

# Importance et contrôle de biofilms formés par les staphylocoques lors d'infections intra-mammaires chez la vache laitière : une revue bibliographique

C. GOETZ<sup>1,‡</sup>, S. DUFOUR<sup>1,‡</sup>, M. ARCHAMBAULT<sup>1,‡</sup>, F. MALOUIN<sup>2,‡</sup>, M. JACQUES<sup>1,‡,\*</sup>

<sup>1</sup>Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal, St Hyacinthe, QC, Canada.

<sup>2</sup>Département de biologie, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, QC, Canada.

<sup>‡</sup>Regroupement de recherche pour un lait de qualité optimale (Op+Lait), St-Hyacinthe, QC, Canada.

\*Auteur chargé de la correspondance: [mario.jacques@umontreal.ca](mailto:mario.jacques@umontreal.ca)

## RÉSUMÉ

Le biofilm bactérien est un mode de vie permettant aux bactéries de survivre dans un environnement hostile et cela grâce à une plus grande tolérance aux biocides et à la réponse immunitaire de l'hôte que les bactéries sous forme libre ou planctonique. Les bactéries ayant la capacité de former des biofilms peuvent causer des complications cliniques chez l'animal dont les bovins. En effet, la plupart des espèces bactériennes fréquemment isolées lors d'infections intra-mammaires chez la vache laitière possèdent la capacité de former un biofilm. C'est notamment le cas des staphylocoques qui sont des pathogènes fréquents de la glande mammaire. La mammite bovine est une inflammation plus ou moins prononcée de la glande mammaire qui peut entraîner une réduction de l'activité sécrétrice de la glande, des signes visibles et quantifiables d'inconfort et de douleur et, parfois, la mort de l'animal. Les pertes économiques imputables à cette maladie sont considérables. Les connaissances se rapportant aux biofilms formés par les staphylocoques ont permis le développement de molécules antibiofilm ciblant spécifiquement les étapes de formation du biofilm. Ces molécules ont été développées afin d'être appliquées en médecine humaine et, malheureusement, très peu de données existent sur leur utilisation en médecine vétérinaire. Pourtant l'utilisation potentielle de ces molécules ayant une cible différente de celles des antibiotiques pourrait être proposée en monothérapie ou en combinaison avec un antibiotique afin d'augmenter l'efficacité de ce dernier et ainsi contribuer à définir de nouvelles alternatives thérapeutiques en médecine vétérinaire afin de mieux contrôler certaines maladies infectieuses animales dont la mammite bovine.

**Mots-clés :** mammite bovine, *Staphylococcus aureus*, staphylocoques à coagulase négative, biofilm, molécules antibiofilm.

## SUMMARY

### Importance and control of biofilm formation by staphylococci during intra-mammary infections in dairy cows: a review of literature

Bacterial biofilms allow bacteria to survive in hostile environments. Bacteria having the ability to form biofilms are significantly less susceptible to antibiotics, disinfectants and host immune response than bacteria in planktonic form. Bacteria within biofilms pose a serious risk to human and animal health including dairy cows. Indeed, the most frequently isolated bacteria during intra-mammary infections in dairy cows have the ability to form a biofilm. This is also true with staphylococci that are frequent pathogens of the mammary gland. Mastitis is an inflammation of the mammary gland in cows that causes a reduction in the secretory activity of the gland, quantifiable signs of discomfort and pain and, in some instances, death. Economic losses caused by this disease are considerable. The knowledge relating to biofilms formed by staphylococci have allowed the development of antibiofilm molecules specifically targeting biofilm formation steps. These molecules were developed to be applied in human medicine and, unfortunately, very little is known about their use in veterinary medicine. Yet the potential use of these molecules having a different target than antibiotics may be proposed as monotherapy or in combination with an antibiotic to increase their effectiveness. Antibiofilm molecules can represent new therapeutic alternatives in veterinary medicine and allow a better control of infectious diseases in animals, including bovine mastitis.

**Keywords:** bovine mastitis, *Staphylococcus aureus*, coagulase negative staphylococci, biofilm, antibiofilm molecules.

## Introduction

Les mammites bovines constituent pour l'industrie laitière une des maladies les plus redoutées et cela notamment en raison de leur incidence élevée et de leurs impacts négatifs importants sur le bien-être animal, la production laitière et la qualité du lait [27, 42]. Les mammites sont une inflammation de la glande mammaire de la vache le plus souvent consécutive à une infection intra-mammaire (IIM) [9, 91]. Les pathogènes responsables de ces infections sont souvent classés en fonction de leur mode de transmission [9]. On parlera alors d'IIM d'origine environnementale (ex : les IIM à coliformes, à *Streptococcus uberis*), qui sont associées essentiellement à la forme clinique de la maladie, ou d'IIM d'origine contagieuse (ex : IIM à *Staphylococcus*

*aureus*, à *Streptococcus agalactiae*) associées quant à elles majoritairement à la forme subclinique de la maladie (i.e. absence de signes visibles) [11, 87, 108]. Dans ce dernier cas, une procédure diagnostique devra être utilisée pour identifier les vaches ou les quartiers affectés. Le comptage des cellules somatiques (CCS) et l'analyse bactériologique du lait sont souvent utilisés à cette fin [29, 32].

Bien que, sur un individu donné le stade subclinique puisse évoluer vers un stade clinique et vice versa, d'un point de vue populationnel, ces deux formes de la maladie sont souvent considérées comme deux problèmes de santé indépendants [5, 72]. En effet, dans les troupeaux laitiers, il est fréquent d'observer une incidence élevée de mammite clinique sans problème majeur de CCS et le contraire est

également souvent observé (i.e. CCS du réservoir élevé, mais peu de cas de mammite clinique) [5, 72].

Dans une étude récente menée sur une cohorte de 69 troupeaux canadiens, on estimait qu'en général 21.3% des vaches expérimentent au moins un épisode de mammite clinique durant une lactation standardisée de 305 jours [36]. Des données similaires ont été obtenues au Pays-Bas (28.6%), en Flandre (27%), en France dans des troupeaux présentant un faible CCS (20.1%) ainsi qu'en Nouvelle-Zélande (22.7%) [7, 85, 93, 104]. Au Danemark, l'incidence d'épisode de mammite clinique semblait plus élevée (44.7%) [94].

Bien que très visibles et inquiétants pour les producteurs laitiers, les cas de mammite clinique entraînent généralement une baisse de production laitière relativement faible puisque ces événements sont souvent de courte durée. Dans le pire des cas, des pertes de production significatives pourront être observées sur près de 70 jours et seront suivies d'un retour à un niveau de production s'approchant, mais inférieur, au niveau de production initial [41].

La mammite subclinique est, quant à elle, beaucoup plus fréquente. Au Canada, des prévalences de quartiers infectés de 3.9 et 42.7% étaient rapportées pour l'espèce *S. aureus* et les SCN, respectivement [33, 34]. De manière similaire, des prévalences de quartiers infectés à *S. aureus* ou à SCN, respectivement de 3.1 et 9.7% ont été rapportées en Flandre [86]. Au Danemark, des prévalences de vaches infectées à *S. aureus* ou à SCN de 10.2 et 4.1% ont été observées [1]. Finalement, 9.7 et 13.2% des 77 172 échantillons de lait soumis au Wisconsin Veterinary Diagnostic Laboratory entre 1994 et 2001 étaient positifs pour *S. aureus* ou SCN, respectivement [62].

Cependant, ces résultats s'intéressant à la prévalence d'IIM peuvent difficilement être comparés aux résultats d'incidence de mammite clinique. Malheureusement très peu de données existent sur l'incidence d'IIM par espèce bactérienne. Dans l'étude cohorte canadienne préalablement citée, on estimait qu'en général 7% des quartiers (i.e. approximativement 20 à 28% des vaches) développent une IIM à *S. aureus* durant une lactation standardisée de 305 jours (i.e. une incidence de 0.007 nouvelles IIM/quartier-mois [33]). Des résultats similaires ont été rapportés par Zadoks et al. [108]. Cependant, ces IIM persisteront souvent pour de longues périodes de temps, parfois pour la vie de l'animal, et entraîneront une inflammation et une baisse de production laitière continue et persistante [28]. Pour d'autres pathogènes souvent impliqués lors de mammite subclinique, les SCN par exemple, une incidence encore plus élevée de nouvelles infections a été rapportée avec 290% des quartiers qui expérimentaient une nouvelle IIM à SCN durant une lactation de 305 jours (i.e. une incidence de 0.29 nouvelles IIM/quartier-mois [33]). Les IIM causées par ces derniers pathogènes, cependant, dureraient en général moins d'un mois et entraîneraient donc des baisses de production laitière relativement moins importantes [38].

La capacité que possèdent certains pathogènes, par exemple *S. aureus*, à persister dans la glande mammaire pour de longue période de temps est extrêmement problématique pour l'industrie laitière. Plusieurs mécanismes permettent l'échappement de la bactérie au système immunitaire de l'hôte et/ou aux approches thérapeutiques [6, 14]. Plus particulièrement, la capacité à former un biofilm a été démontrée en laboratoire pour plusieurs des pathogènes de la mammite dont *S. aureus*, *Escherichia coli*, et *S. uberis* [69]. Cette propriété est possiblement responsable de l'échec de certains traitements antibiotiques ce qui motive les chercheurs à définir de nouvelles alternatives thérapeutiques pour traiter la mammite en association ou non avec un traitement antibiotique [17]. Une bonne connaissance des composants et des différentes étapes de formation du biofilm ont permis de développer trois stratégies alternatives [23] : (1) inhibition de l'adhésion de la bactérie sous forme planctonique sur une surface et cela dans le but d'empêcher la formation du biofilm ; (2) perturbation de l'architecture du biofilm durant la phase de maturation ; (3) inhibition des signaux intra et intercellulaires. L'utilisation potentielle de ces molécules ayant une cible différente de celles des antibiotiques pourrait être proposée en monothérapie ou en combinaison avec un antibiotique afin d'augmenter l'efficacité de ce dernier et ainsi contribuer à mieux contrôler les maladies infectieuses animales dont la mammite bovine.

L'objectif de cette revue est de synthétiser les connaissances actuelles sur les biofilms, particulièrement ceux produits par les staphylocoques, et leur rôle dans le cas des IIM chez la vache laitière et de discuter les avenues potentielles de traitement ciblant le biofilm.

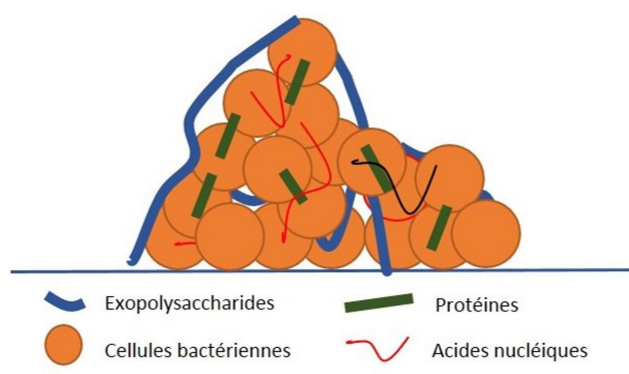
## Le biofilm bactérien

### GÉNÉRALITÉS

Le biofilm bactérien est une communauté de bactéries qui s'agrègent en une microcolonie recouverte d'une matrice polymérique et adhèrent sur une surface biotique (ex : muqueuses) ou abiotique (ex : cathéters, surfaces ou équipements à la ferme, à l'abattoir ou à l'usine de transformation) [24]. Il est estimé que près de 80 % de la biomasse microbienne de la planète résiderait sous forme de biofilm [89]. Ce mode de vie permet aux bactéries de survivre dans un environnement hostile et cela grâce entre autres à une plus grande résistance ou tolérance aux antibiotiques, aux désinfectants mais aussi à la réponse immunitaire de l'hôte, que les bactéries sous forme libre ou planctonique [17, 24, 68, 74, 95, 102]. Les bactéries ayant la capacité de former des biofilms peuvent amener des problèmes cliniques aussi bien chez l'homme que chez l'animal. Les « National Institutes of Health » (NIH) aux États-Unis estiment que plus de 75% des infections microbiennes chez l'homme (ex : endocardite, fibrose kystique, infections associées aux soins) sont imputables à la persistance des bactéries sous forme de biofilm [43, 44, 82].

## CARACTÉRISTIQUES COMMUNES DES BIOFILMS

Les bactéries ayant la capacité de former un biofilm présentent des caractéristiques conjointes [24, 102]. Premièrement, ces cellules bactériennes sont recouvertes d'une matrice polymérique fortement hydratée (>90% d'eau) et composée d'exopolysaccharides, de protéines et d'acides nucléiques (Figure 1). Cependant, leur répartition est fonction de l'espèce concernée. Par exemple, chez *S. aureus*, le polysaccharide le plus fréquemment retrouvé est un polymère de N-acétyl-D-glucosamine (nommé PNAG ou PIA, « polysaccharide intercellular adhesin ») [3].



**Figure 1 :** Composition du biofilm

Les cellules bactériennes sont recouvertes d'une matrice polymérique fortement hydratée et composée d'exopolysaccharides, de protéines et d'acides nucléiques. D'après Lister et al., 2014 [61].

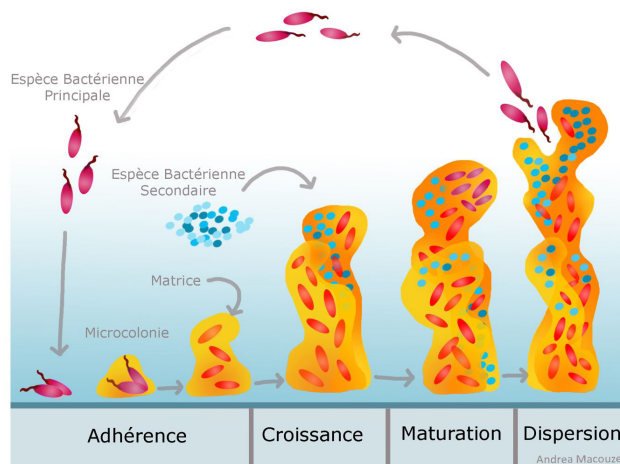
Deuxièmement, le développement du biofilm répond à des signaux extracellulaires qui sont soit présents dans l'environnement proche de la bactérie soit produits par la bactérie elle-même comme par exemple le « quorum sensing » (QS) [70]. Le QS est un mécanisme de régulation de l'expression génique en réponse à des variations de la densité cellulaire. On parle alors de mécanisme de perception de densité cellulaire. Ce dernier est basé sur un principe de masse critique, c'est-à-dire qu'une fois que les concentrations en molécules signales atteignent une valeur seuil, des régulateurs transcriptionnels vont être activés et exercer un contrôle sur des gènes spécifiques impliqués notamment dans les stades tardifs de formation du biofilm. Le QS régule la physiologie du biofilm ainsi que l'épaisseur du biofilm. Il va également initier la phase de dispersion du biofilm [78].

Troisièmement, le biofilm protège les bactéries de toute agression extérieure telle que le système immunitaire de l'hôte, la dessiccation ou encore les biocides (antibiotiques et désinfectants) [24, 44].

## LES DIFFÉRENTES ÉTAPES DE FORMATION DU BIOFILM

Les étapes de formation du biofilm suivent également un schéma similaire pour toutes les bactéries (Figure 2). On différencie en général cinq phases : (1) développement d'un film conditionnant sur une surface ; (2) mouvement des

bactéries sous forme planctonique vers cette même surface ; (3) adhésion réversible puis irréversible des microorganismes à la surface ; (4) croissance et division des microorganismes puis formation de microcolonies et maturation du biofilm ; (5) détachement et dispersion de cellules du biofilm [82].



**Figure 2 :** Les différentes étapes de formation du biofilm.

Les bactéries sous forme libre ou planctonique vont adhérer à une surface, s'agréger et former des microcolonies. S'en suivra une différenciation de ces dernières en biofilm avec une croissance et une maturation de ce dernier jusqu'à sa taille maximale puis un détachement et une dispersion de bactéries qui vont-elles-mêmes aller coloniser de nouvelles surfaces.

Dans le texte qui suit, nous allons nous intéresser plus particulièrement aux facteurs moléculaires d'adhésion et de dispersion qui sont des cibles importantes dans le développement de stratégies antibiofilm. Ces facteurs varient d'une espèce bactérienne à l'autre. Ici, nous nous intéresserons à ceux mis en place chez les staphylocoques [77].

## L'ATTACHEMENT

Dans un premier temps, les cellules bactériennes sous forme planctonique vont venir s'agréger à une surface biotique ou abiotique par l'intermédiaire de transport passif (ex : sédimentation) ou alors de transport actif en faisant notamment intervenir des structures spécifiques de la bactérie (ex : flagelles chez *Pseudomonas aeruginosa*) [82]. Il s'en suivra une adhésion réversible correspondant à un attachement faible des cellules bactériennes à la surface et faisant intervenir des interactions faibles de type forces de Van der Waals et liaisons électrostatiques.

L'attachement sur une surface biotique se fera soit directement à la surface soit indirectement par l'intermédiaire d'un film conditionnant formé par les molécules de la matrice de l'hôte et reconnues par les MSCRAMM (« microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules ») qui sont ancrées dans la membrane cellulaire de la bactérie [77]. On distinguera 3 types de MSCRAMM en fonction de leur ligand (i.e. fibronectine, collagène et fibrinogène). La formation d'un film conditionnant pourra également être observée lors de l'attachement à une surface

abiotique. Dans ce cas-là, l'attachement sera dépendant des caractéristiques physicochimiques du matériel impliqué ainsi que de la surface de la bactérie mise en cause (hydrophobicité et exopolysaccharides). Si la cellule réside assez longtemps à la surface, l'adhésion deviendra irréversible et entraînera l'adhésion permanente du microorganisme à cette même surface et cela grâce à des interactions fortes et spécifiques.

Une fois que l'attachement des cellules bactériennes à la surface sera définitif, celles-ci vont s'agréger entre elles et former des microcolonies. On observera ensuite la croissance et la maturation du biofilm qui sera régité par des forces d'adhésion notamment pour permettre l'agglutination des bactéries entre elles mais également par des forces perturbatrices qui vont quant à elles permettre au biofilm d'acquies sa structure finale mais également plus tardivement de permettre le détachement d'amas de cellules bactériennes du biofilm [77].

Chez les staphylocoques, la molécule d'adhésion la plus importante est le PNAG ou PIA [76]. Ce dernier est codé par les gènes du locus *ica*. *icaA* et *icaD* interviennent notamment dans la synthèse d'une N-acétyl-D-glucosamine transférase dont le rôle est d'ajouter des résidus N-acétyl-glucosamine à la chaîne oligo N-acétyl-glucosamine en cours de polymérisation. *icaC* quant à lui code pour le transporteur du PNAG. Enfin, *IcaB* va déacétyler le pré-PNAG après son exportation. Les charges positives introduites par la N-déacétylation vont notamment expliquer la localisation du PNAG à la surface de la bactérie.

En revanche, des souches de staphylocoques ayant la capacité de former des biofilms ne possédant pas les gènes du locus *ica* ont permis de mettre en évidence l'implication de protéines dans l'adhésion du biofilm telles que Aap (« Accumulation associated protein »), Embp (« Extracellular matrix binding protein »), FnBps (« Fibronectin binding proteins ») ou encore la protéine A [77]. Leurs mécanismes d'implication dans l'adhésion cellule-cellule ne sont cependant pas encore totalement élucidés. Des polymères semblent également impliqués dans cette phase comme par exemple l'acide teichoïque qui interagit avec d'autres polymères de surface par l'intermédiaire de liaisons électrostatiques.

L'ADN extracellulaire (eDNA) libéré par les bactéries lysées semble également impliqué dans l'interaction avec d'autres structures de surface de la bactérie et de l'hôte et cela grâce à ses charges négatives [77].

## LE DÉTACHEMENT

Une fois la taille maximale du biofilm atteinte, différents mécanismes de dispersion vont intervenir [61]. Ce phénomène pourra être initié par différents facteurs tels qu'une perturbation mécanique (ex : forces de cisaillement), une dégradation enzymatique de la matrice extracellulaire (ex : DNase) ou du substrat sur lequel le biofilm est attaché (ex : hyaluronidase), une induction de la motilité, une

production d'agents tensioactifs ou encore un relâchement dans l'environnement extérieur d'exopolysaccharides [51]. Le mécanisme majeur mis en place par *S. aureus* est la production d'enzymes et de surfactants dans le but de dégrader plus ou moins spécifiquement les composants de la matrice polysaccharidique.

L'implication des PSM (« phenol soluble modulins »), une famille de toxines isolées notamment dans des souches de *S. aureus* très virulentes, dans le développement du biofilm et surtout dans le détachement des cellules bactériennes a été démontrée [84]. Chez les staphylocoques, la régulation de ces toxines est prise en charge par le système Agr (« Accessory gene regulator »).

Le système Agr est le nom donné au QS chez les staphylocoques. Ce système est activé par des peptides auto-induits (AIP), codés et produits par l'opéron *agr*. Ce système contrôle également d'autres facteurs de détachement, quant à eux plus spécifiques, les protéases.

On compte chez *S. aureus*, 10 protéases dont 7 sérine protéases, 2 cystéine protéases et 1 métalloprotéase. Celles-ci sont impliquées dans la dégradation des protéines de la matrice extracellulaire et de ce fait de la déstabilisation du biofilm. La protéase V8, par exemple, dégrade spécifiquement Bap (« Biofilm associated protein ») et FnBPs. À noter, que des protéases notamment produites par *Staphylococcus epidermidis*, semblent également entraîner la dispersion du biofilm de *S. aureus* [61].

D'autres mécanismes enzymatiques sont également impliqués dans cette étape de détachement, comme les nucléases ou encore la dispersine B. Cette dernière, isolée chez *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, va induire une dispersion du biofilm de *S. aureus* et de *S. epidermidis* en hydrolysant la liaison glycosidique du PNAG, dégradant ainsi la matrice et entraînant le détachement de cellules bactériennes du biofilm [52].

Le détachement est une étape clé dans la transmission et la persistance du biofilm car il entraîne la dispersion de cellules planctoniques qui vont coloniser d'autres surfaces et ainsi pouvoir conduire à la transmission de la bactérie de l'environnement vers un hôte mais aussi entre individus ou encore à une propagation de l'infection chez un même individu.

Afin d'étudier la formation et la dispersion du biofilm mais également de déterminer l'effet de molécules thérapeutiques sur celui-ci, plusieurs techniques sont disponibles en laboratoire. Parmi elles, on distinguera les méthodes statiques telles que les microplaques 96 puits et le «biofilm ring test», des méthodes dynamiques telles que le «drip flow cell» et la microfluidique. Les caractéristiques de ces différentes techniques, mais également leurs avantages et inconvénients, sont dans le Tableau I.



## RÔLE DU BIOFILM LORS D'INFECTIONS INTRA-MAMMAIRES

En médecine vétérinaire, les bactéries pouvant former des biofilms sont responsables de nombreuses pathologies persistantes et sont notamment impliquées dans les infections chroniques non traitables, les infections associées à du matériel chirurgical, mais aussi, dans la mammité bovine [39, 69, 100]. En effet, des études ont mis en évidence la capacité à former un biofilm par les pathogènes de la mammité [69]. C'est notamment le cas pour *S. aureus*, *E. coli*, *S. uberis* et les SCN [69, 100]. Le biofilm est présenté comme un facteur de virulence de ces bactéries dans les IIM. Chez *S. aureus*, la formation de biofilm est associée à la persistance des IIM mais également à la perte de sensibilité de la bactérie aux traitements antibiotiques. Chez les SCN, la formation de biofilm semble aussi intervenir dans la persistance puisque sa production est associée à des stades plus avancés de la

lactation [100] mais également à une perte de sensibilité aux biocides. En effet, une étude réalisée sur des souches de SCN isolées dans des cas de mammité bovine a montré que les souches ayant la capacité à former un biofilm présentaient une sensibilité diminuée aux antibiotiques et désinfectants couramment utilisés [101]. Il faudra, par exemple, utiliser une dose d'antibiotique (pénicilline G/novobiocine ou ceftiofur) 4 à 2048 fois supérieure à la concentration minimale inhibitrice (CMI) afin de pouvoir éradiquer le biofilm formé par les souches de SCN [101]. Ces souches vont également présenter une sensibilité diminuée aux désinfectants à base d'iode. En effet, un temps de contact 2 à 10 fois supérieur sera nécessaire afin d'éradiquer complètement le biofilm formé [101]. En revanche, la chlorhexidine présenterait la même efficacité sur les différentes souches de SCN testées qu'elles soient sous forme planctonique ou sous forme biofilm [101].

Méthodes d'étude du biofilm	Caractéristiques	Avantages	Inconvénients	Références
<b>Microplaques 96 puits</b>	Interface solide liquide; Évaluation quantitative de la formation de biofilms par mesure de sa densité optique	Simple d'utilisation ; Rapide ; Criblage haut débit ; Compatible avec lecteur de plaques	Condition statique : pas de forces de cisaillement ; Aucun ajout de milieu frais	[22]
<b>"Biofilm ring test"</b>	Interface solide liquide; Évaluation quantitative de la formation de biofilms par mesure de la capacité du biofilm à immobiliser des billes magnétiques	Simple d'utilisation; Rapide; Criblage haut débit; Absence d'étapes de lavage et coloration	Condition statique : pas de forces de cisaillement ; Aucun ajout de milieu frais	[19]
<b>Tubes de plastique ou de verre</b>	Interface air liquide; Évaluation qualitative de la formation de biofilm	Condition dynamique (agitation) ; Observation de pellicules	Non quantitatif	[21]
<b>"Flow cell"</b>	Étude de la formation de biofilm à l'interface solide liquide sous l'action de forces de cisaillement; Gros volumes	Condition dynamique ; Observable directement par microscopie	Forces de cisaillement ; Nombre de chambres limité ; Risque de contamination élevé	[45]
<b>"Drip flow cell"</b>	Idem "Flow cell" mais formation de biofilm à l'interface air liquide; Gros volumes	Condition dynamique ; Écoulement milieu frais ; Conditions proches de celles retrouvées dans les poumons;	Forces de cisaillement ; Nombre de chambres limité ; Risque de contamination élevé	[40]
<b>Microfluidique</b>	Étude de la formation de biofilms à l'interface solide liquide sous l'action de forces de cisaillement	Criblage haut débit; Micro volumes; Forces de cisaillement contrôlées; Observable directement par microscopie	Coût élevé de l'appareil; Personnel expérimenté requis	[8]
<b>Calgary Biofilm Device</b>	Formation de biofilms sur des "Peg"; Évaluation de la résistance du biofilm aux biocides par mesure de la CMEB (Concentration minimale éradiquant le biofilm)	Criblage haut débit d'agents antimicrobiens; Forces de cisaillement	Non adapté à toutes les espèces bactériennes	[16]

TABLEAU I : Les méthodes d'étude du biofilm les plus couramment utilisées en laboratoire.

Plusieurs techniques sont disponibles en laboratoire afin d'étudier la formation et la dispersion du biofilm mais également afin de déterminer l'effet de molécules thérapeutiques sur celui-ci. Le choix de la technique se fera en fonction de ses avantages et inconvénients mais également en fonction de son usage. D'après Lebeaux et col [60].

Plusieurs hypothèses permettent d'expliquer la perte de sensibilité des bactéries sous forme biofilm vis-à-vis des agents antimicrobiens [24, 44]. Premièrement, la matrice polymérique agit comme une barrière et diminue ou empêche la diffusion de l'antibiotique dans le biofilm. La concentration d'antibiotique ne sera alors plus suffisante pour endommager la bactérie ciblée. Deuxièmement, la matrice polymérique présente des charges électrostatiques à sa surface qui vont fixer et bloquer certains agents antimicrobiens empêchant une fois encore d'atteindre une concentration suffisante d'antibiotique. La dernière explication concerne l'état physiologique des cellules bactériennes du biofilm qui, du fait d'une faible concentration en éléments nutritifs ainsi qu'en oxygène à certains endroits du biofilm, seront peu actives voir dormantes et ne seront donc pas ciblées par les antibiotiques inhibant le processus métabolique bactérien. Ces cellules dites persistantes permettront alors la repopulation du biofilm affaibli par le traitement antibiotique et conduiront à une chronicité de l'infection [49]. De plus, les bactéries cultivées en condition de biofilm mixte (i.e. comportant plus d'une espèce microbienne) présentent une diminution de leur sensibilité aux antibiotiques en comparaison à celle cultivées en condition de biofilm simple. Par exemple, une espèce bactérienne habituellement sensible aux  $\beta$ -lactamines pourra être protégée contre l'action de ces antibiotiques grâce à la production d'une  $\beta$ -lactamase par une autre espèce bactérienne présente dans le biofilm mixte [44].

La résistance ou tolérance conférée aux bactéries du biofilm est responsable de l'échec de certains traitements antibiotiques ce qui pousse à développer de nouvelles stratégies thérapeutiques, en association ou non, avec le traitement antibiotique initial [17].

## Les antibiofilms

### GÉNÉRALITÉS

Différentes stratégies sont envisagées pour prévenir ou inhiber le développement du biofilm [92]. Par exemple, en limitant l'étape d'adhésion, le passage de la forme planctonique à la forme biofilm, l'étape de maturation ou les échanges intercellulaires. Mais aussi en réactivant les cellules dormantes ou encore en favorisant la dispersion des cellules bactériennes du biofilm [10].

### LES ANTIBIOFILMS CHEZ LES STAPHYLOCOQUES

L'importance des infections chroniques à staphylocoques en médecine animale et en médecine humaine justifie la recherche d'alternatives thérapeutiques aux antibiotiques. Un éventail de stratégies thérapeutiques curatives ou préventives ciblant les différentes étapes de formation du biofilm est proposé en médecine humaine. La littérature se rapportant à l'utilisation de molécules antibiofilm chez l'animal est quant à elle beaucoup moins documentée. Les exemples qui suivent portent donc presque exclusivement sur des données obtenues en médecine humaine.

### INHIBITEURS DE L'ATTACHEMENT DE LA BACTÉRIE SOUS FORME PLANCTONIQUE À UNE SURFACE

La façon la plus simple d'inhiber le développement d'un biofilm est d'empêcher sa formation et cela notamment en perturbant l'attachement des bactéries sous forme planctonique à une surface biotique ou abiotique. L'attachement est contrôlé par différents facteurs tels que les protéines d'adhésion de la bactérie mais également les propriétés physico-chimiques de la surface en question [30].

De ce fait de nouvelles stratégies ont été proposées afin de bloquer les stades précoces du développement du biofilm en prévenant l'attachement de la bactérie à une surface abiotique. Cela pourra se faire soit en utilisant des surfaces modifiées soit en recouvrant les surfaces avec des composés limitant l'adhésion des bactéries comme c'est le cas de l'arylrhodamine [23]. Les différentes propriétés de ces stratégies alternatives (nature du composé, origine, spectre et mode d'action), sont représentées dans le Tableau II. Cependant cette stratégie n'est pas adaptée aux IIM étant donné que l'objectif sera, dans ce cas, d'éradiquer un biofilm déjà formé sur une surface biotique, la glande mammaire. En revanche, ce type de stratégie peut être intéressant pour l'industrie laitière notamment en empêchant la formation de biofilm sur la surface des équipements utilisés pour la récolte et l'entreposage du lait sur les fermes ou encore dans les usines de transformation du lait [99].

### PERTURBATEUR DE L'ARCHITECTURE DU BIOFILM

La majorité des molécules antibiofilm proposées dans la littérature agissent en perturbant l'architecture du biofilm (Tableau III), et cela soit par inhibition de la formation du biofilm soit par induction de sa dispersion. Dans ce dernier cas, les cellules libérées dans le milieu extérieur recouvreront leur sensibilité initiale aux antibiotiques. De ce fait, les molécules induisant une dispersion des cellules du biofilm seront indiquées en association à une antibiothérapie. Parmi les différentes alternatives proposées, on retrouve essentiellement des enzymes ciblant la matrice comme par exemple la dispersine B qui est une enzyme catalysant l'hydrolyse du PNAG et va ainsi perturber l'architecture du biofilm de staphylocoques [52]. Mais également des molécules signales telle que l'acide cis-2-décénoïque qui en plus d'inhiber la formation du biofilm va aussi induire sa dispersion [25]. L'immunothérapie [83] et la phagothérapie [15, 54] sont également des alternatives prometteuses. Les molécules antibiofilm perturbant l'architecture pourrait ainsi être utilisées pour traiter les IIM en association (molécules dispersant le biofilm) ou non (molécules inhibant la formation de biofilm) avec un traitement antibiotique comme par exemple avec les céphalosporines, la pénicilline ou encore les combinaisons thérapeutiques associées à la pénicilline.

Stratégie antibiofilm	Nature du composé	Origine du composé	Mode d'action	Spectre d'activité	Références
<b>Silicone recouvert d'un polymère modifié</b>	Polymère d'acrylate modifié	Biotechnologie	Inhibe l'attachement de la bactérie à la surface abiotique de façon non spécifique	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Escherichia coli</i> et <i>Staphylococcus aureus</i>	[46]
<b>Surface de cathéters modifiée avec un polymère de sulfobétaine</b>	Polymère zwitterionique	Biotechnologie	Antithrombotique et inhibe l'attachement des cellules bactériennes à la surface abiotique de façon non spécifique	<i>Acinetobacter baumannii</i> , <i>Candida albicans</i> , <i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> et <i>Staphylococcus epidermidis</i>	[95]
<b>Aryl rhodamines</b>	Composés organiques	Synthèse chimique	Inhibe l'adhésion primaire de la cellule bactérienne à la surface de façon non spécifique.	<i>S. aureus</i> , <i>S. epidermidis</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>E. faecium</i> et <i>E. gallinarum</i>	[75]
<b>Ethylene glycol tetraacetic acid (EGTA) et trisodium citrate (TSC)</b>	Agents chélateurs	Synthèse chimique	Fixe les cations métalliques Ca <sup>++</sup> et Mg <sup>++</sup> qui ont un rôle important dans l'adhésion	Certaines souches de <i>S. aureus</i>	[2]
<b>Eugenol et cinnamaldehyde</b>	Huiles essentielles	Végétale ( <i>Syzygium aromaticum</i> et <i>Cinnamomum zeylanicum</i> )	Inhibe l'adhésion primaire de la cellule bactérienne à la surface de façon non spécifique.	<i>S. aureus</i>	[13]
<b>Argent (Ag)</b>	Ion, métal ou nanoparticule	Naturels et biotechnologies	Entraine une modification de la structure et de la morphologie du microorganisme en interagissant avec des molécules contenant du soufre ou du phosphore (ex: ADN)	<i>Bacillus subtilis</i> , <i>E. coli</i> , <i>Legionella pneumophila</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>S. aureus</i> et <i>S. epidermidis</i>	[20, 97]

TABLEAU II : Inhibiteurs de l'attachement de la bactérie sous forme planctonique à une surface biotique ou abiotique.

Le développement de surfaces recouvertes de substances antibactériennes va empêcher l'attachement des cellules bactériennes sous forme planctonique à cette surface et ainsi bloquer la formation future d'un biofilm.

Stratégie antibiofilm	Nature du composé	Origine du composé	Mode d'action	Spectre d'activité	Références
<b>Acide cis-2 décénoïque</b>	Acide gras	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Inhibe le développement du biofilm et induit sa dispersion	Gram négatif et positif dont <i>S. aureus</i>	[25]
<b>N-acétyl L cystéine</b>	Acide aminé non essentiel	Synthèse chimique	Induit la dégradation du biofilm	<i>S. aureus</i> et <i>P. aeruginosa</i>	[31]
<b>Dispersine B</b>	Glycosyl hydrolase	<i>Aggregatibacter actinomycetem-comitans</i>	Enzyme bactérienne hydrolysant la liaison glycosidique du PNAG de la matrice	<i>S. epidermidis</i>	[52]
<b>Nucléase</b>	DNase	<i>S. aureus</i>	Endonucléase dégradant l'ADN simple et double brin de façon Ca <sup>++</sup> dépendant	<i>S. aureus</i>	[55]
<b>Pulmozyme</b>	DNase I	Génie génétique	Hydrolyse l'ADN contenu dans la matrice et prévient la formation de biofilm sur les surfaces abiotiques	<i>P. aeruginosa</i> et <i>S. aureus</i>	[63]

<b>Lysostaphine</b>	Métallo- endopeptidase	<i>Staphylococcus simulans</i>	Clive spécifiquement le pont transversal pentaglycine du peptidoglycane et perturbe l'architecture de la matrice extracellulaire du biofilm	<i>S.aureus</i> et <i>S. epidermidis</i>	[106, 58]
<b>Protéinase K</b>	Enzyme protéolytique	<i>Tritirachium album</i>	Dégradation des protéines de surface et des protéines de la matrice par clivage des liaisons peptides des AA	<i>S. aureus</i>	[18]
<b>Ssp A</b>	Sérine protéase	<i>S. aureus</i>	Clivage de protéines de surface et de protéines sécrétées	<i>S. aureus</i>	[65]
<b>Esp</b>	Sérine protéase	<i>S. epidermidis</i>	Homologue de la protéase V8. Clivage de protéines de surface et de protéines sécrétées	<i>S. aureus</i>	[50]
<b>Aureolysine</b>	Métalloprotéase	<i>S. aureus</i>	Clivage de protéines de surface et de protéines sécrétées	<i>S. aureus</i>	[65]
<b>Las B</b>	Élastase	<i>P. aeruginosa</i>	Inhibe la formation du biofilm et dispersion	<i>S. aureus</i>	[80]
<b>Lectine de type C</b>	Protéine	Venin de serpent	Inhibe la formation du biofilm	<i>S. aureus</i> et SCN	[57]
<b>Carvacrol et thymol</b>	Huile essentielle	Végétale	Inhibe la croissance du biofilm préformé mais aussi sa formation	<i>S. aureus</i> et <i>S. epidermidis</i>	[71]
<b>Peptide 1018</b>	Peptide	Synthèse chimique	Bloque le ppGpp, une alarmonne (une molécule produite suite à un stress), impliqué dans le développement du biofilm	Gram négatif et positif dont <i>S. aureus</i>	[26]
<b>Vaccin</b>	Cellules bactériennes inactivées	<i>S. aureus</i>	Immunisation avec des cellules inactivées d'une souche de <i>S. aureus</i> productrice forte de biofilm	<i>S. aureus</i>	[83]
<b>Vaccin quadrivalent</b>	Protéines de la paroi et de la membrane bactérienne	<i>S. aureus</i>	Immunisation avec des protéines immunogènes; Réduction ostéomyélite en coadministration avec vancomycine	<i>S. aureus</i>	[12]
<b>Phagothérapie + rifampicine</b>	Bactériophage SAP 26	<i>S. aureus</i>	Les phages vont induire la destruction du biofilm libérant des bactéries sous forme planctonique alors sensibles aux ATB.	<i>S. aureus</i>	[88]
<b>Huiles d'agrume</b>	Huiles essentiels	Végétale	Inhibition de la formation mais entraine également sa dispersion	<i>S. aureus</i>	[37]
<b>Acide ellagique</b>	Composé polyphénolique	Végétale	Inhibe la formation du biofilm	<i>S. aureus</i> , <i>Streptococcus dysgalactiae</i>	[35]
<b>Chelerythrine, sanguinarine dihydroxybenzo- furane et proanthocyanidine</b>	Alcaloïdes et flavonoïdes	Végétale	Inhibe la formation du biofilm	<i>S. aureus</i> et Gram positif	[4]
<b>Acide tannique</b>	Composé polyphénolique	Végétale	Inhibe la croissance du biofilm sans inhiber la croissance bactérienne	<i>S. aureus</i>	[81]



<b>Acide tannique</b>	Composé polyphénolique	Végétale	Inhibe la croissance du biofilm sans inhiber la croissance bactérienne	<i>S. aureus</i>	[81]
<b>Magnolol</b>	Composé organique	Végétale	Inhibe la formation du biofilm par inhibition de l'autolyse et de la libération d'ADN extracellulaire	<i>S. aureus</i>	[105]
<b>Bromoageliférine</b>	Dérivés alcaïdoïdes	Marine	Inhibe la formation du biofilm	Gram négatif et positif dont <i>S. aureus</i>	[47]
<b>Oroidin, Ageliférin, Mauritiamine</b>	2-amino-imi/triazole	Synthèse Chimique	Inhibe la formation du biofilm et dispersion Activité synergique avec ATB traditionnels	<i>S. aureus, A. baumannii</i>	[90]

TABLEAU III : Perturbateurs de l'architecture du biofilm.

Les molécules antibiofilm perturbant l'architecture du biofilm vont agir soit en bloquant le développement d'un biofilm mature soit en entraînant la dispersion des cellules du biofilm.

Stratégie antibiofilm	Nature du composé	Origine du composé	Mode d'action	Spectre d'activité	Références
<b>Hamamelitannin</b>	Polyphénol. Analogue non peptidique de RIP (RNAIII Inhibiting Peptide)	Naturel ( <i>Hamamelis virginiana</i> )	Inhibe les signaux intracellulaires par inhibition d'un régulateur du QS, le RNA III	<i>S. aureus</i> et <i>S. epidermidis</i>	[56]
<b>Nanoparticules d'Ag couplées à des extraits de citronnelle</b>	Nanotechnologie	Biotechnologie couplée à des extraits d'origine naturelle <i>Cimbopogan citratus</i>	Augmente l'activité du Quorum quenching contre la formation de biofilm	<i>S. aureus</i>	[66]
<b>Nitrate de sodium (NaNO<sub>3</sub>) ou nitrite de sodium (NaNO<sub>2</sub>)</b>	Composés chimiques	Synthèse	Réponse adaptative induite par un stress après administration de nitrite (Production de NO)	<i>S. aureus</i> et <i>S. epidermidis</i>	[96]
<b>AIP type I (Auto Inducing Peptide)</b>	Peptide	<i>S. aureus</i>	Inhibe l'expression de RNA III	<i>S. aureus</i>	[67]
<b>AIP type IV</b>			Inhibe l'expression d' <i>agr</i>		
<b>Furanone 7 couplé à du polystyrène ou à un cathéter</b>	Lactone hétérocyclique	Synthèse chimique	Interfère dans la communication entre les bactéries induite par AI-2.	<i>S. epidermidis</i>	[48]
<b>Furanone 2 et 3</b>	Lactone hétérocyclique	Synthèse chimique	Bloque la formation du biofilm via une inhibition de la cascade de signalisation initiée par AIP	<i>S. aureus</i>	[107]
<b>AP 4-5</b>	Haptène	Synthèse chimique	Provoque une réponse immunitaire de type Ac (Acm anti AIP IV) qui inhibe le QS par séquestration de l'AIP de type IV	<i>S. aureus</i>	[79]
<b>c-di-GMP extracellulaire</b>	Messenger secondaire	Synthèse chimique	Inhibe l'adhésion intercellulaire	<i>S. aureus</i>	[53]

TABLEAU IV : Perturbateurs de la signalisation inter et intracellulaire.

Les molécules antibiofilm perturbant la signalisation inter et intracellulaire vont agir en inhibant la génération de ces signaux, en bloquant le récepteur du signal ou encore en perturbant le signal émis.

## PERTURBATEURS DES SIGNAUX INTRA ET EXTRACELLULAIRES

Les bactéries sont exposées à différents signaux. Ils peuvent être mécaniques (ex : « surface sensing »), environnementaux (ex : concentrations en fer, en glucose, en oxygène), intracellulaires (ex : c-di-GMP) ou encore être basés sur la densité cellulaire (ex : QS). Ces mécanismes sont impliqués dans la formation mais également dans la dispersion du biofilm, la perturbation de ces signaux peut constituer une nouvelle alternative thérapeutique (Tableau IV). Et cela notamment par le développement d'inhibiteurs du QS. Ces petites molécules non peptidiques, peptides ou protéines vont agir soit en inhibant la génération de ces signaux soit en bloquant le récepteur du signal soit en perturbant le signal émis et de ce fait altérer les interactions intercellulaires nécessaires à la formation d'un biofilm. Ce type de molécule peut s'avérer intéressant également dans le traitement des IIM en association ou non avec les antibiotiques conventionnels.

## LES ANTIBIOFILMS DANS LE TRAITEMENT DES IIM À STAPHYLOCOQUES CHEZ LES BOVINS

Parmi les différentes stratégies proposées précédemment, très peu d'études s'intéressent à l'application des molécules antibiofilm en médecine vétérinaire dans le traitement des infections à staphylocoques [12, 37, 53, 57]. Pourtant cette alternative pourrait s'avérer intéressante étant donné les problèmes liés à l'utilisation des antibiotiques dans le traitement de la MB à staphylocoques (e.g. développement de résistance, présence de résidus dans le lait, temps de retrait) [73]. Des études devront être réalisées afin d'évaluer l'efficacité de ces différentes molécules dans un contexte d'IIM chez la vache laitière mais également d'établir les limites liées à leur formulation, leur mode d'administration ainsi qu'à leur toxicité. De ce fait, nous pouvons spéculer sur l'administration d'une molécule antibiofilm idéale. Dans un premier temps, celle-ci pourrait être dispensée sous différentes formulations telles qu'une pommade ou un onguent, une suspension intramammaire, une solution de trempage ou encore des lingettes pré-imprégnées. Ensuite, en fonction de la forme galénique utilisée, un schéma thérapeutique sera mis en place. Dans le cas de suspensions, le produit sera administré par voie intramammaire et pourra être utilisé lors de la phase de tarissement afin de prévenir les nouvelles IIM mais également de traiter les IIM préexistantes (infusion intramammaire). Dans le cas d'une solution de trempage, de lingettes, de pommades ou d'onguent, la molécule pourra être administrée par voie topique après la traite afin de déloger les bactéries de l'extrémité du trayon et ainsi prévenir la survenue d'IIM. Finalement, il faudra vérifier l'efficacité du produit chez la vache. Pour cela, les paramètres pharmacocinétiques (e.g. biodisponibilité, concentration maximale, volume de distribution, demi-vie d'élimination, et clairance) et pharmacodynamiques (fenêtre thérapeutique) devront être mesurés. De plus, il sera important de vérifier que l'effet n'est pas diminué dans le lait comme c'est le cas

pour l'oxytétracycline qui est quatre fois moins efficace dans le lait [9].

## Conclusion et perspectives

La littérature se rapportant aux staphylocoques et à leur capacité à former un biofilm est plutôt complète. En effet, on connaît assez bien les différentes étapes et composantes du biofilm de staphylocoques particulièrement chez les souches d'origine humaine. Cette connaissance a d'ailleurs permis le développement d'une variété de molécules antibiofilm ciblant spécifiquement les étapes d'attachement, de maturation et de dispersion du biofilm. L'utilisation potentielle de ces molécules ayant une cible différente de celles des antibiotiques pourra être proposée en monothérapie ou en combinaison avec un antibiotique afin d'augmenter l'efficacité de ce dernier. Des études devront par contre être réalisées afin d'évaluer l'efficacité de ces différentes molécules ainsi que les limites liées à leur utilisation dans un contexte d'IIM chez la vache laitière.

## Remerciements

CG a reçu une bourse du Regroupement de recherche pour un lait de qualité optimale (Op+Lait), un regroupement stratégique financé par le Fonds de recherche du Québec - Nature et technologies et les Producteurs de lait du Québec. Les travaux de MJ, SD et FM sont financés en partie par la Grappe de recherche laitière (Les producteurs laitiers du Canada, Agriculture et Agroalimentaire Canada et la Commission canadienne du lait).

## Bibliographie

1. - AARESTRUP F.M., WEGENER H.C., ROSDAHL V.T., JENSEN N.E.: Staphylococcal and other bacterial species associated with intramammary infections in Danish dairy herds. *Acta Vet. Scand.*, 1995, **36**, 475-487.
2. - ABRAHAM N.M., LAMLERTTHON S., FOWLER V.G., JEFFERSON K.K.: Chelating agents exert distinct effects on biofilm formation in *Staphylococcus aureus* depending on strain background: role for clumping factor B. *J. Med. Microbiol.*, 2012, **61**, 1062-1070.
3. - ARCIOLA C.R., CAMPOCCIA D., RAVAIOLI S., MONTANARO L.: Polysaccharide intercellular adhesin in biofilm: structural and regulatory aspects. *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, 2015, 5:7. eCollection 2015. Review.
4. - ARTINI M., PAPA R., BARBATO G., SCOARUGH I G.L., CELLINI A., MORAZZONI P., BOMBARDELLI E., SELAN L.: Bacterial biofilm formation inhibitory activity revealed for plant derived natural compounds. *Bioorg. Med. Chem.*, 2012, **20**, 920-926.
5. - BARKEMA H.W., SCHUKKEN Y.H., LAM T.J., BEIBOER M.L., WILMINK H., BENEDICTUS G., BRAND A.: Incidence of clinical mastitis in dairy

- herds grouped in three categories by bulk milk somatic cell counts. *J. Dairy Sci.*, 1998, **81**, 411-419.
6. - BARKEMA H.W., SCHUKKEN Y.H., ZADOKS R.N.: The role of cow, pathogen, and treatment regimen in the therapeutic success of bovine *Staphylococcus aureus* mastitis. *J. Dairy Sci.*, 2006, **89**, 1877-1895.
  7. - BARNOUIN J., BORD S., BAZIN S., CHASSAGNE M.: Dairy management practices associated with incidence rate of clinical mastitis in low somatic cell score herds in France. *J. Dairy Sci.*, 2005, **88**, 3700-3709.
  8. - BENOIT M.R., CONANT C.G., IONESCU-ZANETTI C., SCHWARTZ M., MATIN A.: New device for high-throughput viability screening of flow biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2010, **76**, 4136-4142.
  9. - BLOWEY R., EDMONDSON P.: Mastitis control in dairy herds, 256 pages, Kindle edition, Londres, 2010.
  10. - BORDI C., DE BENTZMANN S.: Hacking into bacterial biofilms: a new therapeutic challenge. *Ann. Intensive Care*, 2011, **1**, 19.
  11. - BRADLEY A.J., GREEN M.J.: Adaptation of *Escherichia coli* to the bovine mammary gland. *J. Clin. Microbiol.*, 2001, **39**, 1845-1849.
  12. - BRADY R.A., O'MAY G.A., LEID J.G., PRIOR M.L., COSTERTON J.W., SHIRTLIFF M.E.: Resolution of *Staphylococcus aureus* biofilm infection using vaccination and antibiotic treatment. *Infect. Immun.*, 2011, **79**, 1797-1803.
  13. - BUDRI P.E., SILVA N.C., BONSAGLIA E.C., FERNANDES JÚNIOR A., ARAÚJO JÚNIOR J.P., DOYAMA J.T., GONÇALVES J.L., SANTOS M.V., FITZGERALD-HUGHES D., RALL V.L.: Effect of essential oils of *Syzygium aromaticum* and *Cinnamomum zeylanicum* and their major components on biofilm production in *Staphylococcus aureus* strains isolated from milk of cows with mastitis. *J. Dairy Sci.*, 2015, **98**, 5899-5904.
  14. - CAIN C.L.: Antimicrobial resistance in staphylococci in small animals. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.*, 2013, **43**, 19-40.
  15. - CERCA N., OLIVEIRA R., AZEREDO J.: Susceptibility of *Staphylococcus epidermidis* planktonic cells and biofilms to the lytic action of *Staphylococcus* bacteriophage K. *Lett. Appl. Microbiol.*, 2007, **45**, 313-317.
  16. - CERI H., OLSON M.E., STREMICK C., READ R.R., MORCK D., BURET A.: The Calgary Biofilm Device: new technology for rapid determination of antibiotic susceptibilities of bacterial biofilms. *J. Clin. Microbiol.*, 1999, **37**, 1771-1776.
  17. - CERI H., OLSON M.E., TURNER R.J.: Needed, new paradigms in antibiotic development. *Expert. Opin. Pharmacother.*, 2010, **11**, 1233-1237.
  18. - CHAIGNON P., SADOVSKAYA I., RAGUNAH CH., RAMASUBBU N., KAPLAN J.B., JABBOURI S.: Susceptibility of staphylococcal biofilms to enzymatic treatments depends on their chemical composition. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2007, **75**, 125-132.
  19. - CHAVANT P., GAILLARD-MARTINIE B., TALON R., HÉBRAUD M., BERNARDI T.: A new device for rapid evaluation of biofilm formation potential by bacteria. *J. Microbiol. Methods*, 2007, **68**, 605-612.
  20. - CHERNOUSOVA S., EPPLE M.: Silver as antibacterial agent: ion, nanoparticle, and metal. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 2013, **52**, 1636-1653.
  21. - CHRISTENSEN G.D., SIMPSON W.A., BISNO A.L., BEACHEY E.H.: Adherence of slime-producing strains of *Staphylococcus epidermidis* to smooth surfaces. *Infect. Immun.*, 1982, **37**, 318-326.
  22. - CHRISTENSEN G.D., SIMPSON W.A., YOUNGER J.J., BADDOUR L.M., BARRETT F.F., MELTON D.M., BEACHEY E.H.: Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. *J. Clin. Microbiol.*, 1985, **22**, 996-1006.
  23. - CHUNG P.Y., TOH Y.S.: Anti-biofilm agents: recent breakthrough against multi-drug resistant *Staphylococcus aureus*. *Pathog. Dis.*, 2014, **70**, 231-239.
  24. - COSTERTON J.W., STEWART P.S., GREENBERG E.P.: Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*, 1999, **284**, 1318-1322.
  25. - DAVIES D.G., MARQUES C.N.: A fatty acid messenger is responsible for inducing dispersion in microbial biofilms. *J. Bacteriol.*, 2009, **191**, 1393-1403.
  26. - DE LA FUENTE-NÚÑEZ C., REFFUVEILLE F., HANEY E.F., STRAUS S.K., HANCOCK R.E.: Broad-spectrum anti-biofilm peptide that targets a cellular stress response. *PLoS Pathog.*, 2014, **10**(5).
  27. - DE VliegHER S., FOX L.K., PIEPERS S., MCDougALL S., BARKEMA H.W.: Mastitis in dairy heifers: nature of the disease, potential impact, prevention, and control. *J. Dairy Sci.*, 2012, **95**, 1025-1040.
  28. - DJABRI B., BAREILLE N., BEAUDEAU F., SEEGER S.H.: Quarter milk somatic cell count in infected dairy cows: a meta-analysis. *Vet. Res.*, 2002, **33**, 335-357.
  29. - DOHOO I.R., SMITH J., ANDERSEN S., KELTON D.F., GODDEN S.: Diagnosing intramammary infections: evaluation of definitions based on a single milk sample. *J. Dairy Sci.*, 2011, **94**, 250-261.
  30. - DONLAN R.M.: Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerg. Infect. Dis.*, 2002, **8**, 881-890.
  31. - DRAGO L., DE VECCHIE E., MATTINA R., ROMANÒ C.L.: Activity of N-acetyl-L-cysteine against biofilm of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* on orthopedic prosthetic materials. *Int. J. Artif. Organs*, 2013, **36**, 39-46.
  32. - DUFOUR S., DOHOO I.R.: Monitoring herd incidence of intramammary infection in lactating cows using repeated longitudinal somatic cell count measurements. *J. Dairy Sci.*, 2013, **96**, 1568-1580.
  33. - DUFOUR S., DOHOO I.R., BARKEMA H.W., DESCÔTEAUX L., DEVRIES T.J., REYHER K.K., ROY J.P., SCHOLL D.T.: Manageable risk factors associated with the lactational incidence, elimination, and

- prevalence of *Staphylococcus aureus* intramammary infections in dairy cows. *J. Dairy Sci.*, 2012, **95**, 1283-1300.
34. - DUFOUR S., DOHOO I.R., BARKEMA H.W., DESCÔTEAUX L., DEVRIES T.J., REYHER K.K., ROY J.P., SCHOLL D.T.: Epidemiology of coagulase-negative staphylococci intramammary infection in dairy cattle and the effect of bacteriological culture misclassification. *J. Dairy Sci.*, 2012, **95**, 3110-3124.
  35. - DÜRIG A., KOUSKOUMVEKAKI I., VEJBOG R.M., KLEMM P.: Chemoinformatics-assisted development of new anti-biofilm compounds. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2010, **87**, 309-317.
  36. - ELGHAFGHUF A., DUFOUR S., REYHER K., DOHOO I., STRYHN H.: Survival analysis of clinical mastitis data using a nested frailty Cox model fit as a mixed-effects Poisson model. *Prev. Vet. Med.*, 2014, **117**, 456-468.
  37. - FEDERMAN C., JOO J., ALMARIO J.A., SALAHEEN S., BISWAS D.: Citrus-derived oil inhibits *Staphylococcus aureus* growth and alters its interactions with bovine mammary cells. *J. Dairy Sci.*, 2016, **99**, 3667-3674.
  38. - FRY P.R., MIDDLETON J.R., DUFOUR S., PERRY J., SCHOLL D., DOHOO I.: Association of coagulase-negative staphylococcal species, mammary quarter milk somatic cell count, and persistence of intramammary infection in dairy cattle. *J. Dairy Sci.*, 2014, **97**, 4876-4885.
  39. - GARDNER A.J., PERCIVAL S.L., COCHRANE C.A.: Biofilms and role to infection and disease in veterinary medicine. In Percival S.L. (éd), Knottenbelt D.C. (éd), Cochrane C.A. (éd): *Biofilms and veterinary medicine*, Springer, Heidelberg, 2011, 111-129.
  40. - GOERES D.M., HAMILTON M.A., BECK N.A., BUCKINGHAM-MEYER K., HILYARD J.D., LOETTERLE L.R., LORENZ L.A., WALKER D.K., STEWART P.S.: A method for growing a biofilm under low shear at the air-liquid interface using the drip flow biofilm reactor. *Nat. Protoc.*, 2009, **4**, 783-788.
  41. - GRÖHN Y.T., WILSON D.J., GONZÁLEZ R.N., HERTL J.A., SCHULTE H., BENNETT G., SCHUKKEN Y.H.: Effect of pathogen-specific clinical mastitis on milk yield in dairy cows. *J. Dairy Sci.*, 2004, **87**, 3358-3374.
  42. - HALASA T., HUIJPS K., ØSTERÅS O., HOGEVEEN H.: Economic effects of bovine mastitis and mastitis management: a review. *Vet. Q.*, 2007, **29**, 18-31.
  43. - HALL-STOODLEY L., COSTERTON J.W., STOODLEY P.: Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nat. Rev. Microbiol.*, 2004, **2**, 95-108.
  44. - HALL-STOODLEY L., STOODLEY P.: Evolving concepts in biofilm infections. *Cell. Microbiol.*, 2009, **11**, 1034-1043.
  45. - HEYDORN A., NIELSEN A.T., HENTZER M., STERNBERG C., GIVSKOV M., ERSBØLL B.K., MOLIN S.: Quantification of biofilm structures by the novel computer program COMSTAT. *Microbiology*, 2000, **146**, 2395-2407.
  46. - HOOK A.L., CHANG C.Y., YANG J., LUCKETT J., COCKAYNE A., ATKINSON S., MEI Y., BAYSTON R., IRVINE D.J., LANGER R., ANDERSON D.G., WILLIAMS P., DAVIES M.C., ALEXANDER M.R.: Combinatorial discovery of polymers resistant to bacterial attachment. *Nat. Biotechnol.*, 2012, **30**, 868-875.
  47. - HUIGENS R.W. 3RD, MA L., GAMBINO C., MOELLER P.D., BASSO A., CAVANAGH J., WOZNIAK D.J., MELANDER C.: Control of bacterial biofilms with marine alkaloid derivatives. *Mol. Biosyst.*, 2008, **4**, 614-621.
  48. - HUME E.B., BAVEJA J., MUIR B., SCHUBERT T.L., KUMAR N., KJELLEBERG S., GRIESSER H.J., THISSEN H., READ R., POOLE-WARREN L.A., SCHINDHELM K., WILLCOX M.D.: The control of *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation and in vivo infection rates by covalently bound furanones. *Biomaterials*, 2004, **25**, 5023-5030.
  49. - HUMPHREYS G.J., MCBAIN A.J.: An introduction to the biology of biofilm recalcitrance. In Percival S.L. (éd), Williams D. (éd), Randle J. (éd): *Biofilms in infection prevention and control*, Elsevier Academic Press, San Diego, 2014, 245-256.
  50. - IWASE T., UEHARA Y., SHINJI H., TAJIMA A., SEO H., TAKADA K., AGATA T., MIZUNOE Y.: *Staphylococcus epidermidis* Esp inhibits *Staphylococcus aureus* biofilm formation and nasal colonization. *Nature*, 2010, **465**, 346-349.
  51. - JACQUES M., ARAGON V., TREMBLAY Y.D.: Biofilm formation in bacterial pathogens of veterinary importance. *Anim. Health Res. Rev.*, 2010, **11**, 97-121.
  52. - KAPLAN J.B., RAGUNATH C., VELLIYAGOUNDER K., FINE D.H., RAMASUBBU N.: Enzymatic detachment of *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2004, **48**, 2633-2336.
  53. - KARAOLIS D.K., RASHID M.H., CHYTHANYA R., LUO W., HYODO M., HAYAKAWA Y.: c-di-GMP (3'-5'-cyclic diguanylic acid) inhibits *Staphylococcus aureus* cell-cell interactions and biofilm formation. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2005, **49**, 1029-1038.
  54. - KELLY D., MCAULIFFE O., ROSS R.P., COFFEY A.: Prevention of *Staphylococcus aureus* biofilm formation and reduction in established biofilm density using a combination of phage K and modified derivatives. *Lett. Appl. Microbiol.*, 2012, **54**, 286-291.
  55. - KIEDROWSKI M.R., KAVANAUGH J.S., MALONE C.L., MOOTZ J.M., VOYICH J.M., SMELTZER M.S., BAYLES K.W., HORSWILL A.R.: Nuclease modulates biofilm formation in community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *PLoS One*, 2011, **6**.
  56. - KIRAN M.D., ADIKESAVAN N.V., CIRIONI O., GIACOMETTI A., SILVESTRI C., SCALISE G., GHISELLI R., SABA V., ORLANDO F., SHOHAM M., BALABAN N.: Discovery of a quorum-sensing inhibitor of drug-resistant staphylococcal infections by structure-based virtual screening. *Mol. Pharmacol.*, 2008, **73**, 1578-1586.



57. - KLEIN R.C., FABRES-KLEIN M.H., DE OLIVEIRA L.L., FEIO R.N., MALOUIN F., RIBON ADE O.: A C-Type Lectin from *Bothrops jararacussu* Venom Disrupts Staphylococcal Biofilms. *PLoS One*, 2015, **10**.
58. - KOKAI-KUN J.F., CHANTURIYA T., MOND J.J.: Lysostaphin eradicates established *Staphylococcus aureus* biofilms in jugular vein catheterized mice. *J. Antimicrob. Chemother.*, 2009, **64**, 94-100.
59. - KWON A.S., PARK G.C., RYU S.Y., LIM D.H., LIM D.Y., CHOI C.H., PARK Y., LIM Y.: Higher biofilm formation in multidrug-resistant clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. *Int. J. Antimicrob. Agents*, 2008, **32**, 68-72.
60. - LEBEAUX D., CHAUHAN A., RENDUELES O., BELOIN C.: From in vitro to in vivo Models of Bacterial Biofilm-Related Infections. *Pathogens*, 2013, **2**, 288-356.
61. - LISTER J.L., HORSWILL A.R.: *Staphylococcus aureus* biofilms: recent developments in biofilm dispersal. *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, 2014, **4**, 178.
62. - MAKOVEC J.A., RUEGG P.L.: Results of milk samples submitted for microbiological examination in Wisconsin from 1994 to 2001. *J. Dairy Sci.*, 2003, **86**, 3466-3472.
63. - MANN E.E., RICE K.C., BOLES B.R., ENDRES J.L., RANJIT D., CHANDRAMOHAN L., TSANG L.H., SMELTZER M.S., HORSWILL A.R., BAYLES K.W.: Modulation of eDNA release and degradation affects *Staphylococcus aureus* biofilm maturation. *PLoS One*, 2009, **4**.
64. - MANN E.E., WOZNIAK D.J.: *Pseudomonas* biofilm matrix composition and niche biology. *FEMS Microbiol. Rev.*, 2012, **36**, 893-916.
65. - MARTÍ M., TROTONDA M.P., TORMO-MÁS M.A., VERGARA-IRIGARAY M., CHEUNG A.L., LASA I., PENADÉS J.R.: Extracellular proteases inhibit protein-dependent biofilm formation in *Staphylococcus aureus*. *Microbes Infect.*, 2010, **12**, 55-64.
66. - MASURKAR S.A., CHAUDHARI P.R., SHIDORE V.B., KAMBLE S.P.: Effect of biologically synthesised silver nanoparticles on *Staphylococcus aureus* biofilm quenching and prevention of biofilm formation. *IET Nanobiotechnol.*, 2012, **6**, 110-114.
67. - MDOWELL P., AFFAS Z., REYNOLDS C., HOLDEN M.T., WOOD S.J., SAINT S., COCKAYNE A., HILL P.J., DODD C.E., BYCROFT B.W., CHAN W.C., WILLIAMS P.: Structure, activity and evolution of the group I thiolactone peptide quorum-sensing system of *Staphylococcus aureus*. *Mol. Microbiol.*, 2001, **41**, 503-512.
68. - MELCHIOR M.B., FINK-GREMMELS J., GAASTRA W.: Comparative assessment of the antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis in biofilm versus planktonic culture. *J. Vet. Med. B Infect. Dis. Vet. Public Health*, 2006, **53**, 326-332.
69. - MELCHIOR M.B., Bovine mastitis and biofilms. In Percival SL (éd), Knottenbelt D.C. (éd), Cochrane C.A. (éd): *Biofilms and veterinary medicine*, Springer, Heidelberg, 2011, 205-222.
70. - MILLER M.B., BASSLER B.L.: Quorum sensing in bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.*, 2001, **55**, 165-199.
71. - NOSTRO A., SUDANO ROCCARO A., BISIGNANO G., MARINO A., CANNATELLI M.A., PIZZIMENTI F.C., CIONI P.L., PROCOPIO F., BLANCO A.R.: Effects of oregano, carvacrol and thymol on *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *J. Med. Microbiol.*, 2007, **56**, 519-523.
72. - OLDE RIEKERINK R.G., BARKEMA H.W., KELTON D.F., SCHOLL D.T.: Incidence rate of clinical mastitis on Canadian dairy farms. *J. Dairy Sci.*, 2008, **91**, 1366-77.
73. - OLIVER S.P., MURINDA S.E.: Antimicrobial resistance of mastitis pathogens. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.*, 2012, **28**, 165-185.
74. - OLSON M.E., CERI H., MORCK D.W., BURET A.G., READ R.R.: Biofilm bacteria: formation and comparative susceptibility to antibiotics. *Can. J. Vet. Res.*, 2002, **66**, 86-92.
75. - OPPERMAN T.J., KWASNY S.M., WILLIAMS J.D., KHAN A.R., PEET N.P., MOIR D.T., BOWLIN T.L.: Aryl rhodanines specifically inhibit staphylococcal and enterococcal biofilm formation. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2009, **53**, 4357-4367.
76. - OTTO M.: Molecular basis of *Staphylococcus epidermidis* infections. *Semin. Immunopathol.*, 2012, **34**, 201-214.
77. - OTTO M.: Staphylococcal infections: mechanisms of biofilm maturation and detachment as critical determinants of pathogenicity. *Annu. Rev. Med.*, 2013, **64**, 175-188.
78. - PAN J., REN D.: Quorum sensing inhibitors: a patent overview. *Expert Opin. Ther. Pat.*, 2009, **19**, 1581-1601.
79. - PARK J., JAGASIA R., KAUFMANN G.F., MATHISON J.C., RUIZ D.I., MOSS J.A., MEIJLER M.M., ULEVITCH R.J., JANDA K.D.: Infection control by antibody disruption of bacterial quorum sensing signaling. *Chem. Biol.*, 2007, **14**, 1119-1127.
80. - PARK J.H., LEE J.H., CHO M.H., HERZBERG M., LEE J.: Acceleration of protease effect on *Staphylococcus aureus* biofilm dispersal. *FEMS Microbiol. Lett.*, 2012, **335**, 31-38.
81. - PAYNE D.E., MARTIN N.R., PARZYCH K.R., RICKARD A.H., UNDERWOOD A., BOLES B.R.: Tannic acid inhibits *Staphylococcus aureus* surface colonization in an IsaA-dependent manner. *Infect. Immun.*, 2013, **81**, 496-504.
82. - PERCIVAL S.L., MALIC S., CRUZ H., WILLIAMS D.W.: Introduction aux biofilms. In Percival SL (éd), Knottenbelt D.C. (éd), Cochrane C.A. (éd): *Biofilms and veterinary medicine*, Springer, Heidelberg, 2011, 41-69.
83. - PÉREZ M.M., PRENAFETA A., VALLE J., PENADÉS J., ROTA C., SOLANO C., MARCO J., GRILLÓ M.J., LASA I., IRACHE J.M., MAIRA-LITRAN T., JIMÉNEZ-BARBERO J., COSTA L., PIER G.B.,

- DE ANDRÉS D., AMORENA B.: Protection from *Staphylococcus aureus* mastitis associated with poly-N-acetyl beta-1,6 glucosamine specific antibody production using biofilm-embedded bacteria. *Vaccine*, 2009, **27**, 2379-2386.
84. - PESCHEL A., OTTO M.: Phenol-soluble modulins and staphylococcal infection. *Nat. Rev. Microbiol.*, 2013, **11**, 667-673.
85. - PETROVSKI K.R., HEUER C., PARKINSON T.J., WILLIAMSON N.B.: The incidence and aetiology of clinical bovine mastitis on 14 farms in Northland, New Zealand. *N. Z. Vet. J.*, 2009, **57**, 109-115.
86. - PIEPERS S., DE MEULEMEESTER L., DE KRUIF A., OPSOMER G., BARKEMA H.W., DE VliegHER S.: Prevalence and distribution of mastitis pathogens in subclinically infected dairy cows in Flanders, Belgium. *J. Dairy Res.*, 2007, **74**, 478-483.
87. - PYÖRÄLÄ S., TAPONEN S.: Coagulase-negative staphylococci-emerging mastitis pathogens. *Vet. Microbiol.*, 2009, **134**, 3-8.
88. - RAHMAN M., KIM S., KIM S.M., SEOL S.Y., KIM J.: Characterization of induced *Staphylococcus aureus* bacteriophage SAP-26 and its anti-biofilm activity with rifampicin. *Biofouling*, 2011, **27**, 1087-1093.
89. - RICHARDS J.J., MELANDER C.: Controlling bacterial biofilms. *Chembiochem*, 2009, **10**, 2287-2294.
90. - ROGERS S.A., HUIGENS R.W. 3RD, CAVANAGH J., MELANDER C.: Synergistic effects between conventional antibiotics and 2-aminoimidazole-derived antibiofilm agents. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2010, **54**, 2112-2118.
91. - RUEGG P.L., ERSKINE R.J., MORIN D.E.: Mammary gland health. In Smith B.P. (éd.): Large animals internal medicine, fifth edition, Elsevier, St Louis, 2015, 1015-1043.
92. - RUMBAUGH K.P. ET AHMAD I.: Antibiofilm agents: from diagnosis to treatment and prevention, Volume 8, 497 pages, Springer, Heidelberg, 2013.
93. - SANTMAN-BERENDS I.M., SWINKELS J.M., LAM T.J., KEURENTJES J., VAN SCHAİK G.: Evaluation of udder health parameters and risk factors for clinical mastitis in Dutch dairy herds in the context of a restricted antimicrobial usage policy. *J. Dairy Sci.*, 2016, **99**, 2930-2939.
94. - SATO K., BARTLETT P.C., ALBAN L., AGGER J.F., HOUE H.: Managerial and environmental determinants of clinical mastitis in Danish dairy herds. *Acta Vet. Scand.*, 2008, **50**, 4.
95. - SCHERR T.D., HEIM C.E., MORRISON J.M., KIELIAN T.: Hiding in Plain Sight: Interplay between Staphylococcal Biofilms and Host Immunity. *Front. Immunol.*, 2014, **5**.
96. - SCHLAG S., NERZ C., BIRKENSTOCK T.A., ALTENBEREND F., GÖTZ F.: Inhibition of staphylococcal biofilm formation by nitrite. *J. Bacteriol.*, 2007, **189**, 7911-7919.
97. - SECINTI K.D., ÖZALP H., ATTAR A., SARGON M.F.: Nanoparticle silver ion coatings inhibit biofilm formation on titanium implants. *J. Clin. Neurosci.* 2011, **18**, 391-395.
98. - SMITH R.S., ZHANG Z., BOUCHARD M., LI J., LAPP H.S., BROTSKE G.R., LUCCHINO D.L., WEAVER D., ROTH L.A., COURY A., BIGGERSTAFF J., SUKAVANESHVAR S., LANGER R., LOOSE C.: Vascular catheters with a nonleaching polysulfobetaine surface modification reduce thrombus formation and microbial attachment. *Sci. Transl. Med.*, 2012, **4**. DOI: 10.1126/scitranslmed.3004120
99. - TEH H.K., FLINT S., BROOKS J. AND KNIGHT G.: Biofilms in the dairy industry, 263 pages, John Wiley & sons, Chichester, 2015.
100. - TREMBLAY Y.D., LAMARCHE D., CHEVER P., HAINE D., MESSIER S., JACQUES M.: Characterization of the ability of coagulase-negative staphylococci isolated from the milk of Canadian farms to form biofilms. *J. Dairy Sci.*, 2013, **96**, 234-246.
101. - TREMBLAY Y.D., CARON V., BLONDEAU A., MESSIER S., JACQUES M.: Biofilm formation by coagulase-negative staphylococci: impact on the efficacy of antimicrobials and disinfectants commonly used on dairy farms. *Vet. Microbiol.*, 2014, **172**, 511-518.
102. - TREMBLAY Y.D., HATHROUBI S. JACQUES M.: Les biofilms bactériens : leur importance en santé animale et en santé publique. *Can. J. Vet. Res.*, 2014, **78**, 110-116.
103. - VEH K.A., KLEIN R.C., STER C., KEEFE G., LACASSE P., SCHOLL D., ROY J.-P., HAINE D., DUFOUR S., TALBOT B.G., RIBON A.O.B., MALOUIN F. Genotypic and Phenotypic Characterization of *Staphylococcus aureus* Causing Persistent and Non-Persistent Subclinical Bovine Intramammary-Quarter Infections During Lactation or at Dry-Off. *J. Dairy Sci.*, 2015, **98**, 155-168.
104. - VERBEKE J., PIEPERS S., SUPRÉ K., DE VliegHER S.: Pathogen-specific incidence rate of clinical mastitis in Flemish dairy herds, severity, and association with herd hygiene. *J. Dairy Sci.*, 2014, **97**, 6926-6934.
105. - WANG D., JIN Q., XIANG H., WANG W., GUO N., ZHANG K., TANG X., MENG R., FENG H., LIU L., WANG X., LIANG J., SHEN F., XING M., DENG X., YU L.: Transcriptional and functional analysis of the effects of magnolol: inhibition of autolysis and biofilms in *Staphylococcus aureus*. *PLoS One*, 2011, **6**.
106. - WU J.A., KUSUMA C., MOND J.J., KOKAI-KUN J.F.: Lysostaphin disrupts *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms on artificial surfaces. *Antimicrob Agents Chemother.*, 2003, **47**, 3407-3414.
107. - YUJIE L., GENG X., HUANG Y.C., LI Y., YANG K., YE L., CHEN X., ZHAO G., YIN C.: The effect of brominated furanones on the formation of *Staphylococcus aureus* biofilm on PVC. *Cell. Biochem Biophys.*, 2013, **67**, 1501-1505.
108. - ZADOKS R.N., ALLORE H.G., BARKEMA H.W., SAMPIMON O.C., WELLENBERG G.J., GRÖHN Y.T., SCHUKKENT Y.H.: Cow- and quarter-level risk factors for *Streptococcus uberis* and *Staphylococcus aureus* mastitis. *J. Dairy Sci.*, 2001, **84**, 2649-2663.