colonisation par SARM [26].

2.1.4 Transmission et diagnostic

Une étude a démontré que SARM était présent chez un porc sur dix dans les fermes qui n'administraient pas quotidiennement des antibiotiques et chez six porcs sur dix dans les fermes le faisant [18]. De plus, d'après plusieurs études, l'utilisation d'antibiotiques est hautement associée à la colonisation par SARM chez les animaux et chez les humains [80-82]. Il a été suggéré que l'utilisation de la tétracycline était une des causes de l'émergence des SARM ST398. Cette hypothèse vient du fait que la très grande majorité des SARM ST398 sont résistants à la tétracycline [67, 80, 83, 84].

Le SARM peut se transmettre par contact direct entre individus ou par contact indirect via des surfaces contaminées. Il peut se transmettre par l'air, l'eau, la nourriture ou par des vecteurs animaux. Il peut aussi se transmettre d'humain à humain, de surfaces contaminées à l'humain, d'animal à l'humain et vice-versa [17]. Il y a de plus en plus de cas d'infections à SARM chez les travailleurs des porcheries ou des abattoirs [31]. Une étude en 2009 a démontré que la transmission entre les porcs et les humains était responsable de 23 à 45% de la colonisation par le SARM chez les fermiers et 4,6% chez les vétérinaires [12]. De plus, en 2011, une étude a montré que les vétérinaires travaillant avec

les petits animaux n'avaient pas un risque plus élevé de colonisation par SARM tandis qu'il y avait une forte corrélation entre l'acquisition de LA-SARM et l'exposition des vétérinaires travaillant avec des porcs vivants [85]. D'autres études ont suggéré qu'il y avait un plus grand risque que les fermiers, les vétérinaires et les autres personnes qui sont exposées aux porcs soient colonisés par SARM ST398 [22, 51, 56, 86, 87]. En Allemagne, SARM ST398 est un colonisateur nasal de la majorité des porcs et représentait 0,22% de tous les SARM retrouvés dans les infections humaines en 2006/2007. Le ST398 a aussi été détecté chez des patients ayant des pneumonies en Europe central et est maintenant présent dans la chaîne alimentaire [88]. Ainsi, le transfert entre les différentes espèces animales, et entre les animaux et les humains semble relié à une faible spécificité d'hôte par le SARM ST398 qui n'est pas encore comprise [4, 89]. De plus, le SARM ST398 est maintenant retrouvé en production alimentaire animale et a été retrouvé dans 11,9% des découpes de viandes de plusieurs pays [90]. Une schématisation de la transmission générale de bactéries résistantes comme les SARM se retrouvent en figure 2.

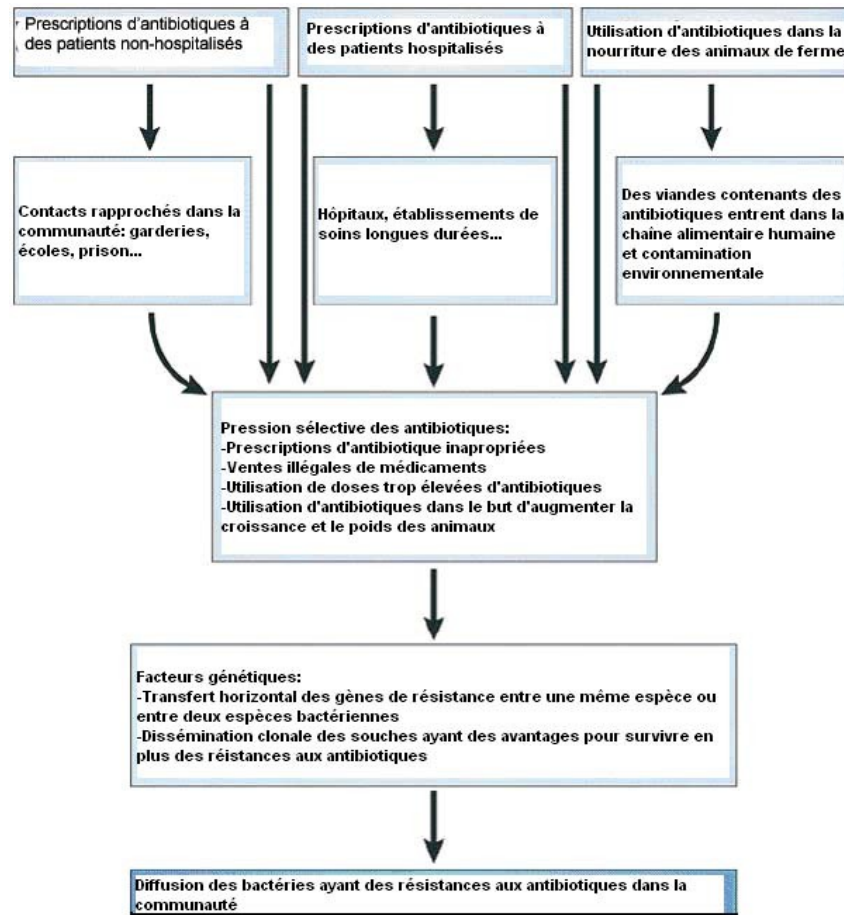


Figure 2. Schématisation de la transmission adaptée de Nature, 2006 [91].

Une fois l'identification biochimique de *S. aureus* obtenue, la méthode la plus utilisée pour diagnostiquer une souche de SARM est la diffusion sur gélose Mueller-Hinton (MH) avec un disque d'oxacilline (une pénicilline semi-synthétique) à 5 µg suivi d'une incubation à 30°C pendant 48 heures. Les géloses sont préalablementensemencées avec un inoculum 0,5 McFarland dilué 1/10. Il y a résistance à la méthicilline si les diamètres d'inhibition sont inférieurs à 20 mm pour l'oxacilline [92]. Il est important de suivre certains paramètres physico-chimiques lors de la détection phénotypique de la résistance à la méthicilline avec le disque d'oxacilline. Si les paramètres ne sont pas bien respectés, il

peut y avoir augmentation de la proportion de colonies filles qui expriment la résistance à un très haut niveau. Si le milieu est trop concentré en sel par exemple, cela peut favoriser la production de pénicillinase staphylococcique et ainsi faire apparaître des souches sensibles à l'oxacilline faussement résistantes [20, 92, 93].

Si l'échantillon à tester contient une seule souche et n'est pas un écouvillon nasal ou de peau, la méthode de détection du gène *mecA* par PCR est adéquate. Cependant, si c'est un écouvillon, il peut y avoir d'autres microorganismes de la flore bactérienne normale, comme *S. epidermidis* ou d'autres *Staphylococcus* qui contiennent une séquence d'ADN *mecA* très homologue à celle de SARM. Puisque les éléments *SCCmec* s'intègrent toujours dans le gène *orfX* qui est un gène hautement spécifique à *S. aureus*, la détection de SARM par la jonction *orfX-SCCmec* par PCR est une bonne méthode d'identification (Figure 1) [21]. De plus, d'autres gènes spécifiques à SARM peuvent être détectés par PCR comme les gènes, *femA* et *femB* (facteurs essentiels à la résistance à la méthicilline) [48].

2.1.5 Typage

2.1.5.1 Multilocus sequence typing (MLST)

Le typage par la méthode du Multilocus sequence typing (MLST) est une excellente méthode pour étudier l'évolution moléculaire de *S. aureus* [19]. Cette méthode est basée sur l'analyse de fragments de sept gènes de ménage (*arcC*, *aroE*, *glpF*, *gmk*, *pta*, *tpi* et *yqiL*) qui ont une taille d'environ 500 bp. Chaque gène de ménage est associé à un allèle spécifique. Les allèles des sept gènes de ménage définissent la lignée de *S. aureus* en établissant un profil allélique se nommant « sequence type » (ST). Un SARM est désigné selon son ST et son type d'élément *SCCmec* [19]. À cause des sept différents PCR et des 14 réactions de séquençage d'ADN, la méthode MLST est coûteuse et laborieuse [21]. Les

nouveaux clones de LA-SARM chez le porc sont le plus souvent des ST398 [9, 29, 69]. Les autres ST retrouvés chez les porcs sont jusqu'à présent ST5, ST9, ST621, ST752, ST753, ST804 et ST1067 [5, 28, 88].

2.1.5.2 Pulsed Field Gel Electrophoresis (Électrophorèse en champs pulsé ou PFGE)

Le PFGE est considéré comme une des plus discriminantes méthodes de typage de SARM [19]. L'ADN chromosomal de SARM est digéré avec l'enzyme de restriction *SmaI* et les fragments d'ADN résultants sont séparés par migration sur un gel d'agarose avec différents voltages. Ensuite, les profils sont analysés par comparaison en utilisant des applications informatiques variées comme celles fournis par la plateforme de BioNumerics [19]. Malheureusement, les nouveaux clones de SARM ST398 découverts chez les porcs sont non-typables par PFGE avec l'enzyme *SmaI* à cause de la présence d'un nouvel enzyme de méthylation de l'ADN dans ces souches [18, 54, 55, 79]. Plus récemment, une nouvelle enzyme a été trouvée pour digérer l'ADN du SARM ST398, le *Cfr9I*, un néoschizomer de *SmaI*. La combinaison du PFGE avec l'enzyme *Cfr9I* publié en 2010, du typage du gène *spa* et du gène *SCCmec* démontre une bonne reproductibilité et discrimination des résultats pour le SARM ST398 [94].

2.1.5.3 Le typage du gène *spa*

Le typage du gène *spa* est une méthode de typage par simple locus. La méthode détermine la variation des régions polymorphiques X du locus de la protéine A de *S. aureus* [19]. La diversité du gène *spa* tient aux nombres de répétitions d'une séquence de 24 bp. La méthode de typage du gène *spa* est moins coûteuse, moins laborieuse et plus rapide que la méthode MLST [19, 21]. En effet, il suffit d'une réaction PCR, d'un séquençage, puis le *spa*-type peut être assigné en utilisant un programme nommé le *ridom* StaphType [95]. Les

nouveaux clones ST398 ont des types de gènes *spa* très variés [29]. Les types *spa* les plus souvent retrouvés chez le porc sont t011, t034, t108 et t1451 [9, 10, 12, 96].

2.1.5.4 Le typage du gène SCC*mec*

Le terme SCC*mec* désigne la famille d'éléments chromosomiques qui se situent dans un intervalle de 25 à 65 kb [21]. La méthode de typage du gène SCC*mec* est basée sur des PCR multiplexes dans lesquels le gène *mecA* et différents locus de SCC*mec* de type I à XI sont détectés. Par cette méthode, la structure du complexe *mec* et la présence de différents gènes *ccr* sont identifiés [19]. Des études récentes ont démontré que cette méthode ne pouvait pas identifier certains éléments SCC*mec* trouvés dans les nouveaux types de ST398. De nouveaux SCC*mec* sont assez couramment identifiés, ce qui implique que la méthode de typage du gène SCC*mec* devra régulièrement être adaptée [19]. Les nouveaux clones de ST398 sont habituellement de type SCC*mec* III, IV, IVa ou V [28, 29, 94].

2.1.5.5 Multiple locus variable number of tandem repeats (VNTR) analysis (MLVA)

Le MLVA est une technique qui a été développée plus récemment. Cette technique consiste en l'amplification simultanée de différents gènes ayant des nombres variables de courtes répétitions en tandem [97]. En effet, les VNTRs sont hautement polymorphiques et varient dans le nombre d'unités répétées. Pour le typage par MLVA, les variations dans plusieurs gènes peuvent être observées tel que, le gène *sspA* (sérine protéase), le gène *spa* (protéine A), les gènes *sdr C, D* et *E* (protéine Sdr), le gène *clfA* (facteur d'agglutination A), le gène *clfB* (facteur d'agglutination B) et le gène *coa* (protéine liant le collagène) [98]. Cette méthode est maintenant très utilisée et est basée sur la longueur des fragments d'ADN obtenue par pcr [99]. Un essai ne comprenant que huit loci VNTR (appelé MLVA-

8) a donné des résultats très comparables avec la technique du MLST pour des souches de *S. aureus* [100].

2.1.6 Contrôle de l'infection à SARM

Les procédures pour prévenir ou réduire la présence de SARM ST398 chez les travailleurs en contact avec les animaux sont d'avoir une bonne hygiène des mains, d'utiliser des désinfectants à base d'alcool et de mettre des gants et des masques. Si ces travailleurs sont admis à l'hôpital, certains auteurs recommandent qu'ils mentionnent qu'ils sont en contact avec des animaux de ferme et qu'ils soient ainsi mis en quarantaine pour éviter la propagation du germe [12, 35, 101]. Les options à envisager pour contrôler l'apparition de SARM ST398 dans les fermes sont premièrement, de réduire la pression sélective des antibiotiques dans les porcheries et les poulaillers en diminuant l'utilisation d'antibiotiques. Deuxièmement, appliquer les bonnes pratiques sanitaires pour ainsi ne pas disséminer le SARM de fermes en fermes. De plus, il faut identifier les animaux porteurs et les isoler en les mettant en quarantaine pour éviter la transmission aux animaux sains, même s'il s'avère plutôt difficile de mettre en place de telles mesures [22, 102].

2.2 Résistance aux antibiotiques

2.2.1 Méthodes de détection phénotypiques

2.2.1.1 Concentration minimale inhibitrice (CMI)

La CMI est la plus faible concentration d'antibiotique pouvant inhiber complètement la croissance d'une bactérie dans un milieu donné. La méthode de diffusion en gélose qui permet de déterminer la CMI se nomme le 'E-test'. Ce test permet de déterminer la CMI grâce à l'utilisation de bandelettes imprégnées d'un gradient exponentiel continu de

l'antibiotique à tester. La CMI est calculée en mesurant l'intersection des deux ellipses où l'inhibition de la croissance est complète (Figure 3). Pour le SARM, une souche est dite résistante à la méthicilline si la CMI est strictement supérieure à 2 mg/ml et sensible si la CMI est inférieure ou égale à 2 mg/ml [92]. S'il y a présence de microcolonies dans l'ellipse cela est dû à une résistance hétérogène à la méthicilline [92]. Une résistance hétérogène indique que seule une proportion donnée et constante de colonies filles expriment la résistance [20].

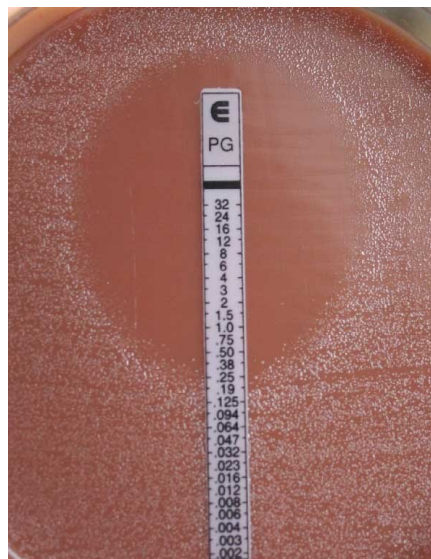


Figure 3. Résultat d'une CMI effectuée par E-test.

Les méthodes de CMI peuvent être effectuées en milieu liquide ou en milieu solide. Elles consistent à mettre un inoculum bactérien standardisé au contact de concentrations décroissantes d'antibiotiques. Pour ce qui est de la méthode de dilution en milieu solide, l'antibiotique est directement incorporé dans le milieu Müller-Hinton agar. Ensuite, les géloses sontensemencées avec un inoculum de la souche de SARM. Après incubation, la CMI est déterminée par la plus faible concentration d'antibiotique inhibant la croissance de

la souche [103]. Pour la méthode de dilution en milieu liquide, un inoculum de la souche de SARM est distribué dans une série de tubes (macro-dilution) ou de cupules (micro-dilution) contenant l'antibiotique aux concentrations à tester. Après incubation, la CMI correspond à la plus faible concentration d'antibiotique indiquée par le tube ou la cupule où aucune croissance n'est visible [103]. Pour toutes ces méthodes et les antibiotiques utilisés, la classification de type sensible, intermédiaire (limite) ou résistant correspondante à la CMI sera obtenue après comparaison de la dite CMI à l'aide de chartes officielles de CMI publiées par le 'Clinical Laboratory Standard Institute' (CLSI). La CMI permet donc d'évaluer le degré de sensibilité ou de résistance d'une souche donnée.

2.2.1.2 La méthode Kirby-Bauer

La méthode de Kirby-Bauer permet d'obtenir des résultats qualitatifs de type sensible, intermédiaire (limite) ou résistant. Brièvement, des disques d'antibiotiques sont déposés sur la surface d'un milieu Müller-Hinton, préalablement ensemencé avec une concentration précise (MacFarland 0.5) d'une culture pure de la souche de SARM. Les antibiotiques diffusent ensuite uniformément sur la gélose. Leur concentration est donc inversement proportionnelle à la distance du disque. Après 24 heures d'incubation, les disques ont des zones d'inhibition circulaires où il y a absence de culture [103]. Les résultats qualitatifs sont obtenus après la lecture de la zone d'inhibition en millimètre suivi d'une comparaison à l'aide de chartes officielles publiées par le CLSI. La règle générale étant que plus la bactérie est sensible plus la zone d'inhibition sera grande. Par contre, le degré de sensibilité ou de résistance d'une souche donnée ne peut pas être vraiment évalué avec précision à l'aide de cette méthode car la CMI n'est pas obtenue.

2.2.2 Méthodes de détection génotypiques

Pour s'assurer qu'une souche a un gène de résistance spécifique, des techniques de détections génotypiques telles que le PCR ou la biopuce peuvent être utilisées. Le désavantages du PCR, c'est qu'on ne peut vérifier qu'un gène ou quelques gènes à la fois soit par PCR simple ou multiplexe alors que la méthode de biopuce permet la détection de plusieurs gènes de résistance à la fois [104]. Le principe de la biopuce est d'extraire l'ADN des différentes souches de SARM et de comparer leurs gènes avec un *S. aureus* étalon. L'ADN subit une amplification afin d'obtenir suffisamment de matériel génétique. Ensuite, l'ADN est marqué par des colorants, soit la cyanine 3 (fluorochrome vert) ou la cyanine 5 (fluorochrome rouge). Une fois marqué l'ADN est déposé sur une lame de verre qui possède fixée à sa surface, des fragments de gènes de résistance et de virulence de *S. aureus* [105]. Chaque point de fluorescence émise de la puce est analysé individuellement par un scanner à très haute résolution à la longueur d'onde d'excitation de la cyanine 3 puis de la cyanine 5. L'image scannée est ensuite traduite en niveaux de gris qui représente l'intensité de fluorescence. Puis, l'intensité du signal entre le vert et le rouge est comparée et analysée par bio-informatique, ce qui permet de s'assurer de la présence d'un gène sous différentes conditions (Figure 4).

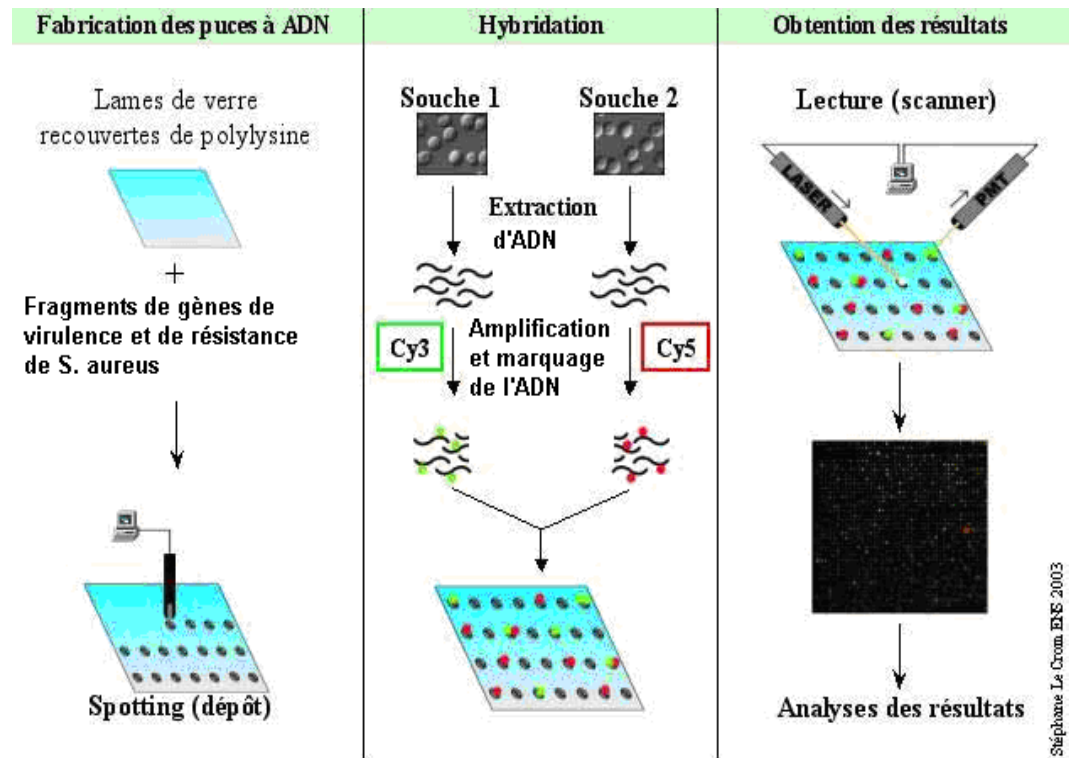


Figure 4. Schématisation du principe de la puce à ADN (adapté du Service de génomique du département de biologie de l'École Normale Supérieure de Paris).

Plusieurs biopuces de *S. aureus* ont été mises sur le marché dont la StaphyType de CLONDIAG en Allemagne qui reconnaît 330 séquences spécifiques. Elle détecte une grande variété de résistances aux antibiotiques (acide fusidique, aminoglycosides, bléomycine, chloramphénicol/florfénicol, lincosamides, macrolides, mupirocine, streptogramines, streptothricine, tétracycline, triméthoprime et vancomycine), de marqueurs d'espèces, de méthode de typage (*SCCmec*, *spa*) et de marqueurs de virulence. Sa grande représentativité explique pourquoi elle est utilisée dans plusieurs études [89, 106, 107]. La biopuce StaphyType de CLONDIAG, utilise une nouvelle technologie. En effet, la biopuce est localisée au fond de puits. L'ADN de *S. aureus* à tester est marqué à la biotine puis l'hybridation avec la biopuce donne un profil d'hybridation spécifique à la souche. La détection des profils se fait par méthode de coloration par précipitation (HRP (Peroxydase

de Raifort)) à l'aide du conjugué à la streptavidine et du substrat colorimétrique nommé 'Seramun Green' [107]. Ceci permet d'obtenir des profils d'hybridation pour les différents gènes de résistance aux antibiotiques, de virulence et de marqueurs d'espèces composants les souches à tester.

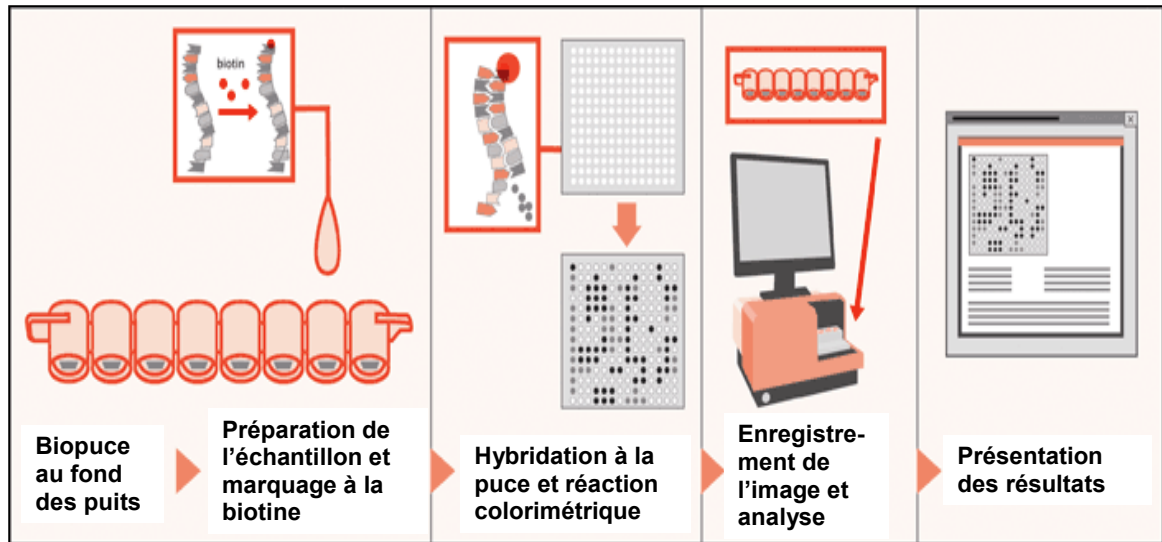


Figure 5. Schématisation du principe de la puce à ADN StaphyType de Clondiag (Adapté du site de la compagnie Alere).

L'équipe de Zhu (2007) quand à elle, a mis sur pied une biopuce qui reconnaît six gènes de résistances aux antibiotiques (*mecA*, *blaZ*, *aac(6')-Ie-aph(2'')*, *ermA*, *ermC* et *msrA*) ainsi que la région variable 16S de l'ARNr pour différencier les différents espèces de staphylocoques [108]. L'équipe de Monecke, en 2005, a développé une biopuce qui reconnaît 38 cibles de *S. aureus*, dont des gènes de résistance, des toxines et quelques contrôles spécifiques à l'espèce [104]. Spence et coll. (2008) ont produit une biopuce reconnaissant 84 cibles de *S. aureus*. Elle reconnaît des gènes spécifiques à l'espèce (*cap*, *coa*, *cpn60*, *femA*, *nuc*, et *tpi*), de résistance aux antibiotiques (aminoglycosides, bléomycine, érythromycine, lincosamides, macrolides, streptogramines, tétracycline, triméthoprime et vancomycine), de toxines (toxine exfoliative, entérotoxine et hémolysine) et de virulence (adhésine, biofilm et capsule). De plus, elle peut analyser treize souches

simultanément [109]. Finalement, une biopuce a été réalisée pour une étude épidémiologique de SARM [110]. Elle contient 221 gènes et utilise 390 amorces pour l'amplification des cibles avant l'hybridation et pour identifier les gènes ou les allèles caractéristiques de *S. aureus* codant pour des gènes de virulence, de résistance aux antibiotiques, de régulateurs génétiques ainsi que des gènes constituant les îlots génomiques [110].

La méthode de biopuce semble plus avantageuse que le PCR conventionnel grâce aux multiples gènes de résistance aux antibiotiques, de virulence et de marqueurs d'espèce qui peuvent être testés simultanément. Cependant, les désavantages de la méthode est que la biopuce est moins sensible et plus coûteuse que le PCR conventionnel. Le PCR quand à lui, est une méthode plus laborieuse mais plus sensible et spécifique. En effet, les PCR servent souvent à compléter les résultats négatifs des gènes de résistance obtenus par biopuce, car cette dernière peut parfois être moins sensible que celle du PCR. Les réactions PCR sont en effet plus sensibles, car même si le gène n'est présent qu'en une seule copie, il sera tout de même amplifié. Tandis qu'il faut en général que la cible soit présente en quantité suffisante afin qu'elle soit reconnue par la biopuce. De plus, les résistances génotypiques associées à des mutations ne peuvent être détectées par des biopuces telles que décrites précédemment. Par exemple, la résistance aux quinolones est principalement due à deux cibles intracellulaires, soit l'ADN gyrase et la topoisomérase IV qui sont des enzymes essentiels à la réplication de l'ADN de la bactérie. Or, un seul point de mutation dans ces cibles encodant pour un acide aminé peut causer une résistance aux quinolones. Pour détecter ces mutations, il est alors préférable de faire des PCR pour amplifier ces gènes puis de séquencer l'amplicon. Ces séquences sont ensuite comparées avec la séquence étalon [111].

2.2.3 Généralités sur la résistance aux antibiotiques de SARM

2.2.3.1 Le SARM d'origine porcine

La résistance aux antibiotiques survient lorsqu'un microorganisme devient résistant à un ou plusieurs antibiotiques par mutation spontanée ou par acquisition de gènes exogènes de résistance provenant d'autres microorganismes soit par conjugaison, transduction ou transformation. La conjugaison est un transfert de matériel génétique, le plus souvent de plasmides, qui s'effectue entre une bactérie donneuse et une bactérie receveuse. La transduction est un transfert de matériel génétique effectué par des bactériophages à des bactéries tandis que la transformation est le transfert d'ADN libre capté par une bactérie réceptrice avant d'être éventuellement intégré à son chromosome (Voir figure 6). Les gènes sont portés par des intégrons, des transposons et/ou des plasmides. Une fois nouvellement acquis, ces gènes peuvent potentiellement muter [112, 113].

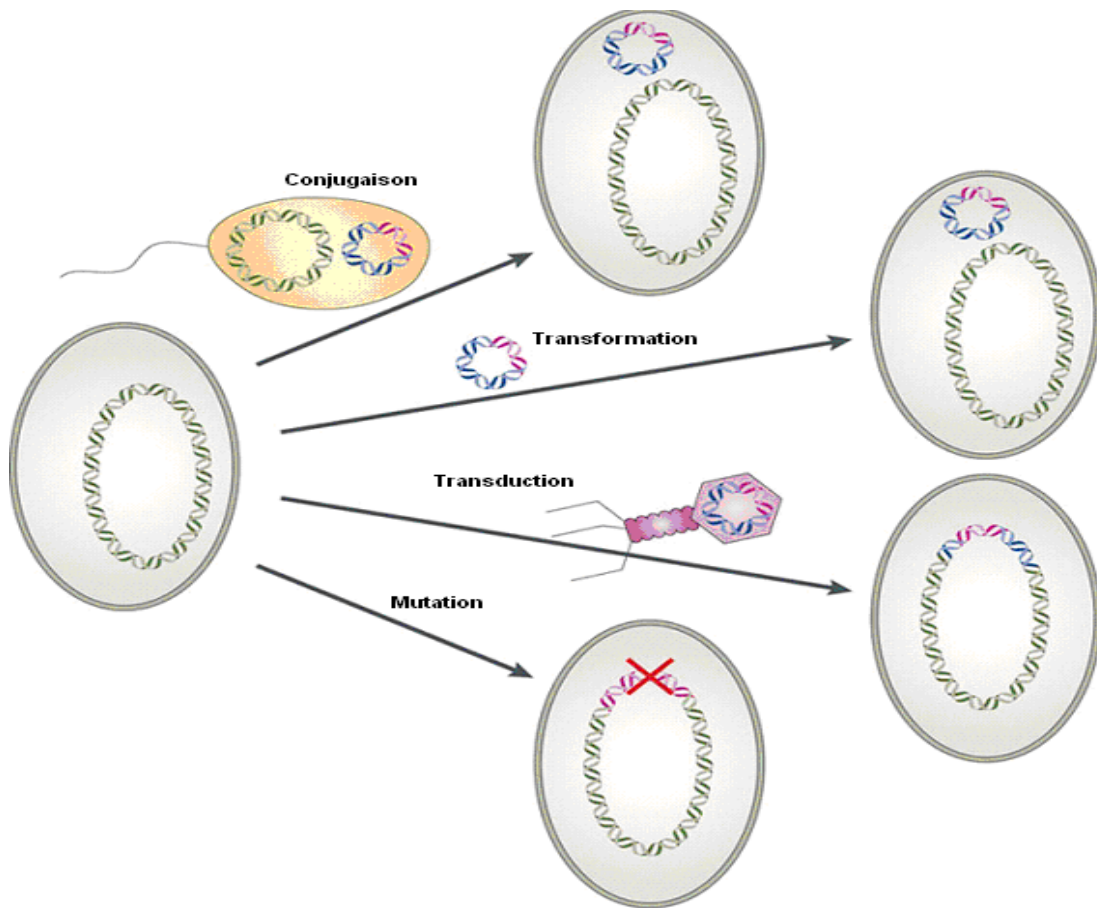


Figure 6. Principe de l'acquisition à la résistance aux antibiotiques adapté de Nature, 2010 [114].

Le SARM est résistant à toutes les β -lactamines dont les pénicillines (pénames), les inhibiteurs de β -lactamases, les pénèmes, les carbapénèmes, les monobactames ainsi que les céphalosporines. Il y a seulement deux céphalosporines efficaces contre le SARM soit la ceftaroline et le ceftobiprole [115, 116]. Les différentes classes de β -lactamines sont présentées en Annexe II. De plus, les souches de SARM sont souvent résistantes à d'autres classes d'antibiotiques. On parle de multi-résistance lorsque le SARM est résistant à plus de trois classes d'antibiotiques. La résistance à la méthicilline est donc utilisée également comme marqueur de multi-résistance [101]. Chez l'homme, le SARM est souvent résistant aux fluoroquinolones, mais sensible aux tétracyclines, alors que chez le porc, le SARM

ST398 est en majorité résistant aux tétracyclines, mais sensible aux fluoroquinolones et au triméthoprime-sulfaméthoxazole [83, 117].

Une récente étude allemande a rapporté que des souches de SARM ST398 provenant de porcs malades (infections de la peau, des voies respiratoires, des voies génitales-urinaires, de septicémie, de polysérosites et d'entérite nécrosante) étaient toutes résistantes à la tétracycline. De plus, de hauts taux de résistance ont été observés aux triméthoprimés (28/54), aux macrolides et aux lincosamides (24/54) [15]. En fait, jusqu'à maintenant les résistances envers la tétracycline, l'érythromycine, la clindamycine, la quinupristine-dalfopristine, le ciprofloxacine, les sulfamides, le triméthoprime/sulfaméthoxazole et les aminoglycosides ont été rapportées chez le SARM ST398 [63].

La présence de SARM dans les porcheries et les abattoirs pourrait être, entre autre, le résultat de la trop grande utilisation d'antibiotiques [117]. Pourtant, la méthicilline et l'oxacilline ne sont jamais utilisées dans les porcheries. Une étude a émis deux hypothèses expliquant la présence de SARM dans les élevages de porcs. La première est que l'utilisation d'autres β -lactamines favoriserait l'émergence de SARM due à une résistance croisée. La deuxième hypothèse est celle de la co-sélection, qui repose sur la possibilité de co-existence dans le génome bactérien, des gènes de résistance à la méthicilline avec des gènes de résistance à d'autres antibiotiques souvent utilisés en production porcine [117]. De plus, une étude a démontré que le SARM ST398 isolé chez des porcs variait très peu dans sa virulence et dans le type de gènes *spa*, mais différait grandement dans la résistance aux antibiotiques [15]. Le SARM ST398 aurait donc l'habileté d'acquérir horizontalement du matériel génétique d'autres bactéries ce qui pourrait augmenter sa résistance aux antibiotiques et potentiellement sa virulence [15].

Le transfert horizontal de gènes parmi les bactéries via leurs éléments génétiques mobiles est le principal mode de diffusion des résistances aux antibiotiques et des facteurs de virulence chez les pathogènes [118]. Les éléments mobiles génétiques sont de larges morceaux d'ADN qui codent pour les fonctions de mobilisation. Les principaux éléments génétiques mobiles de *S. aureus* sont les bactériophages, les îlots de pathogénicité (SaPI), les plasmides, les transposons, les cassettes chromosomiques staphylococcales (SCC) et l'assimilation d'ADN nu. Ils sont connus pour être responsables du mouvement d'ADN entre les différentes espèces bactériennes [118, 119].

Les bactériophages peuvent coder pour des toxines, comme l'entérotoxine A (*sea*), la leucocidine de Pantan-Valentine (PV-*luk*), la protéine d'inhibition du complément (*scin*), la protéine d'inhibition de la chémotaxie (*chip*) et la staphylokinase (*sak*) [120-122]. Les îlots de pathogénicité portent souvent plusieurs gènes de virulence et ressemblent aux bactériophages, il leur manque cependant les gènes pour construire la tête et la queue des capsides qui sont nécessaires aux transferts horizontaux [123]. C'est pourquoi, ils sont associés à des phages qui les aident aux transferts horizontaux.

Les îlots de pathogénicité codent pour: la toxine-1 du syndrome du choc toxique (*tst*), des gènes de superantigène, un transporteur putatif de multi-résistance, et un gène de résistance à l'acide fusidique [124, 125]. La plupart des souches de *S. aureus* contiennent un îlot de pathogénicité, mais certaines en contiennent deux.

La plupart des souches de *S. aureus* contiennent un ou plusieurs plasmides, mais il y a deux principaux types de plasmides décrits chez *S. aureus*. Le premier est un petit plasmide circulaire qui code seulement pour une ou deux résistances, comme par exemple *pT181* [126]. Le deuxième, est un large plasmide répliqué par le mécanisme thêta et qui peut contenir une combinaison de gènes de résistance incluant la pénicillinase, les métaux

lourds, résistances aux détergents, aux triméthoprimes et aux aminoglycosides [127]. Il y a aussi des gros plasmides qui codent pour le gène *tra* du transfert conjugatif. De nouveaux plasmides contenant plusieurs gènes de résistance aux antibiotiques ont été découverts dernièrement chez des souches de SARM ST398 comme par exemple, le plasmide pKKS25 (40Kb) contenant les gènes *erm*(T), *drf*(K) et *tet*(L) [128] ainsi que le plasmide pKKS825 (14,3 Kb) contenant les gènes *aadD*, *tet*(L), *dfr*(K) et *vga*(C) [129].

Les transposons sont relativement petits et codent pour des gènes de résistance, comme *Tn552* contenant le gène *bla* pour la pénicillinase ainsi que *Tn554* codant pour les résistances à l'érythromycine et à la spectinomycine. Ces transposons peuvent se retrouver intégrés dans les éléments SCC, les plasmides ou dans le chromosome. Une souche peut en contenir plusieurs copies [130]. D'autres transposons sont de tailles plus grandes et relativement rares mais peuvent coder pour la résistance à la tétracycline, aux triméthoprimes ou aux aminoglycosides. De plus, le gène de résistance à la vancomycine (*vanA*) peut être retrouvé chez certain SARM d'origine humaine. Il est codé par un transposon qui a été transféré des entérocoques [131, 132].

Le gène *mecA* se retrouve sur un des multiples éléments mobiles de grande taille nommé *SCCmec*. Les gènes SCC sont quant à eux, de grands fragments d'ADN qui s'insèrent toujours dans le gène *orfX* du chromosome de *S. aureus* comme décrit plus haut. Les SCC peuvent aussi contenir d'autres gènes de résistance que *mecA* qui se retrouvent sur de petits transposons ou intégrés dans de petits plasmides. Les protéines codées par les gènes *ccr* sont responsables de la précision de l'excision et de l'intégration d'élément *SCCmec* dans le chromosome des *Staphylococcus*, mais l'excision des *SCCmec* ne semble pas très fréquente et les *SCCmec* sont relativement stables et transfèrent nettement moins souvent que les autres éléments mobiles génétiques [119].

Le transfert horizontal de gènes joue un rôle prédominant dans la rapide acquisition de résistance aux antibiotiques chez *S. aureus*. Un système de restriction-modification (système de défense des bactéries incluant des enzymes de restriction pour digérer l'ADN parasite et des enzymes de méthylation pour protéger l'ADN de la bactérie) de type I, le *Sau1*, a été trouvé chez *S. aureus*. *Sau1* contribuerait à l'évolution de *S. aureus* et contrôlerait le transfert horizontal des éléments mobiles génétiques [133]. Il a déjà été observé dans une étude, des transferts horizontaux de gènes de résistance tels que *copB* et une ATPase transportant le cadmium de plusieurs espèces bactériennes (*Listeria monocytogenes* et *Staphylococcus saprophyticus*) causant des mammites bovines à une espèce de SARM d'origine humaine [118]. Selon cette étude le SARM d'origine humaine pourrait donc acquérir des gènes de résistance de d'autres espèces bactériennes. Une étude comparative des génomes de 161 souches de *S. aureus* d'origine humaine et de 56 souches de *S. aureus* provenant de différents animaux malades a révélé une variation génétique entre les souches humaines et animales [134]. Plusieurs gènes conservés dans toutes les souches humaines étaient variables ou manquant dans les souches animales tel que les gènes codant pour des facteurs d'adhésion *fnbA* et *fnbB* et le gène codant pour la coagulase *coa*. Plusieurs variations dans les éléments mobiles génétiques ont été notées ainsi que plusieurs évidences d'échanges d'éléments mobiles génétiques, tels que les bactériophages et les îlots de pathogénicité, entre des souches humaines et animales [134].

Le tableau III résume les résistances génotypiques envers les antibiotiques ayant été rapportés chez le SARM d'origine porcine. De plus, le ST398 présente souvent le gène *cfrr* de multi-résistance aux antibiotiques [88]. Le gène *cfrr* est responsable de plusieurs résistances dont la résistance aux oxazolidinones, aux pleuromutilines, aux phénicoles, aux lincosamides et aux streptogramines A [88]. Une étude sur des souches de SARM porcins

provenant de plusieurs pays a mis en évidence la présence d'une nouvelle résistance, soit la résistance au zinc. La présence de cette nouvelle résistance provenant du gène *crzC* serait due à l'utilisation de zinc comme additif alimentaire dans la nourriture des porcs pour prévenir les maladies gastro-intestinales[135].

Tableau III: Les résistances génotypiques envers les antibiotiques rapportées chez le SARM d'origine porcine.

Antibiotiques	Gènes de résistance	Plasmides (Kb)	Mécanisme de résistance	Références
Aminocyclitol Apramycine	<i>apmA</i>	pAFS11 (40)	-Acétyltransférase	[136]
Aminoglycosides gentamicine kanamycine streptomycine tobramycine	<i>aacA/aphD</i> <i>aph(2'')/acc(6')</i> <i>aph(3')</i> <i>ant(4')</i> <i>aadD</i>	- - - - pKKS825 (14,3)	-Adényltransférase/ phosphoransférase -Adényltransférase/ phosphoransférase -Phosphoransférase -Adényltransférase -Adényltransférase	[15, 56, 70, 137]
Lincosamides clindamycine pirlimycine lincosamine	<i>vga(A)</i> <i>vga(C)</i> <i>lnu(A/A')</i> <i>cfr</i>	pCPS32 (5,7) pKKS825 (14,3) pCPS49 (5,3) - pSCFS3 (9,4)	-ABC transporteur -ABC transporteur -Nucléotidyltransférase -Méthyltransférase de l'ARNr 23S	[75, 88, 129]
Macrolides Érythromycine	<i>erm(A)</i> <i>erm(B)</i> <i>erm(C)</i> <i>erm(T)</i> <i>msrA</i>	- - - pKKS25 (40) -	-Méthyltransférase de l'adénine de l'ARNr -Méthyltransférase de l'adénine de l'ARNr -Méthyltransférase de l'adénine de l'ARNr -Méthyltransférase de l'adénine de l'ARNr -Pompe à efflux	[15, 70, 128]
Oxazolidinone linézolide	<i>cfr</i>	pSCFS3 (9,4)	-Méthyltransférase de l'ARNr 23S	[88]
Phénicoles chloramphénicole florfénicole	<i>cfr</i> <i>fexA</i>	pSCFS3 (9,4) -	-Méthyltransférase de l'ARNr 23S -Pompe à efflux	[15, 88]

Pleuromutilines	<i>cfp</i>	pSCFS3 (9,4)	-Méthyltransférase de l'ARNr 23S	[15, 88]
	<i>vga(C)</i>	pKKS825 (14,3)	-ABC transporteur	
Streptogramines dalfopristine quinupristine	<i>erm(A)</i>	-	-Méthyltransférase de l'adénine du l'ARNr	[15, 70, 88, 128, 138]
	<i>erm(B)</i>	-	-Méthyltransférase de l'adénine de l'ARNr	
	<i>erm(C)</i>	-	-Méthyltransférase de l'adénine de l'ARNr	
	<i>erm(T)</i>	pKKS25(40)	-Méthyltransférase de l'adénine de l'ARNr	
	<i>vga(C)</i>	pKKS825(14,3)	-ABC transporteur	
	<i>vga(E)</i>	-	-ABC transporteur	
	<i>cfp</i>	pSCFS3(9,4)	-Méthyltransférase de l'ARNr 23S	
	<i>msrA</i>	-	-Pompe à efflux	
Streptomycine	<i>str</i>	-	-Adényltransférase	[70]
Tétracyclines	<i>tet(M)</i>	-	-Protéine de protection ribosomale	[52, 56, 128]
	<i>tet(K)</i>	-	-Pompe à efflux	
	<i>tet(L)</i>	pKKS2187 (40) pKKS25 (40) pKKS825 (14,3)	-Pompe à efflux	
Triméthoprim	<i>dfrA</i>	pSK639	-Dihydrofolate réductase intensive	[15, 70, 128]
	<i>dfrG</i>	-	-Dihydrofolate réductase intensive	
	<i>dfrK</i>	pKKS25 (40) pKKS825 (14,3) pKKS2187 (40)	-Dihydrofolate réductase intensive	
	<i>dfrS1</i>	-	-Dihydrofolate réductase intensive	

2.2.3.2 Le SARM d'origine humaine

Le SARM d'origine humaine, soit les HA-SARM et les CA-SARM, sont aussi considérés comme étant multi-résistants. Une étude faite aux États-Unis de 1996 à 2008 révèle une importante augmentation du taux de résistance des SARM de 1996 à 2004. Cependant, ce taux semble se stabiliser de 2004 à 2008. De plus, les SARM provenant des patients des soins intensifs, des patients qui ne sont pas aux soins intensifs et des patients à

l'extérieur des hôpitaux, montrent des patrons de résistances aux antibiotiques similaires [139]. En effet, cette étude démontre que le taux de résistance au triméthoprim/sulfaméthoxazole, à la tétracycline et à la gentamicine a diminué ces dernières années, tandis que le taux de résistance à l'érythromycine, à la ciprofloxacine ainsi qu'à la clindamycine est toujours aussi élevé [139]. Une autre étude effectuée dans plusieurs unités de soins intensifs au Canada durant 10 mois en 2005 révèle que le SARM représentait 4,7% de tous les isolats et 21,9% de tous les cas d'infections à staphylocoque prélevés. De tous les SARM retrouvés, 90,7% était des souches de HA-SARM et 9,3 % était des souches CA-SARM. Ces isolats de SARM étaient résistants à 91,8 % à la lévofloxacine, à 89,9 % à la clarithromycine, à 76,1 % à la clindamycine et à 11,7 % au triméthoprim-sulfaméthoxazole [140]. Un autre problème important survient lorsque l'antibiotique le plus utilisé comme traitement des SARM d'origine humaine, la vancomycine, devient aussi inefficace. En effet, l'utilisation de vancomycine comme traitement pour toutes sortes d'infections a beaucoup augmenté ces dernières années et ceci coïncide avec une augmentation du nombre de SARM résistant à cet antibiotique. L'utilisation non-judicieuse d'antibiotiques pour le traitement de différentes infections soulève donc des inquiétudes en ce qui concerne la prolifération de bactéries plus résistantes et potentiellement la sélection de clones plus résistants et virulents dans un environnement donné tel le milieu hospitalier ou en production animale [141, 142].

Articles scientifiques

Contribution à l'article 1:

J'ai effectué les manipulations de micro-dilution pour déterminer les concentrations minimales inhibitrices envers les antibiotiques. J'ai effectué la méthode de biopuce sur les deux isolats de SARM et participé à l'interprétation des résultats de biopuce. J'ai également vérifié certains résultats en PCR. Finalement, j'ai participé à la rédaction de certaines sections de l'article.

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

Michael Beaudry-Ferland^{1Φ}, Geneviève Pelletier-Jacques^{1Φ}, Ann Letellier¹, Brian Talbot², Hélène Monière-Wollank², Myriame Lafrance², François Malouin², Monecke Stefan³ 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, ³ Institute for Medical Microbiology and Hygiene, Technical University of Dresden, Dresden, Germany/Alere technologies, Jena, Germany

*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 Methicillin-susceptible *S. aureus* (MSSA). 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, blood agar and selective MRSA chromogenic agar plates. A multiplex PCR was performed using the *nuc* and *mecA* genes to discriminate between MRSA and MSSA. 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 MSSA 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). Unknown SCC*mec* elements were 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 towards 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 classes of antimicrobials other than β -lactams. MRSA carriage and seroconversion were examined to see whether the host responded differently to MRSA or MSSA colonization. The presence of MSSA-specific antibodies in pig sera was measured for each animal using indirect ELISA and a mixture of two widespread MSSA antigens (IsdH [143] and IsdB). Sera (1:3000) were considered positive if A_{450} was >0.3 . Regardless of the colonization site, MSSA-/MRSA-pigs ($n=34$) and MSSA+ pigs ($n=194$) showed 20.6% and 32.5% seroconversion, respectively. Notably, pigs colonized by MRSA at one body site and no MSSA at the other sampling site ($n=18$) showed a significantly lower (5.6%) seroconversion ($P < 0.05$) compared to pigs colonized by MSSA at one or both sites without MRSA. The findings of the study show that the nostrils and axillae of abattoir pigs can harbor MRSA isolates with multiple antimicrobial resistances. In addition, these MRSA were possibly able to colonize the host either without stimulating antibody production, by attenuating the humoral immune response or by colonizing pigs that are less immunocompetent. 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 [144]. The protein is encoded by the *mecA* gene located on mobile genetic elements called staphylococcal chromosomal cassettes (SCC*mec*). 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 [145-149]. Different animal-specific lineages such as livestock-associated-MRSA (LA-MRSA) have been implicated, and also human-associated MRSA genotypes have been identified [145]. MRSA has also been found in companion animals and horses, and transmission between humans and colonized animals has been reported [74, 145, 150, 151].

MRSA colonization in pigs was first reported in the Netherlands [152]. More recently, MRSA has been isolated from healthy pigs of various age groups in a number of countries at farms and at slaughterhouses [153-158]. Most of the isolates belong to the multilocus sequence type (MLST) ST398 and many of them showed resistance toward tetracycline [159]. Erythromycin and clindamycin resistances have also been reported [69]. Resistance to ciprofloxacin and trimethoprim-sulfamethoxazole seems less commonly encountered [70, 155, 156, 159]. However, these strains are usually susceptible to rifampin, vancomycin, and linezolid [153, 156, 159-161]. 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* [58]. Persons 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 [152, 162]. In many countries, pig exposure is now considered a significant risk factor for MRSA ST398 colonization in humans [145, 159]. Reports have also documented apparent transmission of MRSA between pigs and pig farmers and their family members [145, 162]. Many cases of colonized pig workers have been reported in the last 10 years in different countries [70, 154, 155, 158, 159, 163]. MRSA of porcine origin has also been reported as the cause of human infections such as those of skin and soft tissue infections [74, 145, 164], destructive otomastoiditis [151] and severe pneumonia [150].

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 [165, 166]. 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 [90, 165, 166].

As one purpose of this work was to evaluate seroconversion and colonization by MSSA or MRSA, genes coding for surface expressed proteins were selected. The iron-regulated surface determinants (IsdH and IsdB) are specialized in the acquisition of iron from the

heme proteins [167] and represent suitable target antigens for studying seropositivity in many animal species including pigs. The protein IsdH captures hemoglobin associated with haptoglobin [168] whereas the protein IsdB is a hemoglobin receptor [169]. The Isd iron-acquisition system is thought to be of major importance for *S. aureus* pathogenesis [170] and is strongly expressed in the mammalian environment [171].

A Canadian study reported an MRSA prevalence of 24.9% in farm pigs in the province of Ontario. The predominant MRSA strains were of MLST ST398 [55]. 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 for the presence of 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, we also evaluated the seroconversion of pigs to determine whether the host responds differently to MSSA or MRSA colonization.

2. Materials and methods

2.1 Sample collection and bacterial isolation

Nasal swabs, skin swabs and blood samples were collected from each of 316 pigs selected randomly 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 farm of origin were noted. The swabs were inoculated on blood agar plate (Bio-Rad, Canada) and into 5 ml of enrichment broth containing 10 g tryptone/L, 75 g sodium chloride/L, 10 g mannitol/L and 2.5 g of yeast extract/L as previously described [55]. Possible MRSA colonies were selected using MRSA *Select*TM agar (Bio-Rad, Canada) while MSSA were selected on blood agar plate. Blood samples were also collected from each pig at slaughter. After centrifugation, the sera were divided into 3 aliquots of 1.5 ml and frozen for further analysis.

2.2 Molecular testing

DNA extraction was performed with 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 [172, 173]. The presence of *pvl*, *eta*, *etb* and *tstI* genes was determined by a multiplex PCR [173]. 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 [174] 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 [175] 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 CCRI-9598 (type IVc), MRSA CCRI-9593 (type IVd) and MRSA 97 (type V) were used as positive controls.

2.3 Antimicrobial susceptibility testing

Isolates 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) using the guidelines and breakpoints of the Clinical and Laboratory Standards Institute [176, 177]. The minimal inhibitory concentration (MIC) of 18 antimicrobials were determined (Table 1) using the interpretation breakpoints indicated in parentheses: 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 or 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 isolates (MRSAp97 and MRSAp154N) based on different abattoirs, antimicrobial resistance, SCCmec types and MLVA lineages. These MRSA isolates were characterized by the StaphType© array based on the Array-Tube platform (Alere technologies, Jena, Germany) [178] 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 SCCmec types. This system detects genes encoding for various virulence factors such as staphylococcal enterotoxins (*selA-selE*, *selG-selO*, *selQ*, *selR*, *selU*), 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*).

2.5 Production of recombinant 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 and as previously described [179]. Recombinant proteins were produced in *Escherichia coli* M15 with pREP-4 plasmid after isopropyl β -d-1-thiogalactopyranoside (IPTG) induction (Qiagen) according to the manufacturer's recommendations. Protein purification was performed under native conditions using a nickel-nitrilotriacetic acid (Ni-NTA) resin (Qiagen). Recombinant proteins were dialyzed and concentrated if necessary.

2.6 Antibody detection

The presence of antibodies against IsdH and IsdB was determined by an indirect ELISA as previously described [180]. Briefly, Nunc MaxiSorp 96-well plates (Thermo Fisher Scientific Inc., Rochester, NY, USA) were coated with the recombinant protein (5 μ g/ml of either IsdH or IsdB or a mixture of both diluted in 0.1 M carbonate/bicarbonate buffer) and incubated overnight at 37°C. The plates were washed twice with PBS containing 0.05% Tween20. The plates were then saturated with the blocking solution (PBS containing 5% skim milk powder) for 1 h at 37°C. After two washes, 100 μ l of the test sera diluted 1/3000 in PBS containing 5% skim milk powder were loaded in triplicate into the

plates and incubated for 2 h at 37°C. The plates were washed two times. One hundred microlitres of horseradish peroxidase (HRP)-conjugated secondary antibody was added to the plate. The secondary antibodies used were a rabbit anti-pig IgG (Sigma-Aldrich, St - Louis, MO) diluted 1/1000 in blocking solution. After 1 h of incubation at 37°C followed by two washes, peroxidase activity was detected with 3,3',5,5'- tetramethylbenzidine (TMB) reagent (KPL Inc., Gaithersburg, MD, USA) according to the manufacturer's recommendations. Absorbance at 450 nm (A_{450}) was recorded with a Power Wave 200 plate reader (Bio-tek Instruments, Winooski, VT, USA). A sera was considered positive for *S. aureus* antibodies (seroconversion) when the A_{450} was greater than 0.3 for a sera diluted 1/3000 as previously described [180].

3. RESULTS

3.1 MRSA prevalence in swine

Nasal swabs, axillary skin swabs and blood samples were taken from each of 316 swine at two slaughterhouses (A and B) representing 43 farms (A: 35 farms and B: 8 farms). A total of 107 MRSA isolates were recovered from nasal or skin samples (107/632). MRSA prevalence in swine varied depending 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 the abscesses (0/28). MRSA prevalence at slaughterhouse A was numerically higher (30.8%; 52/169) than that observed at slaughterhouse B (23.8%; 35/147).

3.2 Antimicrobial susceptibility

Frequency of antimicrobial resistance based on MICs for MRSA ($n = 107$) are presented in Table 1 with respect to the MIC₅₀ and the MIC₉₀ for each antimicrobial. All isolates 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 for specific antimicrobials. Only a small number of isolates were resistant to daptomycin (0.9%) whereas a greater frequency of resistance towards clindamycin (29%) and erythromycin (29%) was more commonly observed. Most of the isolates were resistant to tetracycline (98.1%) in addition to being resistant to beta-lactams (ampicillin, ceftriaxone, oxacillin and penicillin) as expected. Despite harboring the *mecA* gene, four of the characterized isolates were susceptible to oxacillin and ceftriaxone, whereas all

isolates were resistant to ampicillin and penicillin. About one third of the isolates, 28% (30/107), were resistant to representatives of four classes of antimicrobials namely, beta-lactams, lincosamides (clindamycin), tetracyclines, and macrolides (erythromycin) (Table 2). Of those, 41.9% (26/62) were from the abattoir A and 8.8% (4/45) from the abattoir B. The Z test was used to compare both proportions and the result indicated that these were significantly different ($z = 3.8$, $p = 0.0002$). Two MRSA isolates were randomly selected (MRSAp97, resistant to AMP-OXA-PEN-TET and intermediate to CEF-CLI-ERY; and MRSAp154N, resistance to AMP-CLI-ERY-OXA-PEN-TET and intermediate to CEF-Q/D) for further testing using microarray.

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 whereas certain clones were found in many herds (Fig. 1). Most isolates of clone VI were from abattoir B (69.8%; 30/43) whereas 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 SCCmec type V (70.1%; 75/107). Unknown SCCmec types were observed in 29.9 % (32/107) of the isolates (Table 3). Microarray analysis of MRSAp97 and MRSAp154N revealed the presence of genes encoding for antimicrobial resistance and virulence (Fig. 1). Among particular points to note, the overall hybridization pattern of MRSAp97 was in accordance to ST398 SCCmecV whereas that of MRSAp154N was in agreement with ST5 with an atypical SCCmec element. The antimicrobial resistance genotypes were also different. MRSAp97 was shown to harbour the genes *lnu(A)*, *erm(A)*, *tet(K)*, and *tet(M)* whereas

MRSAp154N was shown to possess the genes *erm(C)*, *tet(L)*, *aadD*, *fosB* and *vga(A)*. MRSAp154N isolate was also shown to harbor genes encoding for enterotoxins (*seg*, *sei*, *selm*, *seln*, *selo*, *selu*) whereas isolate MRSAp97 did not carry any of these genes. The leukocidins, serin protease and hemolysin gene profiles were similar in those two isolates except for the genes *lukD*, *lukE*, *splA*, *splB* and *hly* which were absent in MRSAp97. The aureolysin, staphopains and capsule/biofilm gene profiles were undisguishable in both isolates. MRSAp97 was shown to possess an *agr* group I whereas MRSAp154N was shown to carry an *agr* group II.

3.4 Seroconversion of pigs

The presence of antibodies against two *S. aureus* surface proteins in the sera of abattoir pigs was evaluated by ELISA. Overall, 27.6% of sera (87/315 sera 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 sera against IsdB than against IsdH. Because the numbers of positive sera were small when divided into a variety of categories, we could not define any association between seroconversion and the origin of sera (farm or slaughterhouse), the characteristics of MRSA isolates (*SCCmec*, MLVA clones) or the site of colonization (nasal, skin). However, the percentage of positive sera differed depending on the presence of MRSA. Figure 3 shows the percentage of positive sera in animal groups colonized by MRSA compared to MSSA. 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 sera 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 sera 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.

4. Discussion

This study is one of the first to document the presence of MRSA ST398 in two Canadian abattoir pigs, and to our knowledge, the first in Canada to report on their antimicrobial resistance. MRSA prevalence in swine was dependent on the site of colonization and the abattoir. This indicated that swine may harbour MRSA in their nostrils and/or on their skin axillary region and suggests that more than one site should be sampled to established carriage. The total prevalence (27.5%, skin or nasal or both) we report here is similar to that previously published in farm pigs in Canada (24.9%) [55]. However, the proportion of positive abattoir pigs were lower than those reported for pigs sampled in the Netherlands [181] and Germany [69] using similar sampling and laboratory procedures.

The antimicrobial resistance of the MRSA isolates of this study was mainly restricted to the β -lactams, tetracycline, macrolides and lincosamides. These results are similar to the data previously reported from Germany [69] but different from the findings reported from Belgium [182] where MRSA isolates of MLST ST398 were, in addition, often resistant to fluoroquinolones and aminoglycosides. Also, Dutch isolates collected at the slaughterhouse were more often resistant to aminoglycosides [181]. It has been suggested that the resistant strains are probably spread clonally from herd to herd [69].

Tetracycline resistance could have been selected and maintained in the swine population by antimicrobial pressure on the farms. Production systems of herds that were sampled at both abattoirs employed similar antimicrobial prophylactic and therapeutic protocols, including the use of tetracycline. In this study, the tetracycline resistance phenotype could

be explained by the presence of *tet(K)* and *tet(L)* genes whereas the lincosamide-macrolide resistance phenotype could be explained by the presence of *lnuA*, and *erm(A)*, or *erm(C)* genes, respectively. These genes encode for either efflux pumps or ribosomal protection proteins [183-185]. These results demonstrate that abattoir pigs are an important reservoir of tetracycline-resistant MRSA in Canada.

Multi-resistance (defined as resistance to three or more non-beta-lactam antimicrobial classes) was also identified since one third of the isolates were resistant to four different classes of antimicrobials and most of these isolates were from abattoir A. The 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. Multi-resistance has previously been described in MRSA isolates from Belgium where 63% of the tested strains were multi-resistant [182].

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 [186, 187]. 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 that of 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 [188]. 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 [188]. This correlation was related to cell wall thickening, suggesting that the physical barrier of a thickened cell wall may also contribute to daptomycin resistance in *S. aureus* [188]. This is the only mechanism of resistance toward daptomycin identified thus far. Interestingly, a vancomycin MIC value of 2 µg/ml was measured for the daptomycin-resistant isolate MRSAp96. Although the vancomycin intermediate breakpoint is 8-16 µg/ml, this MIC is the highest value recorded for this antimicrobial compound in our study. Analysis of the cell wall thickness of this isolate is currently underway.

The presence of additional genes, *aadD*, *fosB* and *vgaA*, encoding respectively for resistance to aminoglycosides (tobramycin, neomycin), fosfomycin (bleomycin) and streptogramin were identified in the tested isolates by microarray. Interestingly, the presence of the *vgaA* gene was linked to an intermediate resistance phenotype toward streptogramin. Phenotypic resistances to tobramycin, neomycin and fosfomycin (bleomycin) were not tested, whereas antimicrobial resistance to gentamicin and

streptomycin were not observed. This is in agreement with what was previously found in other studies where microarrays have been used [189, 190]. Genes encoding resistance to lincosamide (*lnu(A)*), 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 [181, 191]. The remaining isolates belonged to unknown SCC*mec* type(s). Previous reports on SCC*mec* elements have suggested that certain sub-types of SCC*mec* may result from the fusion of two SCC*mec* followed by deletion [192, 193]. Further studies are needed to determine the unknown SCC*mec* type(s).

In addition, this is, to our knowledge, the first study where *selG*, *selI*, *selM*, *selN*, *selO*, *selU*, and *lukX* genes were found in MRSA isolates from swine. It is possible that isolates 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 [80, 156, 159].

MLVA has been reported as a simpler and more rapid typing method than pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) with high intralaboratory reproducibility [174, 194]. It has been suggested as a rapid screening method for hospital outbreak studies where the major objective is to determine if isolates that are epidemiologically linked and collected over a relatively short period of time are related or unrelated [174]. However, data have

indicated that MLVA cannot be used to predict PFGE types because MLVA was shown to cluster isolates collected over a period of several years in a manner different from PFGE.

Following these findings, MLVA was selected to type, for the first time, MRSA of pig origin to determine their relatedness. Two dominant clones were identified and certain clones contained one or many isolates. This may indicate a rather homogenous group of MRSA with clonal spread within the pig population sampled. Because MLVA has never been used for typing MRSA isolates of pig origin, comparison cannot be made with other studies using this technique. However, similar findings have been previously observed in Germany using *spa*-typing [69]. In our hands, the MLVA method which was originally described as one multiplex PCR [194] or one multiplex and one single PCR [174] had to be optimized using four PCRs for greater visual discrimination.

IsdH and IsdB are relatively well conserved across unrelated *S. aureus* and MRSA lineages colonizing a variety of animal species in addition to showing little intra-lineage variation [195]. This 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 isolate-specific antibodies. Overall, our results suggest many possibilities that will need to be further investigated. Pigs could be more densely colonized by MSSA than by MRSA which could translate into a lower immune response by MRSA than MSSA. Also, MRSA could colonize the host without stimulating IgG antibody production. This idea is supported by evidence showing that MRSA produce relatively

fewer immuno-stimulating toxins than MSSA isolates [196]. It would be of interest to see whether similar results could be obtained by measuring mucosal IgA. 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* [197]. 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 [198]. Overall, the observed low seroconversion rate in pigs colonized by MRSA suggests a possible inadequate humoral immune response against the microorganism and this may possibly explain the relative importance of MRSA in pig farms and abattoirs in Canada and around the world. Further studies are needed to adequately test hypotheses linking MRSA colonization to lower seroconversion.

In conclusion, these results show that the nostrils and axillary skin of abattoir pigs can harbor MRSA isolates that possess genes encoding antimicrobial resistance and virulence factors. In addition, a low seroconversion rate suggests a possible inadequate humoral immune response against these MRSA. This could 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		Number of isolates with MIC (µg/ml) of:																			MIC ₅₀ ^b	MIC ₉₀ ^b					
Class	Agent ^a	≤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	MIC ₅₀ ^b	MIC ₉₀ ^b
Beta-lactams	AMP	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	23	84								>16	>16
	CEF										4	-	-	-	-	-	84	-	12	7						16	32
	OXA		-	-	-	3	-	1	-	-	-	-	-	1	102											>8	>8
	PEN	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	107										>8	>8
Lincosamides	CLI	2	-	6	-	64	-	4	-	-	31														64	>2	
Cyclic lipopeptide	DPT		87	-	-	17	-	2	-	1	-	-	-	-	-										≤0.25	0.5	
Macrolides	ERY		34	-	-	39	-	-	-	3	-	-	31												0.5	>4	
Fluoroquinolones	CIP				102	-	-	5	-	-																≤0.5	≤0.5
	GAT						107	-	-	-	-	-	-	-	-											≤1	≤1
	LEV		103	-	-	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-											≤0.25	≤0.25
Oxazolidinone	LIZ							67	-	37	-	3	-	-											1	2	
Streptogramins	Q/D	-	-	66	-	12	-	9	-	20	-	-														0.25	1
Rifamycins	RIF				106	-	-	1	-	-	-	-														≤0.5	≤0.5
Aminoglycosides	GEN								106	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	≤2	≤2
	STR																							107	-	≤1000	≤1000
Tetracyclines	TET									2	-	-	-	-	-	-	-	105								>16	>16
Potentiated sulfonamides	TMS															107	-	-	-	-	-					≤0.5/9.5	≤0.5/9.5
Glycopeptides	VAN						106	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-					≤1	≤1

^a Ampicillin, AMP; ceftriaxone, CEF; ciprofloxacin, CIP; clindamycin, CLI; daptomycin, DPT; erythromycin, ERY; gatifloxacin, GAT; gentamicin, GEN; levofloxacin, LEV; linezolid, LIZ; quinupristin/dalfopristin, Q/D; oxacillin, OXA; penicillin, PEN; rifampin, RIF; streptomycin, STR; tetracycline, TET; trimethoprim/sulfamethoxazoles, TMS; and vancomycin, VAN.

^b Concentration where growth was inhibited in 50% and 90% of the isolates.

The vertical lines indicate the resistance breakpoints; shaded area, concentrations not tested;

Table 2. Pig MRSA antimicrobial resistance phenotypes for classes other than β -lactams

Resistance phenotype^a	Number of positive 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)	
tetracycline, TET		^a clindamycin, CLI; daptomycin, DPT; erythromycin, ERY;

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

MLVA clone	Abattoir	<i>SCCmec</i>	Resistance phenotype ^a	Number of Isolates
VI	A	V	CLI, TET	1
			DPT, TET	1
			TET	11
	B	V	CLI, ERY, TET	3
			TET	27
XI	A	atypical <i>SCCmec</i> elements ^b	CLI, ERY, TET	14
	B	atypical <i>SCCmec</i> elements	-	1
			TET	3
			CLI, ERY, TET	1

^a Clindamycin, CLI; daptomycin, DPT; erythromycin, ERY; tetracycline, TET

^b Harbour an irregular, possibly new *SCCmec* element

Fig.1. MLVA dendrogram representing the clonal relationship among porcine MRSA isolates. Optimization 0.6%, band filtering tolerance 1%, cut-off 80%.

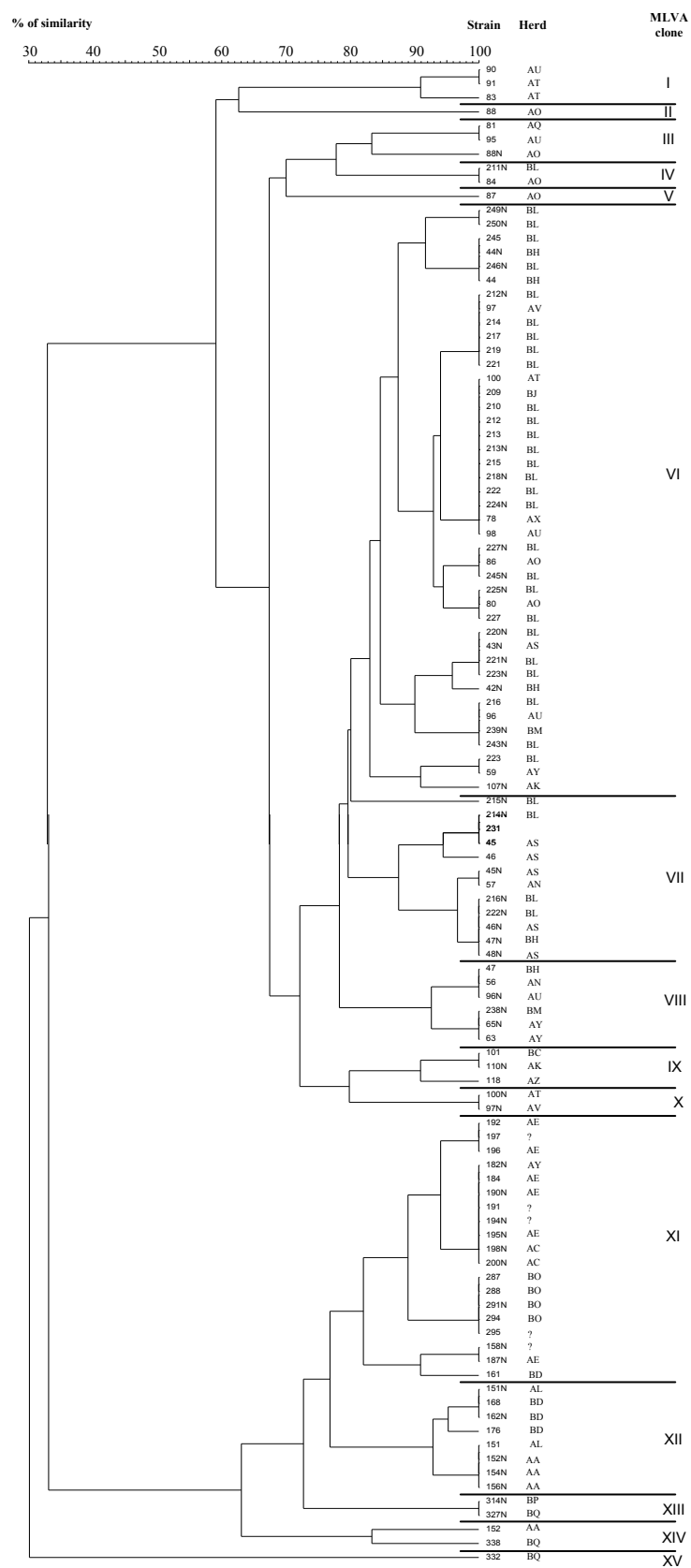
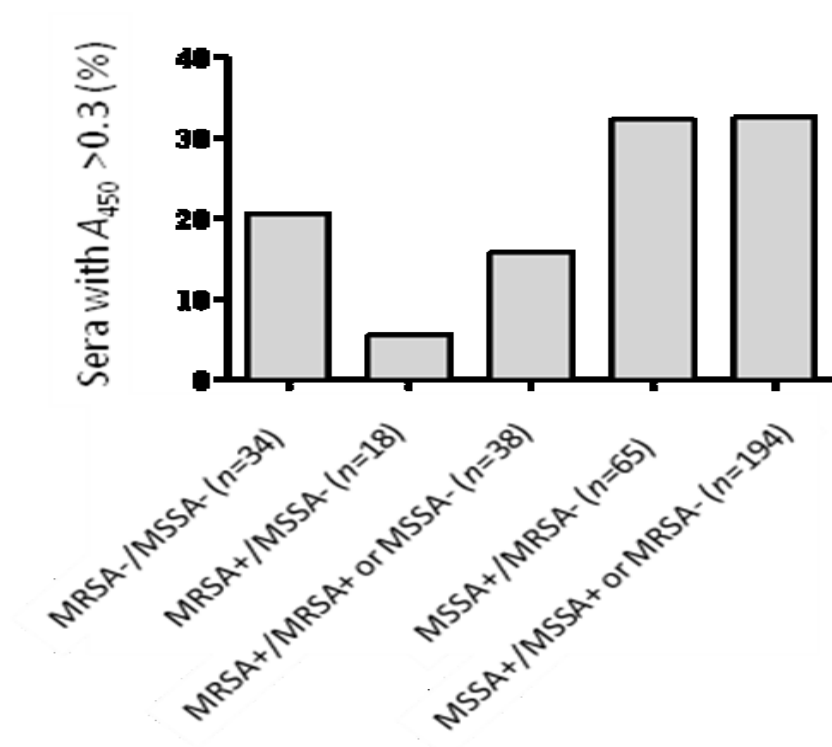


Fig. 2. Antimicrobial resistance and virulence genes detected by microarray in two MRSA isolates of porcine origin in Quebec (Canada).

Genes	Isolate No.*	
	97	154N
Antimicrobial resistance		
<i>mecA</i>	■	■
<i>blaZ</i>	■	■
<i>blaI</i>	■	■
<i>blaR</i>	■	■
<i>ermA</i>	■	■
<i>ermC</i>	■	■
<i>lnu(A)</i>	■	■
<i>vgaA</i>	■	■
<i>aadD</i>	■	■
<i>tetK</i>	■	■
<i>tetL</i>	■	■
<i>tetM</i>	■	■
<i>fosB</i>	■	■
Enterotoxins		
<i>seG</i>	■	■
<i>seI</i>	■	■
<i>seM</i>	■	■
<i>seN</i>	■	■
<i>seO</i>	■	■
<i>seU</i>	■	■
<i>egc-cluster</i>	■	■
Leukocidins		
<i>lukF</i>	■	■
<i>lukS</i>	■	■
<i>hlgA</i>	■	■
<i>lukD</i>	■	■
<i>lukE</i>	■	■
<i>lukX</i>	■	■
<i>lukY-var1</i>	■	■
Hemolysins		
<i>hl</i>	■	■
<i>hla</i>	■	■
<i>hld</i>	■	■
<i>hlIII</i>	■	■
<i>hl_III</i> Other than <i>RF122</i>	■	■
<i>hly</i>	■	■
<i>un-truncated hly</i>	■	■
Aureolysins		
<i>aur</i>	■	■
Serin Protease		
<i>splA</i>	■	■
<i>splB</i>	■	■
Staphopains		
<i>sspA</i>	■	■
<i>sspB</i>	■	■
<i>sspP</i>	■	■
Capsule/Biofilm		
<i>capsule-5</i>	■	■
<i>capH5</i>	■	■
<i>capJ5</i>	■	■
<i>capK5</i>	■	■
<i>icaA</i>	■	■
<i>icaC</i>	■	■
<i>icaD</i>	■	■
Accessory gene regulator		
<i>agrI</i>	■	■
<i>agrII</i>	■	■

*A grey box indicates presence of the gene.

Fig. 3. Proportion of positive sera in animal groups colonized by MRSA compared to MSSA and non-colonized pigs. An ELISA result of $A_{450} > 0.3$ was considered positive (seroconversion). MRSA-/MSSA- ($n=34$), animals with no MSSA or MRSA detected at any body site (nostrils 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 MSSA- ($n=38$), MRSA found at one or two body sites but no MSSA found at the other site; MSSA+/MRSA- ($n=65$), MSSA found at one body site and no MRSA present at the other site; MSSA+ /MSSA+ or MRSA- ($n=194$), MSSA found at one or two body sites but no MRSA was present.



REFERENCES

1. Sharma N, O'Hara J, Novick AC, Lieber M, Remer EM, et al. (2008) Correlation between loss of renal function and loss of renal volume after partial nephrectomy for tumor in a solitary kidney. *J Urol* 179: 1284-1288.
2. Berger-Bachi B, Rohrer S (2002) Factors influencing methicillin resistance in staphylococci. *Arch Microbiol* 178: 165-171.
3. 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.
4. Leonard FC, Markey BK (2008) Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in animals: a review. *Vet J* 175: 27-36.
5. 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.
6. van Duijkeren E, Moleman M, Sloet van Oldruitenborgh-Oosterbaan MM, Mullem 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.
7. 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.

8. 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.
9. Declercq P, Petre D, Gordts B, Voss A (2008) Complicated community-acquired soft tissue infection by MRSA from porcine origin. *Infection* 36: 590-592.
10. 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.
11. Voss A, Loeffen F, Bakker J, Klaassen C, Wulf M (2005) Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in pig farming. *Emerg Infect Dis* 11: 1965-1966.
12. 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*.
13. 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.
14. 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.
15. 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.
16. 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.
 17. 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*.
 18. 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.
 19. 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.
 20. 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*.
 21. 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*.

22. 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*.
23. 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.
24. 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.
25. 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*.
26. 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.
27. van Loo IH, Diederren 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.
28. 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.
29. Kluytmans JA (2010) Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in food products: cause for concern or case for complacency? *Clin Microbiol Infect* 16: 11-15.

30. Skaar EP, Schneewind O (2004) Iron-regulated surface determinants (Isd) of *Staphylococcus aureus*: stealing iron from heme. *Microbes Infect* 6: 390-397.
31. Dryla A, Gelbmann D, von Gabain A, Nagy E (2003) Identification of a novel iron regulated staphylococcal surface protein with haptoglobin-haemoglobin binding activity. *Mol Microbiol* 49: 37-53.
32. Torres VJ, Pishchany G, Humayun M, Schneewind O, Skaar EP (2006) *Staphylococcus aureus* IsdB is a hemoglobin receptor required for heme iron utilization. *J Bacteriol* 188: 8421-8429.
33. 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.
34. 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.
35. Khanna T, Friendship R, Dewey C, Weese JS (2008) Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* colonization in pigs and pig farmers. *Vet Microbiol* 128: 298-303.
36. 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.

37. 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.
38. 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.
39. 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.
40. (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.
41. (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.
42. Fessler A, Scott C, Kadlec K, Ehrlich R, Monecke S, et al. (2010) Characterization of methicillin-resistant Staphylococcus aureus ST398 from cases of bovine mastitis. J Antimicrob Chemother 65: 619-625.
43. 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.

44. 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.
45. de Neeling AJ, van den Broek MJ, Spalburg EC, van Santen-Verheuevel MG, Dam-Deisz WD, et al. (2007) High prevalence of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in pigs. *Vet Microbiol* 122: 366-372.
46. Crombe F, Willems G, Dispas M, Hallin M, Denis O, et al. (2012) Prevalence and antimicrobial susceptibility of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among pigs in Belgium. *Microb Drug Resist* 18: 125-131.
47. 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.
48. 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.
49. 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.

50. Mangili A, Bica I, Snyderman DR, Hamer DH (2005) Daptomycin-resistant, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia. *Clin Infect Dis* 40: 1058-1060.
51. Skiest DJ (2006) Treatment failure resulting from resistance of *Staphylococcus aureus* to daptomycin. *J Clin Microbiol* 44: 655-656.
52. 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.
53. 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.
54. Kadlec K, Ehricht R, Monecke S, Steinacker U, Kaspar H, et al. (2009) Diversity of antimicrobial resistance pheno- and genotypes of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 from diseased swine. *J Antimicrob Chemother*.
55. 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.
56. 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*.

57. Hanssen AM, Ericson Sollid JU (2006) SCCmec in staphylococci: genes on the move. *FEMS Immunol Med Microbiol* 46: 8-20.
58. 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.
59. 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.
60. 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.
61. 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*.
62. 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.
63. Boucher H, Miller LG, Razonable RR (2010) Serious infections caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clin Infect Dis* 51 Suppl 2: S183-197.

Contribution à l'article 2:

J'ai effectué toutes les manipulations sauf les manipulations pour la formation de biofilm.
J'ai participé à l'interprétation des résultats et à la rédaction de l'article.

Microarray Characterization of Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus (MRSA) Isolates of Abattoir Pigs and Evaluation of their Capacity to Form Biofilms

Running Head: Microarray Characterization and Biofilm Formation of MRSA in
Abattoir Pigs

Pelletier-Jacques Geneviève¹, Monecke Stefan², Choinière Sébastien¹, Tremblay Yannick¹, Jacques Mario¹, Malouin François³, Letellier Ann¹, Harel Josée¹ and Archambault Marie^{1*}

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

¹ Faculty of Veterinary Medicine, Department of pathology and microbiology, Centre de Recherche en Infectiologie Porcine (CRIP), University of Montreal, 3 200 Sicotte Street, Saint-Hyacinthe, J2S 7C6, Québec, Canada; ² Institute for Medical Microbiology and Hygiene, Technical University of Dresden, Dresden, Germany. ³ Centre 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: Faculty of Veterinary Medicine, Department of pathology and microbiology, University of Montreal, 3 200 Sicotte Street, Saint-Hyacinthe, J2S 7C6, Québec, Canada. Phone: 1-450-773-8521 ext 8679; Fax: 1-450-778-8108.

ABSTRACT

Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) is an important pathogen causing animal and human infections worldwide. This study was conducted to determine the presence of antimicrobial resistance and virulence genes in MRSA from abattoir pigs, to study their biofilm formation in relation with *agr* specificity groups, and to evaluate horizontal transfer of genes to an MRSA of human clinical origin. Twenty-four porcine MRSA isolates were characterized by a DNA microarray, the StaphyType by Alere technologies. Our results demonstrated that the MRSA isolates from abattoir contained several antimicrobial resistance genes such as *erm(A)*, *erm(B)*, *erm(C)*, *lnu(A/A')*, *tet(K)*, *tet(L)*, *tet(M)*, responsible for macrolide and tetracycline resistance and virulence genes such as those encoding staphylococcal enterotoxins (*selG*, *selI*, *selM*, *selN*, *selO* and *selU*), leukocidins (*lukD*, *lukE*, *lukF*, *lukM*, *lukS*, *lukX*, *lukY*) and hemolysins (*hla*, *hly*, *hlgA*, *hld*). This study presents the first evidence that horizontal transfer of some of these genes can occur between MRSA of porcine and human origin. We also report for the first time biofilm formation in Livestock Associated-MRSA of porcine origin in association with *agr* group II. Biofilm formation likely favors bacterial colonization, persistence, as well as zoonotic potential.

Introduction

Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) is an important pathogen causing animal and human infections worldwide [88]. More recently, a new clone of MRSA, belonging to sequence type 398 (ST398), was described in the literature as a Livestock Associated-MRSA (LA-MRSA) and pigs seem to be the main reservoir [181]. Bacteria of this clone usually colonize the upper respiratory tract of pigs without causing any disease, hence the term healthy carrier. LA-MRSA ST398 isolates may occasionally colonize humans in close contact with pigs [67, 80, 199]. In addition, human skin and soft tissue infections with MRSA ST398 have been reported occasionally [74, 200].

MRSA ST398 of porcine origin is not thought to be highly virulent because they usually do not harbour virulence factors typically found in human MRSA isolates [29]. Until now, the genes *lukF/S-PV* encoding for Panton-Valentine leukocidin toxin (PVL) has not been detected directly in MRSA isolates from animals [70]. However, these genes have occasionally been identified in MRSA ST398 isolates causing disease in humans [60, 61]. The genes encoding for enterotoxins B, K and Q have rarely been reported in ST398 strains of porcine origin [15] while hemolysin genes (*hla*, *hlb*, *hld* and *hlg*) are usually present [70]. Porcine MRSA ST398 strains are usually different from strains of human origin in their *spa* types (t011, t108, t567, t899 and t1939) and in their antimicrobial resistance profiles [27, 80]. Strains of porcine origin are usually tetracycline resistant via the *tet(K)*, *tet(M)* and *tet(L)* genes [15, 27, 52]. Resistance to macrolides, lincosamids and streptogramins (MLS) has also been reported [15, 27, 52]. The MLS resistance of staphylococci can be mediated by different resistance genes, usually encoding for efflux

pump or inactivating enzymes [128]. MRSA ST398 of porcine origin was shown to be able to acquire genetic material horizontally from other bacteria and this may enhance its antimicrobial resistance and possibly its virulence [15].

Horizontal gene transfer via mobile genetic elements between different bacteria is the main mode of transmission of antimicrobial resistance and virulence factors [118]. The major mobile genetic elements (MGEs) of *S. aureus* are bacteriophages, pathogenicity islands (SAPI), plasmids, transposons, staphylococcal cassette chromosome and uptake of naked DNA [118, 119]. Transduction is reported to be the mechanism most commonly used for horizontal gene transfer in *S. aureus* [113, 119]. Bacterial conjugation also occurs as a mechanism for gene transfer. It is most often observed with other bacterial species, such as enterococci to *S. aureus*. Indeed, the resistance gene to vancomycin (*vanA*) found in vancomycin resistant human MRSA originated from a transposon (*Tn1546*) that has been transferred from enterococci [113, 119].

Biofilms are structured communities of bacterial cells coated with polymeric matrix and attached to various surfaces [201]. Two steps seem to be involved in the molecular mechanisms of host colonization by *S. aureus*. Firstly, bacterial adhesion is mediated by different proteins of the family of microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules (MSCRAMMs) to the host extracellular matrix and plasma proteins. Secondly, there is accumulation of bacteria in a growth-dependent way in multilayered cell clusters, also referred to as intercellular adhesion, where biofilm formation genes are involved [202]. In addition, a new *S. aureus* biofilm accumulation phenotype mediated by

the multifunctional fibrinogen- and fibronectin-binding proteins FnBPA and FnBPB has been recently described. FnBP-mediated biofilm development appears to be more commonly associated with MRSA isolates than with methicillin-sensitive *S. aureus* isolates [203]. The ability of *S. aureus* to attach to a surface and develop a biofilm is also an important determinant of resistance to antimicrobials [204]. There is no data concerning biofilm formation in LA-MRSA and data on the presence of MSCRAMM, FnBPA and FnBPB and biofilm formation genes in these MRSA is scarce. Recently, some of these genes (*icaD*, *cna*, *ebpS*, *eno*, *fnbA*, *fnbB*, *clfA* and *clfB*) were found in MRSA ST398 of poultry origin [11]. This suggests that MRSA ST398 isolates have the genetic potential for adherence which may facilitate the colonization of not only chickens but also humans [11, 201]. To respond to many external signals from the host environment as well as the bacterial population, *S. aureus* possesses an accessory gene regulator (*agr*) quorum-sensing system which is a key multiallelic regulatory system that influences the overall regulatory network and the virulon [205]. This global regulon, based on a two-component signal-transduction system, allows formation of the autoinducer peptide (AIP) and transcription of virulence genes involved in biofilm formation [40]. *Agr* locus is transcribed as an operon consisting of four genes encoding the AgrA, B, C and D proteins [206]. The *agr* locus has diverged widely among strains of *S. aureus*, which resulted in four *S. aureus agr* specificity groups, which are referred to as groups I through IV [207, 208]. *Agr*-group II MRSA has been associated with significantly higher levels of biofilm production in comparison with MRSA of the remaining *agr* groups [40, 41]. The specificity groups have the property of heterologous mutual inhibition; that is, the unique AIP of a given group will generally cross-inhibit the

agr signal in strains belonging to a heterologous group [208]. *S. aureus agr* specificity groups seem to correlate with different types of infections. Menstrual toxic shock syndrome (TSS) strains seem to belong to *agr* group III [208, 209]. Isolates of this *agr* group are also responsible for most PVL-associated necrotizing pneumonia cases [210, 211]. Staphylococcal scalded skin syndrome isolates would belong, in majority, to *agr* group IV [207, 212]. These correlations seem to involve the acquisition by strains of each group of particular MGEs carrying toxins [213]. However, other transmissible elements and virulence genes have associated poorly with *agr* alleles [209]. LA-MRSA *agr* specificity groups are currently unknown. This study was conducted to determine antimicrobial resistance and virulence genes of MRSA from abattoir pigs, to study their biofilm formation in relation with *agr* specificity groups and to evaluate horizontal transfer of genes to an MRSA of human clinical origin.

Materials and Methods

Sample collection and bacterial isolation

A total of 107 MRSA isolates were recovered from pigs at two abattoirs located in the province of Quebec, Canada as described previously [214]. These MRSA were recovered from both nasal and skin samples (107/632) and were previously analysed for their phenotypic antimicrobial resistance, Staphylococcal Chromosome Cassette *mec* (SCC*mec*) types and multiple locus variable number of tandem repeats analysis (MLVA) lineages. In addition, twenty-five clinical MRSA isolates of human origin from studies at Sherbrooke and Laval Universities, Québec, Canada, were used in this study for a total of 132 MRSA isolates.

Biofilm formation assay

Biofilms of all 132 MRSA isolates were cultured in 96-well microtiter plates as described by Mitchell et al. [215] with some modifications. Briefly, colonies from a 16-h BHI agar plate were suspended into fresh BHI supplemented with glucose (0.25% w/v) to a 0.5 McFarland standard. A volume (200 μ L) of this inoculum was transferred into 3 wells and the microtiter plate was incubated at 37°C. After a 24-h incubation, the liquid medium was removed using a vacuum and the planktonic cells were removed by washing the wells thrice with phosphate-buffered saline (PBS). The wells were air dried and then stained with 0.1% (w/v) safranin for 10 min. They were washed once with distilled water and then dried at 37°C for 15 min. The stain was then released with 200 μ L of the destaining solution (50% (v/v) ethanol, 50% (v/v) glacial acetic acid) and the amount of released stain was quantified by measuring the absorbance at 490 nm with a microplate

reader (Powerwave, BioTek, Instruments). *Staphylococcus epidermidis* ATCC35984 (a strong biofilm producer) and ATCC12228 (a weak biofilm producer) were used in this study for control purposes.

DNA isolation

Genomic DNA was isolated as described by Arciola et al. [216] with some modifications. Briefly, bacteria from 1.5 ml of overnight cultures were harvested by centrifugation. The pellets were resuspended in a lysostaphin solution (0.1 mg/ml of lysostaphin (Sigma) in Milli-Q water) and incubated for 30 min at 37 °C. A volume (150 µl) of proteinase K solution (0.1 mg/ml of proteinase K (Sigma) in 0.1 M Tris-HCl pH 7.5, 1mM CaCl₂) was added and the resulting mixtures were incubated for 10 min at 37 °C. The samples were then heated for 5 min at 100°C. Cell and insoluble debris were sedimented by centrifugation and the supernatants were transferred to new tubes.

Detection of *icaA* by PCR

All 132 isolates were tested for the presence of the *icaA* gene with primers described by Rohde et al. [217] (Table S1). Briefly, the typical PCR mixture (50 µl) was composed of 200 ng of genomic DNA, 0.2 mM dNTP, 1.5 mM MgCl₂, 0.5 µM *icaAFS*_a, 0.5 µM *icaARS*_a, 5 µl of 10X PCR reaction buffer and 1.25 U of Taq DNA polymerase (GE Healthcare). The PCR mixtures were subjected to 5 min at 94°C, 30 cycles of 30 sec at 94°C, 30 min at 47°C, and 30 sec at 72°C, and a final 1 min at 72°C using a Biometra PCR system Tpersonal or Tgradient Thermal Cycler (Applied Biosystems, Foster City, CA). *S. aureus* isolate MRSA COL (*icaA* positive) was used as a control.

***agr* typing by multiplex PCR**

Agr typing on all 132 isolates was performed as described previously [218]. Briefly, the typical PCR mixture (50 µl) was composed of 200 ng of genomic DNA, 0.2 mM dNTP, 5.0 mM MgCl₂, 0.5 µM *agr1-4Sa*, 0.3 µM *agr1Sa*, 0.3 µM *agr2Sa*, 0.3 µM *agr3Sa*, 0.3 µM *agr4Sa*, 5 µl of 10X PCR reaction buffer and 1.25 U of Taq DNA polymerase (GE Healthcare). The PCR mixtures were subjected to 4 min at 94°C, 30 cycles of 30 sec at 94°C, 1 min at 50°C, and 1 min at 72°C, and a final 5 min at 72°C using a thermocycler as described above. *S. aureus* strain MRSA COL (Agr type I), *S. aureus* strain Mu50 (Agr type II) and *S. aureus* strain Sa606 (Agr type III) were used as positive controls.

DNA Microarrays

Microarray was performed on 24 representative isolates of porcine MRSA. Selective criteria were based on different abattoirs, biofilm formation and previously obtained antimicrobial resistance profiles (Table 1). Also, four human MRSA isolates were tested in the array to select recipient isolates in the filter mating assay. The StaphType© array based on the Array-Tube platform (Alere technologies, Jena, Germany) [89] was used 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 (*selA-selE*, *selG-selO*, *selQ*, *selR*, *selU*), leukocidins (*lukD*, *lukE*, *lukF*, *lukM*, *lukS*, *lukX*, *lukY*), Panton-Valentine leukocidin (PVL) (*lukF-PV*, *lukS-PV*), hemolysins (*hla*, *hly*, *hlgA*, *hld*), and accessory gene regulator system (*agrB-I-IV*, *agrC-I-IV*, *agrD-I-III* and *sarA*).

Filter mating

Transferability of antimicrobial resistance markers was performed using filter mating as previously described by McDougal and al. [219] with a few modifications. Briefly, microarray results were used to select donor and recipient cells of the assays. Two MRSA isolates (#81 and #154N) of porcine origin resistant to tetracycline and erythromycin were used as donor cells and two human clinical MRSA isolates (#CCRI-2023 and #CA-MRSA sa220c) resistant to levofloxacin were used as recipient cells. Isolates were grown overnight in Tryptic soy broth (TSB) at 37°C with shaking. The donor cell culture (100 µl) and the recipient cell culture (1 ml) were added to 9 ml of fresh TSB. After incubation at 37°C with shaking during 4 h, the culture was filtered through a nitrocellulose 0.45µm-pore-size filters (EMD Millipore, 290 Concord Road, Billerica, MA 01821). The filter was placed on a blood agar plate that was incubated overnight at 37°C. The filter was then vortexed in 1 ml of saline 0, 9%. Dilutions of the mixture were spread on selective plates containing the appropriate antimicrobials (erythromycin 4 µg/ml, tetracycline 16 µg/ml, levofloxacin 4 µg/ml). Transconjugants were counted after 48 h of incubation at 37°C. Genes transfer was confirmed by PCR (Table S1). Two transconjugants, T1 and T68, were also tested on the array described above to determine genes acquired during mating.

Plasmid extraction and southern hybridization analysis

Probes for Southern hybridization were generated by substituting standard dNTPs with digoxigenin-labelled dNTPs (PCR Dig Probe Synthesis Kit, Roche Applied Science, Quebec, Canada) in the amplification reaction according to the manufacturer's

instructions. Agarose gels were blotted on positively charged membranes using a Vacuum Blotter Model 785 (Bio-Rad). Then, membranes were probed with digoxigenin-labelled PCR products for the genes *aadD*, *erm(A)*, *erm(C)*, *tet(K)*, *tet(L)*, *tet(M)*, *lnu(A/A')* and *qacC*. Pre-hybridizations and hybridizations were carried out at 65°C for 30 min and 18 h, respectively, in hybridization buffer with subsequent washings, as recommended by the manufacturer. After post-hybridization washing of the membrane, the colorimetric method (NBT/BCIP substrate solution, Roche Applied Science) was used to detect the presence of digoxigenin-labelled probes. PCR products were used as hybridization control and control DNA dig-labelled as detection control. A lysate of *Enterococcus faecalis* JH2-2 was used as negative control.

RESULTS

Biofilm formation of MRSA of porcine and human origins

The current study first determined whether the MRSA isolates ($n= 107$) recovered from healthy pig carriers were able to form biofilm in comparison with human clinical isolates ($n= 25$). As shown in Fig. 1, biofilm formation was observed in 87 MRSA isolates of porcine origin with 73 isolates classified in the “weak” category ($0,110 \geq \text{DO } 490 < 0,500$) and 14 in the “moderate” ($0,500 \geq \text{DO } 490 < 1,500$) category of biofilm formation. All human clinical isolates of MRSA were shown to form biofilm. Most of these isolates were classified in the “moderate” ($n= 15$) or the “high” categories ($n=8$, with $\text{DO}490 \geq 1,500$) of biofilm formation. When PCR was performed on all MRSA isolates to determine their Agr types, most isolates of porcine ($n=76$) and human ($n=12$) origins were of type I. The remaining isolates were of type II (porcine, $n=31$; human, $n=9$) and III (human, $n=4$). Agr types within categories of biofilm formation are presented in Table 2. All isolates of Agr type II of human and porcine origins were classified into the “weak”, “moderate” or “high” categories of biofilm formation. Only isolates of Agr type I were found in the negative biofilm formation class. Isolates were also tested by PCR for the presence of *icaA* gene which encodes for intercellular adhesion protein A. This gene has been found associated with adhesion and biofilm formation in MRSA ST398 of poultry origin [11]. In our study, the *icaA* gene was detected in all MRSA isolates ($n= 106$), except in isolate no. 294, a “weak” biofilm former of *agr*-group II. Together, these results indicate that most MRSA isolates originating from healthy pigs are able to form biofilm, and that *agr*-group II was associated with biofilm formation in these isolates.

Identification of virulence and antimicrobial resistant genes in MRSA of porcine origin

To evaluate whether these MRSA isolates of porcine origin are carrying virulence and antimicrobial resistant genes, a subset of these isolates ($n=24$) were selected for further characterization using a StaphyType array of Alere Technologies [107]. Selection criteria of these isolates listed in Table 1 were based on biofilm formation, different abattoirs, and previously obtained antimicrobial resistance profiles (Beaudry-Ferland et al, submitted). As shown in Tables 3 and 5, these isolates harboured several antimicrobial resistance genes such as *erm(A)*, *erm(C)*, *lnu(A/A')*, *tet(K)*, *tet(M)*, responsible for macrolides, lincomycin, and tetracyclines resistance. Also, virulence genes such as staphylococcal enterotoxins (*selG*, *selI*, *selM*, *selN*, *selO* and *selU*), leukocidins (*lukD*, *lukE*, *lukF*, *lukM*, *lukS*, *lukX*, *lukY*) and hemolysins (*hla*, *hly*, *hlgA*, *hlyD*) were detected. Overall, two different gene profiles were observed among MRSA isolates of porcine origin. One profile represented by a SCCmec V possesses antimicrobial resistant genes *erm(A)*, *erm(B)*, *tet(K)*, *tet(M)* et *tet(L)* and another profile with an unknown SCCmec type possesses the *erm(C)*, *tet(L)*, *vga*, *aadD*, and *fosB* antimicrobial resistance genes. Analysis of virulence genes within these two profiles indicated that isolates with SCCmec V have no enterotoxin genes but have leukocidin genes *lukX* and *lukY* whereas isolates of the unknown SCCmec type have enterotoxin genes *sel(G)*, (I), (M), (N), (O), (U), *Egc*-cluster and leukocidin genes *lukE*, D, X, Y (Tables 4 and 5). Also, four MRSA of human origin were characterized by microarray (Table 5) to identify their virulence and antimicrobial resistant genes in order to identify possible recipients in the filter mating

assay with selected donor MRSA isolates of porcine origin. Human MRSA isolates demonstrated resistance to various antimicrobials such as ciprofloxacin, levofloxacin and gatifloxacin and possess various virulence genes such as *selA selG, sell, selM, selN, selO, lukD, luK, lukE, lukX, lukY, lukF, lukS, hlg, hla, hld* but they differ from the ones found in porcine MRSA isolates.

Filter mating

Filter mating assays from the donor porcine isolate MRSA 81 to recipient human isolate MRSA CCRI-2023 revealed conjugative transfer of *erm(A), tet(M), lnu(A/A')* and *qacC* genes. On the other hand, assays from the donor porcine isolate MRSA 154N to the recipient human isolate CA-MRSA SA220c revealed conjugative transfer of *aadD, erm(C)* and *tet(L)* genes. The presence of these genes in 140 transconjugants was confirmed by PCR. Furthermore, two selected transconjugants (#68, MRSA81-T68; #1, MRSA154N-T1) were characterized by the StaphyType array of CLONDIAG. Microarray results have demonstrated that MRSA81-T68, obtained from donor MRSA 81 and recipient CCRI-2023) had received 21 genes including antimicrobial resistances genes (*erm(A), tet(M)* and *qacC*) (*lnu(A/A')*-positive by PCR), a aureolysin gene (*aur-MRSA252*), adhesion genes (*bbp-ST45, clfA-COL+RF122, clfB-MW2, clfB-RF122, cna, fib-MRSA252, ebpS-01-1111, ebps-COL* and *map-MRSA252*), immunoevasion genes (*hsdSx-CC15, hysA1-MRSA252+RF122/hysA2-COL+USA300* and *hysA2-COL+USA300+NCTC*), and genes coding for staphylococcal superantigen-like proteins (*set9/ss14-MRSA252-SAR0425, set3/ss15-MRSA252, set1/ss17-AF188836, setB3-MRSA252* and *setB2-MRSA252*). In contrast, MRSA154N-T1, obtained from donor

MRSA 154N and recipient CA-MRSA SA220c, received only three genes by horizontal transfer, *erm(C)* and *aadD*, as demonstrated by microarray and *tet(L)*, as demonstrated by PCR.

Plasmid extraction and southern hybridization analysis

Plasmid extraction and hybridization assays revealed conjugative transfer of *Inu(A/A')* gene from the donor porcine isolate MRSA 81 to recipient human clinical isolates MRSA CCRI-2023. This gene was located on plasmid bands of 1,9 kb; 2,3 kb; 2,9 kb; 4,3 kb; and 5,4 kb. However, there was no co-localization between the *Inu (A/A')* gene and the other antimicrobial resistance genes. The *erm(A)* and the *tet(M)* genes were not located on plasmid bands. Moreover, plasmid extraction and hybridization assays revealed conjugative transfer of *erm(C)* (plasmid bands of 25,4 kb, 14,2 kb, 2,8 kb, 2,5 kb, 2,1 kb and 1,9 kb), *tet(L)* (plasmid bands of 21,3kb and 11, 6kb) and *aadD* (plasmid bands of 26,4kb, 24,4kb, 21,3kb, 17,2kb) genes from the donor porcine isolate MRSA 154N to the recipient human clinical isolate CA-MRSA SA220c. Co-hybridization of *tetL* and *aadD* genes on a plasmid band of 21.3 kb was observed on transconjugant #1.

Discussion

Healthcare- and community-associated MRSA are important pathogen causing human infections worldwide [88]. LA-MRSA ST398 is rarely reported in human infections [74, 200]. However, pigs have been attributed as one of the main reservoirs of ST398 and humans in close contact with pigs have been identified as being at a greater risk of acquiring this type of MRSA [67, 80, 199]. Because LA-MRSA are seldom involved in clinical infections, one of the major concerns may be in the horizontal transfer of genes, mainly encoding for antimicrobial resistance and possibly virulence attributes, carried by ST398 to other ST types of MRSA of clinical origin found in humans, which would add to the burden of HA- and CA-MRSA.

The current study was conducted to characterize MRSA from abattoir pigs, to study their biofilm formation in relation with *agr* specificity groups and to evaluate horizontal transfer of genes to a MRSA of human clinical origin. It first demonstrated that these MRSA isolates of porcine origin can carry various virulence and antimicrobial resistant genes. More significantly, this study presents the first evidence that horizontal transfer of some of these genes can occur between MRSA of porcine and human origin. We also report for the first time, weak to moderate biofilm formation in LA-MRSA of porcine origin in association with *agr* group II. These findings in association with the detection of biofilm formation and MSCRAMM genes indicate that this process is likely dependent on the *icaADBC*-encoded exopolysaccharide. Thus, these MRSA have a good genetic capacity for adhesion to the host extracellular matrix and for intercellular adhesion

involved in biofilm formation. This likely favors colonization, persistence and zoonotic potential.

In two separate studies, MRSA isolates belonging to *agr* group II were associated with strong biofilm formation [40, 41]. No strong biofilm formation was observed in the MRSA isolates of porcine origin whereas this was observed in human clinical isolates of this study. However, no *agr* group II pig MRSA was categorized as negative-biofilm producers. All microarray characterized pig MRSA isolates possessed genes encoding for biofilm formation (*icaA*, *icaC* and *icaD*) and MSCRAMM genes (*cna*, *ebpS*, *eno*, *clfA* and *clfB*) such as in the MRSA human isolates tested. Thus, no specific association could be found between these genes and biofilm formation. Genes encoding MSCRAMM and biofilm formation (*icaD*, *cna*, *ebpS*, *eno*, *fnbA*, *fnbB*, *clfA* and *clfB*) were recently found in chicken isolates of MRSA ST398 [11]. However, no specific association could be found between the presence of certain MSCRAMM or biofilm genes in these poultry isolates and the isolate's capacity to cause disease nor in biofilm formation as this was not studied. None of the pig MRSA isolates of our study harbored the genes *fnbA* and *fnbB*, encoding for FnBPA and FnBPB respectively. These proteins were shown to promote acid-induced biofilm accumulation in some human clinical MRSA, a process apparently independent of the *icaADBC*-encoded exopolysaccharide [203]. One study showed that human MRSA isolates from device-related infections, possessing both *fnbA* and *fnbB*, produced significantly more biofilm than isolates with either gene alone under mildly acidic growth conditions [39]. Thus, the

absence of these genes in our pig MRSA isolates could partly explain the weak to moderate biofilm formation results.

MRSA isolates of porcine origin of this study were shown to carry various virulence and antimicrobial resistant genes. More significantly, we demonstrated for the first time horizontal transfer of some of these genes between MRSA of porcine and human origin.

Among particular points to note, the transfer of genes coding for staphylococcal superantigen-like proteins was rather particular as this could contribute in enhancing human MRSA virulence. This occurred between porcine MRSA isolate 81 and human MRSA isolate CCRI-2023. Isolate 81 is a MRSA ST398 with a *SCCmec V* element. In the sequenced genome of isolate S0385 LA-MRSA ST398 isolated from a case of human endocarditis, considerable accessory genome content differences relative to other *S. aureus* genomes were identified and several mobile genetic elements that confer antimicrobial resistance were detected, including a novel composite of an type V (5C2&5) *SCCmec* with distinct joining (J) regions. More importantly, the presence of multiple integrative conjugative elements combined with a lack of a type I restriction and modification of on one of the two nuSa islands, could enhance horizontal gene transfer in this isolate [220]. Whereas some porcine MRSA isolates successfully transferred genes to human MRSA isolates, some combinations of porcine and human MRSA isolates revealed no transfer of genes. This was observed between porcine MRSA isolate 81 and CA-MRSA SA220c and between porcine MRSA isolate 154N and MRSA CCRI-2023. These results support a possible plasmid incompatibility process, which is the inability of two plasmids to coexist in the same host cell in the absence of selective

pressure. This is manifested by the inability of a plasmid to establish in a host that already has a plasmid of the same group.

The incompatibility occurs between genetically similar plasmids and can be due to sharing of common elements involved in replication control. Indeed, if two plasmids have the same replication control, they are inconsistent. Fifteen incompatibility groups are known in *S. aureus* [221]. In this study, conjugative plasmids were not placed in any incompatibility groups but were classified into three groups. The type 1 encodes resistance to gentamicin, kanamycin, tobramycin, neomycin, and sometimes resistance to penicillin and ethidium bromide. The type 2 encodes for the production of a unique and diffusible pigment, for resistance to erythromycin and spectinomycin and sometimes resistance to kanamycin, neomycin and streptomycin. Type 3 revealed no resistance phenotypes.

Conjugative transfer of *aadD*, *erm(A)*, *erm(C)*, *tet(L)*, *tet(M)*, *lnu(A/A')*, and *qacC* genes was observed in this study. The genes *erm(A)* and *tet(M)* were not located on plasmid bands in this study. The *erm(A)* gene was previously found on the chromosome and on transposon Tn554 [222], whereas the *tet(M)* gene was described as being on the chromosome and on transposons Tn5801 and Tn916 [220, 222]. The *lnu(A/A')* gene encodes for a lincomycin-nucleotidyltransferase and confers variable resistance levels of different lincosamides such as lincomycin and pirlimycine, but not to clindamycin. This gene was found on five plasmid bands in MRSA81-T68. This is in agreement with the literature which has reported this gene on several small plasmids such as pBMSa (2750

bp) of *S. aureus* and pLNU1 to pLNU9 (ranging from 2278 bp to 3783 bp) of coagulase-negative staphylococci [223, 224]. The first detection of the *lnu(A)* gene in MRSA ST398 has recently been reported in pig-farmers and pigs [137]. The *aadD* gene was found on four plasmid bands in this study, which differ in molecular weights to that which was previously reported (pUB110 of 4,5 kb; pSk41 of 47,8 kb; and pKKS825 of 14, 3 kb) [129, 222]. The *erm(C)* gene was found to be on several plasmid bands ($n=6$) in MRSA154N-T1. Many plasmids (such as pE194 of 3, 7 kb; pSK1 of 28 kb and pUSA03 of 37, 1 kb) have previously been described harboring this gene [219, 222]. Interestingly, the *erm(C)* gene has previously been transferred by conjugation between two isolates of human MRSA USA300 and was located on plasmid pSK4. It was co-transferred with a resistant gene to mupirocin, *mupA* [219]. Finally, the *tet(L)* gene was found on two plasmids in MRSA154N-T1, which are both different in molecular weights from what was previously reported (pKKS2187 of 40 kb; pKKS25 of 40 kb; and pKKS825 of 14,3 kb) [129, 222].

In summary, the current study provides the first evidence of horizontal transfer of some virulence and antimicrobial resistance genes between MRSA of porcine and human origin. We also report for the first time, weak to moderate biofilm formation in LA-MRSA of porcine origin in association with *agr*-group II. Further studies are needed to identify all genes involved in biofilm formation in LA-MRSA of porcine origin and understand their involvement in this process. Also, further work is needed to determine whether the transfer of specific virulence genes from porcine MRSA to human MRSA can enhance virulence in these isolates.

Acknowledgements

This work was funded by grants from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada to M. Archambault (RGPIN-191461), M. Jacques (RGPIN-003428) and to A. Letellier (RGPIN-110911). Dr. Maurice Boissineau is also gratefully acknowledged for providing human MRSA isolates for this study.

Table 1. List of isolates (n=24) selected for further characterization using a microarray^a

MLST and SCCmec^b	MRSA isolate number	Biofilm formation^c	Abattoir source	Antimicrobial resistance phenotype^d	
CC398-MRSA-V	45, 47, 84, 88, 90, 97, 100N	weak	A	TET	
	81	negative	A	CLI, ERY, TET	
	87	weak	A	CLI, ERY, TET	
	91, 101	negative	A	TET	
	96	negative	A	DPT, TET	
	210, 227	weak	B	CLI, ERY, TET	
	107N	weak	A	CLI, TET	
	211N	weak	B	TET	
	CC5-MRSA with atypical SCCmec elements	152N	moderate	A	CLI, ERY, TET
		151, 152, 161, 154N	weak	A	CLI, ERY, TET
288		weak	B	CLI, ERY, TET	
327N		weak	B	-	
CC9-MRSA with atypical SCCmec elements	332	weak	B	ERY, TET	

^a StaphyType array (Alere technologies, Germany)

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

^c Refer to the biofilm formation assay of this study

^d Other than resistance to β -lactams; CLI, clindamycin; DPT, daptomycin; ERY, erythromycin; and TET, tetracycline

Table 2. Relationship between MRSA origin, Agr type and degree of biofilm formation

MRSA origin	Agr types (<i>n</i>) found in biofilm formation category:			
	Negative	Weak	Moderate	High
Porcine	I (20)	I (54) II (19)	I (2) II (12)	-
Human	-	I (2)	I (6) II (6) III (3)	I (4) II (3) III (1)

Table 3. Antimicrobial resistance genotypes of selected isolates ($n=24$) using a microarray^a

MLST and SCCmec (n)	AMR gene (n)	Expected resistance
CC398-MRSA-V (16)	<i>mecA</i> (16)	Beta-lactams
	<i>blaZ</i> (16)	Beta-lactamase
	<i>erm(A)</i> (16)	MLS
	<i>tet(M)</i> (16)	Tetracycline
	<i>tet(K)</i> (14)	Tetracycline
	<i>linA</i> (8)	Lincosamides
	<i>aadD</i> (5)	Aminoglycoside (Tobramycin, Neomycin)
	<i>erm(B)</i> (2)	MLS
	<i>qacC</i> (2)	Unspecific efflux pump
	<i>erm(C)</i> (1)	MLS
	<i>vga</i> (1)	Streptogramine
	CC5-MRSA with atypical SCCmec elements (7)	<i>mecA</i> (7)
<i>blaZ</i> (7)		^b
<i>fosB</i> (7)		Fosfomycin, Bleomycin
<i>vgaA</i> (7)		^b
<i>aadD</i> (6)		^b
<i>erm(C)</i> (6)		^b
<i>mecA</i>		^b
CC9-MRSA (1)	<i>blaZ</i>	^b
	<i>erm(A)</i>	^b
	<i>fosB</i>	^b
	<i>tet(K)</i>	^b
		^b

^a StaphyType array (Alere technologies, Germany)

^b As previously mentioned

Table 4. Virulence genotypes of selected isolates (n=24) using a microarray^a

MLST/SCC<i>mec</i>	Virulence gene	Virulence factor
CC398-MRSA-V (16)	<i>lukX-Y, lukF, lukS, hlgA, hl, hla, hld, hlll, aur isaB, hsdSx, hysA setC, set6, ssl4-5, set1/ssl7, setB1-B3 icaA, icaC, icaD cna, ebpS, eno, clfA, clfB</i>	Leukocidin/Hemol/Aureo Immunoavoidance Superantigen-like proteins Intercol. Adhe./biofilm MSCRAMMs/Adhesion
CC5-MRSA with atypical SCC<i>mec</i> elements (7)	^b <i>lukE, D, hlb mprF sel G, I, selm, seln, sel, selu, egc-cluster splA and splB ssl3</i>	Leukocidin/Hemol/Aureo Immunoavoidance Enterotoxins Serine proteases Superantigen-like proteins
CC9-MRSA (1)	^b <i>chp, isdA, ebh, fib, fnbA-B, map, sdrC,-D, vwb set7, ssl13-19, et4/ssl10</i>	Immunoavoidance MSCRAMMs/Adhesion Superantigen-like proteins

^a StaphyType array (Alere technologies, Germany)

^b Same genes as for CC398-MRSA-V except for the additional genes indicated

Figure 1. Biofilm formation of MRSA of porcine and human origins.

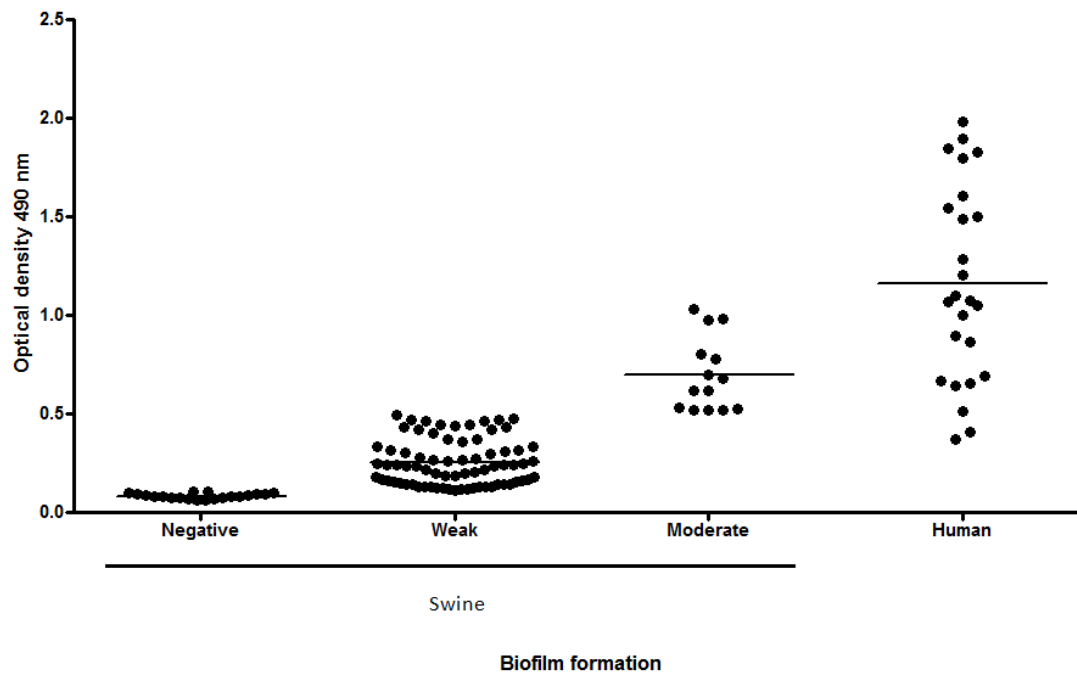


Table S1. Primers used in this study

Primer Sequence 5'-3'	Description	Amplicons (bp)	Reference
F-ATGCACATGGTGCACATGC	<i>agr</i> universal for <i>S. aureus</i>	---	[218]
R-GTCACAAGTACTATAAGCTGCGAT	<i>agr</i> type 1	439	[218]
R-TATTACTAATTGAAAAGTGCCATAGC	<i>agr</i> type 2	572	[218]
R-GTAATGTAATAGCTTGTATAATAATACCCAG	<i>agr</i> type 3	321	[218]
R-CGATAATGCCGTAATACCCG	<i>agr</i> type 4	657	[218]
R-CCTCTGTCTGGGCTTGACC F-TGGCTGTATTAAGCGAAGTC	<i>icaA</i> of <i>S. aureus</i>	669	[217]
F-GCAAGGACCGACAACATTTT R-TGGCACAGATGGTCATAACC	<i>aadD</i>	165	[225]
F-TCTAAAAAGCATGTAAAAGAA R-CTTCGATAGTTTATTAATATTAG	<i>erm(A)</i>	645	[225]
F-TCAAAACATAATATAGATAAA R-GCTAATATTGTTTAAATCGTCAAT	<i>erm(C)</i>	642	[225]
F-GGTGGCTGGGGGGTAGATGTATTAAGTGG R-GCTTCTTTTGAAATACATGGTATTTTTCGATC	<i>lnu (A/A')</i>	323	[225]
F1-CATTGGTCTTATTGGATCG R1-ATTACACTCCGATTTCGG	<i>tet(L)</i>	456	[225]
F-GTGGACAAAGGTACAACGAG R-CGGTAAAGTTCGTCACACAC	<i>tet(M)</i>	406	[226]
F-GGCTTTTCAAATTTATACCATCCT R-ATGCGATGTTCCGAAAATGT	<i>qacC</i>	249	[227]

References

1. Kehrenberg C, Cuny C, Strommenger B, Schwarz S, Witte W (2009) Methicillin-resistant and -susceptible *Staphylococcus aureus* strains of clonal lineages ST398 and ST9 from swine carry the multidrug resistance gene *cfr*. *Antimicrob Agents Chemother* 53: 779-781.
2. de Neeling AJ, van den Broek MJ, Spalburg EC, van Santen-Verheuve MG, Dam-Deisz WD, et al. (2007) High prevalence of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in pigs. *Vet Microbiol* 122: 366-372.
3. de Neeling AJ, van den Broek MJ, Spalburg EC, van Santen-Verheuve MG, Dam-Deisz WD, et al. (2007) High prevalence of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in pigs. *Veterinary Microbiology* 122: 366-372.
4. 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.
5. Huijsdens XW, van Dijke BJ, Spalburg E, van Santen-Verheuve MG, Heck ME, et al. (2006) Community-acquired MRSA and pig-farming. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 5: 26.
6. Declercq P, Petre D, Gordts B, Voss A (2008) Complicated community-acquired soft tissue infection by MRSA from porcine origin. *Infection* 36: 590-592.
7. Ruhlmann CH, Kolmos HJ, Kristiansen JE, Skov R (2008) [Pigs as an infection source for methicillin resistant *Staphylococcus aureus* infections in humans]. *Ugeskr Laeger* 170: 3436.
8. Vanderhaeghen W, Hermans K, Haesebrouck F, Butaye P Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in food production animals. *Epidemiol Infect* 138: 606-625.
9. 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*.
10. Welinder-Olsson C, Floren-Johansson K, Larsson L, Oberg S, Karlsson L, et al. (2008) Infection with Panton-Valentine leukocidin-positive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* t034. *Emerging Infectious Diseases* 14: 1271-1272.
11. Yu F, Chen Z, Liu C, Zhang X, Lin X, et al. (2008) Prevalence of *Staphylococcus aureus* carrying Panton-Valentine leukocidin genes among isolates from hospitalised patients in China. *Clin Microbiol Infect* 14: 381-384.
12. Kadlec K, Ehrlich R, Monecke S, Steinacker U, Kaspar H, et al. (2009) Diversity of antimicrobial resistance pheno- and genotypes of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 from diseased swine. *J Antimicrob Chemother* 64: 1156-1164.
13. van Duijkeren E, Jansen MD, Flemming SC, de Neeling H, Wagenaar JA, et al. (2007) Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in pigs with exudative epidermitis. *Emerg Infect Dis* 13: 1408-1410.
14. Witte W, Strommenger B, Stanek C, Cuny C (2007) Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 in humans and animals, Central Europe. *Emerging Infectious Diseases* 13: 255-258.

15. Kadlec K, Schwarz S (2010) Identification of a plasmid-borne resistance gene cluster comprising the resistance genes *erm(T)*, *dfrK*, and *tet(L)* in a porcine methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 strain. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 54: 915-918.
16. Brody T, Yavatkar AS, Lin Y, Ross J, Kuzin A, et al. (2008) Horizontal gene transfers link a human MRSA pathogen to contagious bovine mastitis bacteria. *PLoS One* 3: e3074.
17. Lindsay JA (2010) Genomic variation and evolution of *Staphylococcus aureus*. *International Journal of Medical Microbiology* 300: 98-103.
18. Ito T, Okuma K, Ma XX, Yuzawa H, Hiramatsu K (2003) Insights on antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* from its whole genome: genomic island SCC. *Drug Resist Updat* 6: 41-52.
19. Jacques M, Aragon V, Tremblay YD (2010) Biofilm formation in bacterial pathogens of veterinary importance. *Anim Health Res Rev* 11: 97-121.
20. Heilmann C, Schweitzer O, Gerke C, Vanittanakom N, Mack D, et al. (1996) Molecular basis of intercellular adhesion in the biofilm-forming *Staphylococcus epidermidis*. *Mol Microbiol* 20: 1083-1091.
21. O'Neill E, Pozzi C, Houston P, Humphreys H, Robinson DA, et al. (2008) A novel *Staphylococcus aureus* biofilm phenotype mediated by the fibronectin-binding proteins, FnBPA and FnBPB. *J Bacteriol* 190: 3835-3850.
22. Lauderdale KJ, Boles BR, Cheung AL, Horswill AR (2009) Interconnections between Sigma B, *agr*, and proteolytic activity in *Staphylococcus aureus* biofilm maturation. *Infect Immun* 77: 1623-1635.
23. Nemati M, Hermans K, Devriese LA, Maes D, Haesebrouck F (2009) Screening of genes encoding adhesion factors and biofilm formation in *Staphylococcus aureus* isolates from poultry. *Avian Pathol* 38: 513-517.
24. Geisinger E, Chen J, Novick RP (2012) Allele-Dependent Differences in Quorum-Sensing Dynamics Result in Variant Expression of Virulence Genes in *Staphylococcus aureus*. *Journal of bacteriology* 194: 2854-2864.
25. Ikonomidis A, Vasdeki A, Kristo I, Maniatis AN, Tsakris A, et al. (2009) Association of biofilm formation and methicillin-resistance with accessory gene regulator (*agr*) loci in Greek *Staphylococcus aureus* clones. *Microb Pathog* 47: 341-344.
26. Novick RP, Geisinger E (2008) Quorum sensing in staphylococci. *Annu Rev Genet* 42: 541-564.
27. Jarraud S, Lyon GJ, Figueiredo AM, Lina G, Vandenesch F, et al. (2000) Exfoliatin-producing strains define a fourth *agr* specificity group in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 182: 6517-6522.
28. Ji G, Beavis R, Novick RP (1997) Bacterial interference caused by autoinducing peptide variants. *Science* 276: 2027-2030.
29. Cafiso V, Bertuccio T, Santagati M, Demelio V, Spina D, et al. (2007) *agr*-Genotyping and transcriptional analysis of biofilm-producing *Staphylococcus aureus*. *FEMS Immunol Med Microbiol* 51: 220-227.
30. Jarraud S, Mougel C, Thioulouse J, Lina G, Meugnier H, et al. (2002) Relationships between *Staphylococcus aureus* genetic background, virulence factors, *agr* groups (alleles), and human disease. *Infect Immun* 70: 631-641.

31. Gillet Y, Issartel B, Vanhems P, Fournet JC, Lina G, et al. (2002) Association between *Staphylococcus aureus* strains carrying gene for Panton-Valentine leukocidin and highly lethal necrotising pneumonia in young immunocompetent patients. *Lancet* 359: 753-759.
32. Tristan A, Bes M, Meugnier H, Lina G, Bozdogan B, et al. (2007) Global distribution of Panton-Valentine leukocidin--positive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, 2006. *Emerg Infect Dis* 13: 594-600.
33. P MD, Affas Z, Reynolds C, Holden MT, Wood SJ, et al. (2001) Structure, activity and evolution of the group I thiolactone peptide quorum-sensing system of *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol* 41: 503-512.
34. Wright JS, 3rd, Traber KE, Corrigan R, Benson SA, Musser JM, et al. (2005) The agr radiation: an early event in the evolution of staphylococci. *J Bacteriol* 187: 5585-5594.
35. Beaudry-Ferland M, Pelletier-Jacques G, Letellier A, Talbot B, Monière-Wollank H, et al. (2012) Characterization of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) Strains from Abattoir Pigs and Association between Colonization and Low Seroconversion.
36. Mitchell G, Seguin DL, Asselin AE, Deziel E, Cantin AM, et al. (2010) *Staphylococcus aureus* sigma B-dependent emergence of small-colony variants and biofilm production following exposure to *Pseudomonas aeruginosa* 4-hydroxy-2-heptylquinoline-N-oxide. *BMC Microbiol* 10: 33.
37. Arciola CR, Collamati S, Donati E, Montanaro L (2001) A rapid PCR method for the detection of slime-producing strains of *Staphylococcus epidermidis* and *S. aureus* in periprosthetic infections. *Diagn Mol Pathol* 10: 130-137.
38. Rohde H, Burandt EC, Siemssen N, Frommelt L, Burdelski C, et al. (2007) Polysaccharide intercellular adhesin or protein factors in biofilm accumulation of *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus* isolated from prosthetic hip and knee joint infections. *Biomaterials* 28: 1711-1720.
39. Lina G, Boutite F, Tristan A, Bes M, Etienne J, et al. (2003) Bacterial competition for human nasal cavity colonization: role of Staphylococcal agr alleles. *Appl Environ Microbiol* 69: 18-23.
40. 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. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 65: 619-625.
41. McDougal LK, Fosheim GE, Nicholson A, Bulens SN, Limbago BM, et al. (2010) Emergence of resistance among USA300 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates causing invasive disease in the United States. *Antimicrob Agents Chemother* 54: 3804-3811.
42. 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.
43. O'Neill E, Humphreys H, O'Gara JP (2009) Carriage of both the fnbA and fnbB genes and growth at 37 degrees C promote FnBP-mediated biofilm development in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical isolates. *J Med Microbiol* 58: 399-402.

44. Schijffelen MJ, Boel CH, van Strijp JA, Fluit AC (2010) Whole genome analysis of a livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 isolate from a case of human endocarditis. *BMC Genomics* 11: 376.
45. Udo EE, Grubb WB (1991) A new incompatibility group plasmid in *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiol Lett* 62: 33-36.
46. Jensen SO, Lyon BR (2009) Genetics of antimicrobial resistance in *Staphylococcus aureus*. *Future Microbiol* 4: 565-582.
47. Loeza-Lara PD, Soto-Huipe M, Baizabal-Aguirre VM, Ochoa-Zarzosa A, Valdez-Alarcon JJ, et al. (2004) pBMSa1, a plasmid from a dairy cow isolate of *Staphylococcus aureus*, encodes a lincomycin resistance determinant and replicates by the rolling-circle mechanism. *Plasmid* 52: 48-56.
48. Luthje P, Schwarz S (2007) Molecular basis of resistance to macrolides and lincosamides among staphylococci and streptococci from various animal sources collected in the resistance monitoring program BfT-GermVet. *Int J Antimicrob Agents* 29: 528-535.
49. Lozano C, Aspiroz C, Ara M, Gomez-Sanz E, Zarazaga M, et al. (2011) Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) ST398 in a farmer with skin lesions and in pigs of his farm: clonal relationship and detection of *lnu(A)* gene. *Clin Microbiol Infect* 17: 923-927.
50. Kadlec K, Schwarz S (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: 3589-3591.
51. 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* 7: 1269-1277.
52. De Leener E, Martel A, Decostere A, Haesebrouck F (2004) Distribution of the *erm* (B) gene, tetracycline resistance genes, and Tn1545-like transposons in macrolide- and lincosamide-resistant enterococci from pigs and humans. *Microb Drug Resist* 10: 341-345.
53. Zmantar T, Kouidhi B, Miladi H, Bakhrouf A (2011) Detection of macrolide and disinfectant resistance genes in clinical *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci. *BMC Res Notes* 4: 453.

3. DISCUSSION GÉNÉRALE

Les CA- et HA-SARM sont d'important pathogènes en médecine humaine à l'échelle mondiale [88]. Le LA-SARM ST398 est rarement rapporté dans les infections humaines [73, 74] [13]. Cependant, les porcs ont été identifiés comme principal réservoir de ce type de SARM et les humains en contact étroit avec les porcs semblent plus à risque de contracter ce SARM [67, 80, 199]. Bien que le SARM ST398 soit rarement retrouvé dans les cas d'infections chez l'homme, une autre problématique demeure, soit celle du transfert horizontal de gènes, principalement ceux codant pour la résistance aux antibiotiques et possiblement pour des attributs de virulence, des SARM ST398 aux autres types de ST retrouvés chez l'humain, surtout les ST d'origine clinique. Ce transfert de gènes pourrait contribuer à amplifier la problématique des HA- et CA-SARM.

Une étude de notre laboratoire a mis en évidence des prévalences de SARM de 30,8% et 23,8% dans deux abattoirs porcins du Québec. C'est la première étude au Canada qui démontre la présence de SARM ST398 dans des abattoirs et qui présente leur résistance aux antibiotiques. Le présent projet de recherche avait comme objectifs d'identifier les gènes de virulence et de résistance aux antibiotiques de ces SARM, de vérifier la localisation plasmidique et la transférabilité de ces gènes à des souches de SARM d'origine humaine, puis d'étudier la formation de biofilm de ces souches. Ces travaux démontrent que le SARM d'origine porcine possède une variété de gènes de résistance aux antibiotiques et de virulence. Cette étude met en évidence pour la première fois le transfert horizontal de certains de ces gènes entre des SARM d'origine porcine et humaine. Nous rapportons également pour la première fois la formation de biofilm chez le LA-SARM en association à un *agr* groupe-II. Ces résultats en association avec la présence de gènes MSCRAMM (microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules) indiquent que le processus de formation de biofilm est probablement dépendent des exopolysaccharides

codés par les gènes *icaADBC*. Ces SARM ont donc une bonne capacité génétique pour l'adhésion à la matrice extracellulaire et à l'adhésion intercellulaire impliquées dans la formation du biofilm. Ceci favorise fort probablement la colonisation et le potentiel zoonotique de ces SARM.

Au total, 107 isolats de SARM ont été identifiés dans l'étude effectuée dans notre laboratoire. Nous avons observé que 29% des souches étaient résistantes à l'érythromycine, un macrolide et la clindamycine, une lincosamides. Ces résultats concordent avec les résultats obtenue aux États-Unis [219], mais différent d'avec ceux de l'Europe où les souches de SARM sont aussi résistantes aux fluoroquinolones et aux aminoglycosides [12, 16, 70]. De plus, presque toutes les souches (98,1%) étaient résistantes à la tétracycline, ce qui concorde fortement avec la littérature et reflètent l'utilisation des tétracyclines en élevage porcin [67, 80]. En effet, la résistance à la tétracycline pourrait avoir été sélectionnée et maintenue dans la population porcine par la sur-utilisation de la tétracycline dans les fermes. Une souche résistante à la daptomycine a également été détectée (souche #96 de l'abattoir A) avec une CMI de 2 µg/ml, et à notre connaissance, il s'agit du premier cas de résistance à la daptomycine rapportée chez des SARM porcins. Plusieurs souches ont démontré différents patrons phénotypiques de résistance aux antibiotiques (Article 2, Tableau 2). Ce qui est comparable à la littérature, puisque plusieurs études montrent des souches de SARM ayant plusieurs résistances à différents antibiotiques. En effet, dans la littérature, les souches de SARM semblent avoir des patrons phénotypiques différents, sauf pour la résistance à la tétracycline qui est toujours présente [12, 15, 16, 63].

Par la suite, un sous-groupe représentatif de ces isolats de SARM ($n=24$) a été soumis à une caractérisation plus approfondie. L'étude a permis de caractériser le SARM chez les porcs d'abattoir, d'étudier leur formation de biofilm en relation avec la spécificité des groupes *agr* et d'évaluer le transfert horizontal de gènes à des SARM cliniques d'origine humaine. Cette étude a d'abord montré que ces isolats de SARM d'origine porcine peuvent porter divers gènes de virulence et de résistance aux antibiotiques. Plus important encore, cette étude présente pour la première fois que le transfert horizontal de certains de ces gènes peut se produire entre le SARM d'origine porcine et humaine. Nous rapportons également pour la première fois, la formation de biofilm, de faible à modérée, dans LA-SARM d'origine porcine en association avec un *agr* groupe II. Ces résultats, en association avec la détection de la formation de biofilms et les gènes MSCRAMM, indiquent que ce processus dépend probablement des gènes *icaADBC* codant pour des exopolysaccharides. Ainsi, ces SARM ont une bonne capacité génétique pour l'adhérence à la matrice extracellulaire et pour l'adhésion intercellulaire impliquée dans la formation de biofilm. C'est probablement ce qui favorise la colonisation, la persistance et leur potentiel zoonotique.

La caractérisation par des tests de PCR et de biopuce à ADN a permis d'identifier des gènes de virulence et de résistance aux antibiotiques. Un nombre important de gènes de virulence a été détecté par biopuce: des entérotoxines staphylococcales (*entG*, *entI*, *entM*, *entN*, *entO* et *entU*), des leucocidines (*lukD*, *lukE*, *lukF*, *lukM*, *lukS*, *lukX*, *lukY*), des hémolysines (*hla*, *hlb*, *hlgA*, *hld*), des auréolysines (*aur*), des gènes d'immunoévasion (*isaB*, *hsdSx*, *hysA*), des gènes codant pour des protéines de superantigènes staphylococcales (*setC*, *set6*, *set9/ss14*, *set3/ss15*, *set1/ss17*, *setB1*, *setB2*, *setB3*), des gènes codant pour la formation de biofilm (*icaA*, *C* et *D*) et des gènes d'adhésion (*cna*, *ebpS*, *eno*,

clfA et *clfB*). Les gènes de résistance *aadD*, *erm(B)*, *erm(C)*, *erm(A)*, *lnu(A/A')*, *tet(M)*, *tet(L)*, *tet(K)* et *qacC*, responsables respectivement de la résistance envers les aminoglycosides, les macrolides, les lincosamides, les tétracyclines et les biocides ont été également détectés. Les profils d'hybridation par biopuce, ont révélé deux patrons de gènes différents selon que les souches de SARM porcine possèdent un SCCmec V (*erm(A)*, *lukX*, *lukY* et parfois *erm(B)*, *tet(K)*, *tet(M)*) ou un SCCmec inconnu (*erm(C)*, *vga*, *aadD*, *fosB*, *entG*, I, M, N, O, U, *egc*-cluster et *lukE*, D, X, et Y). Aucun gène d'entérotoxine n'a été observé chez les SARM ST398 SCCmec V de cette étude et ceux-ci portaient peu de gènes de virulence, ce qui est en accord avec des études allemande et française. Ces études ont séquencé des SARM ST398 SCCmec V et ils ont montré que ces souches portaient moins de gènes de virulence tel que les entérotoxines, mais avaient tout de même des hémolysines [63, 89].

Nous avons ensuite évalué la capacité de formation de biofilm des 107 souches porcines en relation avec les groupes de spécificité de type *agr*. Le système *agr* est un système à deux-composantes et contrôle les facteurs de surface et les cytotoxines et enzymes sécrétés en coordination avec les changements de concentration d'une phéromone sécrétée fort probablement en réponse à une densité de population ou à un quorum [228]. Le locus *agr* a largement divergé parmi les souches de *S. aureus*. Il en résulte quatre groupes spécifiques (Type I à IV). Les SARM *agr*-groupe II ont été associés à une surproduction de biofilm [207, 208] [40, 41]. Notre étude a démontré que les souches de SARM d'origine porcine formaient faiblement ou modérément du biofilm. Mais aucune de ces souches ayant un *agr* type II n'étaient dans la catégorie des producteurs négatifs de biofilm. Toutes les souches porcines et humaines de SARM caractérisées par biopuce possédaient des gènes codant pour la formation de biofilm (*icaA*, *icaC* et *icaD*) et codant pour des facteurs d'adhésion

(*cna*, *ebpS*, *eno*, *clfA* et *clfB*). Nous ne pouvons donc pas faire d'association entre ces gènes et la formation de biofilm puisque certaines souches porcines ne faisaient aucun biofilm. Les gènes codant pour des facteurs d'adhésion ainsi que pour la formation de biofilm (*icaD*, *cna*, *ebpS*, *eno*, *fnbA*, *fnbB*, *clfA* and *clfB*) ont été récemment trouvés chez des souches de SARMS ST398 provenant de poulets [11]. Cependant, cette étude n'a pu faire aucune association entre la présence de ces gènes et la capacité des isolats de causer des maladies, mais malheureusement, la formation de biofilm n'était pas étudiée dans cet article. Aucune des souches de SARM porcine ne possédait les gènes *fnbA* et *fnbB*, qui codent pour FnBPA et FnBPB respectivement. Ces protéines ont été montrées comme induisant l'accumulation de biofilm induit par acide dans des souches cliniques humaines de SARM, un processus apparemment indépendant des gènes *icaADBC* qui codent pour des exopolysaccharides [39]. Une étude montre que les souches de SARM humaines provenant d'infections qui possèdent *fnbA* et *fnbB* produisent significativement plus de biofilm que les isolats qui n'ont qu'un seul des deux gènes dans des conditions de croissance légèrement acide [39]. Ainsi, l'absence de ces gènes dans les souches de SARM porcines pourrait expliquer en partie les résultats de formation de biofilm allant de faible à modérée.

Nous avons également réalisé des études de conjugaison pour évaluer la transférabilité des gènes de résistance aux antibiotiques et de virulence à des SARM d'origine humaine. Nos résultats démontrent pour la première fois le transfert horizontal de certains de ces gènes entre des SARM d'origine porcine et humaine. Parmi les points à remarquer, le transfert de gènes codant pour des protéines 'staphylococcal superantigen-like' a été surprenant car ceci pourrait contribuer à augmenter la virulence des SARM d'origine humaine. Jusqu'à maintenant, les gènes codant pour les protéines 'staphylococcal superantigen-like' ont surtout été rapportés sur des phages tels que le phage type 187 et sur

des îlots de pathogénicité tel que l'îlot de pathogénicité mobile de 15 kb, SaPII [229, 230]. Ce transfert de gènes a été réalisé entre les souches de SARM-81 porcine et SARM-CCRI-2023 humaine. La souche 81 est un SARM ST398 SCC*mec* V. Des différences considérables dans le contenu des génomes accessoires relatifs aux autres génomes de *S. aureus* ont été identifiées dans le génome séquencé de la souche S0385 LA-SARM ST398 isolée d'un cas d'endocardite humaine. Plusieurs éléments génétiques mobiles conférant de la résistance aux antibiotiques ont été détectés, incluant un nouvel SCC*mec* composite de type V (5C2&5) avec des régions de jonctions (J) distinctes. De plus, la présence de multiples éléments conjugatifs intégrés combinée à une absence de site de restriction de Type I et une modification de un des deux îlots nuSa, pourrait augmenter le transfert génétique horizontal dans cette souche [220]. Pendant que certaines souches de SARM d'origine porcine transféraient avec succès à des SARM d'origine humaine, d'autres combinaisons de souches de SARM porcine et humaine ne révélaient aucun transfert. Ceci a été observé entre le SARM-81 porcine et le CA-SARM SA220c humain et entre le SARM-154N porcine et le SARM CCRI-2023 humain. Ces résultats supportent un possible processus d'incompatibilité plasmidique qui résulte en l'incapacité de deux plasmides de coexister dans la même bactérie. Ceci se manifeste par l'incapacité d'un plasmide de s'établir dans un hôte qui possède déjà un plasmide du même groupe. Quinze groupes d'incompatibilité plasmidique sont connus chez *S. aureus* [231].

Le transfert conjugatif des gènes *aadD*, *erm(A)*, *erm(C)*, *tet(L)*, *tet(M)*, *lnu(A/A')*, et *qacC* a été observé dans cette étude. Les gènes *erm(A)* et *tet(M)* n'ont pas été localisés sur des bandes plasmidiques dans cette étude. Le gène *erm(A)* a été précédemment retrouvé sur le chromosome et sur un transposon Tn554 [222], tandis que le gène *tet(M)* a été décrit sur le chromosome et sur les transposons Tn5801 et Tn916 [220, 222]. Le gène *lnu(A/A')*

code pour une nucléotidyltransférase et confère une résistance variable à la lincomycine et la pirlimycine, mais pas à la clindamycine. Ce gène a été trouvé sur cinq bandes plasmidiques chez le transconjuguant 68. Ceci est en accord avec la littérature qui rapporte ce gène sur plusieurs petits plasmides tels pBMSa (2750 pb) de *S. aureus* et pLNU1 à pLNU9 (2278 bp à 3783 pb) de staphylocoque coagulase négative [223, 232]. La première détection du gène *lnu(A)* chez le SARM ST398 a été récemment rapportée chez le porc et les éleveurs de porc [137]. Le gène *aadD* a été trouvé sur quatre bandes plasmidiques dans cette étude et associés à des poids moléculaires différents de ceux précédemment rapportés (pUB110 de 4,5 kb; pSk41 de 47,8 kb; et pKKS825 de 14,3 kb) [15, 222]. Le gène *erm(C)* a été trouvé sur plusieurs bandes plasmidiques ($n=6$) chez le transconjuguant 1. Plusieurs plasmides (pE194 de 3,7 kb; pSK1 de 28 kb, et pUSA03 de 37,1 kb) possédant ce gène ont été précédemment décrits [219, 222]. De plus, il a été précédemment transféré par conjugaison entre deux souches humaines de SARM USA300 et localisé sur le plasmide pSK4 et co-transféré avec un gène de résistance à la mupirocine, *mupA* [219]. Finalement, le gène *tet(L)* a été localisé sur deux bandes plasmidiques chez le transconjuguant 1. Elles ont des poids moléculaires différents de ce qui a été déjà décrit (pKKS2187 de 40 kb; pKKS25 de 40 kb; et pKKS825 de 14,3 kb) [128, 222].

En conclusion, la présente étude met en évidence pour la première fois le transfert horizontal de certains gènes de virulence et de résistance aux antibiotiques entre les SARM d'origine porcine et humaine. De plus, nous décrivons pour la première fois également la formation de biofilm chez le LA-SARM et établissons une association à un *agr*-groupe II. Des études subséquentes seront nécessaires à l'identification de tous les gènes impliqués dans la formation de biofilm chez le LA-SARM d'origine porcine et pour comprendre leur implication dans ce processus. De plus, d'autres études seront nécessaires afin de

déterminer si le transfert de gènes de virulence spécifique des SARM d'origine porcine à des SARM d'origine humaine peut augmenter la virulence de ces dernières.

4. CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Ces travaux de recherche représentent la première étude portant sur les gènes de résistance et de virulence des SARM porcins au Québec et chez le porc à l'abattoir au Canada. Nos résultats démontrent également pour la première fois la capacité de former du biofilm des SARM porcins ainsi que le transfert de gènes de résistance aux antibiotiques et de virulence à des souches de SARM d'origine humaine.

Les gènes de résistance aux antibiotiques ont été localisés sur des plasmides et il serait intéressant de savoir si les gènes de virulence ayant été transférés par conjugaison sont également plasmidiques. De plus, le transfert de gènes de résistance aux antibiotiques de souches porcines à des souches humaines augmenterait considérablement les risques associés aux SARM porcins pour la santé humaine. Ceci diminuerait la facilité à traiter ces SARM. Nos recherches ont démontré que les souches de SARM d'origine porcine étaient porteuses de plusieurs gènes de virulence, ces souches représentent donc un risque pour la santé humaine. De plus, il serait important de savoir si ces SARM peuvent persister dans l'environnement des abattoirs et si le biofilm confère un avantage aux souches de SARM dans cet environnement. Des études seront nécessaires pour permettre l'identification de tous les gènes impliqués dans la formation de biofilm chez les SARM d'origine porcine et pour comprendre leur implication dans ce processus. De plus, des études de virulence *in vivo* pourraient être effectuées afin de déterminer si le transfert de gènes de virulence spécifique des SARM d'origine porcine à des SARM d'origine humaine peut augmenter la virulence de ces dernières.

Chez les porcs, les SARM semble être des colonisateurs des voies nasales et de la peau. Par contre, ces SARM se transmettent facilement aux humains en contact étroit avec les porcs. Ceux-ci sont donc plus à risque de les transmettre à leurs familles et à leurs amis. De plus, puisque les antibiotiques utilisés dans l'industrie porcine ne sont pas tous

les mêmes que ceux utilisés en médecine humaine, nous nous retrouvons avec des bactéries ayant potentiellement des résistances à de nombreuses classes d'antibiotiques. Ces bactéries sont encore plus difficiles à soigner, car elles sont résistantes aux antibiotiques normalement utilisés en médecine humaine ainsi qu'à ceux utilisés en industrie porcine. La recherche sur les bactéries ayant de multiples résistances aux antibiotiques tel le SARM est nécessaire à une meilleure compréhension du phénomène de la résistance aux antibiotiques. Une meilleure connaissance des facteurs de virulence et du phénomène de colonisation et de propagation du SARM et de leurs résistances aux antibiotiques permettra de mettre en place de meilleure mesure de gestion du SARM dans les abattoirs, les fermes ainsi que dans les hôpitaux humains.

BIBLIOGRAPHIE

1. Boucher, H.W. and G.R. Corey, *Epidemiology of methicillin-resistant Staphylococcus aureus*. Clinical Infectious Diseases, 2008. **46 Suppl 5**: p. S344-9.
2. Harper, A.L., et al., *An overview of livestock-associated MRSA in agriculture*. J Agromedicine, 2010. **15**(2): p. 101-4.
3. Kim, T., P.I. Oh, and A.E. Simor, *The economic impact of methicillin-resistant Staphylococcus aureus in Canadian hospitals*. Infection Control and Hospital Epidemiology, 2001. **22**(2): p. 99-104.
4. Walther, B., et al., *Comparative molecular analysis substantiates zoonotic potential of equine methicillin-resistant Staphylococcus aureus*. Journal of Clinical Microbiology, 2009. **47**(3): p. 704-10.
5. Cuny, C., et al., *Emergence of MRSA infections in horses in a veterinary hospital: strain characterisation and comparison with MRSA from humans*. Euro Surveill, 2006. **11**(1): p. 44-7.
6. Juhasz-Kaszanyitzky, E., et al., *MRSA transmission between cows and humans*. Emerging Infectious Diseases, 2007. **13**(4): p. 630-2.
7. Moodley, A., et al., *spa typing of methicillin-resistant Staphylococcus aureus isolated from domestic animals and veterinary staff in the UK and Ireland*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2006. **58**(6): p. 1118-23.
8. Walther, B., et al., *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) isolated from small and exotic animals at a university hospital during routine microbiological examinations*. Veterinary Microbiology, 2008. **127**(1-2): p. 171-8.
9. Persoons, D., et al., *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus in poultry*. Emerg Infect Dis, 2009. **15**(3): p. 452-3.
10. Nemati, M., et al., *Antimicrobial resistance of old and recent Staphylococcus aureus isolates from poultry: first detection of livestock-associated methicillin-resistant strain ST398*. Antimicrob Agents Chemother, 2008. **52**(10): p. 3817-9.
11. Nemati, M., et al., *Screening of genes encoding adhesion factors and biofilm formation in Staphylococcus aureus isolates from poultry*. Avian Pathol, 2009. **38**(6): p. 513-7.
12. Kock, R., et al., *Prevalence and molecular characteristics of methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) among pigs on German farms and import of livestock-related MRSA into hospitals*. European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 2009. **28**(11): p. 1375-82.
13. Golding, G.R., et al., *Livestock-associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus sequence type 398 in humans, Canada*. Emerg Infect Dis. **16**(4): p. 587-94.
14. Devriese, L.A., L.R. Van Damme, and L. Fameree, *Methicillin (cloxacillin)-resistant Staphylococcus aureus strains isolated from bovine mastitis cases*. Zentralbl Veterinarmed B, 1972. **19**(7): p. 598-605.
15. Kadlec, K., et al., *Diversity of antimicrobial resistance pheno- and genotypes of methicillin-resistant Staphylococcus aureus ST398 from diseased swine*. J Antimicrob Chemother, 2009. **64**(6): p. 1156-64.
16. Aspiroz, C., et al., *Skin lesion caused by ST398 and ST1 MRSA, Spain*. Emerg Infect Dis. **16**(1): p. 157-9.
17. EFSA, *Assessment of the Public Health significance of methicillin resistant Staphylococcus aureus (MRSA) in animals and foods*. The European Food Safety Authority, 2009(993): p. 1-73.
18. Weese, J.S. and E. van Duijkeren, *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus and Staphylococcus pseudintermedius in veterinary medicine*. Vet Microbiol. **140**(3-4): p. 418-29.

19. Deurenberg, R.H. and E.E. Stobberingh, *The evolution of Staphylococcus aureus*. Infect Genet Evol, 2008. **8**(6): p. 747-63.
20. Sevin, E., O. Larmaraud-Sevin, and P. Legrand, *Approche moléculaire de la résistance à la méthicilline de Staphylococcus aureus*. Revue Francaise des Laboratoires, 1999(315): p. 25-31.
21. CLSI, *Surveillance for Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus : Principles, Practices, and Challenges ; A Report*, 2010, Clinical and Laboratory standards institute.
22. Catry, B., et al., *Reflection paper on MRSA in food-producing and companion animals: epidemiology and control options for human and animal health*. Epidemiol Infect. **138**(5): p. 626-44.
23. Vanderhaeghen, W., et al., *Species and staphylococcal cassette chromosome mec (SCCmec) diversity among methicillin-resistant non-Staphylococcus aureus staphylococci isolated from pigs*. Vet Microbiol, 2012.
24. Valvatne, H., et al., *A rapid, 2-well, multiplex real-time polymerase chain reaction assay for the detection of SCCmec types I to V in methicillin-resistant Staphylococcus aureus*. Diagn Microbiol Infect Dis, 2009. **65**(4): p. 384-91.
25. Monecke, S., et al., *Distribution of SCCmec-associated phenol-soluble modulins in staphylococci*. Mol Cell Probes, 2012.
26. Van Cleef, B.A., et al., *High prevalence of nasal MRSA carriage in slaughterhouse workers in contact with live pigs in The Netherlands*. Epidemiol Infect. **138**(5): p. 756-63.
27. van Duijkeren, E., et al., *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus in pigs with exudative dermatitis*. Emerg Infect Dis, 2007. **13**(9): p. 1408-10.
28. Morgan, M., *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus and animals: zoonosis or humanosis?* Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2008. **62**(6): p. 1181-7.
29. Vanderhaeghen, W., et al., *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) in food production animals*. Epidemiol Infect. **138**(5): p. 606-25.
30. Gordon, R.J. and F.D. Lowy, *Pathogenesis of methicillin-resistant Staphylococcus aureus infection*. Clin Infect Dis, 2008. **46 Suppl 5**: p. S350-9.
31. Hasman, H., et al., *Spa type distribution in Staphylococcus aureus originating from pigs, cattle and poultry*. Vet Microbiol. **141**(3-4): p. 326-31.
32. Golding, G.R., et al., *A comparison of risk factors associated with community-associated methicillin-resistant and -susceptible Staphylococcus aureus infections in remote communities*. Epidemiol Infect. **138**(5): p. 730-7.
33. Christianson, S., et al., *Comparative genomics of Canadian epidemic lineages of methicillin-resistant Staphylococcus aureus*. J Clin Microbiol, 2007. **45**(6): p. 1904-11.
34. van Loo, I.H., et al., *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus in meat products, the Netherlands*. Emerging Infectious Diseases, 2007. **13**(11): p. 1753-5.
35. Durai, R., P.C. Ng, and H. Hoque, *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus: an update*. Aorn J. **91**(5): p. 599-606; quiz 607-9.
36. Dissemond, J., *Methicillin resistant Staphylococcus aureus (MRSA): Diagnostic, clinical relevance and therapy*. J Dtsch Dermatol Ges, 2009. **7**(6): p. 544-51; quiz 552-3.
37. Schlievert, P.M., et al., *Secreted virulence factor comparison between methicillin-resistant and methicillin-sensitive Staphylococcus aureus, and its relevance to atopic dermatitis*. J Allergy Clin Immunol. **125**(1): p. 39-49.

38. Mitchell, G., et al., *Staphylococcus aureus SigB activity promotes a strong fibronectin-bacterium interaction which may sustain host tissue colonization by small-colony variants isolated from cystic fibrosis patients*. Molecular Microbiology, 2008. **70**(6): p. 1540-55.
39. O'Neill, E., H. Humphreys, and J.P. O'Gara, *Carriage of both the fnbA and fnbB genes and growth at 37 degrees C promote FnBP-mediated biofilm development in methicillin-resistant Staphylococcus aureus clinical isolates*. J Med Microbiol, 2009. **58**(Pt 4): p. 399-402.
40. Ikonomidis, A., et al., *Association of biofilm formation and methicillin-resistance with accessory gene regulator (agr) loci in Greek Staphylococcus aureus clones*. Microb Pathog, 2009. **47**(6): p. 341-4.
41. Cafiso, V., et al., *agr-Genotyping and transcriptional analysis of biofilm-producing Staphylococcus aureus*. FEMS Immunol Med Microbiol, 2007. **51**(1): p. 220-7.
42. Gorwitz, R.J., *Understanding the success of methicillin-resistant Staphylococcus aureus strains causing epidemic disease in the community*. Journal of Infectious Diseases, 2008. **197**(2): p. 179-82.
43. Boyle-Vavra, S. and R.S. Daum, *Community-acquired methicillin-resistant Staphylococcus aureus: the role of Panton-Valentine leukocidin*. Laboratory Investigation, 2007. **87**(1): p. 3-9.
44. Labandeira-Rey, M., et al., *Staphylococcus aureus Panton-Valentine leukocidin causes necrotizing pneumonia*. Science, 2007. **315**(5815): p. 1130-3.
45. Bae, I.G., et al., *Presence of genes encoding the panton-valentine leukocidin exotoxin is not the primary determinant of outcome in patients with complicated skin and skin structure infections due to methicillin-resistant Staphylococcus aureus: results of a multinational trial*. Journal of Clinical Microbiology, 2009. **47**(12): p. 3952-7.
46. Bubeck Wardenburg, J., et al., *Panton-Valentine leukocidin is not a virulence determinant in murine models of community-associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus disease*. Journal of Infectious Diseases, 2008. **198**(8): p. 1166-70.
47. Voyich, J.M., et al., *Is Panton-Valentine leukocidin the major virulence determinant in community-associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus disease?* Journal of Infectious Diseases, 2006. **194**(12): p. 1761-70.
48. Bannerman, T.L. and S.J. Peacock *Staphylococcus, Micrococcus, and Other Catalase-Positive Cocci*, in *Manual of clinical microbiology* 2007, ASM press: Washington, D.C.
49. Diep, B.A., et al., *The arginine catabolic mobile element and staphylococcal chromosomal cassette mec linkage: convergence of virulence and resistance in the USA300 clone of methicillin-resistant Staphylococcus aureus*. J Infect Dis, 2008. **197**(11): p. 1523-30.
50. Voss, A., et al., *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus in pig farming*. Emerging Infectious Diseases, 2005. **11**(12): p. 1965-6.
51. Armand-Lefevre, L., R. Ruimy, and A. Andremont, *Clonal comparison of Staphylococcus aureus isolates from healthy pig farmers, human controls, and pigs*. Emerging Infectious Diseases, 2005. **11**(5): p. 711-4.
52. Witte, W., et al., *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus ST398 in humans and animals, Central Europe*. Emerging Infectious Diseases, 2007. **13**(2): p. 255-8.
53. Meemken, D., et al., *[Occurrence of MRSA in pigs and in humans involved in pig production--preliminary results of a study in the northwest of Germany]*. Deutsche Tierärztliche Wochenschrift, 2008. **115**(4): p. 132-9.
54. Wulf, M. and A. Voss, *MRSA in livestock animals-an epidemic waiting to happen?* Clin Microbiol Infect, 2008. **14**(6): p. 519-21.
55. Khanna, T., et al., *Methicillin resistant Staphylococcus aureus colonization in pigs and pig farmers*. Vet Microbiol, 2008. **128**(3-4): p. 298-303.
56. Denis, O., et al., *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus ST398 in swine farm personnel, Belgium*. Emerging Infectious Diseases, 2009. **15**(7): p. 1098-101.

57. van de Giessen, A.W., et al., *Occurrence of methicillin-resistant Staphylococcus aureus in rats living on pig farms*. Preventive Veterinary Medicine, 2009. **91**(2-4): p. 270-3.
58. Smith, T.C., et al., *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) strain ST398 is present in midwestern U.S. swine and swine workers*. PLoS One, 2009. **4**(1): p. e4258.
59. van Rijen, M.M., P.H. Van Keulen, and J.A. Kluytmans, *Increase in a Dutch hospital of methicillin-resistant Staphylococcus aureus related to animal farming*. Clinical Infectious Diseases, 2008. **46**(2): p. 261-3.
60. Welinder-Olsson, C., et al., *Infection with Panton-Valentine leukocidin-positive methicillin-resistant Staphylococcus aureus t034*. Emerging Infectious Diseases, 2008. **14**(8): p. 1271-2.
61. Yu, F., et al., *Prevalence of Staphylococcus aureus carrying Panton-Valentine leukocidin genes among isolates from hospitalised patients in China*. Clin Microbiol Infect, 2008. **14**(4): p. 381-4.
62. Graveland, H., et al., *Persistence of livestock associated MRSA CC398 in humans is dependent on intensity of animal contact*. PLoS One, 2011. **6**(2): p. e16830.
63. Argudin, M.A., et al., *Virulence and resistance determinants of German Staphylococcus aureus ST398 isolates from nonhuman sources*. Appl Environ Microbiol, 2011. **77**(9): p. 3052-60.
64. Hallin, M., et al., *Diversity of accessory genome of human and livestock-associated ST398 methicillin resistant Staphylococcus aureus strains*. Infect Genet Evol, 2011. **11**(2): p. 290-9.
65. Alt, K., et al., *Factors associated with the occurrence of MRSA CC398 in herds of fattening pigs in Germany*. BMC Vet Res, 2011. **7**(1): p. 69.
66. Broens, E.M., et al., *Prevalence and risk factor analysis of livestock associated MRSA-positive pig herds in The Netherlands*. Prev Vet Med, 2011.
67. de Neeling, A.J., et al., *High prevalence of methicillin resistant Staphylococcus aureus in pigs*. Veterinary Microbiology, 2007. **122**(3-4): p. 366-72.
68. van Belkum, A., et al., *Methicillin-resistant and -susceptible Staphylococcus aureus sequence type 398 in pigs and humans*. Emerging Infectious Diseases, 2008. **14**(3): p. 479-83.
69. Tenhagen, B.A., et al., *Prevalence of MRSA types in slaughter pigs in different German abattoirs*. Vet Rec, 2009. **165**(20): p. 589-93.
70. Gomez-Sanz, E., et al., *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, 2010.
71. Horgan, M., et al., *A study of the prevalence of methicillin-resistant Staphylococcus aureus in pigs and in personnel involved in the pig industry in Ireland*. Vet J, 2010.
72. Sergio, D.M., et al., *Investigation of methicillin-resistant Staphylococcus aureus in pigs used for research*. Journal of Medical Microbiology, 2007. **56**(Pt 8): p. 1107-9.
73. Ruhlmann, C.H., et al., *[Pigs as an infection source for methicillin resistant Staphylococcus aureus infections in humans]*. Ugeskrift for Laeger, 2008. **170**(43): p. 3436.
74. Declercq, P., et al., *Complicated community-acquired soft tissue infection by MRSA from porcine origin*. Infection, 2008. **36**(6): p. 590-2.
75. Lozano, C., et al., *Skin lesion by methicillin-resistant Staphylococcus aureus ST398-t1451 in a Spanish pig farmer: possible transmission from animals to humans*. Vector Borne Zoonotic Dis, 2011. **11**(6): p. 605-7.
76. Broens, E.M., et al., *Quantification of transmission of livestock-associated methicillin resistant Staphylococcus aureus in pigs*. Vet Microbiol, 2011.

77. Espinosa-Gongora, C., et al., *Farm-specific lineages of methicillin-resistant Staphylococcus aureus clonal complex 398 in Danish pig farms*. *Epidemiol Infect*, 2011: p. 1-6.
78. Hartmeyer, G.N., et al., *Pig-associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus: family transmission and severe pneumonia in a newborn*. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*, 2010. **42**(4): p. 318-20.
79. van Cleef, B.A., et al., *Prevalence of livestock-associated MRSA in communities with high pig-densities in The Netherlands*. *PLoS One*. **5**(2): p. e9385.
80. van Duijkeren, E., et al., *Transmission of methicillin-resistant Staphylococcus aureus strains between different kinds of pig farms*. *Vet Microbiol*, 2008. **126**(4): p. 383-9.
81. Angulo, F.J., V.N. Nargund, and T.C. Chiller, *Evidence of an association between use of anti-microbial agents in food animals and anti-microbial resistance among bacteria isolated from humans and the human health consequences of such resistance*. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health*, 2004. **51**(8-9): p. 374-9.
82. Graveland, H., et al., *Methicillin resistant Staphylococcus aureus ST398 in veal calf farming: human MRSA carriage related with animal antimicrobial usage and farm hygiene*. *PLoS One*, 2010. **5**(6): p. e10990.
83. Aarestrup, F.M., L. Cavaco, and H. Hasman, *Decreased susceptibility to zinc chloride is associated with methicillin resistant Staphylococcus aureus CC398 in Danish swine*. *Veterinary Microbiology*, 2010. **142**(3-4): p. 455-7.
84. Lewis, H.C., et al., *Pigs as source of methicillin-resistant Staphylococcus aureus CC398 infections in humans, Denmark*. *Emerging Infectious Diseases*, 2008. **14**(9): p. 1383-9.
85. Garcia-Graells, C., et al., *Livestock veterinarians at high risk of acquiring methicillin-resistant Staphylococcus aureus ST398*. *Epidemiol Infect*, 2011: p. 1-7.
86. de Jonge, R., J.E. Verdier, and A.H. Havelaar, *Prevalence of methicillin-resistant Staphylococcus aureus amongst professional meat handlers in the Netherlands, March-July 2008*. *Euro Surveill*, 2010. **15**(46).
87. Ferber, D., *Infectious disease. From pigs to people: the emergence of a new superbug*. *Science*, 2010. **329**(5995): p. 1010-1.
88. Kehrenberg, C., et al., *Methicillin-resistant and -susceptible Staphylococcus aureus strains of clonal lineages ST398 and ST9 from swine carry the multidrug resistance gene cfr*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2009. **53**(2): p. 779-81.
89. Fessler, A., et al., *Characterization of methicillin-resistant Staphylococcus aureus ST398 from cases of bovine mastitis*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2010. **65**(4): p. 619-25.
90. Kluytmans, J.A., *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus in food products: cause for concern or case for complacency?* *Clin Microbiol Infect*, 2010. **16**(1): p. 11-5.
91. Furuya, E.Y. and F.D. Lowy, *Antimicrobial-resistant bacteria in the community setting*. *Nat Rev Microbiol*, 2006. **4**(1): p. 36-45.
92. Hamdad, F., et al., *[Performance of different methods of oxacillin resistance detection in atypical strains of Staphylococcus aureus]*. *Pathol Biol (Paris)*, 2006. **54**(8-9): p. 447-52.
93. CLSI, *Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated From Animals ; Approved Standard-Third Edition*. Clinical and laboratory standards institute, 2008. **28**(8).
94. Argudin, M.A., et al., *High heterogeneity within methicillin-resistant Staphylococcus aureus ST398 isolates, defined by Cfr9I macrorestriction-pulsed-field gel electrophoresis profiles and spa and SCCmec types*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2010. **76**(3): p. 652-8.
95. de Boer, E., et al., *Prevalence of methicillin-resistant Staphylococcus aureus in meat*. *International Journal of Food Microbiology*, 2009. **134**(1-2): p. 52-6.

96. Mulders, M.N., et al., *Prevalence of livestock-associated MRSA in broiler flocks and risk factors for slaughterhouse personnel in The Netherlands*. *Epidemiology and Infection*, 2010. **138**(5): p. 743-55.
97. Rivero-Perez, B., E. Perez-Roth, and S. Mendez-Alvarez, *Evaluation of multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis for typing a polyclonal hospital-acquired methicillin-resistant Staphylococcus aureus population in an area where such infections are endemic*. *Journal of Clinical Microbiology*, 2010. **48**(8): p. 2991-4.
98. Sabat, A., et al., *New method for typing Staphylococcus aureus strains: multiple-locus variable-number tandem repeat analysis of polymorphism and genetic relationships of clinical isolates*. *Journal of Clinical Microbiology*, 2003. **41**(4): p. 1801-4.
99. Pourcel, C., et al., *Improved multiple-locus variable-number tandem-repeat assay for Staphylococcus aureus genotyping, providing a highly informative technique together with strong phylogenetic value*. *Journal of Clinical Microbiology*, 2009. **47**(10): p. 3121-8.
100. Sobral, D., et al., *High throughput multiple locus variable number of tandem repeat analysis (MLVA) of Staphylococcus aureus from human, animal and food sources*. *PLoS One*, 2012. **7**(5): p. e33967.
101. Grohs, P., *[Trends in Staphylococcus aureus antimicrobials susceptibilities: is methicillin still a relevant multiresistance marker?]*. *Pathologie Biologie*, 2009. **57**(1): p. 1-8.
102. Leonard, F.C. and B.K. Markey, *Meticillin-resistant Staphylococcus aureus in animals: a review*. *Veterinary Journal*, 2008. **175**(1): p. 27-36.
103. CLSI, *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing ; Twentieth Informational Supplement*. Clinical and laboratory standards institute, 2010. **30**(1).
104. Monecke, S. and R. Ehricht, *Rapid genotyping of methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) isolates using miniaturised oligonucleotide arrays*. *Clin Microbiol Infect*, 2005. **11**(10): p. 825-33.
105. Garneau, P., et al., *Diagnostic microarray dor antimicrobial resistance bacterial gene (ABG) identification*. *Journal of Zoonoses and Public Health*, 2010(In press, SP-8).
106. Scicluna, E.A., et al., *Characterisation of MRSA from Malta and the description of a Maltese epidemic MRSA strain*. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 2010. **29**(2): p. 163-70.
107. Monecke, S., et al., *Microarray based study on virulence-associated genes and resistance determinants of Staphylococcus aureus isolates from cattle*. *Vet Microbiol*, 2007. **125**(1-2): p. 128-40.
108. Zhu, L.X., et al., *Use of a DNA microarray for simultaneous detection of antibiotic resistance genes among staphylococcal clinical isolates*. *J Clin Microbiol*, 2007. **45**(11): p. 3514-21.
109. Spence, R.P., et al., *Validation of virulence and epidemiology DNA microarray for identification and characterization of Staphylococcus aureus isolates*. *J Clin Microbiol*, 2008. **46**(5): p. 1620-7.
110. Otsuka, J., et al., *Development and validation of microarray-based assay for epidemiological study of MRSA*. *Molecular and Cellular Probes*, 2008. **22**(1): p. 1-13.
111. Wax, R.G., et al., *Bacterial resistance to antimicrobials*. Second edition ed2008: CRC Press, Taylor and Francis Group.
112. Cohn, L.A. and J.R. Middleton, *A veterinary perspective on methicillin-resistant staphylococci*. *J Vet Emerg Crit Care (San Antonio)*, 2010. **20**(1): p. 31-45.
113. Ito, T., et al., *Insights on antibiotic resistance of Staphylococcus aureus from its whole genome: genomic island SCC*. *Drug Resist Updat*, 2003. **6**(1): p. 41-52.
114. Andersson, D.I. and D. Hughes, *Antibiotic resistance and its cost: is it possible to reverse resistance?* *Nat Rev Microbiol*, 2010. **8**(4): p. 260-71.

115. Prescott, L.M., J.P. Harley, and D.A. Klein, *Microbiologie*. 2nd ed2003, Bruxelles: De Boeck et Larcier s.a.
116. Walther, B., et al., [*Methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) in veterinary medicine: a "new emerging pathogen"?*]. *Berliner und Munchener Tierarztliche Wochenschrift*, 2006. **119**(5-6): p. 222-32.
117. vet, C., *Des Staphylocoques résistants à la méthicilline (MRSA) dans les porcheries : une menace pour la santé publique?* *Folia Veterinaria* 2008(1).
118. Brody, T., et al., *Horizontal gene transfers link a human MRSA pathogen to contagious bovine mastitis bacteria*. *PLoS One*, 2008. **3**(8): p. e3074.
119. Lindsay, J.A., *Genomic variation and evolution of Staphylococcus aureus*. *International Journal of Medical Microbiology*, 2010. **300**(2-3): p. 98-103.
120. Betley, M.J. and J.J. Mekalanos, *Staphylococcal enterotoxin A is encoded by phage*. *Science*, 1985. **229**(4709): p. 185-7.
121. Kaneko, J., et al., *Complete nucleotide sequence and molecular characterization of the temperate staphylococcal bacteriophage phiPVL carrying Panton-Valentine leukocidin genes*. *Gene*, 1998. **215**(1): p. 57-67.
122. van Wamel, W.J., et al., *The innate immune modulators staphylococcal complement inhibitor and chemotaxis inhibitory protein of Staphylococcus aureus are located on beta-hemolysin-converting bacteriophages*. *Journal of Bacteriology*, 2006. **188**(4): p. 1310-5.
123. Lindsay, J.A., et al., *The gene for toxic shock toxin is carried by a family of mobile pathogenicity islands in Staphylococcus aureus*. *Molecular Microbiology*, 1998. **29**(2): p. 527-43.
124. Guinane, C.M., et al., *Pathogenomic analysis of the common bovine Staphylococcus aureus clone (ET3): emergence of a virulent subtype with potential risk to public health*. *Journal of Infectious Diseases*, 2008. **197**(2): p. 205-13.
125. O'Neill, A.J., et al., *Characterization of the epidemic European fusidic acid-resistant impetigo clone of Staphylococcus aureus*. *Journal of Clinical Microbiology*, 2007. **45**(5): p. 1505-10.
126. Khan, S.A., *Plasmid rolling-circle replication: highlights of two decades of research*. *Plasmid*, 2005. **53**(2): p. 126-36.
127. Berg, T., et al., *Complete nucleotide sequence of pSK41: evolution of staphylococcal conjugative multiresistance plasmids*. *Journal of Bacteriology*, 1998. **180**(17): p. 4350-9.
128. Kadlec, K. and S. Schwarz, *Identification of a plasmid-borne resistance gene cluster comprising the resistance genes erm(T), dfrK, and tet(L) in a porcine methicillin-resistant Staphylococcus aureus ST398 strain*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2010. **54**(2): p. 915-8.
129. Kadlec, K. and S. Schwarz, *Novel ABC transporter gene, vga(C), located on a multiresistance plasmid from a porcine methicillin-resistant Staphylococcus aureus ST398 strain*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2009. **53**(8): p. 3589-91.
130. Rowland, S.J. and K.G. Dyke, *Characterization of the staphylococcal beta-lactamase transposon Tn552*. *EMBO Journal*, 1989. **8**(9): p. 2761-73.
131. Mlynarczyk, A., G. Mlynarczyk, and M. Luczak, [*Conjugative transfer of glycopeptide and macrolide resistant genes among Enterococci and from Enterococcus faecalis to Staphylococcus aureus*]. *Medycyna Doswiadczalna i Mikrobiologia*, 2002. **54**(1): p. 21-8.
132. Clark, N.C., et al., *Comparison of Tn1546-like elements in vancomycin-resistant Staphylococcus aureus isolates from Michigan and Pennsylvania*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2005. **49**(1): p. 470-2.
133. Waldron, D.E. and J.A. Lindsay, *SauI: a novel lineage-specific type I restriction-modification system that blocks horizontal gene transfer into Staphylococcus aureus and between S. aureus isolates of different lineages*. *Journal of Bacteriology*, 2006. **188**(15): p. 5578-85.

134. Sung, J.M., D.H. Lloyd, and J.A. Lindsay, *Staphylococcus aureus* host specificity: comparative genomics of human versus animal isolates by multi-strain microarray. *Microbiology*, 2008. **154**(Pt 7): p. 1949-59.
135. Cavaco, L.M., H. Hasman, and F.M. Aarestrup, *Zinc resistance of Staphylococcus aureus of animal origin is strongly associated with methicillin resistance*. *Vet Microbiol*, 2011. **150**(3-4): p. 344-8.
136. Fessler, A.T., K. Kadlec, and S. Schwarz, *Novel apramycin resistance gene apmA in bovine and porcine methicillin-resistant Staphylococcus aureus ST398 isolates*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2011. **55**(1): p. 373-5.
137. Lozano, C., et al., *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) ST398 in a farmer with skin lesions and in pigs of his farm: clonal relationship and detection of lnu(A) gene*. *Clin Microbiol Infect*, 2011. **17**(6): p. 923-7.
138. Schwendener, S. and V. Perreten, *New transposon Tn6133 in MRSA ST398 contains vga(E), a novel streptogramin A-, pleuromutilin-, and lincosamide-resistance gene*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2011.
139. Bordon, J., et al., *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus resistance to non-beta-lactam antimicrobials in the United States from 1996 to 2008*. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 2010. **67**(4): p. 395-8.
140. Zhanel, G.G., et al., *Characterization of methicillin-resistant Staphylococcus aureus, vancomycin-resistant enterococci and extended-spectrum beta-lactamase-producing Escherichia coli in intensive care units in Canada: Results of the Canadian National Intensive Care Unit (CAN-ICU) study (2005-2006)*. *Can J Infect Dis Med Microbiol*, 2008. **19**(3): p. 243-9.
141. Rehm, S.J. and A. Tice, *Staphylococcus aureus: methicillin-susceptible S. aureus to methicillin-resistant S. aureus and vancomycin-resistant S. aureus*. *Clinical Infectious Diseases*, 2010. **51** Suppl 2: p. S176-82.
142. Loomba, P.S., J. Taneja, and B. Mishra, *Methicillin and Vancomycin Resistant S. aureus in Hospitalized Patients*. *J Glob Infect Dis*, 2010. **2**(3): p. 275-83.
143. Sharma, N., et al., *Correlation between loss of renal function and loss of renal volume after partial nephrectomy for tumor in a solitary kidney*. *J Urol*, 2008. **179**(4): p. 1284-8.
144. Berger-Bachi, B. and S. Rohrer, *Factors influencing methicillin resistance in staphylococci*. *Arch Microbiol*, 2002. **178**(3): p. 165-71.
145. Catry, B., et al., *Reflection paper on MRSA in food-producing and companion animals: epidemiology and control options for human and animal health*. *Epidemiol Infect*, 2010. **138**(5): p. 626-44.
146. Leonard, F.C. and B.K. Markey, *Meticillin-resistant Staphylococcus aureus in animals: a review*. *Vet J*, 2008. **175**(1): p. 27-36.
147. Van den Eede, A., et al., *High occurrence of methicillin-resistant Staphylococcus aureus ST398 in equine nasal samples*. *Vet Microbiol*, 2009. **133**(1-2): p. 138-44.
148. van Duijkeren, E., et al., *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus in horses and horse personnel: an investigation of several outbreaks*. *Vet Microbiol*, 2009. **141**(1-2): p. 96-102.
149. Garcia-Alvarez, L., et al., *Meticillin-resistant Staphylococcus aureus with a novel mecA homologue in human and bovine populations in the UK and Denmark: a descriptive study*. *Lancet Infect Dis*, 2011. **11**(8): p. 595-603.
150. Hartmeyer, G.N., et al., *Pig-associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus: family transmission and severe pneumonia in a newborn*. *Scand J Infect Dis*, 2010. **42**(4): p. 318-20.
151. Van Hoecke, H., et al., *Destructive otomastoiditis by MRSA from porcine origin*. *Laryngoscope*, 2009. **119**(1): p. 137-40.
152. Voss, A., et al., *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus in pig farming*. *Emerg Infect Dis*, 2005. **11**(12): p. 1965-6.

153. Wagenaar, J.A., et al., *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, 2009.
154. Lewis, H.C., et al., *Pigs as Source of Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus CC398 Infections in Humans, Denmark*. Emerg Infect Dis, 2008. **14**(9): p. 1383-1384.
155. Pan, A., et al., *Community-acquired methicillin-resistant Staphylococcus aureus ST398 infection, Italy*. Emerg Infect Dis, 2009. **15**(5): p. 845-7.
156. Kock, R., et al., *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, 2009. **28**(11): p. 1375-82.
157. Denis, O., et al., *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus ST398 in Swine Farm Personnel, Belgium*. Emerg Infect Dis, 2009. **15**(7).
158. Neela, V., et al., *Prevalence Of St-9 Mrsa Among Pigs And Pig Handlers In Malaysia*. J Clin Microbiol, 2009.
159. Van Cleef, B.A., et al., *High prevalence of nasal MRSA carriage in slaughterhouse workers in contact with live pigs in The Netherlands*. Epidemiol Infect, 2010. **138**(5): p. 756-63.
160. Meemken, D., et al., *Livestock Associated Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus (LaMRSA) Isolated from Lesions of Pigs at Necropsy in Northwest Germany Between 2004 and 2007*. Zoonoses Public Health, 2009.
161. Battisti, A., et al., *Heterogeneity among methicillin-resistant Staphylococcus aureus from Italian pig finishing holdings*. Vet Microbiol, 2009.
162. Armand-Lefevre, L., R. Ruimy, and A. Andreumont, *Clonal comparison of Staphylococcus aureus isolates from healthy pig farmers, human controls, and pigs*. Emerg Infect Dis, 2005. **11**(5): p. 711-4.
163. Cui, S., et al., *Isolation and characterization of methicillin-resistant Staphylococcus aureus from swine and workers in China*. J Antimicrob Chemother, 2009.
164. Aspiroz, C., et al., *Skin lesion caused by ST398 and ST1 MRSA, Spain*. Emerg Infect Dis, 2010. **16**(1): p. 157-9.
165. van Loo, I.H., et al., *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus in meat products, the Netherlands*. Emerg Infect Dis, 2007. **13**(11): p. 1753-5.
166. de Boer, E., et al., *Prevalence of methicillin-resistant Staphylococcus aureus in meat*. Int J Food Microbiol, 2009. **134**(1-2): p. 52-6.
167. Skaar, E.P. and O. Schneewind, *Iron-regulated surface determinants (Isd) of Staphylococcus aureus: stealing iron from heme*. Microbes Infect, 2004. **6**(4): p. 390-7.
168. Dryla, A., et al., *Identification of a novel iron regulated staphylococcal surface protein with haptoglobin-haemoglobin binding activity*. Mol Microbiol, 2003. **49**(1): p. 37-53.
169. Torres, V.J., et al., *Staphylococcus aureus IsdB is a hemoglobin receptor required for heme iron utilization*. J Bacteriol, 2006. **188**(24): p. 8421-9.
170. Mazmanian, S.K., et al., *Passage of heme-iron across the envelope of Staphylococcus aureus*. Science, 2003. **299**(5608): p. 906-9.
171. Allard, M., et al., *Transcriptional modulation of some Staphylococcus aureus iron-regulated genes during growth in vitro and in a tissue cage model in vivo*. Microbes Infect, 2006. **8**(7): p. 1679-90.
172. Barski, P., et al., *Rapid assay for detection of methicillin-resistant Staphylococcus aureus using multiplex PCR*. Mol Cell Probes, 1996. **10**(6): p. 471-5.

173. Mehrotra, M., G. Wang, and W.M. Johnson, *Multiplex PCR for detection of genes for Staphylococcus aureus enterotoxins, exfoliative toxins, toxic shock syndrome toxin 1, and methicillin resistance*. J Clin Microbiol, 2000. **38**(3): p. 1032-5.
174. Tenover, F.C., et al., *Multiple-locus variable-number tandem-repeat assay analysis of methicillin-resistant Staphylococcus aureus strains*. J Clin Microbiol, 2007. **45**(7): p. 2215-9.
175. Zhang, K., et al., *Novel multiplex PCR assay for characterization and concomitant subtyping of staphylococcal cassette chromosome mec types I to V in methicillin-resistant Staphylococcus aureus*. J Clin Microbiol, 2005. **43**(10): p. 5026-33.
176. *Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals; Approved Standard-Third Edition*. CLSI document M31-A3, Clinical and Laboratory Standards Institute 2008. **Vol. 28 No.8**.
177. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Approved Standard- Twentieth Informational Supplement*. CLSI document M 100-S20, Clinical and Laboratory Standards Institute 2010. **Vol. 31 No. 1**.
178. Fessler, A., et al., *Characterization of methicillin-resistant Staphylococcus aureus ST398 from cases of bovine mastitis*. J Antimicrob Chemother, 2010. **65**(4): p. 619-25.
179. Ster, C., et al., *Evaluation of some Staphylococcus aureus iron-regulated proteins as vaccine targets*. Vet Immunol Immunopathol, 2010. **136**: p. 311-318.
180. Ster, C., et al., *Evaluation of some Staphylococcus aureus iron-regulated proteins as vaccine targets*. Vet Immunol Immunopathol, 2010. **136**(3-4): p. 311-8.
181. de Neeling, A.J., et al., *High prevalence of methicillin resistant Staphylococcus aureus in pigs*. Vet Microbiol, 2007. **122**(3-4): p. 366-72.
182. Crombe, F., et al., *Prevalence and antimicrobial susceptibility of methicillin-resistant Staphylococcus aureus among pigs in Belgium*. Microb Drug Resist, 2012. **18**(2): p. 125-31.
183. Lina, G., et al., *Distribution of genes encoding resistance to macrolides, lincosamides, and streptogramins among staphylococci*. Antimicrob Agents Chemother, 1999. **43**(5): p. 1062-6.
184. Denis, O., et al., *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, 2002. **50**(5): p. 755-7.
185. Bishburg, E. and K. Bishburg, *Minocycline--an old drug for a new century: emphasis on methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) and Acinetobacter baumannii*. Int J Antimicrob Agents, 2009. **34**(5): p. 395-401.
186. Mangili, A., et al., *Daptomycin-resistant, methicillin-resistant Staphylococcus aureus bacteremia*. Clin Infect Dis, 2005. **40**(7): p. 1058-60.
187. Skiest, D.J., *Treatment failure resulting from resistance of Staphylococcus aureus to daptomycin*. J Clin Microbiol, 2006. **44**(2): p. 655-6.
188. Cui, L., et al., *Correlation between Reduced Daptomycin Susceptibility and Vancomycin Resistance in Vancomycin-Intermediate Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother, 2006. **50**(3): p. 1079-82.
189. Huber, H., et al., *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, 2010. **15**(16).
190. Kadlec, K., et al., *Diversity of antimicrobial resistance pheno- and genotypes of methicillin-resistant Staphylococcus aureus ST398 from diseased swine*. J Antimicrob Chemother, 2009.
191. Smith, T.C., et al., *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) strain ST398 is present in midwestern U.S. swine and swine workers*. PLoS ONE, 2008. **4**(1): p. e4258.

192. Li, S., et al., *Novel types of staphylococcal cassette chromosome mec elements identified in CC398 methicillin resistant Staphylococcus aureus strains*. Antimicrob Agents Chemother, 2011.
193. Hanssen, A.M. and J.U. Ericson Sollid, *SCCmec in staphylococci: genes on the move*. FEMS Immunol Med Microbiol, 2006. **46**(1): p. 8-20.
194. Sabat, A., et al., *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, 2003. **41**(4): p. 1801-4.
195. McCarthy, A.J. and J.A. Lindsay, *Genetic variation in Staphylococcus aureus surface and immune evasion genes is lineage associated: implications for vaccine design and host-pathogen interactions*. BMC Microbiol, 2010. **10**: p. 173.
196. Pruneau, M., et al., *Transcriptional analysis of antibiotic resistance and virulence genes in multiresistant hospital-acquired MRSA*. FEMS Immunol Med Microbiol, 2011.
197. Dumont, A.L., et al., *Characterization of a new cytotoxin that contributes to Staphylococcus aureus pathogenesis*. Mol Microbiol, 2011. **79**(3): p. 814-25.
198. Boucher, H., L.G. Miller, and R.R. Razonable, *Serious infections caused by methicillin-resistant Staphylococcus aureus*. Clin Infect Dis, 2010. **51 Suppl 2**: p. S183-97.
199. Huijsdens, X.W., et al., *Community-acquired MRSA and pig-farming*. Ann Clin Microbiol Antimicrob, 2006. **5**: p. 26.
200. Ruhlmann, C.H., et al., *[Pigs as an infection source for methicillin resistant Staphylococcus aureus infections in humans]*. Ugeskr Laeger, 2008. **170**(43): p. 3436.
201. Jacques, M., V. Aragon, and Y.D. Tremblay, *Biofilm formation in bacterial pathogens of veterinary importance*. Anim Health Res Rev, 2010. **11**(2): p. 97-121.
202. Heilmann, C., et al., *Molecular basis of intercellular adhesion in the biofilm-forming Staphylococcus epidermidis*. Mol Microbiol, 1996. **20**(5): p. 1083-91.
203. O'Neill, E., et al., *A novel Staphylococcus aureus biofilm phenotype mediated by the fibronectin-binding proteins, FnBPA and FnBPB*. J Bacteriol, 2008. **190**(11): p. 3835-50.
204. Lauderdale, K.J., et al., *Interconnections between Sigma B, agr, and proteolytic activity in Staphylococcus aureus biofilm maturation*. Infect Immun, 2009. **77**(4): p. 1623-35.
205. Geisinger, E., J. Chen, and R.P. Novick, *Allele-Dependent Differences in Quorum-Sensing Dynamics Result in Variant Expression of Virulence Genes in Staphylococcus aureus*. Journal of bacteriology, 2012. **194**(11): p. 2854-64.
206. Novick, R.P. and E. Geisinger, *Quorum sensing in staphylococci*. Annu Rev Genet, 2008. **42**: p. 541-64.
207. Jarraud, S., et al., *Exfoliatin-producing strains define a fourth agr specificity group in Staphylococcus aureus*. J Bacteriol, 2000. **182**(22): p. 6517-22.
208. Ji, G., R. Beavis, and R.P. Novick, *Bacterial interference caused by autoinducing peptide variants*. Science, 1997. **276**(5321): p. 2027-30.
209. Jarraud, S., et al., *Relationships between Staphylococcus aureus genetic background, virulence factors, agr groups (alleles), and human disease*. Infect Immun, 2002. **70**(2): p. 631-41.
210. Gillet, Y., et al., *Association between Staphylococcus aureus strains carrying gene for Pantone-Valentine leukocidin and highly lethal necrotising pneumonia in young immunocompetent patients*. Lancet, 2002. **359**(9308): p. 753-9.

211. Tristan, A., et al., *Global distribution of Pantone-Valentine leukocidin--positive methicillin-resistant Staphylococcus aureus*, 2006. *Emerg Infect Dis*, 2007. **13**(4): p. 594-600.
212. P, M.D., et al., *Structure, activity and evolution of the group I thiolactone peptide quorum-sensing system of Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol*, 2001. **41**(2): p. 503-12.
213. Wright, J.S., 3rd, et al., *The agr radiation: an early event in the evolution of staphylococci*. *J Bacteriol*, 2005. **187**(16): p. 5585-94.
214. Beaudry-Ferland, M., et al., *Characterization of Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus (MRSA) Strains from Abattoir Pigs and Association between Colonization and Low Seroconversion*, 2012.
215. Mitchell, G., et al., *Staphylococcus aureus sigma B-dependent emergence of small-colony variants and biofilm production following exposure to Pseudomonas aeruginosa 4-hydroxy-2-heptylquinoline-N-oxide*. *BMC Microbiol*, 2010. **10**: p. 33.
216. Arciola, C.R., et al., *A rapid PCR method for the detection of slime-producing strains of Staphylococcus epidermidis and S. aureus in periprosthetic infections*. *Diagn Mol Pathol*, 2001. **10**(2): p. 130-7.
217. Rohde, H., et al., *Polysaccharide intercellular adhesin or protein factors in biofilm accumulation of Staphylococcus epidermidis and Staphylococcus aureus isolated from prosthetic hip and knee joint infections*. *Biomaterials*, 2007. **28**(9): p. 1711-20.
218. Lina, G., et al., *Bacterial competition for human nasal cavity colonization: role of Staphylococcal agr alleles*. *Appl Environ Microbiol*, 2003. **69**(1): p. 18-23.
219. McDougal, L.K., et al., *Emergence of resistance among USA300 methicillin-resistant Staphylococcus aureus isolates causing invasive disease in the United States*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2010. **54**(9): p. 3804-11.
220. Schijffelen, M.J., et al., *Whole genome analysis of a livestock-associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus ST398 isolate from a case of human endocarditis*. *BMC Genomics*, 2010. **11**: p. 376.
221. Udo, E.E. and W.B. Grubb, *A new incompatibility group plasmid in Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiol Lett*, 1991. **62**(1): p. 33-6.
222. Jensen, S.O. and B.R. Lyon, *Genetics of antimicrobial resistance in Staphylococcus aureus*. *Future Microbiol*, 2009. **4**(5): p. 565-82.
223. Loeza-Lara, P.D., et al., *pBMSa1, a plasmid from a dairy cow isolate of Staphylococcus aureus, encodes a lincomycin resistance determinant and replicates by the rolling-circle mechanism*. *Plasmid*, 2004. **52**(1): p. 48-56.
224. Luthje, P. and S. Schwarz, *Molecular basis of resistance to macrolides and lincosamides among staphylococci and streptococci from various animal sources collected in the resistance monitoring program BfT-GermVet*. *Int J Antimicrob Agents*, 2007. **29**(5): p. 528-35.
225. Gomez-Sanz, E., et al., *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*, 2010. **7**(10): p. 1269-77.
226. De Leener, E., et al., *Distribution of the erm (B) gene, tetracycline resistance genes, and Tn1545-like transposons in macrolide- and lincosamide-resistant enterococci from pigs and humans*. *Microb Drug Resist*, 2004. **10**(4): p. 341-5.
227. Zmantar, T., et al., *Detection of macrolide and disinfectant resistance genes in clinical Staphylococcus aureus and coagulase-negative staphylococci*. *BMC Res Notes*, 2011. **4**: p. 453.
228. Novick, R.P., P. Schlievert, and A. Ruzin, *Pathogenicity and resistance islands of staphylococci*. *Microbes Infect*, 2001. **3**(7): p. 585-94.

229. Piechowicz, L., K. Garbacz, and J. Galinski, *Staphylococcus aureus* of phage type 187 isolated from people occurred to be a genes carrier of enterotoxin C and toxic shock syndrome toxin-1 (TSST-1). *Int J Hyg Environ Health*, 2008. **211**(3-4): p. 273-82.
230. Ruzin, A., J. Lindsay, and R.P. Novick, *Molecular genetics of SaP11--a mobile pathogenicity island in Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol*, 2001. **41**(2): p. 365-77.
231. Udo, E.E. and W.B. Grubb, *A new incompatibility group plasmid in Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiology Letters*, 1991. **62**(1): p. 33-6.
232. Luthje, P., M. von Kockritz-Blickwede, and S. Schwarz, *Identification and characterization of nine novel types of small staphylococcal plasmids carrying the lincosamide nucleotidyltransferase gene lnu(A)*. *J Antimicrob Chemother*, 2007. **59**(4): p. 600-6.
233. Devriese, L.A. and J. Hommez, *Epidemiology of methicillin-resistant Staphylococcus aureus in dairy herds*. *Research in Veterinary Science*, 1975. **19**(1): p. 23-7.
234. Scott, G.M., et al., *Cross-infection between animals and man: possible feline transmission of Staphylococcus aureus infection in humans?* *Journal of Hospital Infection*, 1988. **12**(1): p. 29-34.
235. Smith, M.M., P.B. Vasseur, and H.M. Saunders, *Bacterial growth associated with metallic implants in dogs*. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 1989. **195**(6): p. 765-7.
236. Cefai, C., S. Ashurst, and C. Owens, *Human carriage of methicillin-resistant Staphylococcus aureus linked with pet dog*. *Lancet*, 1994. **344**(8921): p. 539-40.
237. Anzai, T., et al., *Isolation of methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) from mares with metritis and its zooepidemiology*. *Journal of Equine Science*, 1996(7): p. 7-11.
238. Hartmann, F.A., S.S. Trostle, and A.A. Klohn, *Isolation of methicillin-resistant Staphylococcus aureus from a postoperative wound infection in a horse*. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 1997. **211**(5): p. 590-2.
239. Shimizu, A., et al., *Genetic analysis of equine methicillin-resistant Staphylococcus aureus by pulsed-field gel electrophoresis*. *Journal of Veterinary Medical Science*, 1997. **59**(10): p. 935-7.
240. Lilenbaum, W., E.L. Nunes, and M.A. Azeredo, *Prevalence and antimicrobial susceptibility of staphylococci isolated from the skin surface of clinically normal cats*. *Letters in Applied Microbiology*, 1998. **27**(4): p. 224-8.
241. Seguin, J.C., et al., *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus outbreak in a veterinary teaching hospital: potential human-to-animal transmission*. *Journal of Clinical Microbiology*, 1999. **37**(5): p. 1459-63.
242. Pak, S.I., H.R. Han, and A. Shimizu, *Characterization of methicillin-resistant Staphylococcus aureus isolated from dogs in Korea*. *Journal of Veterinary Medical Science*, 1999. **61**(9): p. 1013-8.
243. Tomlin, J., et al., *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus infections in 11 dogs*. *Veterinary Record*, 1999. **144**(3): p. 60-4.
244. Gortel, K., et al., *Methicillin resistance among staphylococci isolated from dogs*. *American Journal of Veterinary Research*, 1999. **60**(12): p. 1526-30.
245. Lee, J.H., *Methicillin (Oxacillin)-resistant Staphylococcus aureus strains isolated from major food animals and their potential transmission to humans*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003. **69**(11): p. 6489-94.
246. Manian, F.A., *Asymptomatic nasal carriage of mupirocin-resistant, methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) in a pet dog associated with MRSA infection in household contacts*. *Clinical Infectious Diseases*, 2003. **36**(2): p. e26-8.
247. Goni, P., et al., *Antibiotic resistance and epidemiological typing of Staphylococcus aureus strains from ovine and rabbit mastitis*. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 2004. **23**(3): p. 268-72.

248. van Duijkeren, E., et al., *Methicillin-resistant staphylococci isolated from animals*. *Veterinary Microbiology*, 2004. **103**(1-2): p. 91-7.
249. Rich, M. and L. Roberts, *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus isolates from companion animals*. *Veterinary Record*, 2004. **154**(10): p. 310.
250. Boag, A., A. Loeffler, and D.H. Lloyd, *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus isolates from companion animals*. *Veterinary Record*, 2004. **154**(13): p. 411.
251. Weese, J.S., et al., *Isolation of methicillin-resistant Staphylococcus aureus from the environment in a veterinary teaching hospital*. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 2004. **18**(4): p. 468-70.
252. Bender, J.B., et al., *Isolation of methicillin-resistant Staphylococcus aureus from a non-healing abscess in a cat*. *Veterinary Record*, 2005. **157**(13): p. 388-9.
253. O'Mahony, R., et al., *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) isolated from animals and veterinary personnel in Ireland*. *Veterinary Microbiology*, 2005. **109**(3-4): p. 285-96.
254. Kwon, N.H., et al., *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*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2005. **56**(4): p. 624-32.
255. Loeffler, A., et al., *Prevalence of methicillin-resistant Staphylococcus aureus among staff and pets in a small animal referral hospital in the UK*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2005. **56**(4): p. 692-7.
256. Middleton, J.R., et al., *Surveillance of Staphylococcus aureus in veterinary teaching hospitals*. *Journal of Clinical Microbiology*, 2005. **43**(6): p. 2916-9.
257. Hanselman, B., et al., *Prevalence of methicillin-resistant Staphylococcus aureus colonization in dogs entering a veterinary teaching hospital*. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 2005(20): p. 761.
258. Weese, J.S. and J. Rousseau, *Attempted eradication of methicillin-resistant staphylococcus aureus colonisation in horses on two farms*. *Equine Veterinary Journal*, 2005. **37**(6): p. 510-4.
259. Weese, J.S., et al., *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus in horses and horse personnel, 2000-2002*. *Emerging Infectious Diseases*, 2005. **11**(3): p. 430-5.
260. Baptiste, K.E., et al., *Methicillin-resistant staphylococci in companion animals*. *Emerging Infectious Diseases*, 2005. **11**(12): p. 1942-4.
261. Abbott, Y., F.C. Leonard, and B.K. Markey, *The prevalence of methicillin-resistant Staphylococcus aureus infection and colonization in companion animals in Ireland*. In: *Proceedings of the 60th Annual Conference of the Association of Veterinary Teachers and Research Workers, Scarborough*. Research in Veterinary Science, Supplement., 2006.
262. Leonard, F.C., et al., *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus isolated from a veterinary surgeon and five dogs in one practice*. *Veterinary Record*, 2006. **158**(5): p. 155-9.
263. Strommenger, B., et al., *Molecular characterization of methicillin-resistant Staphylococcus aureus strains from pet animals and their relationship to human isolates*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2006. **57**(3): p. 461-5.
264. Weese, J.S., et al., *An outbreak of methicillin-resistant Staphylococcus aureus skin infections resulting from horse to human transmission in a veterinary hospital*. *Veterinary Microbiology*, 2006. **114**(1-2): p. 160-4.
265. Weese, J.S., et al., *Suspected transmission of methicillin-resistant Staphylococcus aureus between domestic pets and humans in veterinary clinics and in the household*. *Veterinary Microbiology*, 2006. **115**(1-3): p. 148-55.
266. Weese, J.S., et al., *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus in horses at a veterinary teaching hospital: frequency, characterization, and association with clinical disease*. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 2006. **20**(1): p. 182-6.

267. Malik, S., H. Peng, and M.D. Barton, *Partial nucleotide sequencing of the mecA genes of Staphylococcus aureus isolates from cats and dogs*. Journal of Clinical Microbiology, 2006. **44**(2): p. 413-6.
268. Rich, M. and L. Roberts, *MRSA in companion animals*. Veterinary Record, 2006. **159**(16): p. 535-6.
269. Weese, J.S., et al., *Cluster of methicillin-resistant Staphylococcus aureus colonization in a small animal intensive care unit*. Journal of the American Veterinary Medical Association, 2007. **231**(9): p. 1361-4.
270. Boost, M.V., M.M. O'Donoghue, and K.H. Siu, *Characterisation of methicillin-resistant Staphylococcus aureus isolates from dogs and their owners*. Clin Microbiol Infect, 2007. **13**(7): p. 731-3.
271. *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus skin infections from an elephant calf--San Diego, California, 2008*. MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report, 2009. **58**(8): p. 194-8.
272. Anderson, M.E., et al., *Retrospective multicentre study of methicillin-resistant Staphylococcus aureus infections in 115 horses*. Equine Veterinary Journal, 2009. **41**(4): p. 401-5.
273. Loeffler, A., et al., *First isolation of MRSA ST398 from UK animals: a new challenge for infection control teams?* Journal of Hospital Infection, 2009. **72**(3): p. 269-71.
274. Schwartz, M., et al., *Two dogs with iatrogenic discospondylitis caused by methicillin-resistant Staphylococcus aureus*. Journal of Small Animal Practice, 2009. **50**(4): p. 201-5.
275. Tokateloff, N., et al., *Prevalence of methicillin-resistant Staphylococcus aureus colonization in horses in Saskatchewan, Alberta, and British Columbia*. Canadian Veterinary Journal, 2009. **50**(11): p. 1177-80.
276. Soares Magalhaes, R.J., et al., *Risk factors for methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) infection in dogs and cats: a case-control study*. Vet Res. **41**(5): p. 55.
277. Coughlan, K., et al., *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus in resident animals of a long-term care facility*. Zoonoses Public Health, 2010. **57**(3): p. 220-6.
278. Faires, M.C., et al., *Methicillin-resistant and -susceptible Staphylococcus aureus infections in dogs*. Emerging Infectious Diseases, 2010. **16**(1): p. 69-75.
279. van Duijkeren, E., et al., *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus in horses and horse personnel: an investigation of several outbreaks*. Veterinary Microbiology, 2010. **141**(1-2): p. 96-102.
280. Soavi, L., et al., *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus ST398, Italy*. Emerging Infectious Diseases, 2010. **16**(2): p. 346-8.

Publications et communications

Publications

Labrie J, Pelletier-Jacques G, Grasteau A, Ramjeet M, Auger E et Jacques M. Effects of growth conditions on biofilm formation by *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1 reference strain and some field isolates. *Veterinary Research* 2010; 41(1):3

Monecke S, Engelmann I, Archambault M, Coleman DC, Coombs GW, Cortez de Jäckel S, Pelletier-Jacques G, Schwarz S, Shore AC, Slickers P, Ehricht R, Distribution of SCC*mec* associated phenol-soluble modulins in staphylococci. *Molecular and Cellular Probes* (2012), doi: 10.1016/j.mcp.2012.01.001

Présentations scientifiques

Labrie J, Pelletier-Jacques G, Grasteau A, Ramjeet M, Auger E et Jacques M. Influence des conditions de croissance sur la formation de biofilms chez *Actinobacillus pleuropneumoniae* sérotype 1. Colloque international francophone de microbiologie animale. St-Hyacinthe, Qc, 22-24 septembre 2008.

Labrie J, Pelletier-Jacques G, Grasteau A, Ramjeet M, Auger E et Jacques M. Effects of growth conditions on biofilm formation by *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1 reference strain and some field isolates. International Pasteurellaceae Society Meeting. Sorrento, Italy, October 12-15, 2008.

Labrie, J., G. Pelletier-Jacques, V. Deslandes, M. Ramjeet, E. Auger, and M. Jacques. Inhibition of biofilm formation in *Actinobacillus pleuropneumoniae* by a divalent cation. 5th ASM conferences on biofilms. Cancun, Mexico, November 15-19, 2009

Pelletier-Jacques G, Beaudry-Ferland M, Letellier A, Harel J, Archambault M. Étude sur le *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline (SARM) chez le porc à l'abattoir au Québec. 5^{ème} Colloque international francophone de microbiologie animale. Marrakech, Maroc 3-5 avril 2011

Pelletier-Jacques G, Beaudry-Ferland M, Letellier A, Harel J, Archambault M. Étude sur le *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline (SARM) chez le porc à l'abattoir au Québec. 4^{ème} Symposium du CRIP. St-Hyacinthe, 31 mai 2011

Annexe

Annexe I. Résumé chronologique des publications reportant des cas de colonisation et d'infections aux SARM chez des animaux (adapté de Léonard, 2008)

Année	Auteurs	Commentaires
1972	Devriese et al. [14]	Isolement de SARM d'une vache avec une mammite
1975	Devriese et Hommez [233]	Plusieurs isolations de SARM provenant de vaches laitières semblent être d'origine humaine
1988	Scott et al. [234]	Un chat est suspecté d'être la source du SARM dans une salle de gériatrie
1989	Smith et al. [235]	Isolement de <i>Staphylococcus</i> sp. coagulase positive (12% des isolats sont oxacilline résistant) provenant d'implants orthopédiques de chiens
1994	Cefai et al. [236]	L'isolement de SARM nasal chez deux infirmières semble lié à des chiots
1996	Anzai et al. [237]	Isolement de SARM chez 13 juments avec métrite et d'un étalon ayant des lésions de la peau
1997	Hartmann et al. [238]	SARM isolés de blessures à la jambe chez les chevaux
	Shimizu et al. [239]	Le typage par PFGE de SARM équin révèle un modèle très distinct de celui retrouvé chez les humains
1998	Lilenbaum et al. [240]	Isolement de SARM sur des prélèvements de peau de chats cliniquement sains
1999	Sequin et al. [241]	Émergence de SARM chez des chevaux hospitalisés. Des isolats obtenus sur le personnel de l'hôpital sont relativement semblables.
	Pak et al. [242]	Isolement de SARM chez 12 chiens hospitalisés due à une variété de conditions cliniques
	Tomlin et al. [243]	Des infections à SARM chez 11 chiens sont associées à des chirurgies, à des blessures traumatiques et à des pyodermites récurrents
	Gortel et al. [244]	SARM isolés de blessures et de lésions de la peau chez les chiens
2003	Lee [245]	SARM isolés chez les vaches laitières (échantillons de lait) et chez les poulets (échantillons de muscles et d'articulations)
	Manian [246]	Des patrons de PFGE identiques de SARM ont été isolés chez des chiens ayant des propriétaires avec des infections à SARM récurrentes
2004	Goni et al. [247]	Isolement de SARM dans des cas de mammite chez des ovins
	Van Duijkeren et al. [248]	Isolement de SARM chez deux chiens ayant des blessures
	Rich et Roberts [249]	95 isolations de SARM chez des chiens, des chats, un cheval et un lapin. La plupart des isolats proviennent de la peau, de blessures infectées ou d'infections post-opératoires
	Boag et al. [250]	12 SARM isolés chez des chiens et chez des chats
	Weese et al. [251]	Des contaminations environnementales sont suggérées comme une importante source de SARM dans un hôpital vétérinaire universitaire

- 2005 Bender et al. [252] Isolement de SARM sur des abcès non guéris de chats
- O'Mahony et al. [253] Isolement de SARM chez 14 chiens, 8 chevaux, un chat, un lapin et un phoque. Des isolats ont aussi été obtenus du personnel vétérinaire. Les isolats non équins de SARM ont des patrons de PFGE identiques aux SARM humains. Les isolats équins quand à eux, ont des patrons de SARM très distinct.
- Kwon et al. [254] Caractérisation des gènes *SCCmec* de SARM chez les vaches laitières
- Loeffler et al. [255] Isolement de SARM chez le personnel, les chiens et dans l'environnement d'un hôpital pour petits animaux
- Middleton et al. [256] 14% des patients infectés avec *S. aureus* dans 7 hôpitaux vétérinaires universitaires le sont avec SARM
- Hanselman et al. [257] 1% des chiens sont porteurs sains de SARM dans les hôpitaux de cette étude
- Weese et al. (1) [258] Les isolats de SARM des chevaux et du personnel est de type *SCCmec* IV et distinct du SARM épidémique prédominant de la population humaine
- Weese et al. (2) [259] Le taux d'isolement de 4,7% de SARM chez les chevaux examinés monte à 12% quand il y a surveillance et ciblage
- Baptiste et al. [260] Les SARM isolés chez les chiens et sur le personnel vétérinaire à l'hôpital sont identiques par PFGE au SARM épidémique prédominant dans la population humaine. Cinq espèces de SARM distinctes ont été isolées chez les chevaux
- 2006 Abbott et al. [261] Le 0,6% de cas de SARM chez les chiens augmentent à 8% lorsqu'il y a évaluation de cas suspect
- Leonard et al. [262] Les SARM isolés d'infections post-opératoires chez 5 chiens et du nez du vétérinaire sont identiques par PFGE
- Cuny et al. [5] Approx. 0,48% des cas équins présentés à l'hôpital vétérinaire universitaire sont infectés avec SARM. La colonisation du nez par SARM de deux vétérinaires à long terme.
- Strommenger et al. [263] Les SARM isolés chez les chiens et les chats ressemblent aux HA-SARM retrouvés dans la population humaine
- Weese et al. (1) [264] Infections de la peau et colonisation du nez chez le personnel s'occupant d'un poulain ayant une infection à SARM
- Weese et al. (2) [265] Transmission animal à humain et humain à animal de SARM suspectée et suivi de 6 cas d'animaux de compagnies infectés à SARM
- Weese et al. (3) [266] 27 chevaux sur 1000 admis à l'hôpital vétérinaire universitaire sont colonisés par des CA-SARM
- Malik et al. [267] Le gène *mecA* de SARM isolés chez des chiens et des chats est identique à celui retrouvé dans l'espèce humaine
- Rich et Roberts [268] Culture de 561 isolats de SARM venant d'infections cliniques animales entre janvier 2003 et août 2006. Un des 255 chiens en santé était porteur de SARM.
- 2007 Weese et al. Isolement de SARM chez un chien aux soins intensifs.

	[269]	
	Boost et al. [270]	Isolement de SARM chez des animaux de compagnies et leurs propriétaires.
2008	CDC [271]	Infection de la peau d'un éléphant au SARM.
	Nemati et al. [10]	Isolement de SARM ST398 chez des poulets en santé.
2009	Anderson et al. [272]	Entre 2004 et 2006, 115 chevaux de 6 hôpitaux vétérinaires universitaires ont été testés SARM positifs.
	Walther et al. [116]	Isolement de SARM chez des chiens, des personnes et dans l'environnement dans un hôpital vétérinaire.
	Loeffler et al. [273]	Isolement de SARM chez deux chevaux en Angleterre.
	Schwartz et al. [274]	Deux chiens atteints de discospondylites à cause de SARM.
	Tokatelloff et al. [275]	Isolement de SARM chez des chevaux au Canada.
	Persoos et al. [9]	Isolement de SARM provenant de poulet de chairs.
2010	Soares Magalhaes et al. [276]	105 SARM isolés de 197 animaux provenant de 150 vétérinaires.
	Coughlan et al. [277]	Isolement de SARM chez deux chats dans un centre de soins prolongés.
	Faires et al. [278]	Isolement de SARM chez des chiens ayant des infections de la peau et des oreilles.
	Van Duijkeren et al. [279]	Isolement de SARM de 2006 à 2007 chez 7 chevaux et 4 personnes sur 61 travaillant dans des écuries. Isolement en 2008 de SARM chez 17 chevaux et 16 personnes sur 170 travaillant dans des écuries.
	Soavi et al. [280]	Un homme travaillant dans une ferme laitière se présente aux urgences avec des plaies sévères et des ulcères au cou dues au SARM.
	Fessler et al. [89]	Isolement de SARM provenant de cas de mammites bovines et de deux humains sur des fermes en Allemagne.
	Mulders et al. [96]	119 SARM isolés de poulets de chairs et de travailleurs en contact avec les poulets.

Annexe II : Différentes classes de β -lactamines auxquelles les SARMs sont résistants.

Classe de β-lactamines		
Pénicilline naturelle		pénicilline G
Pénicillines semi-synthétiques	anti-staphylococcique (pénicilline M)	méthicilline, cloxacilline, oxacilline
	spectre élargie	aminopénicillines
		carboxypénicillines
		uréidopénicillines
		carbapénème
	monobactames	
Céphalosporines	1ère génération : spectre étroit	cefadroxil, cefazolin, cephalixin, cephaloridine, cephalothin, cephapirine, cephradine
	2ième génération : spectre étendu	cefaclor, cefammandole, cefonicid, ceforanide, cefuroxime, cefproxil, lobracarbef, cefoxetan, cefoxitin
	3ième génération : spectre large	ceftiofure, cefdinir, cefditoren, cefixime, cefoperazone, cefotaxime, cefpodoxime, ceftazidime, ceftibuten, ceftizoxime, ceftriaxone
	4ième génération	cefepime, cefpirome

