

**СРПСКО ВЕТЕРИНАРСКО ДРУШТВО
SERBIAN VETERINARY ASSOCIATION**



ЗБОРНИК РАДОВА И КРАТКИХ САДРЖАЈА

30. САВЕТОВАЊЕ ВЕТЕРИНАРА СРБИЈЕ



**Хотел "Палисад" - Златибор
12-15. септембра 2019. године**

ИЗДАВАЧ
СРПСКО ВЕТЕРИНАРСКО ДРУШТВО

ГЛАВНИ И ОДГОВОРНИ УРЕДНИК
Проф. др Милорад Мириловић

ТЕХНИЧКИ УРЕДНИК
др вет. мед Катарина Вуловић

РЕЦЕНЗЕНТ
Проф. др Владимир Нешић

ШТАМПА
Научна КМД, Београд

ТИРАЖ
500 примерака

Београд, септембар 2019. године

ОРГАНИЗАТОР / ORGANIZER:
СРПСКО ВЕТЕРИНАРСКО ДРУШТВО

СУОРГАНИЗАТОР / CO-ORGANIZER:
ФАКУЛТЕТ ВЕТЕРИНАРСКЕ МЕДИЦИНЕ, БЕОГРАД
ПОЉОПРИВРЕДНИ ФАКУЛТЕТ НОВИ САД,
ДЕПАРТАМЕНТ ЗА ВЕТЕРИНАРСКУ МЕДИЦИНУ

ПОКРОВИТЕЉ / PATRON:
МИНИСТАРСТВО ПОЉОПРИВРЕДЕ,
ШУМАРСТВА И ВОДОПРИВРЕДЕ
УПРАВА ЗА ВЕТЕРИНУ
ВЕТЕРИНАРСКА КОМОРА СРБИЈЕ

АДРЕСА ОРГАНИЗАТОРА / ADDRESS:
Српско ветеринарско друштво
Булевар ослобођења бр. 18, Београд
тел/фах: 011/2685-187
www.svd.rs
svd1890@gmail.com

Председник СВД-а / President of SVA:
Проф. др Милорад Мириловић

ОРГАНИЗАЦИОНИ ОДБОР / ORGANIZATIONAL BOARD:

Председник / President: Милорад Мириловић
Потпредседници / Vice-presidents: Владимир Нешић и
Миодраг Рајковић
Технички секретар / Technical secretary: Катарина Вуловић
Маркетинг менаџер / Marketing manager: Небојша Алексић

ПРОГРАМСКИ ОДБОР / PROGRAMME COMMITTEE:

Радмила Марковић (председник), Владо Теодоровић, Данијела Кировски, Соња Радојичић, Сања Алексић-Ковачевић, Бојан Тохол, Слободанка Вакањац, Неђељко Карабасил, Милан Малетић, Зоран Станимировић, Владимир Магаш.

ПОЧАСНИ ОДБОР / HONORARY COMMITTEE:

Бранислав Недимовић, Емина Милакара, Недељко Тица, Иван Бошњак, Марко Цинцовић, Мишо Коларевић, Саша Бошковић, Ненад Будимовић, Ратко Ралевић.

СЕКРЕТАРИЈАТ / SECRETARIAT:

Слободан Станојевић, Сава Лазић, Иван Милош, Миодраг Бошковић, Станко Бобош, Милутин Симоновић, Зоран Рашић, Милан Ђорђевић, Предраг Масловарић, Зоран Јевтић, Војислав Арсенијевић, Љубинко Штерић, Драгутин Смољановић, Бојан Блонд, Весна Ђорђевић, Добрила Јакић-Димић, Бранислава Белић, Милица Лазић, Ласло Матковић, Дарко Бошњак, Петар Миловић, Миодраг Николић, Никола Милутиновић, Владан Ђурковић, Милош Петровић, Драго Недић, Гордана Жугић, Јасна Стевановић, Жељко Сладојевић.

ЗНАЧАЈ СПОСОБНОСТИ СТВАРАЊА БИОФИЛМА КОД СТАФИЛОКОКА

IMPORTANCE OF ABILITY TO FORM BIOFILM IN STAPHYLOCOCCI

Радослава Савић Радвановић

Факултет ветеринарске медицине Универзитета у Београду

Кратак садржај

Стафилококе се као убиквитарни микроорганизми налазе на кожи људи и животиња, а често колонизује *ductus papillaris* млечне жлезде музних животиња. Овај микроорганизам, први пут описан пре два века, заокупља пажњу научне јавности и често је незиван суперпатогеном због способности да ствара егзоцелуларне ензиме и токсине. На основу способности за стварање ензима коагулазе, разликују се коагулаза позитивне стафилококе (КПС) и коагулаза негативне стафилококе (КНС). КПС имају вишеструки значај. У контексту безбедности хране значај се огледа у могућности да изазову алиментарне интоксикације људи конзумирањем хране која садржи довољну количину ентеротоксина и здравствени значај, јер изазивају маститисе код музних животиња. Стафилококе имају способност да стварају високо организоване комплексе, који се називају биофилмови и који су препознати као важан фактор вируленције стафилокока. Ове комплексне бактеријске структуре пријањају на површине и уроњене су у екстрацелуларни матрикс. Улога матрикса је комплексна, укључујући снабдевање хранљивим материјама и заштита од стресног утицаја спољашње средине. У последње две деценије дефиниција биофилма се мењала, јер су се нова истраживања надограђивала на постојећа знања о формирању, структури, матурацији и резистенцији биофилма. Биофилм се данас дефинише као структурна заједница микроорганизама, који су ирверзибилно везани за супстрат и уклопљени у матрикс екстрацелуларне полимерне супстанце коју сами продукују, а који показују измењени фенотип услед промене брзине раста и транскрипције гена. Механизми стафилокока за стварање биофилмова су сложени и обухватају учешће различитих врста протеина и великог броја гена. Будући да се способност стварања биофилма истиче као значајан фактор вируленције за успостављање перзистентних инфекција млечне жлезде, што сам биофилм штити бактеријску заједницу од антимикробних лекова, на тај начин умањујући успех антимикробне терапије и што стварање биофилма на површинама, које долазе у контакт са храном током процеса добијања хране, представљајући извор конатминације циљ овог прегледног рада је да се укаже на значај способности стафилокока да стварају биофилм.

Кључне речи: биофилм, маститис, стафилококе

Summary

Staphylococci as ubiquitous microorganisms are found on the human and animals skin, and often colonize *ductus papillaris* in mammary glands of dairy animals. This microorganism, first described two centuries ago, occupies the attention of the scientific community and it is often named as a superpathogen due to its ability to form exocellular enzymes and toxins. Based on the ability for synthesis of the enzyme coagulase there are coagulase-positive staphylococci (CPS) and coagulase-negative staphylococci (CoNS). CPS are of multiple significance. In the context of food safety, importance is reflected to the possibility of causing food poisoning of people ingesting food that contains a sufficient amount of enterotoxins and health significance is due to the possibility of causing mastitis in dairy animals. Staphylococci are characterized by the ability to form highly organized complexes, called biofilms,

recognized as an important factor of the virulence of staphylococci. These complex bacterial structures adhere to the surfaces and are embedded in the extracellular matrix. The role of the matrix is complex, including the supply by nutrients and protection against environmental stress impacts. In the last two decades, the definition of biofilm had been changing, because the new research were upgrading the existing knowledge on the formation, structure, maturation and resistance of biofilm. The biofilm is currently defined as a structural community of microorganisms irreversibly attached to a substrate and embedded in a matrix of extracellular polymeric substances which themselves produce, and which exhibit modified phenotype due to changes in the growth rate and gene transcription. The mechanisms of biofilm formation in staphylococci are complex and include the participation of various proteins and a large number of genes. Since the ability to form biofilms represent a significant factor in virulence for the establishment of persistent infections of the mammary gland and biofilm protects the bacterial community of antimicrobial drugs, thereby reducing the success of antimicrobial therapy and the formation of biofilms on surfaces, that come into contact with food during the production process of food representing a source of contamination, the aim of this review paper is to highlight the importance of ability to form biofilm in staphylococci.

Key words: biofilm, mastitis, staphylococci

УВОД

Стафилококе су препознате као један од најчешћих узрочника инфекција, које се доводе у везу са стварањем биопилма. Ова особеност стафилокока по којој се издвајају међу патогеним микроорганизмима, који имају способност да стварају биопилм је због чињенице да је овај микроорганизам чест коменсал на површини коже и слузокоже људи и животиња. Поред тога стафилококе се могу наћи на чврстим површинама хируршких инструмената, површинама, које долазе у контакт са храном током процеса производње хране, на прибору за мужу и другим чврстим површинама, које могу да представљају извор инфекције. Дуго времена истраживања у области стварања биопилма на молекуларној основи била су фокусирана на Грам-негативне микроорганизме, претежно *Pseudomonas aeruginosa*, који је лакше доступан за молекуларна/генетичка истраживања. У новије време, помаци у молекуларној биологији стафилокока су омогућили истраживачима да се поставе молекуларне основе стварања биопилма. Такође, формиран су и модели животиња за проучавање стафилококних инфекција праћених стварањем биопилма. Стога, можемо рећи да су стафилококе данас најбоље проучени микроорганизми, који стварају биопилм и посебно *S. epidermidis*. У овом прегледном раду ће бити указано на значај стварања биопилма код стафилокока и механизам стварања биопилма.

Значај стафилокока као узрочника маститиса и стварање биопилма

Маститис крава имају велики економски утицај на индустрију млека и могу бити проузроковани различитим микроорганизмима. Маститис се дефинише као запаљенски процес у млечној жлезди изазван интрамамарним инфекцијама. Род *Staphylococcus* је најчешће изолован узрочник (Seixas и сар., 2014), који може да проузрокује маститисе у супклиничкој и клиничкој форми. До данас је описано 50 врста и подврста стафилокока, које карактеришу различити фактори вируленције. На основу способности за стварање ензима коагулазе, разликују се коагулаза позитивне стафилококе (КПС) и коагулаза негативне стафилококе (КНС). Главни представник КПС је *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus*. Као убиквитарни микроорганизам налази се на кожи људи и животиња, а често колонизује *ductus papillaris* млечне жлезде музних животиња. Док *Staphylococcus aureus* изазива супклиничке и клиничке маститисе код музних животиња, КНС обично изазивају супклиничке маститисе са повећањем броја соматских ћелија. Стафилококе изазивају инфекцију брзо, перзистирају у млечној жлезди и могу да остану дуго неоткривене, најчешће код супклиничких маститиса. Коагулаза позитивне стафилококе имају способност да стварају високо организоване комплексе који се називају биопилмови и који су препознати као важан фактор вируленције стафилокока (Oliveira и сар., 2007). Ове комплексне бактеријске структуре пријањају на површине и уроњене су у екстрацелуларни матрикс. Улога

овог матрикса је комплексна, укључујући снабдевање хранљивим материјама и заштита од стресног утицаја спољашње средине (Oliveira и сар., 2007). У последње две деценије дефиниција биофилма се непрестано мењала, јер се свако ново истраживање надограђивало постојеће знање о формирању, структури, матурацији и резистенцији биофилма. (Sabarwara, 2015). Сажимањем знања о већ познатим карактеристикама, и новооткривеним физиолошким особинама, биофилм је данас дефинисан као структурна заједница микроорганизама, који су иреверзибилно везани за супстрат и уклопљени у матрикс екстрацелуларне полимерне супстанце коју сами продукују, а који показују измењени фенотип услед промене брзине раста и транскрипције гена. Механизми стафилокока за стварање биофимова су сложени и обухватају учешће различитих врста протеина и великог броја гена (Dargwish и Asfour, 2013). Сматра се да је то процес, који се одвија у два корака. Прво се бактерија адхерира за површину посредством капсуларног антигена, који се назива капсуларни полисахаридни адхезин (*PS/A*). Потом се бактерија умножава формирајући вишеслојни биофилм, који је у вези са стварањем полисахаридног интерцелуларног адхезина (*PIA*). Интерцелуларни адхезиони (*ica*) локус се састоји од гена *icaADB* и *C*, који кодирају протеине медијаторе синтезе *PIA* и *PS/A* код стафилокока. Способност стварања биофилма умањује ефекат терапије и повежава вероватноћу појаве антимикробне резистенције.

У хуманој медицини *S. aureus* и коагулаза негативне стафилококе (КНС) (на пример *S. epidermidis*) се наводе као најчешће изоловани микроорганизми у интрахоспиталним инфекцијама код пацијената на интензивној нези. Када се има у виду да је изузетно висок проценат ових изолата резистентан на метицилин (89% КНС у поређењу са 59,5% за *S. epidermidis*), а стафилококе немају специфичан механизам антимикробне резистенције, која се базира на преносу генетских фактора резистенције (хромозомска или чешће кодирана плазмидима), стварање биофилма је од несумњивог значаја.

Поред здравственог, значај овог микроорганизма са аспекта безбедности хране се огледа у томе што ствара термостабилне ентеротоксине, који унети у одређеној количини, путем хране у организам човека изазивају интоксикације.

Молекуларне основе стварања биофилма код стафилокока

У овом прегледном раду ће бити описано стварање биофилма у току инфекције. Испитивања микроорганизама, који имају способност да стварају биофилм су показала да стварање биофилма иде у два корака од којих је први почетно везивање и потом фаза матурације, фазе које се разликују у физиологији и захтевају деловање специфичних фазних фактора. Завршна фаза одвајања (или ширења) обухвата одвајање појединачних ћелија, или ћелијских кластера различитим механизмима и сматра се суштинском за ширење бактерија у току инфекције (Слика 1).

1) Везивање

Фаза везивање у организму се одвија кроз везивање за протеине матрикса, што представља први корак у стварању биофилма. *S. epidermidis* и *S. aureus* карактерише велики број такозваних „микробних површинских компоненти које препознају адхезивне молекуле матрикса“ (MSCRAMMs - *microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules*) и имају способност да се везују за протеине матрикса као што су фибриноген или фибронектин, а често може бити комбинација различитих протеина матрикса. MSCRAMMs имају заједничку структуру која подразумева изложен домен за везивање, домен ћелијског зида који има понављајућу структуру и домен који је одговоран за ковалентно или нековалентно везивање за површину бактерија. Ковалентно везивање катализује група ензима званих сортазе, које везују сачувани мотив MSCRAMMs за пептидогликан. Најзначајнији ензим је сортаза А, која препознаје LPXTG мотив на „C“-терминалу на површини секвенце протеина. Сојеве *S. aureus* карактерише шири спектар типа LPXTG MSCRAMMs (~20), у поређењу са *S. epidermidis* (~12) (Gill и сар., 2005). Једина функционална сличност код ове две врсте микроорганизама је присуство неколико понављајућих серин аспартат протеина (*Sdr* протеини). Ова група протеина се састоји од површинских протеина који имају карактеристични домен серин-аспартат који се понавља у домену ћелијских зидова. Поред тога, обе врсте имају заједнички акумулациони протеин (*Aap*) и неколико нековалентно везаних површинских протеина, попут аутолизина (*Atl*). Механизам и силе које управљају причвршћивањем нековалентно везаних MSCRAMMs на површину стафилокока

још увек нису добро разјашњени. На површини ћелије стафилокока се налазе ензими аутолизини. Постоје докази који указују на то да су аутолизини нековалентно везани за теикоичну киселину (Peschel и сар., 2000). Ови ензими, поред своје примарне улоге у промету ћелијских зидова, олакшавају везивање за пластичне површине и протеине матрикса (Heilmann и сар., 2003). Тако, аутолизини имају суштинску функционалну улогу у везивању бактерија. Слично аутолизинима, липаза *GehD* има примарну каталитичку улогу, али постоје докази који указују на то да има додатну адхезивну улогу (Bowden и сар., 2002).

Стафилококе су познате по својој изузетној способности лепљења за пластичне површине. Иако је та способност била основа за већину *in vitro* истраживања биофилма спроведених код стафилокока (и код других патогена који стварају биофилм), није јасно да ли директно везивање за пластику има значајну улогу у патогенези инфекције насталих медицинским прибором. Протеини матрикса домаћина прекривају инструменте/прибор убрзо након убацивања и на тај начин настаје специфична интеракција између ових протеина и MSCRAMMs -а што је највероватније од велике важности за колонизацију. Класични тест на микротитар плочама за испитивање стварања биофилма на абиотским површинама представљао је драгоцено средство у испитивањима, посебно фактора повезаних са стварањем биофилма. Међутим, то је далеко од модела, којим се могу представити карактеристике инфекција повезаних са биофилмом *in vivo*.

2) Матурација

Фаза матурације у процесу стварања биофилма се карактерише: а) интерцелуларном агрегацијом, која се може постићи различитим молекулима као што су адхезивни протеини или често полисахаридним ектополимерима, и б) силама структурирања биофилма, које доводе до појаве 3-димензионалног зрелог биофилма у облику печурке, који је окружен каналима испуњеним течностима.

2.1) Адхезионе силе: агрегација

Код стафилокока главни молекул одговоран за интерцелуларну адхезију је полисахаридни интерцелуларни адхезин (*PIA*), који се још назива поли-N-ацетилглюкозамин (*PNAG*) према хемијској структури. То је делимично деацетилован полимер бета-1-6-везани N-ацетилглюкозамина, који заједно са другим полимерима, као што је теикоична киселина и протеинима ствара највећи део слузи, екстрацелуларног матрикса код стафилокока, које стварају биофилм. Присуство *PIA* је доказано и код других врста микроорганизама што указује да овај полимер има значајну улогу у настанку биофилма и инфекција повезаних са стварањем биофилма (Wang и сар., 2004). Деацетилација резидуа N-ацетилглюкозамина у *PIA* има биолошки значај. Доприноси настанку позитивног наелектрисања иначе у неутрално наелектрисаном молекулу, ослобађањем слободних амино група, које постају наелектрисане при неутралном, или киселом рН, што је природан хабитат за стафилококе на кожи. Када је површина бактеријске ћелије негативно наелектрисана, *PIA* се понаша као лепак који спаја ћелије електростатичком интеракцијом. Теикоична киселина може да представља негативно наелектрисане молекуле, који ступају у рекацију са *PIA* на површини ћелије. На количину теикоичне киселине и *PIA* утичу фактори средине што још увек није у потпуности разјашњено (Sadovskaya и сар., 2005).

Синтеза *PIA* је регулисана локусом *ica* гена, који садржи N-ацетилглюкозамина трансферазу (*icaA* и *icaD*), *PIA* деацетилазу (*icaB*), *PIA* експортер (*icaC*), и регулаторни ген (*icaR*). Експресију локуса *ica* гена регулишу различити фактори средине и протеини регулатори. Стварање и деацетилација *PIA* су препознати као кључни фактори вируленције код *S. epidermidis* (Fluckiger и сар., 2005). Иако, неколико модела на животињама потврђују ову чињеницу (Kristian и сар., 2004), стварање *PIA* нема општи значај за стварање биофилма и настанак инфекција, које се доводе у везу са биофилмом, јер је доказано стварање биофилма не зависи од *PIA* (Rohde и сар., 2005). У литератури су присутни подаци да неки сојеви изоловани у инфекцијама, које се доводе у везу са стварањем биофилма не садрже *ica* гене (Arciola и сар., 2006). У случајевима формирања биофилма независно од *PIA*, адхезиони протеини највероватније замењују *PIA*. Чини се да је *Aap* најважнији протеин укључен у стварање биофилма независно од *PIA*.

Код изолата *S. aureus* пореклом од животиња оболелих од маститиса протеин на површини ћелијског зида се назива „biofilm associated protein“ (*Bap*) и доводи се у везу са адхеренцијом на полистиренске површине, интерцелуларном адхезијом и стварањем биофилма. Постоје докази о

значају *Bap* током инфекције млечне жлезде (Cucarella и сар., 2004). Номологни облик *bap*, који се назива *bhp* је доказан код изолата *S. epidermidis* пореклом од људи (Gill и сар., 2005). *Bap* хомолози су такође доказани код других врста бактерија указујући на значај ове групе површинских протеина за стварање биофилма (Lasa и Penades, 2006).

S. aureus и *S. epidermidis* садрже теикоичну киселину (*TA*), која се уобичајено може наћи код многих Грам-позитивних бактерија. *TA* може да буде везана за ћелијски зид (*WTA*), или за ћелијску мембрану преко масти као липотеикоична киселина (*LTA*). *TA* код *S. epidermidis* значајно повећава адхезију за површине обложене фибронектином указујући на улогу ове киселине за вируленцију микроорганизма (Hussain и сар. 2001).

2.2) Разарајуће силе: структурирање биофилма

Зрео бифилм има тродимензионалну структуру, која се описује као „куле“, или „печурке“. Између тих „кула“ се налазе канали испуњени течношћу, за које се претпоставља да имају виталну функцију у достављању хранљивих материја у дубље слојеве биофилма. Механизми који воде ка стварању канала и структурирању биофилма су слабије проучени од механизма који доводе до интерцелуларне адхезије. Првобитно су резултати истраживања код *Pseudomonas aeruginosa* показали учешће преношења сигнала са ћелију на ћелију (*quorum-sensing system*). Код стафилокока, диференцијална експресија егзополисахарида *PIA* може донекле допринети структурирању биофилма. У супротном, ензимска разградња *PIA* се јавља код других бактерија које карактеришу *PIA* хомолози и вероватно нису присутни код стафилокока.

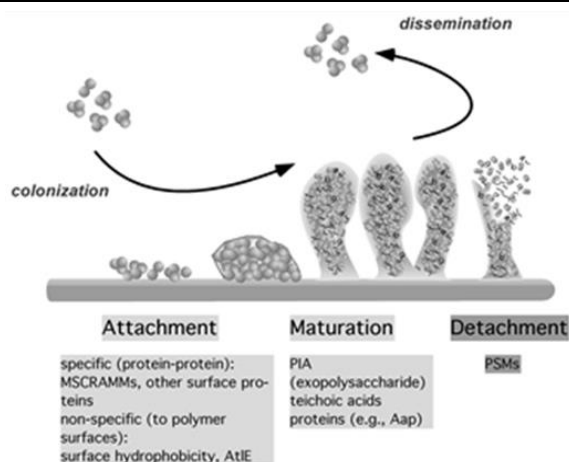
Истраживања Otto (2008) у САД показују да стафилококе користе *quorum-sensing* контролисане сурфактант пептиде за структурирање биофилма, слично као код *P. aeruginosa*, али базирано на хемијски различитим ефектор молекулима. Фенол-растворљиви модулини (*PSMs*) су класа пептида, која је први пут описана као про-запаљенска компонента код *S. epidermidis* (Mehlin и сар., 1999). Сви *PSMs* имају алфа-хеликоидну структуру и изразите карактеристике сурфактанта (смањују површински напон). Могу се поделити у две класе: 1. алфа тип са дужином ~20 аминокиселина и 2. бета тип са дужином ~40-45 аминокиселина. У условима постојања биофилма, експресија *PSM* се пребацује на бета тип пептида, што је кодирано опероном. Експресија *PSM* бета пептида има кључну улогу у развоју биофилма код *S. epidermidis*.

3) Одвајање

Одвајање биофилма је суштинско за ширење бактерија на друга места колонизације. Може настати одвајањем појединих ћелија или кластера ћелија. Неколико фактора може да допринесе одвајању: 1) механичке силе, као што су проток у крвном суду, 2) престанак стварања градивне материје биофилма, као што је егзополисахарид, и 3) *sensu strictu* фактори одвајања, као што су ензими који разлажу матрикс, или површински активне материје. Због свега тога, наведени фактори се не разликују од оних о којима се говори као о агенсима за структурирање биофилма. Ако се стварају у великој количини, ови фактори могу да изазову одвајање, нарочито у пределу површине биофилма. Контролисано одвајање одржава дебљину биофилма и регулише специфичну стопу ширења биофилма. Код стафилокока овај механизам контролише *quorum-sensing* систем *agr*.

4) Одумирање ћелија и екстрацелуларне ДНК

Подаци из литературе говоре да контролисана ћелијска смрт стафилокока допринноси развоју биофилма. Док је феномен контролисане ћелијске смрти и даље представља контроверзно питање, повећани степен лизе ћелија утиче на стварање биофилма. Неколико регулаторних система, који контролишу аутолизу као што је *CidR* утичу на бифилм (Yang и сар., 2006). Ослобађање ДНК код *CidR* муреин хидролаза регулатора је процес који прати лизу ћелија и допринноси стварању биофилма (Rice и сар., 2007). Молекули ДНК имају способност да се везују за друге молекуле у матриксу биофилма на сличан начин као теикоична киселина, укључујући катјонске полимере као што је горе помињани *PIA*. Због природе ДНК, може се очекивати да ће аутолиза имати сличан утицај на стварање биофилма по том механизму, који је опсервиран код *Atl* типа аутолизина.



Слика 1. Фазе стварања биофилма код стафилокока (Otto, 2008)

ЗАКЉУЧАК

Механизми стафилокока за стварање биофилмова су сложени и обухватају учешће различитих врста протеина и великог броја гена. Помааци у разумевању стварања биофилма код стафилокока показали да постоје кључни структурни и регулаторни фактори који одређују облик и физиологију биофилма стафилокока. Иако настанак биофилма не зависи од експресије ектополисахарида *PIA*, ипак се сматра суштинском компонентом потребном за настанак инфекција изазваних стафилококама, а вероватно и код других врста микроорганизама. Интензивна испитивања генома ће дати основу за боље разумевање физиологије биофилма и успостављање молекуларне основе за развој анистафилококних лекова и вакцина.

Захвалница: Рад је подржан од стране пројекта П 46009, који финансира Министарство просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије.

Литература

1. Arciola CR, et al., 2006, Detection of biofilm formation in *Staphylococcus epidermidis* from implant infections. Comparison of a PCR-method that recognizes the presence of *ica* genes with two classic phenotypic methods, *J Biomed Mater Res A*, 76, 425–30.
2. Bowden MG, Visai L, Longshaw CM, Holland KT, Speziale P, Hook M, 2002, Is the GehD lipase from *Staphylococcus epidermidis* a collagen binding adhesin? *J Biol Chem*, 277,43017–23.
3. Cucarella C, et al., 2004, Role of biofilm-associated protein *bap* in the pathogenesis of bovine *Staphylococcus aureus*, *Infect Immun*, 72, 2177–85.
4. Ćabarkapa Ivana, 2015, Sposobnost formiranja biofilma različitih sojeva *Salmonella enteritidis* i inhibitorni efekat etarskih ulja na inicijalnu adheziju i formirani biofilm. Doktorska disertacija, Tehnološki fakultet, Univerzitet u Novom Sadu.
5. Darwish F Samah and Asfour A E Hanaa, 2013, Investigation of Biofilm Forming Ability In Staphylococci Causing Bovine Mastitis Using Phenotypic and Genotypic Assays, *The Scientific World Journal Volume*, Article ID 378492.
6. Fluckiger U, et al., 2005, Biofilm formation, *icaADBC* transcription, and polysaccharide intercellular adhesin synthesis by staphylococci in a device-related infection model, *Infect Immun*, 73, 1811–19.
7. Gill SR, et al., 2005, Insights on evolution of virulence and resistance from the complete genome analysis of an early methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain and a biofilm-producing methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* strain, *J Bacteriol*, 187, 2426–38.
8. Heilmann C, Thumm G, Chhatwal GS, Hartleib J, Uekotter A, Peters G, 2003, Identification and characterization of a novel autolysin (*Aae*) with adhesive properties from *Staphylococcus epidermidis*, *Microbiology*, 149, 2769–78.
9. Hussain M, Heilmann C, Peters G, Herrmann M, 2001, Teichoic acid enhances adhesion of *Staphylococcus epidermidis* to immobilized

30. ЈУБИЛАРНО САВЕТОВАЊЕ ВЕТЕРИНАРА СРБИЈЕ

fibronectin, *Microb Pathog*, 31, 261–70. 10. Kristian SA, et al., 2004, The ability of biofilm formation does not influence virulence of *Staphylococcus aureus* and host response in a mouse tissue cage infection model. *Microb Pathog*, 36, 237–45. 11. Lasa I, Penades JR, 2006, Bap: a family of surface proteins involved in biofilm formation. *Res Microbiol*, 157, 99–107. 12. Oliveira M Nunes, Carneiro SF, Bexiga C, Bernardo RF and Vilela CL, 2007, Time course of biofilm formation by *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* mastitis isolates, *Vet. Microbiol*, 124,187-91. 13. Otto Michael, 2008, Staphylococcal biofilms, *Curr Top Microbiol Immunol*, 322, 207–28. 14. Peschel A, Vuong C, Otto M, Gotz F, 2000, The D-alanine residues of *Staphylococcus aureus* teichoic acids alter the susceptibility to vancomycin and the activity of autolytic enzymes, *Antimicrob Agents Chemother*, 44, 2845–47. 15. Rice KC et al, 2007, The *cidA* murein hydrolase regulator contributes to DNA release and biofilm development in *Staphylococcus aureus*, *Proc Natl Acad Sci USA*, 104, 8113–18. 16. Rohde H, et al., 2005, Induction of *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation via proteolytic processing of the accumulation-associated protein by staphylococcal and host proteases, *Mol Microbiol*, 55,1883–95. 17. Sadovskaya I, Vinogradov E, Flahaut S, Kogan G, Jabbouri S, 2005, Extracellular carbohydrate-containing polymers of a model biofilm-producing strain, *Staphylococcus epidermidis* RP62A, *Infect Immun*,73, 3007–17. 18. Seixas R, Santos JP, Bexiga R, Vilela CL, Oliveira M, 2014, Short communication: Antimicrobial resistance and virulence characterization of methicillin-resistant staphylococci isolates from bovine mastitis cases in Portugal, *J Dairy Sci*, 97, 340–44. 19. Wang X, Preston JFI, Romeo T, 2004, The *pgaABCD* locus of *Escherichia coli* promotes the synthesis of a polysaccharide adhesin required for biofilm formation, *J Bacteriol*, 186, 2724–2734. 20. Yang SJ, Dunman PM, Projan SJ, Bayles KW, 2006, Characterization of the *Staphylococcus aureus* CidR regulon: elucidation of a novel role for acetoin metabolism in cell death and lysis, *Mol Microbiol*, 60,458–68.