

# Wybrane cechy chorobotwórczości oraz zróżnicowanie genomowe szczepów *Staphylococcus aureus* wyizolowanych z mleka krów z zapaleniem gruczołu mlekowego w regionie północno-wschodniej Polski

MAŁGORZATA DZIEKIEWICZ-MRUGASIEWICZ, MAGDALENA RZEWUSKA\*,  
ILONA STEFAŃSKA\*, ANTONI JAKUBCZAK\*\*

Zakład Diagnostyki Laboratoryjnej i Klinicznej Katedry Nauk Klinicznych Wydziału Medycyny Weterynaryjnej SGGW,  
ul. Nowoursynowska 159c, 02-787 Warszawa

\*Zakład Bakteriologii i Biologii Molekularnej Katedry Nauk Przedklinicznych Wydziału Medycyny Weterynaryjnej SGGW,  
ul. Ciszewskiego 8, 02-786 Warszawa

\*\*Katedra Mikrobiologii AP, ul. Prusa 12, 08-110 Siedlce

Dziekiewicz-Mrugasiewicz M., Rzewuska M., Stefańska I., Jakubczak A.

## Select pathogenic characteristics as well as the genotypic diversity of *Staphylococcus aureus* strains isolated from milk of cows with mastitis in the north-east region of Poland

### Summary

The aim of this study was the characterization of *Staphylococcus aureus* strains isolated from milk of cows with mastitis in the north-east region of Poland. Genotyping of 45 isolates by ADSRRS-fingerprinting showed nine different patterns of bands. Genotype D was predominant and 29 *S. aureus* strains (65.5%) were classified to this genotype. These strains of genotype D had strong pathogenicity, because in the first year of the study only 14.29% isolates belonged to D and in the next year 73.64% isolates. The strains of the predominant genotype showed stronger pathogenic properties than the strains of other genotypes. The majority of them showed a significant adhesion to the epithelial cells of the mammary gland, and the strong ability to produce slime and to form biofilm.

**Key words:** *Staphylococcus aureus*, mastitis, ADSRRS-fingerprinting, adhesion, slime, biofilm

*Staphylococcus aureus* jest ważnym czynnikiem etiologicznym zapalenia gruczołu mlekowego u krów mlecznych (19). Jego znaczenie systematycznie wzrasta, czego wyrazem jest trzykrotny wzrost zakażeń tym drobnoustrojem w ostatnim dziesięcioleciu w Polsce (21). Chorobotwórczość *S. aureus* wynika ze zdolności bakterii do adhezji do komórek nabłonka gruczołu mlekowego (11), wytwarzania enzymów i toksyn oraz zdolności przetrwania w gruczole mlekowym. Przyleganie bakterii do komórek nabłonkowych, które ułatwia obecność gronkowcowych białek powierzchniowych i egzopolisacharydów, prowadzi do kolonizacji tkanek gruczołu mlekowego i jest uznawane za pierwszy etap zakażenia (1, 4). Wytwarzanie przez drobnoustroje enzymów, takich jak: koagulaza, fibrynolizyna, hialuronidaza, lipaza oraz toksyn, głównie hemolizyn i leukocydyn, zwiększa inwazyjność *S. aureus* i ułatwia penetrację do tkanki gruczołowej (7). Tworzenie otorbionych ropni, zdolność przeżywania w makrofagach (12) oraz tworzenie biofilmu powoduje, że drobnoustroje są mniej

podatne na fagocytozę i działanie antybakteryjne leków (9, 28). Skutkuje to również trudnymi w leczeniu i zwalczaniu zapaleniami gruczołu mlekowego. W zapobieganiu występowania nowych zakażeń należy uwzględnić programy zwalczania *mastitis* w stadzie, jak również dokładne poznanie czynnika etiologicznego.

Ze względu na dużą zmienność fenotypową drobnoustrojów coraz częściej stosowane jest różnicowanie szczepów na poziomie molekularnym. Jedną z metod szybkiego różnicowania, nawet bardzo blisko spokrewnionych szczepów, jest analiza polegająca na amplifikacji fragmentów DNA otaczających rzadkie miejsca restrykcyjne (ADSRRS – Amplification of DNA Fragments Surrounding Rare Restriction Sites) (13, 14, 22).

Celem badań było określenie występowania wybranych właściwości chorobotwórczych i analiza genomów szczepów *S. aureus* wyizolowanych z mleka krów z zapaleniem gruczołu mlekowego. Szczególną uwagę zwrócono na zależność między przynależnością szczepów do danego genotypu a ich cechami chorobotwórczości,

takimi jak zdolność do adhezji oraz tworzenie śluzu i biofilmu.

### Materiał i metody

Materiał do badań stanowiło 45 szczepów *S. aureus* wyizolowanych z mleka krów z zapaleniem gruczołu mlekowego w latach 2002-2003. Próbkę mleka pochodziły z gospodarstw województwa podlaskiego, z powiatów: łomżyńskiego, kolneńskiego, zambrowskiego, grajewskiego, monieckiego i Wysokie Mazowieckie. Izolację i identyfikację szczepów wykonano według metodyki opisaną przez Malinowskiego i Kłossowską (20).

**Cechy chorobotwórczości.** Zdolność szczepów *S. aureus* do adhezji do komórek nabłonka gruczołu mlekowego określono według metody opracowanej przez Frosta (11). Zdolność do wytwarzania śluzu badano na podłożu z czerwieni Congo (CRA – Congo Red Agar) zgodnie z zaleceniami Freemana i wsp. (10). Natomiast zdolność do tworzenia biofilmu badano metodą płytkową według Vasudevana i wsp. (28). Do wykrywania penicyliny wykorzystano  $\beta$ -laktamazowe patyczki identyfikacyjne – BR66A (Oxoid Ltd), test wykonano zgodnie z procedurą zalecaną przez producenta. Wytwarzanie lipazy badano na podłożu Baird-Parkera (BBL) z dodatkiem 5% żółtka jaja kurzego. Wyniki odczytywano po 48 godz. inkubacji w 37°C.

**Analiza genotypowa metodą ADSRRS-fingerprinting.** Genomowy DNA izolowano z komórek 24-godzinnych hodowli poszczególnych szczepów *S. aureus* uzyskanych na podłożu agarowym. Używano zestawu Genomic DNA Prep Plus (A&A Biotechnology, Polska), zgodnie z procedurą zalecaną przez producenta.

Trawienie enzymatyczne genomowego DNA przeprowadzono przy użyciu 2 enzymów restrykcyjnych: XbaI (10 U/ $\mu$ l) i BglII (10 U/ $\mu$ l) (Sigma-Aldrich, Niemcy). Reakcja trawienia przebiegała przez 2-3 godziny w temperaturze 37°C. Następnie DNA wytrącono z mieszaniny reakcyjnej stosując precipitację etanolem.

Strawiony DNA poddano reakcji ligacji z dwoma adaptorami: krótkim adaptorem dla enzymu XbaI składającym się z dwóch oligonukleotydów: 5'-CTAGGTCGACGTT-3'; 3'-CAGCTGCAACCCTACTTCC-5' i adaptorem długim dla enzymu BglII: 5'-GATCCGTCGACAACGGCGTTCCTTCGTCTACCATCC-3'; 3'-GCAGCTGTTGCCGCAAGGAAGCAGATGGTAGG-5' (DNA-Gdańsk, Polska).

Strawiony DNA po precipitacji rozpuszczano w 20  $\mu$ l mieszaniny ligacyjnej, która składała się z: 2  $\mu$ l buforu do ligacji (10  $\times$ ), 1  $\mu$ l (20 pmol) każdego z adaptorów, 0,5  $\mu$ l T4 ligazy DNA (Epicentre, USA), 2  $\mu$ l 50% roztworu PEG 4000 i 13,5  $\mu$ l wody. Reakcja ligacji przebiegała w 16°C przez 2 godz. Następnie dodano 80  $\mu$ l buforu TE i produkty reakcji ligacji precipitowano alkoholem etylowym.

Cząsteczki DNA zligowane z adaptorami stanowiły matrycowy materiał do reakcji PCR. Mieszanina reakcyjna zawierała: 2  $\mu$ l matrycowego DNA, 5  $\mu$ l buforu do polimerazy Pwo (10  $\times$ ), 5  $\mu$ l mieszaniny dNTPs (po 2 mM każdego), 1  $\mu$ l (1 U) polimerazy Pwo (DNA-Gdańsk II, Polska), po 50 pM każdego ze starterów: XbaI – krótki starter (5'-CCTT-CATCCACCAACGTCGAC-3') i BglII – długi starter (5'-GGATGGTAGACGAAGGAACGC-3') oraz wodę do objętości 50  $\mu$ l. Reakcja PCR była przeprowadzana w termocyklerze GENEAMP PCR System 2400 (Perkin-Elmer, USA). Zastosowany został następujący profil temperaturowy: wstępna denaturacja w temperaturze 94°C przez 5 min., wypełnia-

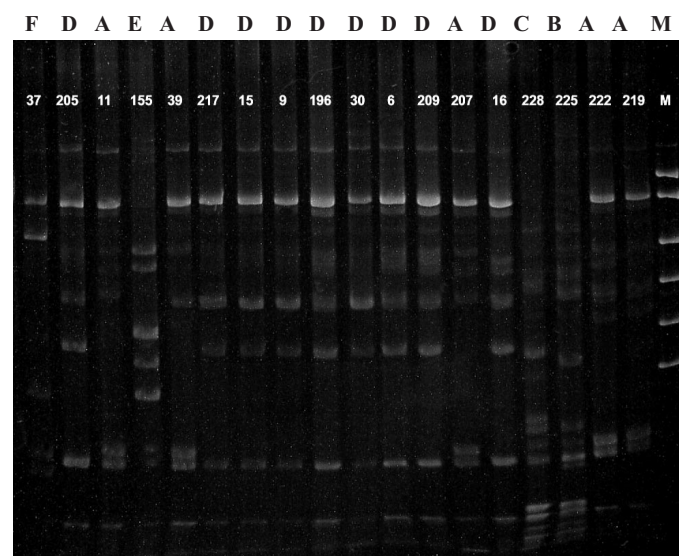
nie końców fragmentów DNA w temperaturze 72°C przez 5 min., denaturacja w temperaturze 94°C przez 5 min., a następnie 22 cykle: 94°C przez 30 s, 62°C przez 30 s, 72°C przez 90 s. Końcowy etap wydłużania przeprowadzono w temperaturze 72°C przez 5 min. Produkty PCR rozdzielano elektroforetycznie w 6% żelu poliakrylamidowym w buforze TBE, a następnie wybarwiano bromkiem etydyny (0,5  $\mu$ g/ml) przez 10-15 min. Wynik rozdziału oceniano w świetle UV i dokumentowano wykonując fotografie.

Do analizy statystycznej zastosowano pakiet statystyczny SPSS 12.0. Do analizy wytwarzania śluzu, biofilmu, lipazy i  $\beta$ -laktamazy zastosowano nieparametryczne testy zgodności Chi-kwadrat Pearsona, natomiast do oznaczenia zdolności do adhezji do komórek nabłonkowych gruczołu mlekowego wykorzystano jednoczynnikową analizę wariancji (UNI-ANOVA).

### Wyniki i omówienie

W wyniku badania 45 szczepów *S. aureus* metodą ADSRRS-fingerprinting otrzymano różne profile amplifikacyjne, na które składało się od 9 do 13 fragmentów DNA o wielkości 200-1600 par zasad. Dane te przedstawiono na ryc. 1. Na podstawie analizy uzyskanych rezultatów wyróżniono 9 grup genotypowych szczepów, które oznaczono literami od A do I. Najwięcej szczepów *S. aureus* zaliczono do genotypu D (29 izolatów). Do pozostałych genotypów zakwalifikowano: 5 szczepów – genotyp A, 4 szczepy – genotyp E, 2 szczepy – genotyp C oraz po jednym szczepie do genotypów B, F, G, H, I.

Analiza pochodzenia szczepów *S. aureus* należących do poszczególnych genotypów wykazała, że szczepy grupy D dominowały w powiatach: zambrowskim, grajewskim, Wysokie Mazowieckie, kolneńskim i łomżyńskim. Jedynie w powiecie monieckim występowały szczepy zaliczone do genotypu E. Najbardziej zróżnicowane genotypowo szczepy wyizolowano w powiecie łomżyńskim. Wśród nich wyodrębniono 8 genotypów, tj. A, B, C, D, E, F, G, H. Do dominującej grupy zali-



Ryc. 1. Profile ADSRRS-fingerprinting uzyskane dla wybranych szczepów *S. aureus* (M – marker, cyfry oznaczają badane szczepy; litery oznaczają przynależność do genotypu)

Tab. 1. Cechy fenotypowe szczepów *S. aureus* należących do genotypu D oraz szczepów należących do pozostałych genotypów

Genotyp	n	Śluz *		Biofilm NS		Lipaza NS		β-laktamaza NS		Adhezja **	
		+	-	+	-	+	-	+	-	średnia	błąd
D	29	16 55,2%	13 44,8%	20 69,0%	9 31,0%	12 58,6%	17 41,4%	12 41,4%	17 58,6%	10,46	± 0,50
Inne	16	3 18,8%	13 81,3%	9 56,2%	7 43,8%	8 50,0%	8 50,0%	3 18,8%	13 81,3%	7,63	± 0,67

Objaśnienia: (-) – wynik ujemny, brak badanej właściwości; (+) – wynik dodatni, występowanie badanej właściwości; \* –  $p \leq 0,05$ ; \*\* –  $p \leq 0,01$ ; NS – nieistotnie statystycznie

czono 13 szczepów *S. aureus* (50%). Do pozostałych zaliczono, odpowiednio: 5 szczepów (genotyp A), 2 szczepy (genotyp C i E) i po 1 szczepie do genotypów B, F, G, H. W powiecie kolneńskim 85,71% przebadanych szczepów zaliczono do genotypu D. Stwierdzono, że odsetek izolacji szczepów dominującego genotypu systematycznie wzrastał. W pierwszym roku badania szczepy genotypu D stanowiły 14,29%, w drugim roku badania aż 73,64% wszystkich izolatów *S. aureus*.

Porównanie właściwości fenotypowych szczepów genotypu D oraz szczepów należących do innych genotypów (tab. 1) wykazało, że szczepy należące do genotypu D mają więcej cech determinujących chorobotwórczość gronkowców niż szczepy należące do pozostałych genotypów. Wśród szczepów dominującego genotypu 16 (55,2%) miało zdolność do wytwarzania śluzu, a 20 z nich (69%) tworzyło biofilm. Wśród szczepów zaliczonych do pozostałych 8 genotypów śluz wytwarzało 18,8%, a biofilm 56,2% szczepów. Zdecydowanie silniejszą adhezję do komórek nabłonka gruczołu mlekowego wykazywały również szczepy dominującego genotypu, wśród których średnia liczba komórek bakteryjnych przylegających do pojedynczej komórki nabłonkowej wynosiła ponad 10. Podobnie, większy odsetek szczepów genotypu D wykazywał zdolności do wytwarzania lipazy (58,6%) i β-laktamazy (41,4%).

Do różnicowania szczepów *S. aureus* izolowanych z mleka krów z powodzeniem stosowano różne metody biologii molekularnej, takie jak: analiza profili plazmidowych (16), analiza restrykcyjna plazmidowego (5) lub chromosomalnego DNA (REA) (23), rybotypowanie (5), analiza polimorfizmu genów, głównie genu *spa* i genu *coa* (16, 25) oraz różne odmiany PCR (15, 18, 23, 26). Metodą, która doskonale sprawdziła się w różnicowaniu gronkowców, jest PFGE (16, 29), uznawana ze względu na dużą siłę dyskryminacyjną za „złoty standard”. Jednak z uwagi na duże koszty i częste trudności techniczne metoda ta nie jest wykorzystywana w rutynowej diagnostyce klinicznej. Zastosowana w badaniach własnych metoda ADSRRS-fingerprinting cechuje się wysokim potencjałem różnicującym, a wybiórcza amplifikacja, będąca wynikiem zjawiska supresji reakcji PCR prowadzi do powstawania niewielkiej liczby produktów, co pozwala na łatwą interpretację wyników (13). Dotychczas metodę ADSRRS-fingerprinting z powodzeniem stosowano do różnicowania wyizolowanych od ludzi szczepów: *Escherichia coli*, *Klebsiella oxytoca* i *K. pneumoniae* (22), *Serratia marcescens* i *Enterococcus faecium* (13, 14) oraz *S. aureus* (3). Ostatnio metodę ADSRRS-fingerprinting zastosowano również do oceny zmienności genomowej szczepów *Corynebacterium pseudotuberculosis* wyizolowanych od kóz (27).

Wykorzystując tę metodę stwierdzono występowanie w badanym regionie szczepów *S. aureus* różniących się genomami, a także dominację szczepów zaliczonych do genotypu D, rozprzestrzeniających się wśród zwierząt w wielu powiatach województwa podlaskiego. Wielu autorów podkreśla fakt, że chociaż w badanych regionach izolowane są różne genotypowo szczepy *S. aureus* (5, 29), to nowe zakażenia gruczołu mlekowego na ogół wywołują szczepy dominującego genotypu, co wykazano również w badaniach własnych. Lipman i wsp. (18) przy wykorzystaniu techniki PCR-fingerprinting wykazali, że w badanym stadzie za nowe zakażenia u krów odpowiedzialne były szczepy należące do jednego genotypu. Również badania Lama i wsp. (15) wykazały, że *mastitis* w 7 badanych stadach, wywoływał jeden dominujący szczep *S. aureus*. Raimundo i wsp. (25) izolowali szczepy *S. aureus* o tym samym genotypie z próbek mleka pochodzących od krów z odległych ferm w Australii, między którymi nie było żadnego kontaktu. W innych badaniach Zadoks i wsp. (29) wykazali, że za ostre przypadki *mastitis*, które wystąpiły równocześnie u kilku krów w stadzie, odpowiadały szczepy *S. aureus* należące do dominującego w tym regionie genotypu. Obserwacje te świadczą, że zakażenia wywołane przez gronkowca złocistego są zaraźliwe, a dominujące szczepy szybko rozprzestrzeniają się w stadzie. Potwierdzają to również analizy wykonane na przełomie 2002 i 2003 r., w których określano występowanie szczepów *S. aureus* u krów w badanym regionie. W ich wyniku stwierdzono ponad trzykrotny wzrost odsetka izolacji *S. aureus* (8). Sachanowicz i wsp. (26), poddali genotypowaniu metodą PCR-fingerprinting 10 szczepów *S. aureus* izolowanych z mleka krów w regionie łomżyńskim w 2000 r. W wyniku otrzymali 6 odmiennych wzorów produktów amplifikacji. Żadnego genotypu nie można było uznać za dominujący. Może to sugerować, że w przeciągu 2 lat pojawiły się w regionie szczepy gronkowcowe bardziej zjadliwe i inwazyjne, które szybko rozprzestrzeniają się wśród krów. Według danych piśmiennictwa (29), szczepy dominujących genotypów mają więcej cech determinujących chorobotwórczość niż pozostałe. Potwierdzają ten fakt również badania własne. Porównanie zależności pomiędzy przynależnością do danego genotypu a występowaniem określonych cech chorobotwórczych

ności wykazało, że zjadliwość szczepów należących do genotypu D była większa niż szczepów należących do pozostałych genotypów. Szczepy genotypu D zdecydowanie silniej przylegały do komórek nabłonka gruczołu mlekowego niż szczepy innych grup oraz większość z nich (55,2%) wytwarzała śluz i tworzyła biofilm (69%). Adhezja do komórek nabłonka gruczołu mlekowego jest uznawana za pierwszy etap zakażenia, natomiast wytwarzanie egzopolisacharydów zwiększa zdolność do przylegania do komórek gospodarza (1, 4). W badaniach Baselgi i wsp. (4) wykazano, że szczepy *S. aureus* wytwarzające śluz częściej wywoływały zakażenie wewnątrzwymieniowe u owiec niż szczepy nie wytwarzające śluzu. Szczepy te były mniej wrażliwe na mechanizmy obronne gospodarza (17), ponieważ otoczka śluzowa maskuje antygeny występujące w ścianie komórkowej bakterii (6). Właściwości te stwierdzono u szczepów z grupy D, co może tłumaczyć jego szybkie rozprzestrzenianie się w badanym regionie. Dodatkowo szczepy dominującego genotypu w większym odsetku tworzyły biofilm i wytwarzały  $\beta$ -laktamazę, co sugeruje, że komórki bakteryjne były chronione przed działaniem mechanizmów obronnych gospodarza oraz wyjaśnia ich mniejszą wrażliwość na działanie antybiotyków (2). Dowodem może być fakt, że szczepy tego samego genotypu były izolowane na początku choroby i po kilkutygodniowym leczeniu (24). Fox i wsp. (9) stwierdzili, że szczepy *S. aureus* wyizolowane z mleka krów miały większą zdolność do tworzenia biofilmu niż szczepy wyizolowane ze skóry rąk dojarzy i przewodów sprzętu udojowego. Potwierdza to, że zdolność do tworzenia biofilmu jest ważnym czynnikiem chorobotwórczości gronkowców wywołujących *mastitis*, utrudniającym zwalczanie zakażeń w stadzie. Właściwość ta umożliwia przetrwanie drobnoustrojów w gruczole mlekowym i przyczynia się do powstawania zapaleń przewlekłych.

Podsumowując należy stwierdzić, że metoda ADSRRS-fingerprinting jest w dużym stopniu przydatna do różnicowania szczepów *S. aureus* izolowanych od krów oraz w dochodzeniu epidemiologicznym. Zaobserwowana zależność pomiędzy przynależnością do określonych grup genomowych a właściwościami chorobotwórczymi powinna być brana pod uwagę w opracowywaniu skutecznych programów zwalczania tych zakażeń gruczołu mlekowego u krów.

## Piśmiennictwo

- Aguilar B., Amorena B., Iturralde M.: Effect of slime on adherence of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine and ovine mastitis. *Vet. Microbiol.* 2001, 78, 183-190.
- Amorena B., Garcia E., Monzün M., Leiva J., Oteiza C., Pérez M., Alabart J. L., Hernández-Yago J.: Antibiotic susceptibility assay for *Staphylococcus aureus* in biofilms developed in vitro. *J. Antimicrobial Chem.* 1999, 44, 43-55.
- Barańska-Rybak W.: Amplification of DNA fragments surrounding rare restriction sites (ADSRRS-fingerprinting) for typing *Staphylococcus aureus* isolated from patients with recurrent furunculosis. ECCMID Meeting, Prague, Czech Republic, Poster 2004.
- Baselga R., Albizu I., De La Cruz M., Cacho E., Barberan M., Amorena B.: Phase variation of slime production in *Staphylococcus aureus*: implications in colonization and virulence. *Infect. Immun.* 1993, 61, 4857-4862.
- Buzzola F. R., Quelle L., Gomez M. I., Catalano M., Steele-Moore L., Berg D., Gentilini E., Denamiel G., Sordelli D. O.: Genotyping analysis of *Staphylococcus aureus* from milk of dairy cows with mastitis in Argentina. *Epidemiol. Infect.* 2001, 126, 445-452.
- Caputy C., Costerton J. W.: Immunological examination of glycocalyxes of *Staphylococcus aureus* strains Willey and Smith. *Current Microbiol.* 1984, 11, 297-302.
- Cifrian E., Guidry A. J., Bramley A. J., Norcross N. L., Bastida-Corcuera F. D., Marquardt W. W.: Effect of staphylococcal  $\beta$  toxin on the cytotoxicity, proliferation and adherence of *Staphylococcus aureus* to bovine mammary epithelial cells. *Vet. Microbiol.* 1996, 48, 187-198.
- Dziekiewicz-Mrugasiewicz M.: Występowanie i charakterystyka szczepów *Staphylococcus aureus* izolowanych z mleka krów w regionie północno-wschodniej Polski. Praca dokt. SGGW, Warszawa 2007.
- Fox L. K., Zadoks R. N., Gaskins C. T.: Biofilm production by *Staphylococcus aureus* associated with intramammary infection. *Vet. Microbiol.* 2005, 107, 295-299.
- Freeman D. J., Falkner F. R., Keane C. T.: New method for detecting slime production by coagulase negative staphylococci. *J. Clin. Pathol.* 1989, 42, 872-874.
- Frost A. J.: Selective adhesion of microorganisms to the ductular epithelium of bovine mammary gland. *Infect. Immun.* 1975, 12, 1154-1156.
- 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. Letters* 2000, 193, 57-62.
- Krawczyk B., Lewandowski K., Bronk M., Samet A., Myjak P., Kur J.: Evaluation of novel method based on amplification of DNA fragments surrounding rare restriction sites (ADSRRS-fingerprinting) for typing strains of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. *J. Microbiol. Methods.* 2003, 52, 341-351.
- Krawczyk B., Naumiuk L., Lewandowski K., Baraniak A., Gniadowski M., Samet A., Kur J.: Evaluation and comparison of random amplification of polymorphic DNA, pulsed-field gel electrophoresis and ADSRRS-fingerprinting for typing *Serratia marcescens* outbreaks. *FEMS* 2003, 38, 241-248.
- 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.
- Lange C., Cardoso M., Senczek D., Schwarz S.: Molecular subtyping of *Staphylococcus aureus* from cases bovine mastitis in Brazil. *Vet. Microbiol.* 1999, 67, 127-141.
- Lee J. C., Betley M. J., Hopkins C. A., Pérez N. E., Pier G. B.: Virulence studies, in mice, of transposon-induced mutants of *Staphylococcus aureus* differing in capsular size. *J. Infect. Dis.* 1987, 156, 935-939.
- Lipman L., Nijts de A., Lam T., Rost J., Dijk von L., Schukken Y., Gaastra W.: Genotyping by PCR, of *Staphylococcus aureus* strains, isolated from mammary gland of cows. *Vet. Microbiol.* 1996, 48, 51-55.
- Malinowski E.: Przyczyny, leczenie i zapobieganie mastitis u krów. *PIWet Puławy* 1997.
- Malinowski E., Kłosowska A.: Diagnostyka zakażeń i zapaleń wymienia. *PIWet Puławy* 2002.
- Malinowski E., Lassa H., Kłosowska A., Smulski S., Markiewicz H., Kaczmarowski M.: Etiological agents of dairy cows mastitis in western part of Poland. *Pol. J. Vet. Sci.* 2006, 9, 191-194.
- Masny A., Płucienniczak A.: Fingerprinting of bacterial genomes by amplification of DNA fragments surrounding rare restriction sites. *BioTechniques.* 2001, 13, 930-936.
- Matthews K. R., Jayarao B. M., Oliver S. P.: Plasmid pattern analysis of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mammary secretions. *J. Dairy Sci.* 1993, 75, 3318-3323.
- Myllys V., Ridell J., Björkroth J., Biese I., Pyörälä S.: Persistence in bovine mastitis of *Staphylococcus aureus* clones as assessed by random amplified polymorphic DNA analysis, ribotyping and biotyping. *Vet. Microbiol.* 1997, 57, 245-251.
- Raimundo O., Deighton M., Capstick J., Gerraty N.: Molecular typing of *Staphylococcus aureus* of bovine origin by polymorphisms of the coagulase gene. *Vet. Microbiol.* 1999, 66, 275-284.
- Sachanowicz J., Jakubczak A., Kleczkowski M.: Różnicowanie szczepów *Staphylococcus aureus* metodą PCR-fingerprinting. *Medycyna Wet.* 2003, 59, 710-712.
- Stefańska I., Rzewuska M., Nowicki M., Kaba J., Binek M.: Właściwości fizjologiczne i zmienność genomowa szczepów *Corynebacterium pseudotuberculosis* wyizolowanych od kóz. *Medycyna Wet.* 2007, 63 Supplement, 1474-1477.
- Vasudevan P., Nair M., Annamalai T., Venkitanarayanan K. S.: Phenotypic and genotypic characterization of bovine mastitis isolates of *Staphylococcus aureus* for biofilm formation. *Vet. Microbiol.* 2003, 92, 179-185.
- Zadoks R.: Comparison of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis and human skin, milking equipment and bovine milk by phage typing, pulsed-field gel electrophoresis and binary typing. *J. Clin. Microbiol.* 2002, 40 (11), 3894-3902.

Adres autora: dr Małgorzata Dziekiewicz-Mrugasiewicz, ul. Nowoursynowska 159c, 02-787 Warszawa; e-mail: mdziekiewicz@o2.pl