

# Właściwości fenotypowe i genotypowe szczepów *Staphylococcus aureus* wyizolowanych z mleka krów chorych na mastitis

JOLANTA SACHANOWICZ, ANTONI JAKUBCZAK, MAŁGORZATA PIECHOTA

Zakład Mikrobiologii Akademii Podlaskiej, ul. Prusa 12, 08-110 Siedlce

Sachanowicz J., Jakubczak A., Piechota M.

## Phenotype and genotype traits of *S. aureus* strains isolated from mastitis milk samples

### Summary

The aim of the study was to characterize *S. aureus* strains isolated from mastitis milk. A total of 143 strains were studied in order to characterize coagulate activity using the tube method and human and bovine plasma, the presence of the clumping factor, mannitol fermentation, fibrinolysin production in human and bovine plasma, hemolysis of sheep erythrocytes, egg yolk reaction, tellurite reduction, phosphates production, and growth with crystal violet and acid production from ribose and mannose. The study classified the total amount of strains into 4 biotypes based on acid production from mannitol, mannose and ribose. The majority of strains were classified into the 4 biotypes. All isolates were tested for antibiotic resistance: penicillin, amoxicillin, cefalexin, gentamicin, lincomycin, enrofloxacin, erythromycin, bacitracin and tetracycline. Over half the strains were resistant to penicillin - 54.5% and most strains were susceptible to cephalexin - 78.3%. 20 strains were tested for induction to L forms with antibiotics: penicillin, ampicillin, amoxicillin - clavulanic acid and streptomycin. Penicillin, ampicillin and amoxicillin - clavulanic acid induced L forms from some of the strains. More L forms were induced with ampicillin - 11 strains. Streptomycin did not result in the transition of vegetative cells of *S. aureus* into L forms. Some strains also produced reversible colonies. Subcultures of these colonies to blood agar resulted in reversion to the parental form. 10 strains of *S. aureus* were tested used PCR - fingerprinting. This DNA-based method was enabled 6 different banding patterns to be discriminated amongst the 2-6 bands produced.

**Keywords:** *Staphylococcus aureus*, mastitis

*Staphylococcus aureus* jest jedną z najczęściej izolowanych bakterii z mleka krów chorych na mastitis (1, 6, 10-12, 18). W obliczu masowego rozpowszechnienia się gronkowców będących jednym z najgroźniejszych patogenów, zasadne jest dokładne poznanie tych bakterii, ich właściwości fizjologicznych, genetycznych, warunków umożliwiających ich namnażanie, przetrwanie i zarazem czynników hamujących ich rozwój.

Badania miały na celu opracowanie fenotypowej i genotypowej charakterystyki szczepów *S. aureus* pochodzących z mleka krów chorych na zapalenie gruczołu mlekowego oraz ocenę przydatności fenotypowych i genotypowych metod typowania szczepów *S. aureus*.

### Materiał i metody

Badaniami objęto grupę 143 szczepów *S. aureus* wyizolowanych z mleka krów chorych na mastitis wg (7). Szczepy pochodziły z Pracowni Bakteriologicznej Zakładu Higieny Weterynaryjnej w Łomży i z Pracowni Chorób Wymion Wojewódzkiego Zakładu Weterynarii w Siedlcach. Wyizolowane szczepy identyfikowano wykorzystując test API - STAPH firmy bio Merieux, jako szczep kontrolny wykorzystano *S. aureus* ATCC 9144 - PIWET Nr 661.

Określono właściwości biochemiczne wszystkich badanych szczepów *S. aureus*, zbadano wrażliwość tych szczepów na wybrane antybiotyki oraz określono ich metycylooporność. Następnie zbadano wpływ wybranych antybiotyków na wytwarzanie form L szczepów najbardziej zróżnicowanych biochemicznie oraz 10 wybranych szczepów zróżnicowano metodą PCR-fingerprinting.

Test na koagulazę przeprowadzono w dwóch niezależnych badaniach, z osoczem ludzkim i bydlęcym, oznaczono czynnik zlepiający CF (clumping factor), zbadano produkcję alkalicznej fosfatazy oraz obecność fibrylizyny. Zdolność szczepów do hemolizowania erytrocytów badano na podłożu agarowym z krwinkami baraniami, natomiast aktywność lipolityczną szczepów oznaczano na podłożu stałym Baird-Parkera (BBL) z dodatkiem 5% żółtka kurzego. Redukcję tellurynu potasu oznaczano na podłożu Baird-Parkera (BBL). Zdolność szczepów do fermentacji mannitolu badano na podłożu Chapmana. Zbadano także zdolność wzrostu szczepów *S. aureus* na podłożu agarowym z fioletem krystalicznym oraz określono rozkład mannozy i rybozy na podłożu płynnym (10).

Określenie wrażliwości na wybrane antybiotyki przeprowadzono metodą dyfuzji krążkowej wg Kirby'ego i Bauera (cyt. 23). Metycylooporność (MR) określono na podłożu TSA (agar tryptozowo-sojowy) z 25 mg metycyliny na litr.

Wzrost pojedynczych, zróżnicowanych morfologicznie kolonii, jak i wzrost zlewny, świadczył o oporności szczepu na metycylinę. Szczepy MRSA dające wzrost policzalnych kolonii uznano za heterogennie odporne na metycylinę, a szczepy rosnące w sposób zlewny po 18 h inkubacji, uznano za homogenicznie odporne na metycylinę (20).

Szczepy poddano biotypowaniu na podstawie fermentacji mannitolu, mannozy i rybozy wg Umeki i wsp. (21).

Do wytwarzania w warunkach *in vitro* form L użyto penicyliny (Polfa-Tarchomin) w stężeniu 100 j.m./ml, ampicyliny (Bremer Pharma GmbH) – 100 µg/ml, amoksycyliny z kwasem klawulanowym (Pfizer) µ 100 µg/ml i streptomycyny (Polfa-Tarchomin) – 100 µg/ml. Do hodowli form L użyto agaru BHI (z wyciągiem mózgowo-sercowym) i bulionu BHI firmy Difco z dodatkiem 5% NaCl, 5% sacharozy, 10% surowicy końskiej i 0,5% ekstraktu drożdżowego przygotowanego wg Owensa (16). Za wynik dodatni przyjmowano dominujący lub jednolity wzrost kolonii typowych dla form L (15). W tym zakresie zbadano 20 szczepów.

Genomowe DNA wybranych 10 najbardziej zróżnicowanych biochemicznie szczepów izolowano z odwirowanej masy komórkowej wykorzystując zestaw Genomic DNA Prep Plus A&Biotechnology (Gdynia, Polska), stosując do lizy komórek enzym lizostafinę (Lysostaphin, Fluka nr kat. 62965). Izolację przeprowadzono zgodnie z procedurą podaną przez producenta.

PCR przeprowadzano w 50 µl objętości próby, w termocyklerze Perkin Elmer, model 2400. Dla każdego szczepu przeprowadzono po dwie reakcje PCR celem potwierdzenia powtarzalności wyniku. Jako najlepiej różnicujący został wybrany starter gfaseq4: 5'-cccactgtgtgttcata-3'. Warunki reakcji amplifikacji były następujące: wstępna denaturacja przez 2 min. w 93°C, 10 cykli – denaturacja przez 30 s w 93°C, przyłączanie startera przez 60 s w 33°C, wydłużanie nici DNA przez 60 s w 72°C. Następnie 30 cykli – denaturacja DNA przez 30 s w 93°C, dołączanie startera przez 30 s w 50°C, elongacja przez 40 s w 72°C i wydłużanie końcowe przez 2 min. w 72°C. Zawsze wykonywano kontrolę negatywną reakcji PCR. Próbkę kontroli negatywnej zawierała wszystkie składniki reakcji PCR z wyjątkiem matrycy DNA. Produkty reakcji rozdzielano elektroforetycznie w 8% żelu poliakrylamidowym (bufor TBE) zgodnie z ogólnie przyjętymi procedurami, przy napięciu 5 V/cm. Na żel наносzono od 5 do 20 µl mieszaniny reakcyjnej. Po elektroforezie żel wybarwiano przez 20 min. w wodzie zawierającej bromek etydyny o stężeniu 0,5 µg/ml.

## Wyniki i omówienie

W tab. 1 przedstawiono właściwości fizjologiczne szczepów *S. aureus* wyizolowanych z mleka. Wszystkie 143 szczepy wytwarzały koagulazę związaną – clumping factor. Prawie wszystkie szczepy (97,9%) fermentowały mannitol. 108 (75,5%) szczepów koagulowało plazmę ludzką, a 116 (81,1%) plazmę bydlęcą. Wystąpiły również różnice w wytwarzaniu fibrylizyny przez *S. aureus* w zależności od użytej plazmy ludzkiej lub bydlęcej, odpowiednio 53 szczepy (37,1%) i 62 (43,4%). Więcej szczepów wytwarzało hemolizynę β – 42 (29,4%) niż hemolizynę α – 22 (15,4%). Aktywność lipolityczną wykazały aż 124 szczepy (86,7%). Fosfatazę wytwarzało 95 szczepów (66,4%). Próba z fioletem krystalicznym dała pozytywne wyniki u 123 szczepów (86%). Dość duże różnice wystąpiły w fermentacji 2 cukrów, a mia-

Tab. 1. Charakterystyka fenotypowa 143 szczepów *S. aureus* izolowanych z mleka krów chorych na mastitis

Badana cecha	Liczba szczepów (%)
Wytwarzanie koagulazy z plazmą:	
– ludzką	108 (75,5)
– bydlęcą	166 (81,1)
Wytwarzanie fibrylizyny z plazmą:	
– ludzką	53 (37,1)
– bydlęcą	62 (43,4)
Hemolizyna:	
– α	22 (15,4)
– β	42 (29,4)
Redukcja telluru potasu	108 (75,5)
Wytwarzanie lipazy	124 (86,7)
Wytwarzanie CF	143 (100)
Wytwarzanie fosfatazy	95 (66,4)
Fermentacja mannitolu	140 (97,9)
Próba z fioletem krystalicznym	123 (86,0)
Fermentacja cukrów	
– mannoza	116 (81,7)
– ryboza	84 (58,7)

Tab. 2. Wyniki badań wrażliwości na antybiotyki 143 szczepów *S. aureus* wyizolowanych z mleka pochodzącego od krów chorych na mastitis

Antybiotyk	Liczba szczepów (%)		
	wrażliwych	średnio wrażliwych	opornych
Penicylina	24 (16,8)	41 (28,7)	78 (54,5)
Amoksycylina	96 (67,1)	39 (27,3)	8 (5,6)
Cefaleksyna	112 (78,3)	13 (9,1)	18 (12,6)
Gentamycyna	52 (36,4)	56 (39,2)	35 (24,5)
Linkomycyna	62 (43,3)	38 (26,6)	43 (30,1)
Enrofloksacyna	32 (22,4)	61 (42,6)	50 (35,0)
Erytromycyna	67 (46,8)	44 (30,8)	32 (22,4)
Bacytracyna	48 (33,6)	22 (15,4)	73 (51,0)
Tetracyklina	64 (44,7)	23 (16,1)	56 (39,2)

nowicie mannozę rozkładało 116 szczepów (81,7%), a rybozę 84 szczepy (58,7%).

W wyniku biotypowania największą liczbę szczepów – 84 (58,7%), zakwalifikowano do biotypu IV, do którego należą szczepy wykazujące fermentację mannitolu, mannozy i rybozy. Najmniej szczepów zakwalifikowano do biotypu II – 3 (2,1%), do którego zalicza się szczepy fermentujące mannozę, a nie fermentujące mannitolu i rybozy. Do biotypu I, w którym znajdują się szczepy fermentujące mannitol, a nie fermentujące mannozy i rybozy, zakwalifikowano 27 szczepów (18,9%), a do biotypu III, do którego należą szczepy fermentujące mannitol i mannozę, a nie fermentujące rybozy – 29 (20,3%).

Wrażliwość szczepów *S. aureus* na wybrane antybiotyki przedstawiono w tab. 2.

Antybiotykiem najbardziej skutecznym w stosunku do badanych szczepów okazała się cefaleksyna – 112 szcze-



Tab. 3. Liczba szczepów *S. aureus* wytwarzających formy L nieodwracalne i odwracalne spośród 20 zbadanych, w zależności od rodzaju antybiotyku

Penicylina		Ampicylina		Amoksylicyna z kwasem klawulanowym	
Formy nieodwracalne	Formy odwracalne	Formy nieodwracalne	Formy odwracalne	Formy nieodwracalne	Formy odwracalne
5	3	11	3	4	10

Tab. 4. Analiza wyróżnionych metodą PCR – fingerprinting profili DNA 10 szczepów *S. aureus*

Numer profilu					
1	2	3	4	5	6
Liczba przynależnych szczepów do poszczególnych profili					
2	2	2	1	2	1
Liczba prążków DNA w profilu					
5	2	3	4	3	6

pów wrażliwych (78,3%). Najwięcej opornych szczepów było na penicylinę – 78 szczepów (54,5%). Wysoka oporność wystąpiła także na bacytracynę – 73 szczepów oporne (51,0%).

Badanie w kierunku metycylinyoporności wykazało obecność szczepów metycylinyopornych (MRSA) i metycylinowrażliwych (MSSA). Stwierdzono 7 szczepów MRSA homogenych (4,9%) i 6 szczepów MRSA heterogenych (4,2%). Jednak najwięcej szczepów, w liczbie 130, to szczepów MSSA (90,9%).

Wyhodowane formy L szczepów *S. aureus* w porównaniu z ich wegetatywnymi postaciami cechowały się zdecydowanie mniejszymi wymiarami kolonii. Przybierały charakterystyczny wygląd nieregularnego kształtu „jaja sadzonego”, wrosły w podłoże, były ziarniste, nierówne, ze zwartym, centralnie położonym rdzeniem. Niektóre szczepów *S. aureus* wytworzyły formy L odwracalne, które po przepasażowaniu na agar wzbogacony z dodatkiem 5% krwi baraniej, po 18 godzinach inkubacji w temp 37°C powracały do wyjściowych form wegetatywnych. Antybiotykiem indukującym powstawanie w większym stopniu liczbę nieodwracalnych form L szczepów *S. aureus* okazała się ampicylina, natomiast form odwracalnych – amoksylicyna z kwasem klawulanowym. Streptomycyna nie powodowała przejścia w formy L żadnego z badanych szczepów. Tabela 3 przedstawia liczbę szczepów *S. aureus* wytwarzających formy L nieodwracalne i odwracalne, w zależności od rodzaju antybiotyku.

W wyniku reakcji amplifikacji otrzymano bardzo zróżnicowane profile amplifikacyjne. Pomimo że szczepów pochodziły z tego samego źródła, czyli z mleka krów chorych na *mastitis*, dały różne wzory elektroforetyczne. 10 zbadanych szczepów *S. aureus* reprezentowało 6 profili amplifikacyjnych, a stopień struktury profilu wynosił odpowiednio 5, 2, 3, 4, 3 i 6 prążków DNA. Kwalifikację poszczególnych szczepów do danego profilu przedstawia tab. 4.

Prowadzone od szeregu lat badania nad zmiennością gronkowców wyrażoną, między innymi, szerokim spektrum produkowanych toksyn, enzymów i innych czyn-

ników niszczących komórki gospodarza, pozwoliły poznać czynniki warunkujące ich zdolność do wywoływania chorób. W opinii wielu autorów, czynniki związane z wirulencją *S. aureus* to: wytwarzanie koagulazy, dezoksyrybonukleazy, hemolizyn, hialuronidazy, eksfoliatyny, fosfatazy, lipazy, fibrynolizyny, enzymów proteolitycznych, białka A i produkcja toksyn (23, 24).

W niniejszych badaniach uwzględniono 6 czynników związanych z chorobotwórczością *S. aureus*: wytwarzanie koagulazy wolnej i związanej, fibrynolizyny, hemolizyn, lipazy i fosfatazy. Otrzymane wyniki korelują z wynikami badań innych autorów (1, 13, 21, 24).

Uwzględniając fakt, że szczepów *S. aureus* różnią się pewnymi właściwościami, można podzielić te drobnoustroje na biotypy, przystosowane do poszczególnych gospodarzy. Badane szczepów *S. aureus* poddano biotypowaniu według Umeki (21). Fakt, że najwięcej szczepów wyizolowanych z przypadków *mastitis* zakwalifikowano do biotypu IV, wskazuje na to, iż do biotypu IV przynależą szczepów o najwyższej chorobotwórczości. Potwierdza to wykazana przez autorów analiza powiązań między biotypami *S. aureus* a czynnikami decydującymi o chorobotwórczości tych bakterii (8).

Badania własne nad wpływem wybranych antybiotyków na wytwarzanie form L, korelują z wynikami badań innych autorów (15, 16). Wykazano podobnie jak i w badaniach Owensa (16), że szczepów *S. aureus* przechodziły w formy L, tylko i wyłącznie w wyniku kontaktu z antybiotykiem  $\beta$ -laktamowym. Po przepasażowaniu form L odwracalnych na agar krwawy, obserwowano wzrost form wegetatywnych *S. aureus*. Także formy L nieodwracalne, kilkakrotnie zawieszane w bulionie dla form L i przesiewane na agar dla form L, wykazywały na agarze krwawym rewersję do form wegetatywnych. Wytwarzanie form L może być przyczyną niepowodzeń w terapii zakażeń gronkowcowych. Mimo ustąpienia objawów klinicznych po antybiotykoterapii, po pewnym czasie dochodzi do nawrotu choroby i w badaniu laboratoryjnym ponownie są izolowane *S. aureus*, które przeszły z form L do form wegetatywnych (15).

Wyniki badań wielu autorów (6, 18, 23) wskazują na wysoką oporność szczepów *S. aureus* na antybiotyki stosowane w terapii zapaleń gruczołu mlekowego. W badaniach własnych otrzymano podobne wyniki. Należy podkreślić wysoki odsetek szczepów *S. aureus* opornych na penicylinę, aż 54% badanych szczepów pochodzących z mleka krów chorych na *mastitis* było opornych. Wysoką oporność szczepów *S. aureus* na penicylinę wykazało szereg autorów: 53,8% szczepów opornych na penicylinę wśród 103 zbadanych (18), 27,4% opornych z 51 zbadanych (23) oraz 40,3% wśród 206 zbadanych (6). Najskuteczniejszym antybiotykiem w badaniach okazała się cefaleksyna – 78,3% szczepów wrażliwych, ale znacznie wyższą wrażliwość na cefalosporyny szczepów *S. aureus* wyizolowanych z mleka krów chorych na *mastitis* wykazali inni autorzy (6, 18), którzy wśród przebadanych 103 i 206 szczepów *S. aureus* stwierdzili 100% wrażliwość na ten antybiotyk.



Wyniki badań dotyczące metycylinooporności wskazują na obecność MRSA wśród szczepów *S. aureus* wyizolowanych z mleka krów chorych na *mastitis* – 9,1%. Rozbieżne są wyniki badań innych autorów: od braku stwierdzenia MRSA wśród 103 szczepów (18) oraz wśród 172 szczepów (9), do stwierdzenia 3,9% szczepów MRSA w badaniach 51 szczepów *S. aureus* (19), aż do wyizolowania 68 szczepów MRSA z 20 stad krów mlecznych (3).

Powszechnie stosowane metody typowania drobnoustrojów opierają się głównie na badaniu cech morfologicznych, serologicznych i biochemicznych. Są to jednak niepełne metody ich identyfikacji. Jedynie analiza materiału genetycznego jednoznacznie określa zbiór cech charakterystycznych dla danego gatunku bakterii. Perspektywną techniką szybkiego subtypowania jest analiza genomowego DNA metodą – fingerprinting. Celem metod zastosowanych w niniejszych badaniach molekularnych było określenie zróżnicowania genomowego wśród szczepów *S. aureus* izolowanych z mleka krów chorych na *mastitis*. W wyniku reakcji amplifikacji otrzymano, pomimo takiego samego źródła pochodzenia izolatów, zróżnicowane profile amplifikacyjne, co wskazuje na znaczne zróżnicowanie na poziomie genomowym szczepów *S. aureus*.

Wyniki badań innych autorów wskazują na przydatność techniki PCR – fingerprinting w subtypowaniu gronkowców. Przeprowadzono genotypowanie metodą PCR – fingerprinting 71 szczepów *S. aureus* wyizolowanych z wymienia krów pochodzących ze stada ze stwierdzonym zakażeniem gronkowcowym (12). Otrzymane profile amplifikacyjne wykazały, że za zakażenia w stadzie odpowiedzialny był ten sam szczep *S. aureus*. Podobne wyniki otrzymali autorzy, którzy tą samą techniką PCR – fingerprinting wykazali, iż *mastitis* stwierdzone w 7 stadach krów wywołane zostało jednym dominującym szczepem *S. aureus*, co potwierdza teorię, że zapalenie wymienia na tle gronkowcowym jest wysoce zaraźliwe (11). Metodą tą udowodniono, że uporczywość infekcji wymienia krów spowodowanych przez *S. aureus* wynika z trudności eliminacji zakaźnego szczepu, który wywołał *mastitis* (14). Dowodem na to było stwierdzenie szczepów o takim samym genotypie wyizolowanych z 20 ćwiartek z ostrym zapaleniem wymienia na początku choroby i potem w 3. tygodniu po leczeniu.

Biotypowanie szczepów *S. aureus* na podstawie fermentacji mannitolu, mannozy i rybozy ma praktyczne znaczenie w określaniu potencjalnej chorobotwórczości szczepów zakażających gruczoł mlekowy bydła. Stwierdzono zdolność do przechodzenia pod wpływem antybiotyków  $\beta$ -laktamowych kolonii szczepów *S. aureus* w formy L, co może być jedną z przyczyn niepowodzeń w antybiotykoterapii gruczołu mlekowego krów. Po zastosowaniu do typowania molekularnego metody DNA-fingerprinting stwierdzono występowanie różnic w profilu DNA szczepów *S. aureus*, pomimo pochodzenia ich z tego samego źródła.

## Piśmiennictwo

1. Akineden O., Annemuller C., Hassan A. A., Lammler C., Woiter W., Zschock M.: Toxin genes and other characteristics of *Staphylococcus aureus* isolates from milk of cows with mastitis. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 2001, 8, 959-964.
2. Biberstein E. L., Jang S. S., Hirsh D. C.: Species distribution of coagulase-positive staphylococci in animals. *J. Clin. Microbiol.* 1984, 19, 610-615.
3. Devriese L. A., Hommez J.: Epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in dairy herds. *Res. Vet. Sci.* 1975, 19, 23-27.
4. Devriese L. A., Oeding P.: Characteristics of *Staphylococcus aureus* strains isolated from different animal species. *Res. Vet. Sci.* 1976, 21, 384-391.
5. Fueyo J. M., Martin M. C., Gonzalez-Hevia M. A., Mendoza M. C.: Enterotoxin production and DNA fingerprinting in *Staphylococcus aureus* isolated from human and food sample. Relations between genetic types and enterotoxins. *Int. J. Food. Microbiol.* 2001, 20, 139-145.
6. Gentilini E., Denamiel G., Llorente P., Godaly S., Reuelto M., DeGregorio O.: Antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Argentina. *J. Dairy Sci.* 2000, 83, 1224-1227.
7. Grajewska P., Artecki E.: Instytut Weterynarii. Diagnostyka laboratoryjna mastitis. CODKW, Puławy 1978.
8. Jakubczak A., Sachanowicz J., Piechota M., Czerni M., Kasztelan R., Mieczkowski J.: Ocena fenotypowa szczepów *Staphylococcus aureus* izolowanych od ludzi, zwierząt i żywności. *Mat. XI Kongresu PTNW, Annales UMCS* 2000, 55, 219.
9. Kamata S., Matsunaga T., Uchida K., Uchida K.: Detection of causative bacteria for bovine mastitis and their susceptibility to beta-lactam antibacterial agents. *Jpn J. Antibiot.* 1990, 43, 1698-1712.
10. Kędzia W.: Diagnostyka mikrobiologiczna w medycynie. PZWL, Warszawa 1990.
11. Lam T. J., Lipman L. J., Schukken Y. H., Gaastra W., Brand A.: Epidemiological characteristics of bovine clinical mastitis caused by *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* studied by DNA fingerprinting. *Am. J. Vet. Res.* 1996, 57, 39-42.
12. Lipman L. J., de Nijis A., Schukken Y. H., Gaastra W.: Genotyping by PCR of *Staphylococcus aureus* strains, isolated from mammary gland of cows. *Vet. Microbiol.* 1996, 48, 51-55.
13. Matsunaga T., Kamata S., Kakiuchi N., Uchida K.: Characteristics of *Staphylococcus aureus* isolated from peracute, acute and chronic bovine mastitis. *J. Vet. Med. Sci.* 1993, 55, 297-300.
14. Myllys V., Ridell J., Bjorkroth J., Biese I., Pyorala S.: Persistence in bovine mastitis of *Staphylococcus aureus* clone as assessed by random amplified polymorphic DNA analysis, ribotyping and biotyping. *Vet. Microbiol.* 1997, 57, 245-251.
15. Owens W. E.: Isolation of *Staphylococcus aureus* L forms from experimentally induced bovine mastitis. *J. Clin. Microbiol.* 1987, 25, 1956-1961.
16. Owens W. E.: Evaluation of various antibiotics for induction of L forms from *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine mastitis. *J. Clin. Microbiol.* 1988, 26, 2187-2190.
17. Park J., Park C.: Production of staphylokinase in *Staphylococcus hyicus* subsp. *hyicus* strains of swine, poultry, and bovine origin. *Korean J. Vet. Res.* 1997, 37, 359-365.
18. Puig de Centorbi O. N., de Cuadrado A. M., Alcaraz L. E., Laciari A. L., de Milan M. C.: Prevalence of *Staphylococcus aureus* isolated from subclinical bovine mastitis in dairies of the city of San Luis. *Rev. Argent. Microbiol.* 1992, 24, 73-80.
19. Thornsberry C., Marler J. K., Watts J. L., Yancey R. J.: Activity of pirlimycin against pathogens from cows with mastitis and recommendations for disk diffusion tests. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1993, 37, 1122-1126.
20. Trzeciński K., Boruc J., Kowalik Z., Tyski S., Zareba T., Hryniewicz W.: Ocena wiarygodności metod oznaczania oporności szczepów *Staphylococcus aureus* na metycylinę. *Med. Dośw. Mikrobiol.* 1994, 46, 113-131.
21. Umeki F., Otsuka G., Seki M., Yoshida M., Yosai A., Takeishi M.: Evaluation of acid production from carbohydrates and pathogenicity of *Staphylococcus aureus* in bovine quarter milk. *Milchwissenschaft* 1992, 48, 22-25.
22. Virella G.: Mikrobiologia i choroby zakaźne. Wydawnictwo Wrocław. Wyd. I. 2000.
23. Yoshimura H., Ishimaru M., Kojima A.: Minimum inhibitory concentrations of 20 antimicrobial agents against *Staphylococcus aureus* isolated from bovine intramammary infections in Japan. *J. Vet. Med. B. Infect. Dis. Vet. Public Health* 2002, 49, 457-460.
24. Zaremba M. L., Borowski J.: Podstawy mikrobiologii lekarskiej. PZWL, Warszawa 1994.
25. Zeccconi A., Vicenzoni G., Piccinini R., Ben C. D., Bronzo V.: Phenotypic and genotypic characteristics of *Staphylococcus aureus* strains isolated from clinical and subclinical mastitis. *BCVA, Edinburgh* 1996, 1-4.