

La vaccination contre les mammites à *Staphylococcus aureus* chez la vache laitière

WALLEMACQ H., GIRARD B., LEKEUX P., BUREAU F.

Laboratoire de Physiologie cellulaire et moléculaire, GIGA-R et Faculté de Médecine vétérinaire, Université de Liège, Avenue de l'Hôpital, 1, 4000 Liège, Belgique.

Correspondance : Fabrice Bureau E-mail : fabrice.bureau@ulg.ac.be

RÉSUMÉ : Les mammites à *Staphylococcus (S.) aureus* sont considérées comme l'une des maladies majeures chez les vaches laitières, causant de lourdes pertes économiques principalement dues à la réduction de la qualité et de la quantité de lait produit. Elles se caractérisent fréquemment par des formes subcliniques et chroniques, rendant leur diagnostic et leur contrôle difficile. La pathogénie des infections mammaires à *S. aureus* n'est pas encore complètement élucidée, mais comprend notamment l'intervention de nombreux facteurs de virulence tels que des toxines, et des protéines ou des polysaccharides de surface. De nombreux vaccins ont été développés en ciblant ces facteurs essentiels à l'établissement des mammites à *S. aureus*. Ces différentes approches vaccinales sont présentées et classifiées en fonction du type d'antigène utilisé. Par ailleurs, les stratégies vaccinales développées en médecine humaine, potentiellement transposables aux infections mammaires bovines, sont également abordées. Cependant, aucune approche vaccinale n'a à ce jour permis de prévenir efficacement les mammites bovines à *S. aureus*. L'induction d'une réponse essentiellement humorale ainsi qu'une couverture antigénique inadaptée pourraient être responsables du manque de protection observé lors de la majorité des essais vaccinaux contre *S. aureus*.

1. INTRODUCTION

1.1 Les mammites

Les mammites consistent en une inflammation de la glande mammaire, le plus souvent développée en réponse à une infection bactérienne intramammaire. Elles constituent la pathologie la plus fréquente et la plus coûteuse rencontrée en élevage laitier (Seegers *et al.*, 2003). Les infections subcliniques sont responsables d'environ 80 % de l'ensemble des pertes économiques associées aux mammites, liées à une réduction de la production et de la qualité du lait, ainsi qu'aux coûts de traitements et de préventions (Seegers *et al.*, 2003 ; Shim *et al.*, 2004 ; Petrovski *et al.*, 2006). Le caractère clinique ou non d'une mammité est majoritairement influencé par le genre et l'espèce de la bactérie pathogène (Rainard et Riollot, 2006). Les bactéries coliformes sont souvent associées à des mammites aiguës accompagnées de symptômes cliniques. À l'opposé,

Staphylococcus aureus, bien que pouvant induire des mammites cliniques, cause le plus fréquemment des mammites subcliniques (Sutra et Poutrel, 1994 ; Sears et Mccarthy, 2003). Ces mammites subcliniques à *S. aureus* ont, de plus, tendance à devenir chroniques et à persister durant de longues périodes de temps (Sears et Mccarthy, 2003). Chez les vaches laitières, les mammites à *S. aureus* s'expriment le plus souvent par une élévation du taux de cellules somatiques dans le lait, principalement liée à un afflux des neutrophiles (Van Oostveldt *et al.*, 2001). Le caractère subclinique de ces mammites et la capacité de survie des *S. aureus* à l'intérieur des cellules mammaires compliquent respectivement le diagnostic de terrain et l'isolement de la bactérie en laboratoire (Brouillette *et al.*, 2004 ; Von Eiff *et al.*, 2006). Lors d'antibiothérapies, les taux de guérison associés aux mammites à *S. aureus* sont généralement faibles (Brouillette *et al.*, 2004).

Enfin, bien que de nombreuses études vaccinales aient mis en évidence l'induction d'une réponse humorale, la majorité des vaccins ne permet pas, à ce jour, de prévenir l'infection de la glande mammaire (Middleton, 2008).

1.2 La pathogénie des mammites à *S. aureus*

Bien qu'elle ne soit pas complètement élucidée, la pathogénie des mammites à *S. aureus* permet de mieux comprendre les choix de cibles antigéniques et de stratégies vaccinales, décrits dans la littérature. De nombreux auteurs ont décrit trois phases lors d'infection à *S. aureus* : l'adhésion aux cellules de l'hôte et à la matrice protéique extracellulaire, l'invasion ou la pénétration et l'évasion du système immunitaire de l'hôte (Kerro Dego *et al.*, 2002 ; Foster, 2005 ; Middleton, 2008). Lors de mammites, le réservoir infectieux est composé par les glandes mammaires des vaches infectées mais

également par la machine à traire et potentiellement par la peau des trayons (Roberson *et al.*, 1994 ; Haveri *et al.*, 2008 ; Piccinini *et al.*, 2009). Le canal du trayon représente le premier moyen de défense (Capuco *et al.*, 1994) et est franchi par *S. aureus* lors de la traite, permettant ainsi la dissémination des bactéries à l'ensemble du parenchyme mammaire (Sutra et Poutrel, 1994 ; Kerro Dego *et al.*, 2002). Après cette intrusion, la première étape dans la colonisation de la glande mammaire consiste en l'adhésion des *S. aureus* aux cellules de l'hôte et à la matrice protéique extracellulaire. Cet attachement permet aux bactéries de ne pas être évacuée par le flux physiologique et inverse du lait. Les *S. aureus* expriment de nombreux facteurs de virulence impliqués dans la phase d'attachement incluant notamment les protéines se liant à la *fibronectine* (*FnBP*), au fibrinogène (*FgBP*) et au collagène (*Cna*) ainsi que les *clumping factor* (*Clf*) A et B, l'acide teichoïque et certains composants des biofilms (Clarke et Foster, 2006 ; Middleton *et al.*, 2009).

Après cette phase d'adhésion, *S. aureus* synthétise et sécrète de nombreux facteurs, facilitant l'invasion et la pénétration du parenchyme mammaire, tels que des toxines (les hémolysines, les leucocidines) et des enzymes (sortase, protéase, coagulase, lipase, hyaluronidase) (Oviedo-Boyso *et al.*, 2007 ; Suriyaphol *et al.*, 2009).

Enfin, l'évasion du système immunitaire implique de nombreux facteurs de virulence dont les toxines superantigéniques, la protéine A, la capsule polysaccharidique, la production de biofilms et la persistance intracellulaire de *S. aureus* (Sutra et Poutrel, 1994 ; Oviedo-Boyso *et al.*, 2007). Les toxines superantigéniques, comprenant les entérotoxines et la toxine du choc septique (TSST-1), sont capables de lier directement le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de type II des cellules présentatrices d'antigènes aux récepteurs des lymphocytes T, provoquant une prolifération incoordonnée des lymphocytes T et une libération de cytokines pro-inflammatoires non spécifiques (Ferens *et al.*, 1998a ; 1998b ; Kuroishi *et al.*, 2003). La protéine A inhibe l'opsonisation et la phagocytose médiées par les anticorps dirigés contre *S. aureus*, en fixant la fraction constante des immunoglobulines de type G (IgG) (Foster, 2005 ; Middleton, 2008). La capsule

polysaccharidique est exprimée durant la phase de croissance post-exponentielle (O'riordan et Lee, 2004). En plus de faciliter l'adhésion de la bactérie aux cellules endothéliales (Pöhlmann-Dietze *et al.*, 2000), la capsule est capable d'interférer avec la phagocytose des *S. aureus* (Thakker *et al.*, 1998) et pourrait masquer les antigènes de la paroi cellulaire (Risley *et al.*, 2007). Cependant, bien que la majorité de souches de *S. aureus* humaines expriment une capsule, la production de celle-ci par les souches bovines semble plus variable, sous-tendant une moindre contribution de ce facteur dans la pathogénie et la chronicité des mammites à *S. aureus* bovines (Sompolinsky *et al.*, 1985 ; Poutrel *et al.*, 1988 ; Guidry *et al.*, 1997 ; Sordelli *et al.*, 2000 ; Tollersrud *et al.*, 2000). De plus, l'absence de capsule, en augmentant l'internalisation des *S. aureus* à l'intérieur des cellules de l'hôte, pourraient faciliter la chronicité de ce type d'infection intramammaire (Tuchscherer *et al.*, 2005).

Les biofilms sont constitués de multiples couches de *S. aureus* comprises dans une matrice formée majoritairement de polysaccharides mais également de protéines et d'ADN (Fox *et al.*, 2005 ; Oliveira *et al.*, 2006 ; Cue *et al.*, 2009). En plus de faciliter l'adhésion et la colonisation de la glande mammaire par *S. aureus*, les biofilms contribuent également à l'évasion du système immunitaire, conduisant à l'apparition d'infections persistantes (Costerton *et al.*, 1999 ; Vasudevan *et al.*, 2003 ; Cucarella *et al.*, 2004 ; Brouillette *et al.*, 2005 ; Fox *et al.*, 2005). Les biofilms, à l'instar de la capsule polysaccharidique, protégeraient contre la phagocytose et permettraient à *S. aureus* de résister aux traitements antibiotiques (Cucarella *et al.*, 2004). Cependant, le pourcentage de souches de *S. aureus* produisant des biofilms *in vitro* varie fortement d'une étude à l'autre (Vasudevan *et al.*, 2003 ; Fox *et al.*, 2005 ; Dhanawade *et al.*, 2009 ; Melchior *et al.*, 2009).

Enfin, plusieurs études ont également démontré que *S. aureus* était capable d'envahir et de survivre à l'intérieur de cellules épithéliales mammaires (Almeida *et al.*, 1996 ; Bayles *et al.*, 1998 ; Atalla *et al.*, 2009) et de résister à l'activité bactéricide des cellules phagocytaires (Hébert *et al.*, 2000 ; Voyich *et al.*, 2005 ; Garzoni et Kelley, 2009). Parallèlement, une sous-population phénotypique de *S. aureus* intra-

cellulaires a été caractérisée par la faible taille et dénommée sous le terme de « small colony variants » (SCVs) (Quie, 1969 ; Carter et Kerr, 2003 ; Brouillette *et al.*, 2004 ; Proctor *et al.*, 2006 ; Atalla *et al.*, 2009 ; Mitchell *et al.*, 2010). Ces SCVs sont fréquemment isolés lors d'infections chroniques chez l'homme et chez le bovin, et sont très résistants à de nombreux antibiotiques (Sompolinsky *et al.*, 1974 ; Proctor *et al.*, 2006 ; Atalla *et al.*, 2008). La persistance de *S. aureus* intracellulaires pourrait contribuer à l'établissement d'infections chroniques en permettant à la bactérie d'échapper à l'action de nombreux antibiotiques et du système immunitaire humoral (Alexander et Hudson, 2001 ; Brouillette *et al.*, 2004 ; Deleo et Otto, 2008). Enfin, il a été récemment démontré que le facteur alternatif de transcription Sigma B influence positivement et parallèlement l'apparition de SCVs et la production de biofilms (Mitchell *et al.*, 2010).

2. LA VACCINATION

Les buts visés par la vaccination lors des infections à *S. aureus* sont multiples et peuvent consister en (i) la diminution de la sévérité des symptômes cliniques, (ii) en la réduction du taux cellulaire dans le lait ou (iii) en la réduction du nombre de cas de mammites à *S. aureus* au sein d'une exploitation. Cependant, bien que les mammites bovines à *S. aureus* puissent ponctuellement prendre un caractère aigu voire suraigu, la majorité de ces infections ont fréquemment tendance à persister sous la forme de mammites chroniques et subcliniques. De part cette caractéristique majeure, l'importance de ces infections réside principalement dans le fait qu'elles sont à l'origine d'importantes pertes économiques. Au vu de l'aspect fortement contagieux de ce type d'infections, les objectifs principaux de la vaccination contre *S. aureus* consiste chez le bovin en la réduction du taux cellulaire des vaches atteintes et en la prévention de nouveaux cas de mammites à *S. aureus* au sein d'une exploitation (Middleton, 2008).

Deux modes d'immunisation sont possibles : l'une passive à l'aide d'anticorps mono- ou polyclonaux et l'autre active, à l'aide d'antigènes. De part les buts à atteindre évoqués précédemment, la immunisation passive ne présente que peu d'intérêt dans le

cadre des mammites à *S. aureus*. Dès lors, cette revue sera principalement consacrée à la vaccination active. Ce type de vaccination nécessite trois éléments essentiels : (i) un antigène contre lequel une réponse immune adaptative est générée, (ii) une stimulation du système immunitaire inné destiné à potentialiser la réponse antigène-spécifique (adjuvant) et (iii) un système de délivrance assurant le dépôt adéquat de l'antigène et l'adjuvant (figure 1) (Ulmer *et al.*, 2006).

La recherche de vaccins contre les mammites à *S. aureus* a débuté il y a près d'un demi-siècle, et l'ensemble de ces vaccins peuvent être classifié selon le type d'antigène utilisé. Les diverses approches vaccinales ont été développées soit à partir du microorganisme entier (bactéries atténuées ou inactivées, ou extraits totaux bactériens), soit à partir d'un fragment sous-unitaire de la bactérie, pouvant être de nature protéique ou polysaccharidique (figure 2).

2.1 Vaccination contre la bactérie entière

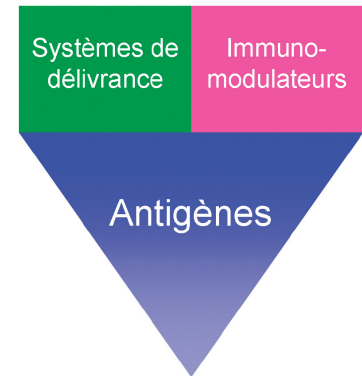
Le plus simple des vaccins consiste en l'utilisation de microorganismes entiers (atténués ou inactivés) ou de lysats produits à partir de ces derniers, associés ou non à des adjuvants. En médecine vétérinaire, l'utilisation de

ce type de vaccins a été abondamment étudiée dans le cas des mammites à *S. aureus* et un de ceux-ci a été commercialisé à partir des années 1970 (Lysigin[®], Boehringer Ingelheim) (Middleton *et al.*, 2006).

2.1.1 Vaccins atténués

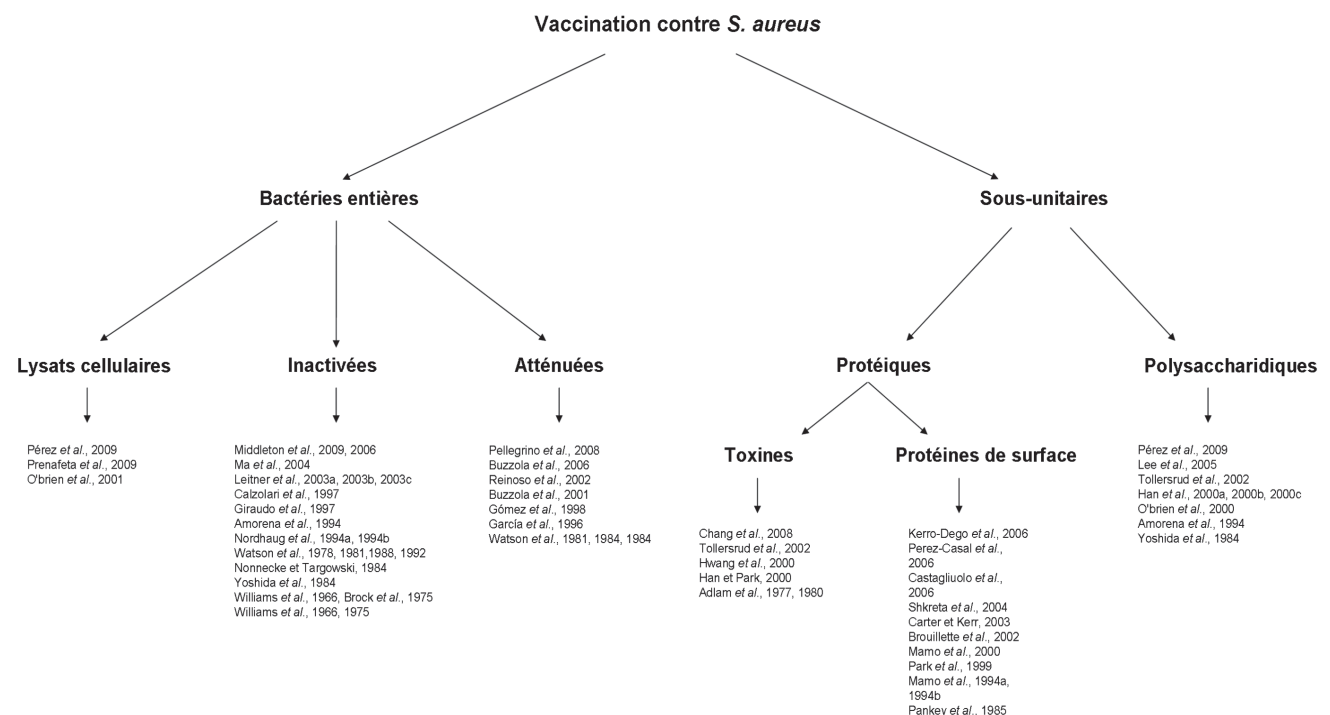
Différentes équipes à travers le monde ont mis au point des vaccins atténués contre *S. aureus* (figure 2). Ce type de vaccination présente l'avantage de mimer une infection naturelle et d'inclure l'ensemble des éléments clés nécessaires à l'induction d'une réponse immune adaptative (figure 1). Différentes techniques chimique, physique ou génétique, permettent d'atténuer les souches de *S. aureus* et d'en étudier leur pouvoir protecteur. Par exemple, une souche avirulente de *S. aureus* dénommée RC122 issue d'une souche pathogène de *S. aureus* RC108 a été mise au point (Pellegrino *et al.*, 2008). Après immunisation de vaches vaccinées à l'aide de cette souche RC122, une augmentation significative de la réponse immune humorale spécifique a été observée par rapport au groupe d'animaux non immunisés. Cependant, après l'inoculation expérimentale de ces deux groupes à l'aide de la souche virulente RC108, la comparaison de la charge bactérienne et du taux cellulaire moyen présents dans le

Figure 1. : Composantes clés de la vaccination active un antigène contre lequel une réponse immune adaptative est générée, (ii) une stimulation immune destinée à potentialiser la réponse antigène-spécifique et (iii) un système de délivrance adéquat de l'antigène et l'adjuvant, d'après Ulmer et collaborateurs



lait n'a pas révélé de différence significative entre les vaches vaccinées et contrôles (Pellegrino *et al.*, 2008). Par ailleurs, une autre souche de *S. aureus* atténuée a été obtenue par mutagenèse du gène *aroA*. L'immunisation intramammaire de souris par cette souche atténuée a permis d'induire une réponse mixte T-auxiliaire (Th) de type 1 (Th1) et 2 (Th2), et de réduire significativement la charge bactérienne de souris infectées expérimentalement par *S. aureus* (Buzzola *et al.*, 2006).

Figure 2. : Classification des principaux vaccins développés contre les mammites à *S. aureus* selon le type d'antigène utilisé



Cependant, ce type de vaccin contre *S. aureus* présente un risque de retour à un phénotype virulent et donc à un risque de dissémination et de contamination de cette bactérie (Meeusen *et al.*, 2007).

2.1.2 Vaccins inactivés

Une seconde grande classe de vaccins est formée par les vaccins inactivés. Dans ce type de vaccins, la bactérie perd tout pouvoir pathogène mais conserve ses antigènes de surfaces disponibles pour le système immunitaire adaptatif. Les vaccins tués ne sont généralement pas capables d'induire de réponse immune à médiation cellulaire (en particulier les lymphocytes T cytotoxiques). Par ailleurs, les vaccins inactivés nécessitent fréquemment l'administration concomitante d'adjuvant (tels que les sels d'aluminium ou l'adjuvant incomplet de Freund (FICA)) afin d'augmenter leur pouvoir protecteur. Cependant, les vaccins inactivés et adjuvantés sont particulièrement efficaces pour induire une réponse humorale associée principalement à une sécrétion d'anticorps reconnaissant des épitopes localisés en surface des bactéries pathogènes (Ulmer *et al.*, 2006). Classiquement, les vaccins inactivés sont produits en annihilant toute infectivité de la bactérie par la chaleur ou par un traitement chimique (formaldéhyde, détergent).

Parmi les nombreux essais de vaccin inactivés contre *S. aureus* (figure 2), la Lysigin[®], est le premier et le seul vaccin commercialisé face aux mammites bovines à *S. aureus*. Il est composé de lysats issus de 5 souches de *S. aureus* exprimant les 3 types de capsules polysaccharidiques prédominants lors de mammites bovines (type 5, 8 et 336) (Han *et al.*, 2000b ; Han et Park, 2000 ; Ma *et al.*, 2004). De nombreuses études ont évalué ce vaccin lors de mammites aiguës, démontrant la réduction des symptômes cliniques, une diminution des taux cellulaires individuels, ainsi qu'une augmentation des cas de guérison spontanée (Williams *et al.*, 1966 ; Williams *et al.*, 1975 ; Pankey *et al.*, 1985). Basé sur le fait que la Lysigin[®] est plus efficace lorsqu'il est administré à des génisses primipares avant le vêlage, une étude consistant en l'infection expérimentale de génisses préalablement vaccinées, a permis de confirmer la réduction des symptômes cliniques observés lors des précédentes études

(Middleton *et al.*, 2006). Cependant, aucune différence n'a été observé tant au niveau des comptages individuels dans le lait que de la clairance bactérienne de la glande mammaire. La production d'immunoglobulines spécifiques a également été démontrée (Luby *et al.*, 2007) mais il ressort de cette étude que la concentration de ces anticorps dans le lait pourrait ne pas être suffisante pour permettre une protection contre *S. aureus* (Middleton, 2008 ; Middleton *et al.*, 2009).

Plus récemment, l'utilisation de souches productrices de biofilms dans la préparation de vaccins inactivés a permis de réduire de manière intéressante la charge bactérienne des glandes mammaires de génisses infectées expérimentalement (Pérez *et al.*, 2009 ; Prenafeta *et al.*, 2009). Cette réduction serait liée notamment à l'induction d'anticorps spécifiquement dirigés contre certains composés polysaccharidiques présents dans les biofilms, dont le *Poly-N-acetylglucosamine* (PNAG) et le *slime associated antigenic complex*. L'ensemble de ces travaux ont abouti à la commercialisation d'un vaccin contre les mammites en Europe (StartVac[®], Hipra), le seul qui soit agréé par l'agence européenne des médicaments. Cependant, aucune étude n'a encore permis de déterminer si ce type de vaccination permet de prévenir l'apparition de mammites à *S. aureus*. Bien que cette nouvelle approche vaccinale semble prometteuse, il est important de noter que l'ensemble des souches de *S. aureus* responsables de mammites subcliniques ne semble pas capable de produire des biofilms (Oliveira *et al.*, 2006 ; Vautor *et al.*, 2008 ; Dhanawade *et al.*, 2009).

2.2 Vaccins sous-unitaires

L'utilisation de vaccins contenant des organismes pathogènes entiers atténués ou tués décrits précédemment réduit le besoin d'identifier les antigènes protecteurs. Cependant, ce type d'immunisation présente l'inconvénient potentiel de diluer ou de dévier la réponse immune protectrice contre des antigènes non-protecteurs, ainsi que le désavantage d'être moins sûr. Par conséquent dans le cas où l'antigène protecteur est connu, il est souvent plus sûr et plus efficace de focaliser la réponse immune contre cet antigène précis (Ulmer *et al.*, 2006 ; Titball, 2008). Comme les vaccins inactivés,

les vaccins sous-unitaires nécessitent généralement l'utilisation d'adjuvants ainsi que multiples injections de rappel.

Ce type de vaccins est obtenu soit par purification directe de sous-unités bactériennes à partir de cultures de bactéries, soit par la production d'antigènes recombinants. Cette technologie implique le clonage d'un gène bactérien, correspondant à une cible antigénique, dans un vecteur et son expression dans un système procaryote (bactérie) ou eucaryote (levure ou cellule de mammifère), ou directement par l'hôte, permettant ainsi d'éviter les étapes de production et de purification antigénique *in vitro* (Meeusen *et al.*, 2007). Une méthode de production *in vivo* de sous-unités antigéniques repose sur l'utilisation de vecteurs vivants (tels que les poxvirus ou les adénovirus) intégrant le gène codant pour l'antigène cible (Shams, 2005 ; Titball, 2008). Cependant, ce type de délivrance d'antigène sous-unitaire peut être limité par le développement d'une réponse immune de l'hôte contre le vecteur lui-même. Une seconde technique permettant d'éviter ces deux inconvénients principaux consiste en l'utilisation de vaccins dit à ADN nu. Ces vaccins sont constitués d'ADN plasmidique contenant le gène bactérien cible, le plus souvent sous le contrôle d'un promoteur eucaryote puissant (généralement le promoteur du cytomégalovirus). Après injection du vaccin à ADN par voie intramusculaire, ou intradermique, l'ADN s'intègre dans le génome des cellules dendritiques, des cellules de Langherans (voie intradermique) ou des cellules musculaires, qui expriment ces antigènes bactériens et conduisent à l'induction d'une réponse immune humorale et cellulaire (Wolff *et al.*, 1990 ; Shams, 2005 ; Meeusen *et al.*, 2007 ; Williams *et al.*, 2009).

Enfin, la composante antigénique des vaccins sous-unitaires peut être de nature protéique (protéine de surface ou toxine), polysaccharidique, ou mixte (dénommé également vaccin conjugué).

2.2.1 Les vaccins protéiques

a) Les vaccins dirigés contre les protéines de surfaces

Pour qu'une bactérie colonise la glande et le tissu mammaire, il faut au préala-

ble qu'elle y adhère. Les protéines de surfaces, ou adhésines, de part leur implication importante dans l'initiation des infections mammaires bovines à *S. aureus* ont souvent été utilisées comme cible antigénique (Oviedo, 2007 ; Middleton, 2008). En plus de la protéine A, connue pour lier fortement la fraction constante des IgG, les adhésines incluent de multiples protéines dont nous pouvons citer le Clf A et B, les FnBPs A et B, les FgBPs et le Cna. En permettant aux *S. aureus* de s'arrimer aux cellules de l'hôte et à la matrice extracellulaire, ces adhésines jouent un rôle clé dans l'initiation des mammites en empêchant notamment l'élimination des bactéries par le flux physiologique du lait (Sutra et Poutrel, 1994 ; Oviedo-Boyso *et al.*, 2007).

Lors des premiers essais d'immunisation sous-unitaires, la protéine A a été utilisée comme source antigénique (Pankey *et al.*, 1985). Lors de cette étude, le nombre de nouvelles infections à *S. aureus* ainsi que le taux de cellules somatiques dans le lait n'a cependant pas varié significativement entre les groupes de vaches vaccinées et contrôles. Plus récemment, diverses études murines ont permis d'évaluer l'effet de l'immunisation monovalente développée contre diverses adhésines dont FnBP-A, Clf-A, FgBP ou Cna (Mamo *et al.*, 1994a ; 1994b ; Brouillette *et al.*, 2002). Par rapport aux souris contrôles, une réponse humorale spécifique contre chacune des adhésines a pu être mise en évidence dans le groupe de souris immunisé avec la protéine cible. De plus, l'incubation de bactérie en présence des séra provenant de souris immunisées contre le Clf-A a permis d'augmenter la phagocytose par les macrophages et d'inhiber fortement l'adhésion des bactéries à la fibronectine (Brouillette *et al.*, 2002). Cependant, contrairement à la réponse induite par les FnBP-A et FgBPs, l'immunisation contre le Clf-A et le Cna n'a pas permis de réduire d'une part la charge bactérienne des glandes mammaires et de protéger d'autre part partiellement les souris contre l'infection expérimentale à *S. aureus* (Mamo *et al.*, 1994a ; 1994b ; Brouillette *et al.*, 2002). Chez la vache, une étude a été réalisée afin d'évaluer l'effet préventif d'une telle approche lors d'infection expérimentale en immunisant les animaux contre la FnBP et le Clf-A par vaccination ADN. De façon similaire à ce qu'il avait été observé chez la

souris, ce type d'immunisation a induit la production d'anticorps spécifiques fonctionnels et protège partiellement les animaux infectés en réduisant la charge bactérienne présente dans le lait (Shkreta *et al.*, 2004). Par ailleurs, l'expression d'un immunomodulateur, le *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor* (GM-CSF) en plus de l'immunisation des vaches contre le Clf-A a permis d'augmenter et d'harmoniser la réponse immune développées, du fait de des propriétés stimulantes du GM-CSF sur les cellules dendritiques (Nour El-Din *et al.*, 2006). Cependant, aucune donnée démontrant une efficacité préventive n'a été rapportée. De part la variabilité d'expression importante de ces adhésines (Zecconi *et al.*, 2005 ; Zecconi *et al.*, 2006), une équipe a récemment entrepris d'étudier chez la souris la réponse induite lors de l'expression simultanée de quatre adhésines (FgBP, FnBP-A, Clf-A, Cna) (Castagliuolo *et al.*, 2006). Cependant, cette réponse principalement humorale n'a offert qu'une faible réduction du nombre de bactéries présentes dans les glandes mammaires de souris infectées par rapport aux glandes de souris non immunisées.

Le même type d'approche multivalente a récemment été utilisé lors de modèle d'infections articulaires à *S. aureus* chez la souris, en incluant les gènes codant pour le Clf-A, le FnBP-A et l'enzyme sortase (Gaudreau *et al.*, 2007). Le taux de survie chez les souris immunisées contre ces différents facteurs (55 %) a été augmenté significativement lors d'infection par *S. aureus* par rapport aux souris contrôles (15 %). Cette protection a notamment été expliquée par l'induction d'une réponse mixte de type Th1 et Th2, impliquant la sécrétion d'anticorps opsonisants également associés à une sécrétion spécifique d'interféron (IFN)- γ par la population de lymphocytes CD8⁺. Cependant, l'absence de comparaison entre les immunisations mono- et polyvalentes n'a pas permis de mettre en évidence l'importance de chacun des antigènes. Par ailleurs, cette approche n'apparaît pas prometteuse du fait de l'absence de protection contre l'infection intra-péritonéale de souris observée lors d'immunisation monovalente contre le Clf-A ou le Cna (Mamo *et al.*, 1994b ; Brouillette *et al.*, 2002).

De part la forte conservation de leur séquence codante au travers des dif-

férentes souches humaines, deux autres types de protéines de surface ont récemment fait l'objet d'une attention particulière : l'*Iron-regulated surface determinant* (Isd) et la *serine aspartate repeat* (Sdr) (Kuklin *et al.*, 2006 ; Stranger-Jones *et al.*, 2006). Stranger et collaborateurs (2006) ont sélectionné quatre polypeptides, Isd-A, Isd-B, Sdr-B et Sdr-D, sur 19 protéines de surfaces initialement identifiées sur base de leur haut degré de conservation entre différentes souches de *S. aureus* humains. Le mode de sélection consistait à choisir les 4 protéines de surface induisant la plus forte protection dans un modèle murin d'infection à *S. aureus*. Ensuite, ils ont démontré que la combinaison sous forme d'un vaccin quadrivalent offrait une survie de 100 % des souris lors d'infection expérimentale à *S. aureus*. Bien que ces résultats doivent être interprétés avec précaution par rapport aux infections mammaires chez les bovins, cette étude confirme l'obtention d'une synergie protectrice recherché lors d'associations antigéniques dans le cadre des mammites bovines (Castagliuolo *et al.*, 2006 ; Gaudreau *et al.*, 2007) et démontre l'intérêt d'appliquer ce type d'approche d'identification de nouveaux antigènes relevant, spécifiques aux souches bovines de *S. aureus*.

Enfin, deux protéines de surface, nommées GapB et GapC, ont également été identifiées sur base de leur haut degré de conservation entre 11 souches bovines testées (Goji *et al.*, 2004). L'immunisation de souris par une protéine chimérique GapB/C a révélé l'induction d'une forte réponse immune humorale et d'une réponse cellulaire, respectivement objectivée par une séroconversion spécifique d'IgG₁ et IgG_{2a} et une augmentation de cellules sécrétant de l'interleukine-4 et de l'IFN- γ dans le groupe vacciné (Perez-Casal *et al.*, 2006). Plus récemment, le même groupe a évalué l'utilisation d'un vaccin ADN intégrant les gènes codant pour GapB et/ou GapC chez la vache (Kerro-Dego, 2006). À l'inverse du vaccin recombinant protéique, une très faible réponse immune a été mise en évidence lors de la vaccination ADN. Ce résultat serait potentiellement expliqué par un défaut au niveau de la région promotrice du plasmide (Kerro-Dego *et al.*, 2006). Par conséquent, ce type d'approche n'a pu être évalué lors d'une infection expérimentale.

Enfin, une proportion non négligeable des *S. aureus* synthétise une capsule polysaccharidique *in vivo* (Middleton, 2008). Il a récemment été démontré que cette capsule inhibe la fixation de *S. aureus* par l'intermédiaire de Clf-A au fibrinogène et aux plaquettes, suggérant que le Clf-A pourrait ne pas être un candidat idéal pour prévenir les infections à *S. aureus* qui expriment une capsule *in vivo* (Risley *et al.*, 2007). Ainsi, si la capsule masque les antigènes de la paroi cellulaire, et en conséquence interfèrent avec l'opsonisation de protéine de surface tels que les FnBPs ou Clfs, le choix de ce type d'antigène doit être remis en question lors de vaccination contre les mammites à *S. aureus* (Middleton, 2008).

b) Les vaccins neutralisant les toxines

S. aureus produit plusieurs exotoxines provoquant directement des lésions ou facilitant la pénétration tissulaire. L'obtention d'anticorps neutralisants contre ces diverses toxines semble par conséquent une approche vaccinale intéressante. De manière générale, les vaccins contre les toxines dans le cadre de mammites à *S. aureus* ont visé principalement trois toxines : la toxine- α (Adlam *et al.*, 1977 ; Han et Park, 2000), l'entérotoxine-C (SeC) (Chang *et al.*, 2008) et la TSST-1 (Hu *et al.*, 2003).

Lors d'une immunisation contre la toxine- α chez le lapin ou la souris, la présence d'anticorps neutralisants dans le sang a permis de réduire les effets mortels de cette dernière mais ne réduit ni la concentration bactérienne, ni la formation d'abcès (Adlam *et al.*, 1977 ; Han et Park, 2000). Par ailleurs, les infections expérimentales de ces deux précédentes études ont été réalisées par l'inoculation de souches hautement virulentes responsables de mammites gangréneuses, type de marmite sporadiquement observé dans l'espèce bovine. Comme le suggère l'étude de la mortalité lors de pneumonies à *S. aureus* chez la souris (Bubeck Wardenburg *et al.*, 2008), la protection conférée contre la toxine- α semble plus importante lors des infections aiguës que lors d'infections subcliniques à *S. aureus*, forme prédominante des mammites bovines (Middleton, 2008).

Une autre toxine, TSST-1, a également été retenue comme cible vaccinale potentielle. Lors d'infection murine aiguë, la vaccination de souris par une forme mutante apathogène de

TSST-1 a permis de réduire la mortalité et la charge bactérienne retrouvée dans différents organes, bien que 40 % des individus vaccinés soient morts 11 jours après l'infection expérimentale (Hu *et al.*, 2003). Cependant, ce modèle d'infection aiguë pose les mêmes problèmes d'interprétation que les modèles utilisés pour évaluer l'effet de la neutralisation de la toxine- α . Par ailleurs, le pourcentage de souches de *S. aureus* bovines exprimant la TSST-1 semble être minoritaire (Larsen *et al.*, 2002 ; Fueyo *et al.*, 2005 ; Srinivasan *et al.*, 2006).

Comme la toxine TSST-1, l'entérotoxine C fait parti des toxines superantigéniques qui ont la propriété d'induire la prolifération aspécifique de lymphocytes T en se liant avec une forte affinité aux CMH-II (Ferens *et al.*, 1998a ; 1998b). Un vaccin (MastaVac™, LG Life Sciences) composé d'une SeC mutée a été développé. Une étude a montré une efficacité relative de ce vaccin contre *S. aureus* objectivé par un taux plus faible de cellules somatiques dans le lait et de nouvelles infections intramammaires dans le groupe d'animaux vaccinés (Chang *et al.*, 2008). Cependant, le nombre réduit de vache ($n = 3$) par groupe et le faible niveau d'infection expérimentale ne permettent pas de confirmer statistiquement l'efficacité de ce vaccin. De plus, aucun taux d'anticorps anti-SeC n'a été mesuré dans le lait (Middleton, 2008).

2.2.2 Les vaccins polysaccharidiques

Les polysaccharides au même titre que les protéines de surface ou que les toxines, représentent un facteur de virulence important, en facilitant l'adhésion des *S. aureus* aux tissus mammaires et en inhibant leur phagocytose (Sutra et Poutrel, 1994 ; Oviedo-Boyso *et al.*, 2007). Pas moins de 12 sérotypes polysaccharidiques ont été décrits dans la littérature : 11 polysaccharidiques capsulaires et un polysaccharide de surface 336 (autrefois considéré comme capsulaire) (Guidry *et al.*, 1998 ; Middleton, 2008). Le but des vaccins polysaccharidiques consiste à développer des anticorps opsonisants dirigés spécifiquement contre les polysaccharides présents en surface de micro-organismes. De manière générale, les polysaccharides sont connus pour être faiblement immunogènes et indépendants des lymphocytes T. Afin d'augmenter leur immunogénicité, il

est usuel d'utiliser des adjuvants et de les associer à des protéines porteuses (Fattom *et al.*, 1990 ; Mäkelä et Käyhty, 2002). Les polysaccharides capsulaires ont été purifiés et utilisés pour le développement d'anticorps spécifiques.

Du fait du faible pouvoir immunogène des polysaccharides, plusieurs études ont étudié l'effet de différents adjuvants sur l'induction d'anticorps dirigés contre les capsules de souches bovines inactivées de *S. aureus* (Han *et al.*, 2000a ; Han et Park, 2000). Les anticorps anti-capsulaire chez la vache doivent être majoritairement des IgG₂ du fait que les neutrophiles ne reconnaissent que les fractions constantes des IgG₂. C'est pourquoi le but de cette étude a principalement consisté à comparer l'induction de cet isotype particulier. Parmi les différents adjuvants utilisés, incluant le sulfate de dextran, l'hydroxyde d'aluminium, l'adjuvant complet de Freund et l'*immune-stimulating complex*, il est ressorti que l'hydroxyde d'aluminium était l'inducteur le plus puissant d'IgG₂ spécifiques dirigées contre la capsule polysaccharidiques. Plus récemment, Lee et collaborateurs (2005) ont utilisé un vaccin composé de souches inactivées appartenant aux sérotypes 5, 8 et 336 additionnées ou non d'un adjuvant, l'hydroxyde d'aluminium ou le FICA. La production d'Ig₁ et d'IgG₂ spécifiques de chacun des antigènes capsulaires a été significativement augmentée dans tous les groupes vaccinés, avec une prédominance pour l'isotype IgG₂ dans les deux groupes adjuvantés. Cependant, bien que l'IgG₂ soit l'isotype le plus efficace dans l'opsonisation destiné à promouvoir leur phagocytose par les neutrophiles (Howard *et al.*, 1980 ; Guidry *et al.*, 1997), il semblerait que le niveau de production de ceux-ci n'aient pas été suffisant pour augmenter la phagocytose par les neutrophiles (Lee *et al.*, 2005). Par contre, l'utilisation d'un autre adjuvant composé de microsphères de poly (*DL-lactide-coglycolide*) en combinaison de polysaccharides de capsules (5, 8 et 336) a induit chez la vache la production d'anticorps opsonisants d'isotype IgG₂ augmentant la phagocytoses de *S. aureus in vitro* (O'Brien *et al.*, 2001). Malheureusement, cette équipe n'a caractérisé ni la réponse immune induite dans la glande mammaire ni la protection potentielle conférée par ce type d'approche vaccinale. Enfin, la

Lysigin® est un vaccin dont la composition est proche de celui utilisé dans les études de Lee (incluant chacune des 3 valences polysaccharidiques). Comme décrit précédemment, ce vaccin commercial ne permet de réduire ni les comptages individuels dans le lait, ni de la clairance bactérienne de la glande mammaire malgré une production d'anticorps spécifiques (Middleton *et al.*, 2006 ; Luby *et al.*, 2007 ; Middleton *et al.*, 2009).

Une autre méthode pour augmenter l'immunogénicité des polysaccharides consiste en la conjugaison de ceux-ci avec une protéine porteuse. Tollersrud et collaborateurs (2001) ont notamment démontré que la conjugaison d'un polysaccharide capsulaire (CP) de type 5 avec l'albumine sérique humaine (HSA) permet l'induction d'une réponse humorale spécifique et durable. Cependant, les animaux vaccinés avec une souche complète inactivée exprimant le CP5, présentaient un titre en anticorps spécifiques supérieur à ceux observés dans le groupe d'animaux injectés par le vaccin conjugué CP5-HSA (Tollersrud *et al.*, 2001). De la même manière, Perez et collaborateurs (2009) ont récemment démontré que l'utilisation d'un vaccin complet constitué de souches productrices de biofilms (principalement constitué de PNAG) conférait une réponse humorale contre PNAG supérieure à l'injection du polysaccharide purifié, ainsi qu'une protection supérieure contre l'infection expérimentale de brebis par une souche productrice de biofilms. Cependant, l'ensemble des souches de *S. aureus* responsables de mammites bovines n'est pas capable de produire des biofilms (Vasudevan *et al.*, 2003 ; Fox *et al.*, 2005 ; Vautor *et al.*, 2008 ; Dhanawade *et al.*, 2009 ; Melchior *et al.*, 2009).

Par ailleurs, le vaccin StaphVAX® (Nabi Biopharmaceuticals) constitue une des approches vaccinales proche d'être commercialisée contre les infections humaines à *S. aureus*. Ce vaccin associant deux polysaccharides capsulaires CP5 et CP8 conjugués à une exotoxine A mutée et non toxique, a été démontré comme étant sûr et immunogène (Fattom *et al.*, 2004a). Cependant, l'immunisation de patients hémodialysés n'a pas permis de mettre en évidence une réduction significative des bactériémies à *S. aureus* par rapport aux patients contrôles (Fattom *et al.*, 2004b). Suite à ce résultat défavorable, la firme a décidé d'ajouter le

sérotype 336 ainsi que deux toxines synthétisées par *S. aureus*, la toxine- α et la leucocidine de Panton-Valentine.

Pour expliquer ce résultat négatif, DeLeo et Otto (2008) ont suggéré que la survie intracellulaire de *S. aureus* pourrait être impliquée dans l'absence de protection observée lors d'immunisation contre ces polysaccharides capsulaires. Récemment, la vaccination passive de souris par des séra enrichis en anticorps anti-CP5 et CP8 a été impliquée dans l'induction et l'apparition de SCVs (Tuchscher *et al.*, 2008). Ces SCVs ont pour particularité d'avoir un métabolisme réduit et une capacité de survie intracellulaire très élevée (Proctor *et al.*, 2006 ; Atalla *et al.*, 2009). De plus, cette survie à l'intérieur des phagocytes pourrait servir de réservoir infectieux et de vecteur à *S. aureus* (Deleo et Otto, 2008). En conclusion, ces observations posent la question de savoir si l'augmentation de l'opsonophagocytose est réellement la meilleure approche pour lutter contre les infections à *S. aureus*.

3. LES CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Bien que de nombreux essais de vaccination aient été développés contre les infections à *S. aureus*, un seul vaccin (Startvac®, Hipra) a été récemment commercialisé en Europe. Vu la mise sur le marché récente de ce vaccin, aucune étude épidémiologique à grande échelle n'a encore permis d'évaluer la réduction des taux cellulaires associés à ce type d'infection ainsi que l'apparition de nouveaux cas de mammites à *S. aureus*. Vu que l'ensemble des souches responsables de mammites bovines à *S. aureus* ne sont pas capables de produire le PNAG et le *slime associated antigenic complex*, il semble que l'antigène idéal de *S. aureus* n'ait cependant pas encore été découvert. Cette observation peut en partie être expliquée par la grande diversité antigénique observée au sein des souches de *S. aureus* responsables d'infections mammaires bovines. Cependant, l'identification de nouveaux antigènes relevant par la technique novatrice de la vaccinologie inverse (Rappuoli, 2000), utilisée notamment par Stranger-Jones et collaborateurs (2006), semble constituer l'une des voies d'avenir dans la prévention des infections à *S. aureus*. En effet, la vaccinologie inverse utilise le séquençage du génome de pathogènes afin de réduire le temps nécessaire à la découverte de candidats antigéni-

ques relevant de quelques décennies à quelques années. Par ailleurs, ce même terme de vaccinologie inverse est également utilisé pour désigner une autre approche intéressante d'identification d'antigènes protecteurs dénommée « approche immunomique », dont le principe est de comparer le répertoire en anticorps d'une population humaine ou animale résistante à un pathogène à celui d'une population sensible (Rinaudo *et al.*, 2009). Appliquée aux infections humaines à *S. aureus*, cette approche d'immunomique a notamment conduit à l'identification de protéines hautement immunogènes, incluant des candidats vaccinaux connus ou nouveaux (Vytvytska *et al.*, 2002). L'application de ce type d'approche aux infections bovines pourrait également conduire à l'identification de nouveaux antigènes relevant.

Par ailleurs, l'ensemble des vaccins décrits dans cette revue se focalisent principalement sur l'obtention d'une réponse humorale dirigée contre un antigène spécifique de *S. aureus*. Or, dans de nombreux cas, les bovins possèdent déjà des anticorps circulants reconnaissant les cibles antigéniques et par conséquent, la réponse humorale à elle seule pourrait ne pas être capable d'induire une protection efficace contre *S. aureus*. Parallèlement, dans un modèle murin d'infection létale à *S. aureus* (souche humaine), une étude récente a permis de confirmer la faible implication des lymphocytes B et des anticorps dans la protection conférée par l'immunisation de souris contre la protéine Als3p, structurellement proche du Clf-A de *S. aureus* (Spellberg *et al.*, 2008). En effet, des souris déplétées de l'ensemble de leurs lymphocytes B ont été immunisées par cette approche et n'ont pas vu leur protection réduite face à l'infection létale à *S. aureus*. Par contre, des souris dépourvues de lymphocytes T et immunisées contre Als3p n'étaient pas protégées contre l'infection létale à *S. aureus*. Des expériences de transfert adoptif ont, dans cette même étude, confirmé l'importance des lymphocytes T CD4⁺ et surtout CD8⁺ dans la protection conférée par l'immunisation. À l'opposé, le transfert de sérum ou de lymphocytes B provenant des mêmes souris n'a conféré aucune protection aux souris receveuses (Spellberg *et al.*, 2008). De plus, il a été récemment décrit que l'induction d'une réponse de nature Th1-Th17 permet de protéger des souris contre l'infection expé-

rimentrale de souris à *S. aureus* (Lin *et al.*, 2009). Par ailleurs, les anticorps opsonisants, bien que détectés dans la circulation sanguine, ne semblent pas toujours présents en quantités suffisantes dans la glande mammaire. De plus, dans le lait, la phagocytose des bactéries par les neutrophiles est partiellement affaiblie par la présence de globules graisseux (Paape *et al.*, 1981). Enfin, il semble de plus en plus évident qu'une proportion non négligeable de *S. aureus* soit capable de produire une capsule polysaccharidique *in vivo*, masquant ainsi les antigènes membranaires tels que les Clfs et FnBPs, et remettant également en question les vaccins basés sur une réponse humorale dirigées contre les protéines de surface.

La vaccination contre *S. aureus* impliquant l'induction d'anticorps opsonisants reconnaissant les polysaccharides capsulaires a été également mise en œuvre. Malheureusement, cette approche n'a pas permis de prévenir les infections humaines à *S. aureus*. Deleo et Otto (2008) ont suggéré que la survie intracellulaire des *S. aureus* après opsono-phagocytose pourrait être une raison expliquant l'échec de la vaccination polysaccharidique. Récemment, Tuchscher et collaborateurs (2008) ont confirmé cette hypothèse en démontrant que l'injection d'anticorps anti-capsulaires induisait l'émergence de souches non-capsulés et de SCVs intracellulaires. Par conséquent, l'hypothèse selon laquelle les phagocytes et les cellules épithéliales

mammaires pourraient servir de vecteur pour la dissémination de *S. aureus* a été renforcée, posant la question de savoir si l'induction d'une réponse opsono-phagocytaire était réellement adéquate dans la prévention des infections à *S. aureus* humaines et bovines.

Enfin, l'identification de nouvelles cibles antigéniques chez l'homme par certaines techniques récentes dont l'approche « immunomique », consistant en la comparaison des répertoires antigéniques présents dans des populations infectées par *S. aureus* ou non, saine ou malade semble prometteuse. À l'avenir, ce système d'analyse pourrait être appliqué aux infections bovines. Ainsi, la découverte de nouveaux déterminants antigéniques pertinents et l'induction d'une réponse cellulaire impliquant notamment une réponse cytotoxique dirigée contre les cellules infectées par *S. aureus*, en plus d'une réponse humorale spécifique, apparaissent comme des voies d'avenir pour prévenir les infections bovines à *S. aureus*.

ABSTRACT

Staphylococcus (S.) aureus is a major pathogen for mastitis in dairy cattle. In most cases, *S. aureus* causes long-lasting subclinical and chronic bovine mastitis and leads to significant economic losses by reducing the quantity and the quality of the

milk produced. The pathogenesis of *S. aureus* mastitis includes the ability to persist within host cells and involves multiple virulence factors including toxins, surface proteins and polysaccharides. The numerous vaccines that have been developed induce a specific immune response against these different factors. These different vaccine approaches are described and classified depending on the target antigen used. Moreover, some recent vaccine strategies against human *S. aureus* infections are also discussed and could eventually be used for the design of new bovine vaccines. Although most of bovine vaccines induce specific humoral response, to date, no vaccine has been described to protect efficiently against experimental and naturally occurred bovine *S. aureus* mastitis. In conclusion, this type of immune response and the broad antigenic variability of *S. aureus* strains can partially explain the lack of protection observed during most of vaccine trials.

BIBLIOGRAPHIE

- ADLAM C., WARD P., MCCARTNEY A., ARBUTHNOTT J., THORLEY C. Effect immunization with highly purified alpha- and beta-toxins on staphylococcal mastitis in rabbits. *Infect. Immun.*, 1977, **17**, 250-256.
- ADLAM C., WARD P., TURNER W. Effect of immunization with highly purified Panton-Valentine leucocidin and delta-toxin on staphylococcal mastitis in rabbits. *J. Comp. Pathol.*, 1980, **90**, 265-274.
- ALEXANDER E., HUDSON M. Factors influencing the internalization of *Staphylococcus aureus* and impacts on the course of infections in humans. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2001, **56**, 361-366.
- ALMEIDA R., MATTHEWS K., CIFRIAN E., GUIDRY A., OLIVER S. *Staphylococcus aureus* invasion of bovine mammary epithelial cells. *J. Dairy Sci.*, 1996, **79**, 1021-1026.
- AMORENA B., BASELGA R., ALBIZU I. Use of liposome-immunopotentiated exopolysaccharide as a component of an ovine mastitis staphylococcal vaccine. *Vaccine*, 1994, **12**, 243-249.
- ATALLA H., GYLES C., JACOB C., MOISAN H., MALOUIN F., MALLARD B. Characterization of a *Staphylococcus aureus* small colony variant (SCV) associated with persistent bovine mastitis. *Foodborne Pathog. Dis.*, 2008, **5**, 785-799.
- ATALLA H., GYLES C., MALLARD B. Persistence of a *Staphylococcus aureus* small colony variants (*S. aureus* SCV) within bovine mammary epithelial cells. *Vet. Microbiol.*, 2009,
- BAYLES K., WESSON C., LIU L., FOX L., BOHACH G., TRUMBLE W. Intracellular *Staphylococcus aureus* escapes the endosome and induces apoptosis in epithelial cells. *Infect. Immun.*, 1998, **66**, 336-342.

- BROCK J., STEEL E., REITER B. The effect of intramuscular and intramammary vaccination of cows on antibody levels and resistance to intramammary infection by *Staphylococcus aureus*. *Res. Vet. Sci.*, 1975, **19**, 152-158.
- BROUILLETTE E., GRONDIN G., LEFEBVRE C., TALBOT B.G., MALOUIN F. Mouse mastitis model of infection for antimicrobial compound efficacy studies against intracellular and extracellular forms of *Staphylococcus aureus*. *Vet. Microbiol.*, 2004, **101**, 253-262.
- BROUILLETTE E., HYODO M., HAYAKAWA Y., KARAOLIS D., MALOUIN F. 3',5'-cyclic diguanylic acid reduces the virulence of biofilm-forming *Staphylococcus aureus* strains in a mouse model of mastitis infection. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2005, **49**, 3109-3113.
- BROUILLETTE E., LACASSE P., SHKRETA L., BELANGER J., GRONDIN G., DIARRA M.S., FOURNIER S., TALBOT B.G. DNA immunization against the clumping factor A (CfA) of *Staphylococcus aureus*. *Vaccine*, 2002, **20**, 2348-2357.
- BUBECK WARDENBURG J., PALAZZOLO-BALLANCE A., OTTO M., SCHNEEWIND O., DELEO F. Pantone-Valentine leukocidin is not a virulence determinant in murine models of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* disease. *J. Infect. Dis.*, 2008, **198**, 1166-1170.
- BUZZOLA F., QUELLE L., STEELE-MOORE L., BERG D., DENAMIEL G., GENTILINI E., SORDELLI D. Molecular diversity of live-attenuated prototypic vaccine strains and clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 2001, **202**, 91-95.
- BUZZOLA F.R., BARBAGELATA M.S., CACCURI R.L., SORDELLI D.O. Attenuation and persistence of and ability to induce protective immunity to a *Staphylococcus aureus* aroA mutant in mice. *Infect. Immun.*, 2006, **74**, 3498-3506.
- CALZOLARI A., GIRAUDO J., RAMPONE H., ODIERNO L., GIRAUDO A., FRIGERIO C., BETTERA S., RASPANTI C., HERNÁNDEZ J., WEHBE M., MATTEA M., FERRARI M., LARRIESTRA A., NAGEL R. Field trials of a vaccine against bovine mastitis. 2. Evaluation in two commercial dairy herds. *J. Dairy Sci.*, 1997, **80**, 854-858.
- CAPUCOA., MEING., NICKERSON S., JACK L., WOOD D., BRIGHT S., ASCHENBRENNER R., MILLER R., BITMAN J. Influence of pulsationless milking on teat canal keratin and mastitis. *J. Dairy Sci.*, 1994, **77**, 64-74.
- CARTER E., KERR D. Optimization of DNA-based vaccination in cows using green fluorescent protein and protein A as a prelude to immunization against staphylococcal mastitis. *J. Dairy Sci.*, 2003, **86**, 1177-1186.
- CASTAGLIUOLO I., PICCININI R., BEGGIAO E., PALÙ G., MENGOLI C., DITADI F., VICENZONI G., ZECCONI A. Mucosal genetic immunization against four adhesins protects against *Staphylococcus aureus*-induced mastitis in mice. *Vaccine*, 2006, **24**, 4393-4402.
- CHANG B., MOON J., KANG H., KIM Y., LEE H., KIM J., LEE B., KOO H., PARK Y. Protective effects of recombinant staphylococcal enterotoxin type C mutant vaccine against experimental bovine infection by a strain of *Staphylococcus aureus* isolated from subclinical mastitis in dairy cattle. *Vaccine*, 2008, **26**, 2081-2091.
- CLARKE S., BRUMMELL K., HORSBURGH M., MCDOWELL P., MOHAMAD S., STAPLETON M., ACEVEDO J., READ R., DAY N., PEACOCK S., MOND J., KOKAI-KUN J., FOSTER S. Identification of in vivo-expressed antigens of *Staphylococcus aureus* and their use in vaccinations for protection against nasal carriage. *J. Infect. Dis.*, 2006, **193**, 1098-1108.
- CLARKE S., FOSTER S. Surface adhesins of *Staphylococcus aureus*. *Adv. Microb. Physiol.*, 2006, **51**, 187-224.
- COSTERTON J., STEWART P., GREENBERG E. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*, 1999, **284**, 1318-1322.
- CUCARELLA C., TORMO M., UBEDA C., TROTONDA M., MONZÓN M., PERIS C., AMORENA B., LASA I., PENADÉS J. Role of biofilm-associated protein bap in the pathogenesis of bovine *Staphylococcus aureus*. *Infect. Immun.*, 2004, **72**, 2177-2185.
- CUE D., LEI M., LUONG T., KUECHENMEISTER L., DUNMAN P., O'DONNELL S., ROWE S., O'GARA J., LEE C. Rbf promotes biofilm formation by *Staphylococcus aureus* via repression of icaR, a negative regulator of icaADBC. *J. Bacteriol.*, 2009, **191**, 6363-6373.
- DELEO F., OTTO M. An antidote for *Staphylococcus aureus* pneumonia? *J. Exp. Med.*, 2008, **205**, 271-274.
- DHANAWADE N., KALOREY D., SRINIVASAN R., BARBUDDHE S., KURKURE N. Detection of intercellular adhesion genes and biofilm production in *Staphylococcus aureus* isolated from bovine subclinical mastitis. *Vet. Res. Commun.*, 2009,
- DRYLA A., PRUSTOMERSKY S., GELBMANN D., HANNER M., BETTINGER E., KOCSIS B., KUSTOS T., HENICS T., MEINKE A., NAGY E. Comparison of antibody repertoires against *Staphylococcus aureus* in healthy individuals and in acutely infected patients. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, 2005, **12**, 387-398.
- FATTOMA., FULLER S., PROPST M., WINSTON S., MUENZ L., HE D., NASO R., HORWITH G. Safety and immunogenicity of a booster dose of *Staphylococcus aureus* types 5 and 8 capsular polysaccharide conjugate vaccine (StaphVAX) in hemodialysis patients. *Vaccine*, 2004a, **23**, 656-663.
- FATTOM A., HORWITH G., FULLER S., PROPST M., NASO R. Development of StaphVAX, a polysaccharide conjugate vaccine against *S. aureus* infection: from the lab bench to phase III clinical trials. *Vaccine*, 2004b, **22**, 880-887.

- FATTOM A., SCHNEERSON R., SZU S., VANN W., SHILOACH J., KARAKAWA W., ROBBINS J. Synthesis and immunologic properties in mice of vaccines composed of *Staphylococcus aureus* type 5 and type 8 capsular polysaccharides conjugated to *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A. *Infect. Immun.*, 1990, **58**, 2367-2374.
- FERENS W., DAVIS W., HAMILTON M., PARK Y., DEOBALD C., FOX L., BOHACH G. Activation of bovine lymphocyte subpopulations by staphylococcal enterotoxin C. *Infect. Immun.*, 1998a, **66**, 573-580.
- FERENS W., GOFF W., DAVIS W., FOX L., DEOBALD C., HAMILTON M., BOHACH G. Induction of type 2 cytokines by a staphylococcal enterotoxin superantigen. *J. Nat. Toxins*, 1998b, **7**, 193-213.
- FOSTER T. Immune evasion by staphylococci. *Nat. Rev. Microbiol.*, 2005, **3**, 948-958.
- FOX L., ZADOKS R., GASKINS C. Biofilm production by *Staphylococcus aureus* associated with intramammary infection. *Vet. Microbiol.*, 2005, **107**, 295-299.
- FUEYO J., MENDOZA M., RODICIO M., MUÑIZ J., ALVAREZ M., MARTÍN M. Cytotoxin and pyrogenic toxin superantigen gene profiles of *Staphylococcus aureus* associated with subclinical mastitis in dairy cows and relationships with macrorestriction genomic profiles. *J. Clin. Microbiol.*, 2005, **43**, 1278-1284.
- GARCÍA V., GÓMEZ M., IGLESIAS M., SANJUAN N., GHERARDI M., CERQUETTI M., SORDELLI D. Intramammary immunization with live-attenuated *Staphylococcus aureus*: microbiological and immunological studies in a mouse mastitis model. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, 1996, **14**, 45-51.
- GARZONI C., KELLEY W. *Staphylococcus aureus*: new evidence for intracellular persistence. *Trends Microbiol.*, 2009, **17**, 59-65.
- GAUDREAU M., LACASSE P., TALBOT B. Protective immune responses to a multi-gene DNA vaccine against *Staphylococcus aureus*. *Vaccine*, 2007, **25**, 814-824.
- GIRAUDO J., CALZOLARI A., RAMPONE H., RAMPONE A., GIRAUDO A., BOGNI C., LARRIESTRAA., NAGEL R. Field trials of a vaccine against bovine mastitis. I. Evaluation in heifers. *J. Dairy Sci.*, 1997, **80**, 845-853.
- GOJI N., POTTER A., PEREZ-CASAL J. Characterization of two proteins of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine clinical mastitis with homology to glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Vet. Microbiol.*, 2004, **99**, 269-279.
- GÓMEZ M., GARCÍA V., GHERARDI M., CERQUETTI M., SORDELLI D. Intramammary immunization with live-attenuated *Staphylococcus aureus* protects mice from experimental mastitis. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, 1998, **20**, 21-27.
- GUIDRY A., FATTOM A., PATEL A., O'BRIEN C. Prevalence of capsular serotypes among *Staphylococcus aureus* isolates from cows with mastitis in the United States. *Vet. Microbiol.*, 1997, **59**, 53-58.
- GUIDRY A., FATTOM A., PATEL A., O'BRIEN C., SHEPHERD S., LOHUIS J. Serotyping scheme for *Staphylococcus aureus* isolated from cows with mastitis. *Am. J. Vet. Res.*, 1998, **59**, 1537-1539.
- HAN H., PAK S., KANG S., JONG W., YOUN C. Capsular polysaccharide typing of domestic mastitis-causing *Staphylococcus aureus* strains and its potential exploration of bovine mastitis vaccine development. I. Capsular polysaccharide typing, isolation and purification of the strains. *J. Vet. Sci.*, 2000a, **1**, 53-60.
- HAN H., PAK S.N., GUIDRY A. Prevalence of capsular polysaccharide (CP) types of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitic milk and protection of *S. aureus* infection in mice with CP vaccine. *J. Vet. Med. Sci.*, 2000b, **62**, 1331-1333.
- HAN H., PARK H. Effects of adjuvants on the immune response of staphylococcal alpha toxin and capsular polysaccharide (CPS) in rabbit. *J. Vet. Med. Sci.*, 2000, **62**, 237-241.
- HAVERI M., HOVINEN M., ROSLÖF A., PYÖRÄLÄ S. Molecular types and genetic profiles of *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine intramammary infections and extramammary sites. *J. Clin. Microbiol.*, 2008, **46**, 3728-3735.
- HÉBERT A., SAYASITH K., SÉNÉCHAL S., DUBREUIL P., LAGACÉ J. Demonstration of intracellular *Staphylococcus aureus* in bovine mastitis alveolar cells and macrophages isolated from naturally infected cow milk. *FEMS Microbiol. Lett.*, 2000, **193**, 57-62.
- HOWARD C., TAYLOR G., BROWNLIE J. Surface receptors for immunoglobulin on bovine polymorphonuclear neutrophils and macrophages. *Res. Vet. Sci.*, 1980, **29**, 128-130.
- HU D., OMOE K., SASAKI S., SASHINAMI H., SAKURABAH., YOKOMIZO Y., SHINAGAWA K., NAKANE A. Vaccination with nontoxic mutant toxic shock syndrome toxin 1 protects against *Staphylococcus aureus* infection. *J. Infect. Dis.*, 2003, **188**, 743-752.
- HWANG C., PAK S., HAN H. Effects of autogenous toxoid-bacterin in lactating cows with *Staphylococcus aureus* subclinical mastitis. *J. Vet. Med. Sci.*, 2000, **62**, 875-880.
- KERRO-DEGO O., PRYSLIAK T., POTTER A., PEREZ-CASAL J. DNA-protein immunization against the GapB and GapC proteins of a mastitis isolate of *Staphylococcus aureus*. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 2006, **113**, 125-138.
- KERRO DEGO O., VAN DIJK J., NEDERBRAGT H. Factors involved in the early pathogenesis of bovine *Staphylococcus aureus* mastitis with emphasis on bacterial adhesion and invasion: a review. *Vet. Q.*, 2002, **24**, 181-198.
- KUKLIN N., CLARK D., SECORE S., COOK J., COPE L., MCNEELY T., NOBLE L., BROWN M., ZORMAN J., WANG X., PANCARI G., FAN H., ISETT K., BURGESS B., BRYAN J., BROWNLAW M., GEORGE H., MEINZ M., LIDDELL M., KELLY R.,

- SCHULTZ L., MONTGOMERY D., ONISHI J., LOSADA M., MARTIN M., EBERT T., TAN C., SCHOFIELD T., NAGY E., MEINEKE A., JOYCE J., KURTZ M., CAULFIELD M., JANSEN K., MCCLEMENTS W., ANDERSON A. A novel *Staphylococcus aureus* vaccine: iron surface determinant B induces rapid antibody responses in rhesus macaques and specific increased survival in a murine *S. aureus* sepsis model. *Infect. Immun.*, 2006, **74**, 2215-2223.
- KUROISHI T., KOMINE K., KAI K., ITAGAKI M., KOBAYASHI J., OHTA M., KAMATA S., KUMAGAI K. Concentrations and specific antibodies to staphylococcal enterotoxin-C and toxic shock syndrome toxin-1 in bovine mammary gland secretions, and inflammatory response to the intramammary inoculation of these toxins. *J. Vet. Med. Sci.*, 2003, **65**, 899-906.
- LARSEN H., AARESTRUP F., JENSEN N. Geographical variation in the presence of genes encoding superantigenic exotoxins and beta-hemolysin among *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Europe and USA. *Vet. Microbiol.*, 2002, **85**, 61-67.
- LEE J., O'BRIEN C., GUIDRY A., PAAPE M., SHAFER-WEAVER K., ZHAO X. Effect of a trivalent vaccine against *Staphylococcus aureus* mastitis lymphocyte subpopulations, antibody production, and neutrophil phagocytosis. *Can J Vet. Res.*, 2005, **69**, 11-18.
- LIN L., IBRAHIMA., XU X., FARBER J., AVANESIAN V., BAQUIR B., FU Y., FRENCH S., EDWARDS J.J., SPELLBERG B. Th1-Th17 cells mediate protective adaptive immunity against *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans* infection in mice. *PLoS Pathog.*, 2009, **5**, e1000703.
- LUBY C.D., MIDDLETON J.R., MA J., RINEHART C.L., BUCKLIN S., KOHLER C., TYLER J.W. Characterization of the antibody isotype response in serum and milk of heifers vaccinated with a *Staphylococcus aureus* bacterin (Lysigin). *J. Dairy Res.*, 2007, **74**, 239-246.
- MA J., COCCHIARO J., LEE J. Evaluation of serotypes of *Staphylococcus aureus* strains used in the production of a bovine mastitis bacterin. *J. Dairy Sci.*, 2004, **87**, 178-182.
- MÄKELÄ P., KÄYHTY H. Evolution of conjugate vaccines. *Expert Rev. Vaccines*, 2002, **1**, 399-410.
- MAMO W., BODÉN M., FLOCK J. Vaccination with *Staphylococcus aureus* fibrinogen binding proteins (FgBPs) reduces colonisation of *S. aureus* in a mouse mastitis model. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, 1994a, **10**, 47-53.
- MAMO W., JONSSON P., FLOCK J., LINDBERG M., MÜLLER H., WADSTRÖM T., NELSON L. Vaccination against *Staphylococcus aureus* mastitis: immunological response of mice vaccinated with fibronectin-binding protein (FnBP-A) to challenge with *S. aureus*. *Vaccine*, 1994b, **12**, 988-992.
- MAMO W., FRÖMAN G., MÜLLER H. Protection induced in mice vaccinated with recombinant collagen-binding protein (CnBP) and alpha-toxoid against intramammary infection with *Staphylococcus aureus*. *Microbiol. Immunol.*, 2000, **44**, 381-384.
- MEEUSEN E., WALKER J., PETERS A., PASTORET P., JUNGENSEN G. Current status of veterinary vaccines. *Clin. Microbiol. Rev.*, 2007, **20**, 489-510.
- MELCHIOR M., VAN OSCH M., GRAAT R., VAN DUIJKEREN E., MEVIUS D., NIELEN M., GAASTRA W., FINK-GREMMELS J. Biofilm formation and genotyping of *Staphylococcus aureus* bovine mastitis isolates: evidence for lack of penicillin-resistance in Agr-type II strains. *Vet. Microbiol.*, 2009, **137**, 83-89.
- MIDDLETON J.R. *Staphylococcus aureus* antigens and challenges in vaccine development. *Expert Rev. Vaccines*, 2008, **7**, 805-815.
- MIDDLETON J.R., LUBY C.D., ADAMS D.S. Efficacy of vaccination against staphylococcal mastitis: a review and new data. *Vet. Microbiol.*, 2009, **134**, 192-198.
- MIDDLETON J.R., MA J., RINEHART C.L., TAYLOR V.N., LUBY C.D., STEEVENS B.J. Efficacy of different Lysigin formulations in the prevention of *Staphylococcus aureus* intramammary infection in dairy heifers. *J. Dairy Res.*, 2006, **73**, 10-19.
- MITCHELL G., BROUILLETTE E., SÉGUIN D., ASSELIN A., JACOB C., MALOUIN F. A role for sigma factor B in the emergence of *Staphylococcus aureus* small-colony variants and elevated biofilm production resulting from an exposure to aminoglycosides. *Microb. Pathog.*, 2010, **48**, 18-27.
- NOUR EL-DIN A., SHKRETA L., TALBOT B., DIARRA M., LACASSE P. DNA immunization of dairy cows with the clumping factor A of *Staphylococcus aureus*. *Vaccine*, 2006, **24**, 1997-2006.
- NONNECKE B., TARGOWSKI S. The effect of local and parenteral vaccination on the response of the guinea pig mammary gland to staphylococcal challenge. *J. Reprod. Immunol.*, 1984, **6**, 365-376.
- NORDHAUG M., NESSE L., NORCROSS N., GUDDING R. A field trial with an experimental vaccine against *Staphylococcus aureus* mastitis in cattle: 1. clinical parameters. *J. Dairy Sci.*, 1994a, **77**, 1267-1275.
- NORDHAUG M., NESSE L., NORCROSS N., GUDDING R. A field trial with an experimental vaccine against *Staphylococcus aureus* mastitis in cattle: 2. antibody response. *J. Dairy Sci.*, 1994b, **77**, 1276-1284.
- O'BRIEN C., GUIDRY A., DOUGLASS L., WESTHOFF D. Immunization with *Staphylococcus aureus* lysate incorporated into microspheres. *J. Dairy Sci.*, 2001, **84**, 1791-1799.
- O'RIORDAN K., LEE J. *Staphylococcus aureus* capsular polysaccharides. *Clin. Microbiol. Rev.*, 2004, **17**, 218-234.
- OLIVEIRA M., BEXIGA R., NUNES S., CARNEIRO C., CAVACO L., BERNARDO F., VILELA C. Biofilm-forming ability profiling of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* mastitis isolates. *Vet. Microbiol.*, 2006, **118**, 133-140.

- OVIEDO-BOYSO J., VALDEZ-ALARCÓN J., CAJERO-JUÁREZ M., OCHOA-ZARZOSA A., LÓPEZ-MEZA J., BRAVO-PATIÑO A., BAIZABAL-AGUIRRE V. Innate immune response of bovine mammary gland to pathogenic bacteria responsible for mastitis. *J. Infect.*, 2007, **54**, 399-409.
- PAAPE M., WERGIN W., GUIDRY A., SCHULTZE W. Phagocytic defense of the ruminant mammary gland. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 1981, **137**, 555-578.
- PANKEY J., BODDIE N., WATTS J., NICKERSON S. Evaluation of protein A and a commercial bacterin as vaccines against *Staphylococcus aureus* mastitis by experimental challenge. *J. Dairy Sci.*, 1985, **68**, 726-731.
- PELLEGRINO M., GIRAUDO J., RASPANTI C., NAGEL R., ODIERNOL., PRIMO V., BOGNI C. Experimental trial in heifers vaccinated with *Staphylococcus aureus* avirulent mutant against bovine mastitis. *Vet. Microbiol.*, 2008, **127**, 186-190.
- PEREZ-CASAL J., PRYSLIAK T., KERRO-DEGO O., POTTER A. Immune responses to a *Staphylococcus aureus* GapC/B chimera and its potential use as a component of a vaccine for *S. aureus* mastitis. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 2006, **109**, 85-97.
- PÉREZ M., PRENAFETA A., VALLE J., PENADÉS J., ROTA C., SOLANO C., MARCO J., GRILLÓ M., LASA I., IRACHE J., MAIRA-LITRAN T., JIMÉNEZ-BARBERO J., COSTA L., PIER G., 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.
- PETROVSKI K., TRAJCEV M., BUNESKI G. A review of the factors affecting the costs of bovine mastitis. *J. S. Afr. Vet. Assoc.*, 2006, **77**, 52-60.
- PICCININI R., CESARIS L., DAPRÀ V., BORROMEO V., PICOZZI C., SECCHIC., ZECCONIA. The role of teat skin contamination in the epidemiology of *Staphylococcus aureus* intramammary infections. *J. Dairy Res.*, 2009, **76**, 36-41.
- PÖHLMANN-DIETZE P., ULRICH M., KISER K., DÖRING G., LEE J., FOURNIER J., BOTZENHART K., WOLZ C. Adherence of *Staphylococcus aureus* to endothelial cells: influence of capsular polysaccharide, global regulator agr, and bacterial growth phase. *Infect. Immun.*, 2000, **68**, 4865-4871.
- POUTREL B., BOUTONNIER A., SUTRA L., FOURNIER J. Prevalence of capsular polysaccharide types 5 and 8 among *Staphylococcus aureus* isolates from cow, goat, and ewe milk. *J. Clin. Microbiol.*, 1988, **26**, 38-40.
- PRENAFETA A., MARCH R., FOIX A., CASALS I., COSTA L. Study of the humoral immunological response after vaccination with a *Staphylococcus aureus* biofilm-embedded bacterin in dairy cows: possible role of the exopolysaccharide specific antibody production in the protection from *Staphylococcus aureus* induced mastitis. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 2009, **134**, 208-217.
- PROCTOR R., VON EIFF C., KAHL B., BECKER K., MCNAMARA P., HERRMANN M., PETERS G. Small colony variants: a pathogenic form of bacteria that facilitates persistent and recurrent infections. *Nat. Rev. Microbiol.*, 2006, **4**, 295-305.
- QUIE P. Microcolonies (G-variants) of *Staphylococcus aureus*. *Yale J. Biol. Med.*, 1969, **41**, 394-403.
- RAINARD P., RIOLLET C. Innate immunity of the bovine mammary gland. *Vet. Res.*, 2006, **37**, 369-400.
- RAPPUOLI R. Reverse vaccinology. *Curr Opin Microbiol.*, 2000, **3**, 445-450.
- RINAUDO C., TELFORD J., RAPPUOLI R., SEIB K. Vaccinology in the genome era. *J. Clin. Invest.*, 2009, **119**, 2515-2525.
- REINOSO E., MAGNANO G., GIRAUDO J., CALZOLARI A., BOGNI C. Bovine and rabbit models for the study of a *Staphylococcus aureus* avirulent mutant strain, RC122. *Can. J. Vet. Res.*, 2002, **66**, 285-288.
- RISLEY A., LOUGHMAN A., CYWES-BENTLEY C., FOSTER T., LEE J. Capsular polysaccharide masks clumping factor A-mediated adherence of *Staphylococcus aureus* to fibrinogen and platelets. *J. Infect. Dis.*, 2007, **196**, 919-927.
- ROBERSON J., FOX L., HANCOCK D., GAY J., BESSER T. Ecology of *Staphylococcus aureus* isolated from various sites on dairy farms. *J. Dairy Sci.*, 1994, **77**, 3354-3364.
- SEARS P., MCCARTHY K. Management and treatment of staphylococcal mastitis. *Vet. Clin. North. Am. Food Anim. Pract.*, 2003, **19**, 171-185.
- SEEGERS H., FOURICHON C., BEAUDEAU F. Production effects related to mastitis and mastitis economics in dairy cattle herds. *Vet. Res.*, 2003, **34**, 475-491.
- SHAMS H. Recent developments in veterinary vaccinology. *Vet. J.*, 2005, **170**, 289-299.
- SHIM E., SHANKS R., MORIN D. Milk loss and treatment costs associated with two treatment protocols for clinical mastitis in dairy cows. *J. Dairy Sci.*, 2004, **87**, 2702-2708.
- SHKRETA L., TALBOT B., DIARRA M., LACASSE P. Immune responses to a DNA/protein vaccination strategy against *Staphylococcus aureus* induced mastitis in dairy cows. *Vaccine*, 2004, **23**, 114-126.
- SPELLBERG B., IBRAHIM A., YEAMAN M., LIN L., FU Y., AVANESIAN V., BAYER A., FILLER S., LIPKE P., OTOO H., EDWARDS J.J. The antifungal vaccine derived from the recombinant N terminus of Als3p protects mice against the bacterium *Staphylococcus aureus*. *Infect. Immun.*, 2008, **76**, 4574-4580.
- SOMPOLINSKY D., COHEN M., ZIV G. Epidemiological and biochemical studies on thiamineless dwarf-colony variants of *Staphylococcus aureus* as etiological agents of bovine

- mastitis. *Infect. Immun.*, 1974, **9**, 217-228.
- SOMPOLINSKY D., SAMRA Z., KARAKAWA W., VANN W., SCHNEERSON R., MALIK Z. Encapsulation and capsular types in isolates of *Staphylococcus aureus* from different sources and relationship to phage types. *J. Clin. Microbiol.*, 1985, **22**, 828-834.
- SORDELLI D., BUZZOLA F., GOMEZ M., STEELE-MOORE L., BERG D., GENTILINI E., CATALANO M., REITZ A., TOLLERSRUD T., DENAMIEL G., JERIC P., LEE J. Capsule expression by bovine isolates of *Staphylococcus aureus* from Argentina: genetic and epidemiologic analyses. *J. Clin. Microbiol.*, 2000, **38**, 846-850.
- SRINIVASAN V., SAWANT A., GILLESPIE B., HEADRICK S., CEASARIS L., OLIVER S. Prevalence of enterotoxin and toxic shock syndrome toxin genes in *Staphylococcus aureus* isolated from milk of cows with mastitis. *Foodborne Pathog. Dis.*, 2006, **3**, 274-283.
- STRANGER-JONES Y., BAE T., SCHNEEWIND O. Vaccine assembly from surface proteins of *Staphylococcus aureus*. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2006, **103**, 16942-16947.
- SURIYAPHOL G., SARIKAPUTI M., SURIYAPHOL P. Differential responses of cells from human skin keratinocyte and bovine mammary epithelium to attack by pore-forming *Staphylococcus aureus* alpha-toxin. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.*, 2009, **32**, 491-502.
- SUTRA L., POUTREL B. Virulence factors involved in the pathogenesis of bovine intramammary infections due to *Staphylococcus aureus*. *J. Med. Microbiol.*, 1994, **40**, 79-89.
- THAKKER M., PARK J., CAREY V., LEE J. *Staphylococcus aureus* serotype 5 capsular polysaccharide is antiphagocytic and enhances bacterial virulence in a murine bacteremia model. *Infect. Immun.*, 1998, **66**, 5183-5189.
- TITBALL R. Vaccines against intracellular bacterial pathogens. *Drug. Discov. Today*, 2008, **13**, 596-600.
- TOLLERSRUD T., KENNY K., REITZ A.J., LEE J. Genetic and serologic evaluation of capsule production by bovine mammary isolates of *Staphylococcus aureus* and other *Staphylococcus* spp. from Europe and the United States. *J. Clin. Microbiol.*, 2000, **38**, 2998-3003.
- TOLLERSRUD T., ZERNICHOW L., ANDERSEN S., KENNY K., LUND A. *Staphylococcus aureus* capsular polysaccharide type 5 conjugate and whole cell vaccines stimulate antibody responses in cattle. *Vaccine*, 2001, **19**, 3896-3903.
- TOLLERSRUD T., NØRSTEBØ P., ENGVIK J., ANDERSEN S., REITAN L., LUND A. Antibody responses in sheep vaccinated against *Staphylococcus aureus* mastitis: a comparison of two experimental vaccines containing different adjuvants. *Vet. Res. Commun.*, 2002, **26**, 587-600.
- TUCHSCHERR L., BUZZOLA F., ALVAREZ L., CACCURI R., LEE J., SORDELLI D. Capsule-negative *Staphylococcus aureus* induces chronic experimental mastitis in mice. *Infect. Immun.*, 2005, **73**, 7932-7937.
- TUCHSCHERR L., BUZZOLA F., ALVAREZ L., LEE J., SORDELLI D. Antibodies to capsular polysaccharide and clumping factor A prevent mastitis and the emergence of unencapsulated and small-colony variants of *Staphylococcus aureus* in mice. *Infect. Immun.*, 2008, **76**, 5738-5744.
- ULMER J., VALLEY U., RAPPUOLI R. Vaccine manufacturing: challenges and solutions. *Nat. Biotechnol.*, 2006, **24**, 1377-1383.
- VAN OOSTVELDT K., VANGROENWEGHE F., DOSOGNE H., BURVENICH C. Apoptosis and necrosis of blood and milk polymorphonuclear leukocytes in early and midlactating healthy cows. *Vet. Res.*, 2001, **32**, 617-622.
- VASUDEVAN P., NAIR M., ANNAMALAI T., VENKITANARAYANAN K. Phenotypic and genotypic characterization of bovine mastitis isolates of *Staphylococcus aureus* for biofilm formation. *Vet. Microbiol.*, 2003, **92**, 179-185.
- VAUTOR E., ABADIE G., PONT A., THIERY R. Evaluation of the presence of the *bap* gene in *Staphylococcus aureus* isolates recovered from human and animals species. *Vet. Microbiol.*, 2008, **127**, 407-411.
- VON EIFF C., PETERS G., BECKER K. The small colony variant (SCV) concept: the role of staphylococcal SCVs in persistent infections. *Injury*, 2006, **37**, 26-33.
- VOYICH J., BRAUGHTON K., STURDEVANT D., WHITNEY A., SAÏD-SALIMB., PORCELLA S., LONG R., DORWARD D., GARDNER D., KREISWIRTH B., MUSSER J., DELEO F. Insights into mechanisms used by *Staphylococcus aureus* to avoid destruction by human neutrophils. *J. Immunol.*, 2005, **175**, 3907-3919.
- VYTVYTSKA O., NAGY E., BLÜGGEL M., MEYER H., KURZBAUER R., HUBER L., KLADE C. Identification of vaccine candidate antigens of *Staphylococcus aureus* by serological proteome analysis. *Proteomics*, 2002, **2**, 580-590.
- WATSON D. Evaluation of attenuated, live staphylococcal mastitis vaccine in lactating heifers. *J. Dairy Sci.*, 1984, **67**, 2608-2613.
- WATSON D. Vaccination against experimental staphylococcal mastitis in dairy heifers. *Res. Vet. Sci.*, 1992, **53**, 346-353.
- WATSON D., CAMPBELL R. Vaccination against experimental staphylococcosis in sheep: observations on bacteriology and pathology following challenge. *Aust. Vet. J.*, 1979, **55**, 475-480.
- WATSON D., FRANKLIN N. Immunological cross-reactivity between pseudocapsular antigens of strains of *Staphylococcus aureus* isolated from cases of bovine mastitis. *Vet. Microbiol.*, 1988, **16**, 159-166.
- WATSON D., KENNEDY J. Immunisation against experimental staphylococcal mastitis in sheep: effect of challenge with a heterologous strain of *Staphylococcus aureus*. *Aust. Vet. J.*, 1981, **57**, 309-313.

- WILLIAMS J., CARNES A., HODGSON C. Plasmid DNA vaccine vector design: impact on efficacy, safety and upstream production. *Biotechnol. Adv.*, 2009, **27**, 353-370.
- WILLIAMS J., MAYERHOFER H., BROWN R. Clinical evaluation of a *Staphylococcus aureus* bacterin (polyvalent somatic antigen). *Vet. Med. Small. Anim. Clin.*, 1966, **61**, 789-793.
- WILLIAMS J., SHIPLEY G., SMITH G., GERBER D. A clinical evaluation of *Staphylococcus aureus* bacterin in the control of staphylococcal mastitis in cows. *Vet. Med. Small Anim. Clin.*, 1975, **70**, 587-594.
- WOLFF J., MALONER., WILLIAMS P., CHONG W., ACSADI G., JANI A., FELGNER P. Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. *Science*, 1990, **247**, 1465-1468.
- YOSHIDA K., ICHIMAN Y., NARIKAWA S., EVANS W. Staphylococcal capsular vaccine for preventing mastitis in two herds in Georgia. *J. Dairy Sci.*, 1984, **67**, 620-627.
- ZECCONI A., BINDA E., BORROMEO V., PICCININI R. Relationship between some *Staphylococcus aureus* pathogenic factors and growth rates and somatic cell counts. *J. Dairy Res.*, 2005, **72**, 203-208.
- ZECCONI A., CESARIS L., LIANDRIS E., DAPRÀ V., PICCININI R. Role of several *Staphylococcus aureus* virulence factors on the inflammatory response in bovine mammary gland. *Microb. Pathog.*, 2006, **40**, 177-183.