



## OBECNÉ ASPEKTY TÝKAJÍCÍ SE BIOFILMU A JEJICH VLIVU NA MASTITIDY PREZVÝKAVCŮ

Antoni Prenafeta

antoni.prenafeta@hipra.com

R&D Dept., HIPRA. Avda. La Selva, 135. Amer (Girona) - Spain

### 1. Biofilm jako mechanismus přežívání

**B**iofilm je obecně definován jako dynamické a velmi dobře strukturované mikrobiální společenství, které adhezuje k pevnému povrchu a vytváří agregáty usazené v extracelulární matrixu. Mezi prokaryoty je schopnost vytváření biofilmu velice rozšířená (platí to jak pro rod *Archea*, tak pro Bakterie) a byla dokonce zjištěna i u fosilních mikroorganismů starých 3,2 miliardy let. V nepříznivých a neustále se měnících podmínkách primitivní Země (teplota, pH a UV záření) představovala existence ve formě biofilmu z evolučního hlediska možnou adaptivní výhodu díky roli, kterou má biofilm při udržování homeostázy. Biofilm však neslouží pouze k ochraně před fyzikálními a chemickými vlivy prostředí, ale zlepšuje také mezibuněčnou katalytickou aktivitu (protože buňky se nacházejí v těsném sousedství) a napomáhá hromadění živin na povrchu (Hall-Stoodley et al., 2004). Rezistence biofilmu vůči antimikrobiálním přípravkům (např. antibiotikům) může být způsobena ztíženou možností průniku antimikrobiální látky skrz extracelulární matrix, pomalejším růstem buněk nacházejících se v biofilmu (např.  $\beta$ -laktamová antibiotika jsou účinná jen proti aktivně se dělícím grampozitivním bakteriím) nebo přítomností rezistentního fenotypu v geneticky heterogenní populaci.

### 2. Biofilm v přírodním prostředí a jeho vliv na průběh infekcí

Biofilmy jsou v přírodě všudypřítomné. Tyto biologické struktury je možné nalézt na říčních dnech nebo na povrchu stojatých vod, od extrémních podmínek horkých pramenů i na ledovcích v Antarktidě, v příznivě teplém a vlhkém prostředí sprch nebo lázní, ve vodovodním či palivovém potrubí, v ropovodech, v symbióze s rostlinami atd. Vytváření biofilmu hraje také významnou roli v patogenezi velkého množství lidských nemocí. Příkladem může být adheze rodů *Staphylococcus* nebo *Streptococcus* k proteinům bazální membrány poškozené výstelky srdce, což je příčinou vzniku endokarditidy. Vlivem snížené činnosti řasinek sliznice dýchacích cest a zvýšené viskozity hlenu u pacientů s cystickou fibrózou zase dochází ke kolonizaci dýchacích cest a k vytváření biofilmu druhy *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae* a *Pseudomonas aeruginosa*. Dalším známým příkladem biofilmu je zubní plak tvořený druhem *Streptococcus mutans*. Tvorba biofilmu byla popisována také u uropatogenních kmenů *Escherichia coli*. V neposlední řadě představuje biofilm také významný faktor virulence,

který se podílí na vzniku infekcí v souvislosti s použitím implantátů, jako jsou intravenózní katetry, srdeční chlopně, protézy, peritoneální katetry pro dialýzu, endotracheální trubice atd. Tyto infekce jsou způsobeny převážně adhezí bakterií *S. aureus* a *Staphylococcus epidermidis* k povrchům těchto implantátů (Hall-Stoodley et al., 2004).

Má se za to, že biofilm přispívá k patogenitě mikroorganismů díky své rezistenci k antibiotikům a fagocytóze, čímž usnadňuje rozvoj chronické infekce. Oddělení bakteriálních buněk z biofilmu může být příčinou septikémie (infekce krve) a tyto buňky mohou umožnit vznik nových kolonií. Produkce endotoxinů a exotoxinů způsobuje záněty a poškození tkání. Rezistence proti antibiotikům je jedním z velkých problémů, který znesnadňuje boj s infekcemi způsobovanými mikroorganismy vytvářejícími biofilm. Tabulka 1 ukazuje, že pro smrt bakteriální buňky v biofilmu je nutná vyšší dávka antibiotik, než při jaké je pozorován baktericidní účinek na planktonní bakteriální buňky (volně plovoucí nebo v suspenzi).

**Tabulka 1. Citlivost ATB k různým druhům bakterií rostoucím na planktonních formách (volně či v suspenzi) nebo na biofilmu (Donlan and Costerton, 2002).**

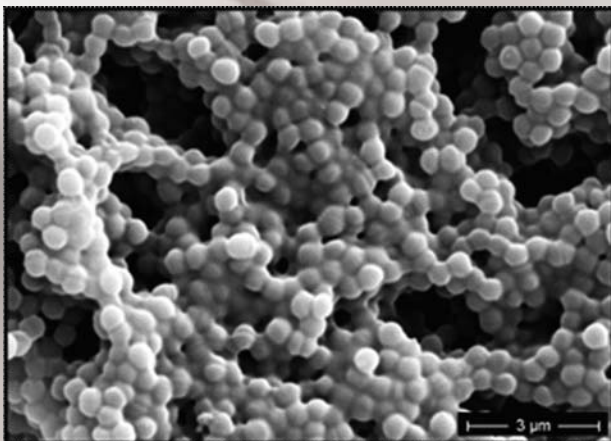
| Mikroorganismus                          | ATB        | MIC ATB či MBC planktonického fenotypu referenčního organismu (µg/ml) | Efektivní koncentrace proti fenotypickému biofilmu (µg/ml) |
|------------------------------------------|------------|-----------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------|
| <i>S. aureus</i> NCTC 8325-4             | Vancomycin | 2 (MBC)                                                               | 20                                                         |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853 | Imipenem   | 1 (MIC)                                                               | 1024                                                       |
| <i>E. coli</i> ATCC 25922                | Ampicillin | 2 (MIC)                                                               | 512                                                        |
| <i>P. pseudomallei</i>                   | Ceftazidim | 8 (MBC)                                                               | 800                                                        |
| <i>Streptococcus sanguis</i> 804         | Doxycyklin | 0,063 (MIC)                                                           | 3,15                                                       |

MIC: Minimální inhibiční koncentrace.

MBC: Minimální koncentrace bakterie.

### 3. Rozvoj biofilmu druhu *S. aureus*

Tvorba biofilmu druhem *S. aureus* je dobře známým procesem probíhající ve dvou krocích. V prvním kroku dochází prostřednictvím specifických nebo fyzikálně-chemických interakcí k adhezi bakteriálních buněk k povrchu. V našem případě tedy specifické adheziny druhu *S. aureus* umožňují adhezi k proteinům v extracelulárním matrixu hostitele, kterými mohou být např. fibronectin-vázající proteiny (*fibronectin binding proteins* FnBPA, FnBPB) (O'Neill et al., 2008), fibrinogen-vázající proteiny (*fibrinogen binding proteins* ClfA, ClfB) (McDevitt et al., 1994), kolagen-vázající protein (*collagen binding protein* Can) (Patti et al., 1992) nebo protein vázající se na kostní sialoprotein (*bone sialoprotein binding protein* BBP) (Tung et al., 2000). Ve druhém kroku pak dochází k pomnožení adheřujících bakteriálních buněk, které spolu následně vzájemně interagují a shlukují se do vrstev usazených v extracelulárním matrixu, který tyto buňky samy produkují (Obr. 1). Hlavní složkou extracelulárního matrixu biofilmů druhů *S. aureus* a *S. epidermidis*, která se podílí na vzniku mezibuněčných interakcí, je exopolysacharid poly-N-acetyl-β-1,6-



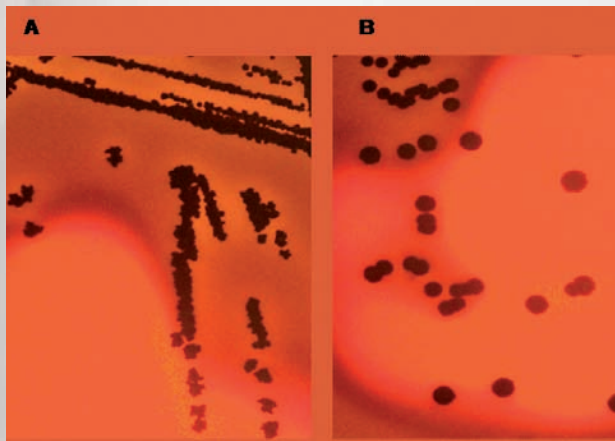
**Obrázek 1.** Sken biofilmu *S. aureus* rostoucího *in vitro* provedeným elektronovým mikroskopem (www.erc.montana.edu).

glukosamin (PNAG) syntetizovaný enzymy, které jsou kódované operonem *icaADBC* (Cramton et al., 1999). U druhu *S. aureus* bylo zjištěno, že na těchto mezibuněčných interakcích a tvorbě biofilmu se mohou rovněž podílet některé proteiny: Bap (Cucarella et al., 2001), protein A (Merino et al., 2009), SasC (Schroeder et al., 2009) a SasG (Corrigan et al., 2007).

### 4. Vliv biofilmu na mastitidy přežvýkavců způsobované bakterií *S. aureus*

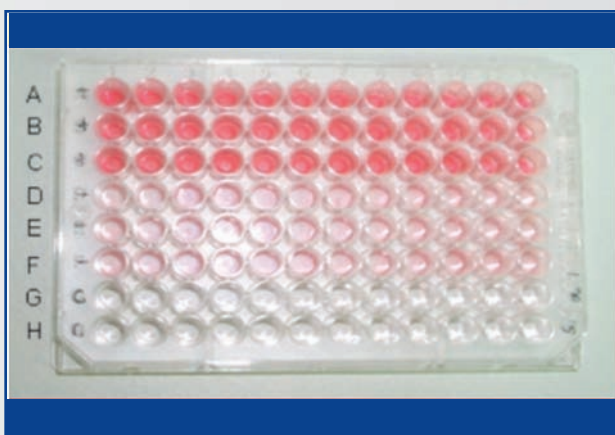
Buňky stafylokoků napadají při mastitidě u skotu a ovcí buňky epitelu mléčné žlázy, rozrůstají se do kolonií postupně obklopaných extracelulárním matrixem, čímž dochází k vytvoření biofilmu. Biofilm je vzhledem ke svým rozměrům odolný proti fagocytóze polymorfonukleárními neutrofily nebo makrofágy a navíc zapříčiňuje rezistenci k antibiotikům, a tím podporuje rozvoj chronické infekce.

Různými studiemi byla v 94,36 % (Cucarella et al., 2004) nebo 100 % (Vasudevan et al., 2003) případů zjištěna při izolaci buněk *S. aureus* během mastitidy u skotu přítomnost operonu *icaADBC* kódujícího enzymy odpovědné za biosyntézu exopolysacharidu PNAG, který je hlavní složkou extracelulárního matrixu biofilmu. Mnoho studií také kromě výše zmíněných genetických faktorů prokázalo i schopnost bakterií izolovaných při mastitidě u skotu vytvářet biofilm *in vitro*. Tuto skutečnost potvrdil ve své studii např. Vasudevan et al. (2003). Pomocí metody posouzení morfologie kolonií rostoucích na agaru s kongo červení zaznamenal, že 91 % izolátů *S. aureus* mastitidy u skotu mělo schopnost vytvořit biofilm *in vitro* (Obr. 2) a 69 % vykazovalo adhezi v mikroděstičkách (Obr. 3). Oliveira et al. (2007) zase ve své studii uvádí, že 80,8 % izolátů *S. aureus* a 75,9 % izolátů *S. epidermidis* mastitidy u skotu vykazovalo schopnost vytvořit biofilm *in vitro*. Dhanawade et al. (2010) zjistil pomocí kultivačního testu na agarových miskách



**Obrázek 2.** Stanovení schopnosti tvorby biofilmu v charakteristických morfologických koloniích na agarových miskách s kongo červení. Slim pozitivní nebo biofilm produkující kmeny tvoří kolonie, které mají hrubé a nepravidelné obrysy na miskách s kongo červení. (A), zatímco slim negativní nebo biofilm neprodukcující izoláty tvoří kolonie s lesklou, hladkou a dobře definovanou hranicí (B).





**Obrázek 3.** Analýza biofilmu na mikromisce (adhezní test). Po inkubační době se *S. aureus* izoluje v jamkách mikromisky, následně se jamky vymývají a uchycené buňky s optickou hustotou (OD) se poté vyhodnocují pomocí ELISA čtečky. Jestliže izolát během svého růstu formoval biofilm, je optická densita jamek vysoká (řady A, B a C), zatímco nesignifikantní je densita v případě, kde nedošlo k produkci biofilmu (řady D, E a F) a to ve srovnání s nenaočkovanou negativní kontrolou jamek (řady G a H).

s kongo červení, že 48,03 % kmenů *S. aureus* izolovaných z mastitidy u skotu mělo schopnost vytvořit biofilm *in vitro*.

Genetické dispozice a schopnost tvorby biofilmu *in vitro* se zdají být pro izoláty *S. aureus* pocházející z mastitidy u skotu zřejmým faktem, ale existuje nějaký důkaz, že k tvorbě biofilmu druhem *S. aureus* v mléčných žlázách opravdu dochází? Watson et al. (1989) s použitím elektronové mikroskopie zjistil, že buňky *S. aureus* izolované přímo z mléka od ovcí a krav s klinickými příznaky mastitidy produkují extracelulární polysacharidový matrix (autory nazývaný pseudokapsula).

Následně Baselga et al. (1993) pomocí imunohistochemické analýzy vzorků parenchymové tkáně mléčné žlázy odebraných od ovce, která byla experimentálním způsobem intramamárně infikována bakterií *S. aureus*, prokázal u těchto bakterií produkci exopolysacharidového matrixu. Nepřímo byla prokázána také produkce exopolysacharidů *in vivo* a to tak, že u ovcí i krav, které byly experimentálním způsobem intramamárně infikovány bakterií *S. aureus*, byly zjištěny specifické protilátky proti PNAG (Perez et al., 2009) a proti antigennímu komplexu SAAC (Slime Associated Antigenic Complex; Prenafeta et al., 2010).

## 5. Účinnost vakcín proti biofilmu bakterie *S. aureus* a jejich použitelnost v boji s mastitidou přežvýkavců

Schopnost bakterie *S. aureus* vytvářet biofilm je významným faktorem virulence, který ovlivňuje patogenезi mastitidy u ovcí a krav. V souvislosti s tímto faktem bylo provedeno testování účinnosti několika experimentálních vakcín, které ukázalo různou míru získané ochrany před touto nemocí. Watson et al. (1993) a Nordhaug et al. (1994) použili vakcíny využívající celých inaktivovaných buněk druhu *S. aureus* usazených v jejich vlastním extracelulárním matrixu, tzv. pseudokapsu. Experimentální vakcíny testované Amorenou et al. (1994) zase obsahovaly směs slizu (exopolysacharidová matrix biofilmu) v liposomech,



toxoidů a různých inaktivovaných izolátů *S. aureus*. Perez et al. (2009) nedávno v návaznosti na skutečnost, že exopolysacharid PNAG představuje hlavní složku extracelulárního matrixu biofilmu vytvářeného druhem *S. aureus*, provedl zkoušku preventivních účinků vakcín proti intramamární infekci způsobené virulentním kmenem *S. aureus*, přičemž pro konstrukci vakcín použil bakteriny (celé inaktivované bakteriální buňky), hrubě extrahovaný polysacharid PNAG, vyčištěný polysacharid PNAG a různé druhy adjuvans. Výsledky jeho studie ukázaly, že vakcíny obsahující bakteriny vzniklé z bakterií produkujících silný biofilm vykazaly v porovnání s ostatními použitými vakcínami (komponovanými z bakterinů bakterií vytvářejících slabý biofilm z

**Tabulka 2. Stanovení slim produkovaného fenotypu (+/-), kapacity biofilmové formace na mikromisce (OD testovaného biofilmu) a produkce komplexu SAAC ((mg SAAC/mg celkového proteinu) v izolátech *S. aureus*. Korelace mezi produkcí komplexu SAAC a tvorbou biofilmu na mikromisce je signifikantní ( $R = 0.882$ ).**

| Izolovaný <i>S. aureus</i> | Slime produkující fenotyp | OD v testovaném biofilmu (SD <sup>1</sup> ) | Produkce komplexu SAAC (SD <sup>1</sup> ) |
|----------------------------|---------------------------|---------------------------------------------|-------------------------------------------|
| SA1H                       | +                         | 1,444 (0,04)                                | 54,0 (0,012)                              |
| SA2H                       | +                         | 1,597 (0,02)                                | 63,3 (0,015)                              |
| SA3H                       | +                         | 0,385 (0,03)                                | 20,8 (0,011)                              |
| SA4H                       | +                         | 1,499 (0,04)                                | 60,5 (0,012)                              |
| SA5H                       | +                         | 1,521 (0,03)                                | 27,6 (0,015)                              |
| SA6H                       | -                         | 0,088 (0,01)                                | 2,2 (0,011)                               |
| SA7H                       | +                         | 1,030 (0,02)                                | 26,5 (0,012)                              |
| SA8H                       | -                         | 0,388 (0,06)                                | Nd <sup>2</sup>                           |
| SA9H                       | -                         | 0,200 (0,02)                                | Nd <sup>2</sup>                           |
| SA10H                      | -                         | 0,145 (0,01)                                | 0,1 (0,010)                               |
| SA11H                      | -                         | 0,130 (0,01)                                | Nd <sup>2</sup>                           |
| SA12H                      | -                         | 0,235 (0,01)                                | Nd <sup>2</sup>                           |
| SA13H                      | +                         | 0,632 (0,02)                                | 6,9 (0,013)                               |

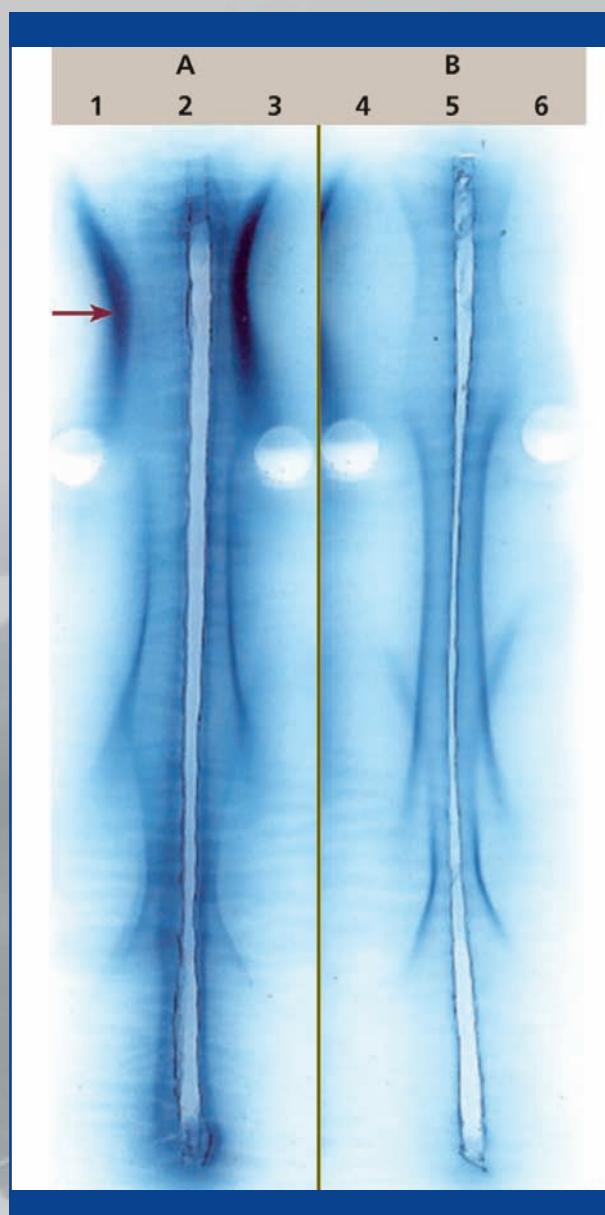
<sup>1</sup>SD: směrodatná odchylka průměru

<sup>2</sup>Nd.: nevyhodnoceno

hrubě extrahovaného PNAG nebo z vyčištěného PNAG) nejvyšší titr specifických protilátek proti PNAG a také nejvyšší míru ochrany proti intramamární infekci.

Prenafetova et al. (2010) studie na experimentálně infikovaných kravách objasnila roli specifických protilátek proti antigennímu komplexu SAAC při prevenci mastitidy způsobované *S. aureus*. Antigenní komplex SAAC je izolovaná buněčná frakce z kmene *S. aureus* vytvářejícího biofilm. Přítomnost této extracelulární látky byla zjištěna u všech izolátů *S. aureus*, u kterých byla na agarových miskách s kongo červení prokázána tvorba slizu (Obr. 4). Jeho tvorba přímo souvisí s vytvářením biofilmu v podmínkách *in vitro* (Tab. 2). Chemická analýza prokázala, že komplex SAAC se skládá z 58 % (w/v) z polysacharidu a ze 42 % (w/v) z proteinu. V polysacharidové frakci bylo zjištěno 6,1 % glukosaminu a galaktosaminu, přičemž přítomnost těchto cukrů může být výsledkem deacetylce PNAG. Za povšimnutí stojí také to, že protilátky proti těmto deacetylovaným formám PNAG patří mezi silné opsoniny (specifické protilátky vážící se na antigen) a zajišťují největší ochranu proti infekci bakterií *S. aureus* (Cerca et al., 2007).

Opsonizace bakteriálních buněk protilátkami a jejich následná fagocytóza polymorfonukleárními neutrofily je hlavním obranným mechanismem mléčných žláz proti infekci. Zároveň však nelze



**Obrázek 4.** Analýza dle imunoelektroforézy v agarovém gelu pro bakteriální extrakty z kmene *S. aureus* produkujícího biofilm (A: jamky 1 a 3) a kmen ne-produkující biofilm (B: jamky 4 a 6), s použitím polyklonálního séra proti celé bakterii (linky 2 a 5). Šipka ukazuje řadu imunoprecipitace pro komplex antigen-antibiotikum SAAC, který je přítomen jen u kmenů charakterizovaných jako exopolysacharidové produkty na agarových plotnách s Kongo červení.

opominout fakt, že specifické protilátky proti biofilmu zajišťují i přímou ochranu. Váží se na bakteriální buňky a znemožňují jejich adhezi k epitelu a mezibuněčné interakce, což by mohlo vést k vytvoření biofilmu. S tím souvisí i studie *in vitro*, která ukázala, že protilátky proti komplexu SAAC jsou odpovědné i za inhibici tvorby biofilmu, a to bez přítomnosti neutrofilů (Obr. 5 ukazuje výsledky výzkumu provedeného autorem).

Jednou z výhod, proč místo kapsulárních antigenů lze použít při konstrukci vakcín látku PNAG a SAAC, je skutečnost, že v takových případech nebyly zjištěny žádné serotypy mezi izoláty *S. aureus*. Z tohoto důvodu zajišťují protilátky vzniklé proti antigenům obsaženým ve vakcíně křížovou ochranu bez ohledu na kapsulární serotypy *S. aureus*.



Antoni Prenafeta | antoni.prenafeta@hipra.com | R&D Dept., HIPRA. Avda. La Selva, 135. Amer (Girona) - Spain

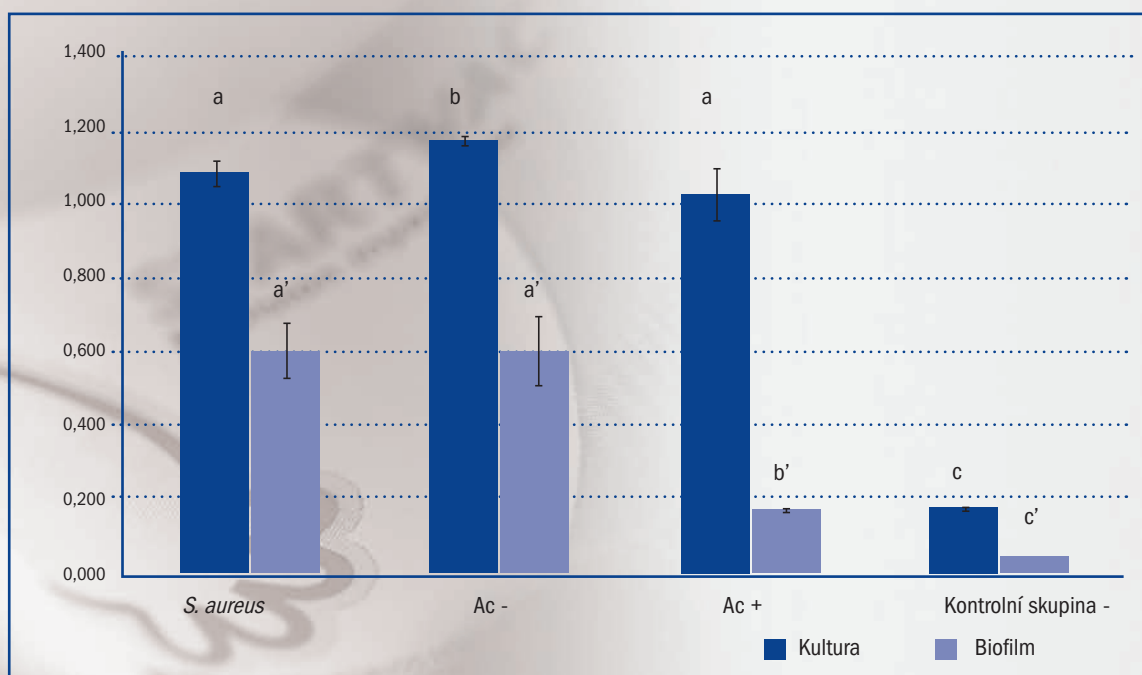
STARTVAC® (HIPRA) je první vakcínou proti mastitidě u skotu, která byla prostřednictvím agentury EMEA (Evropská agentura pro léčivé přípravky) registrována v celé Evropské unii. Vakcína obsahuje inaktivované buňky kmene *S. aureus*, který vytváří silný biofilm s velkým množstvím na buňky vázaného komplexu SAAC. Vakcína dále obsahuje inaktivovaný kmen *E.coli* J5 a vhodné adjuvans posilující imunitní odpověď.

Po imunizaci vakcínou STARTVAC®, která byla prováděna během předklinického testování i klinických zkoušek prováděných v průběhu vývoje vakcíny, byly v krvi i v mléce zjištěny dlouhodobě vysoké titry protilátek proti komplexu SAAC. Klinické zkoušky, které byly prováděné s vakcínou STARTVAC® na šesti farmách (vakcínou STARTVAC® bylo navakcinováno 198 krav, 188 krav sloužilo jako neočkovaná kontrola), ukázaly, že vakcinace významně snížila výskyt klinických i subklinických mastitid způsobených *S. aureus*, koliformními mikroorganismy a koaguláza negativními stafylokoky (CNS) a zmírnila i závažnost jejich klinických příznaků. Po očkování vakcínou STARTVAC® se navíc zvýšilo procento spontánně vyléčených infikovaných krav. Vakcína STARTVAC® je v tomto ohledu první registrovanou vakcínou na světě, která zajišťuje ochranu proti mastitidě způsobené CNS.

Protilátky proti exopolysacharidu PNAG antigenního komplexu SAAC vzniklé imunizací vakcínou STARTVAC® jsou zřejmě jedním z faktorů, které se podílejí na vzniku křížové ochrany proti infekcím způsobeným CNS.

## 6. Perspektivy prevence tvorby biofilmu při mastitidě

Schopnost bakterie *S. aureus* vytvářet biofilm je významným faktorem virulence ovlivňujícím průběh mastitid u skotu a ovcí. Faktorů virulence podílejících se na patogenезi mastitid může být samozřejmě více. Specifické protilátky proti PNAG nebo SAAC však mohou působit preventivně proti infekci mléčných žláz způsobené *S. aureus* tím, že se naváží na exopolysacharidový extracelulární matrix (ještě před vznikem biofilmu), usnadní tak fagocytózu bakterií polymorfonukleárními neutrofily, a tím zajistí eliminaci infekce. Toto je důvodem, proč je očkování vakcínou STARTVAC® dobrou alternativou pro snižování výskytu intramamárních infekcí způsobovaných *S. aureus* a CNS.



**Obrázek 5.** Inhibice biofilmové formace *S. aureus* na mikromisce komplexem anti -SAAC protilátkami. Grafické vyjádření optické hustoty (OD) bakteriálního růstu na konci mikrojамkové inkubace (označeno modře) a OD biofilmu po barvení adherovaných buněk (označeno světle modře). V této studii byly kmeny produkující biofilm *S. aureus* inkubovány bez přítomnosti protilátek (sloupce *S. aureus*), v přítomnosti séra, aniž by byly komplexem anti -SAAC protilátek (sloupce AC) nebo v přítomnosti hyperimunního séra s komplexem anti -SAAC protilátkami (sloupce AC + ). Kontrolní sloupce korespondují s nenaočkováním kultivačním médiem. Sloupce označené stejným písmenem nevykazují rozdíly mezi sebou ( $P < 0,05$ ). Úsečky označují směrodatné odchylky průměru.

## Literatura

1. Amorena, B., Baselga, R. und Albizu, I., 1994. Use of liposome-immunopotentiated exopolysaccharide as a component of an ovine mastitis staphylococcal vaccine. *Vaccine*. 2:243-249.
2. Baselga, R., Albizu, I., De La Cruz, M., Del Cacho, E., Barberan, M. und Amorena, B., 1993. Phase variation of slime production in *Staphylococcus aureus*: implications in colonization and virulence.
3. Cerca, N., Jefferson, K.K., Maira-Litrán, T., Pier, D.B., Kelly-Quintos, C., Goldmann, D.A., Azeredo, J. und Pier, G.B., 2007. Molecular basis for preferential protective efficacy of antibodies directed to the poorly acetylated form of staphylococcal poly-N-acetyl- $\beta$ -(1-6)-glucosamine. *Infect. Immun.* 75:3406-3413.
4. Corrigan, R.M., Rigby, D., Handley, P. und Foster, T.J., 2007. The role of *Staphylococcus aureus* surface protein SasG in adherence and biofilm formation. *Microbiology*. 153:2435-2446.
5. Cramton, S.E., Gerke, C., Schnell, N.F., Nichols, W.W. und Götz, F., 1999. The intercellular adhesion (*ica*) locus is present in *Staphylococcus aureus* and is required for biofilm formation. *Infect. Immun.* 67:5427-5433.
6. Cucarella, C., Tormo, M.A., Úbeda, C., Trotonda, M.P., Monzón, M., Peris, C., Amorena, B., Lasa, I. und Penadés, J.R., 2004. Role of biofilm-associated protein Bap in the pathogenesis of bovine *Staphylococcus aureus*. *Infect. Immun.* 72:2177-2185.
7. Dhanawade, N.B., Kalorey, D.R., Srinivasan, R., Barbudhe, S.B. und Kurkure, N.V., 2010. Detection of intercellular adhesion genes and biofilm production in *Staphylococcus aureus* isolated from bovine subclinical mastitis. *Vet. Res. Commun.* 34:81-9.
8. Donlan, R.M. und Costerton, J.W., 2002. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clinical Microbiology Reviews*. 15:167-193.
9. Hall-Stoodley, L., Costerton, J.W. und Stoodley, P., 2004. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nature Reviews Microbiology*. 2: 95-108.
10. Merino, N., Toledo-Arana, A., Vergara-Irigaray, M., Valle, J., Solano, C., Calvo, E., López, A.J., Foster, T.J., Penadés, J.R. und Lasa, I. 2009. Protein A-mediated multicellular behaviour in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 191:832-843.
11. McDevitt, D., Francois, P., Vaudaux, P. und Foster, T.J., 1994. Molecular characterization of the clumping factor (fibrinogen receptor) of *Staphylococcus aureus*. *Mol. Microbiol.* 11:237-248.
12. Nordhaug, M.L., Nesse, L.L., Norcross, N.L. und Gudding, R., 1994. A field trial with an experimental vaccine against *Staphylococcus aureus* mastitis in cattle. 1. Clinical parameters. *J. Dairy Sci.* 77:1267-1275.
13. Oliveira, M., Nunes, S.F., Carneiro, C., Bexiga, R., Bernardo, F. und Vilela, C.L., 2007. Time course of biofilm formation by *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* mastitis isolates. *Vet. Microbiol.* 124:187-191.
14. O'Neill, E., C. Pozzi, P. Houston, D. Smyth, H. Humphreys, D.A. Robinson, A. Loughman, T. J. Foster und J.P. O'Gara., 2008. A novel *Staphylococcus aureus* biofilm phenotype mediated by the fibronectin-binding proteins, FnBPA and FnBPB. *J. Bacteriol.* 190:3835-50.
15. Patty, J.M., Jonsson, H., Guss, B., Switalski, L.M., Wiberg, K. et al. 1992. Molecular characterization and expression of a gene encoding a *Staphylococcus aureus* collagen adhesion. *J. Biol. Chem.* 267:1766-1772.
16. Pérez, M.M., Prenafeta, A., Valle, J., Penadés, J., Rota, C., Solano, C., Marco, J., Grilló, M.J., Lasa, I., Irache, J.M., Maira-Litrán, T., Jiménez-Barbero, J., Costa, L., Pier, G.B., de Andrés, D., Amorena, B., 2009. Protection from *Staphylococcus aureus* mastitis associated with poly-N-acetyl  $\beta$ -1,6 glucosamine specific antibody production using biofilm-embedded bacteria. *Vaccine*. 27, 2379-2386.
17. Prenafeta, A., March, R., Foix, A., Casals, I. und Costa, LL., 2009. Study of the humoral immunological response after vaccination with a *Staphylococcus aureus* biofilm-embedded bacterin in dairy cows: possible role of the exopolysaccharide specific antibody production in the protection from *Staphylococcus aureus* induced mastitis. *Vet. Immun. Immunopathol.* 134:208-217.
18. Schroeder, K., Jularic, M., Horsburgh, S.M., Hirschhausen, N., Neumann, C., Bertling, A., Schulte, Foster, S., Kehrel, B.E., Peters, G. und Heilmann, C., 2009. Molecular characterization of a novel *Staphylococcus aureus* surface protein (SasC) involved in cell aggregation and biofilm accumulation. *PLoS ONE*. 4(10):7567.
19. Tung, H., Guss, B., Hellman, U., Persson, L., Rubin, K. et al., 2000. A bone sialoprotein-binding protein from *Staphylococcus aureus*: a member of the staphylococcal Sdr family. *Biochem J* 345(3):611-619.
20. Vasudevan, P., Nair, M.K.M., Annamalai, T. und Venkitanarayanan, K.S., 2003. Phenotypic and genotypic characterization of bovine mastitis isolates of *Staphylococcus aureus* for biofilm formation. *Vet. Microbiol.* 92:179-185.
21. Watson, D.L. und Watson, N.A., 1989. Expression of a pseudocapsule by *Staphylococcus aureus*: influence of cultural conditions and relevance to mastitis. *Research in Veterinary Science*. 47:152-157.
22. Watson, D.L. und Davies, H.I., 1993. Influence of adjuvants on the immune response of sheep to a novel *Staphylococcus aureus* vaccine. *Vet. Microbiol.* 34:139-153.