

Znaczenie adhezji oraz tworzenia biofilmu przez *Staphylococcus aureus* w zapaleniu gruczołu mlekowego

MAŁGORZATA DZIEKIEWICZ-MRUGASIEWICZ

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

Dziekiewicz-Mrugasiewicz M.

Role of adhesion and biofilm formation by *Staphylococcus aureus* in bovine mastitis

Summary

The ability of *S. aureus* to adhere to the mammary gland epithelium is considered to be a major virulence factor influencing its pathogenesis in mastitis. This feature enables tissue colonization and development of subsequent stages of infection. The adhesion of *S. aureus* to epithelial cells may involve non-specific physico-chemical interactions and specific interaction between cell-associated ligands and host cell receptors. A major role in adhesion is played by extracellular proteins such as fibronectin binding protein and exopolysaccharides. The structure of the exopolysaccharides varies with the strains of *S. aureus* and may be slime, microcapsule or capsule. Slime production enables adhesion to the epithelial cells and leads to biofilm formation. Biofilm formation by *S. aureus* helps the bacterium to survive hostile environments within the host and is considered to be responsible for chronic infections, also lowering susceptibility to antibiotics.

Keywords: *Staphylococcus aureus*, adhesion, biofilm, mastitis

Zdolność przylegania *S. aureus* do komórek nabłonkowych gruczołu mlekowego jest ważnym czynnikiem chorobotwórczym gronkowców prowadzącym do wystąpienia objawów *mastitis* (2, 15, 22, 26). Właściwość ta umożliwia kolonizację tkanek i rozwinięcie się kolejnych etapów zakażenia. Ma to szczególne znaczenie w przypadku zakażenia gruczołu mlekowego, ponieważ przyleganie *S. aureus* do wrażliwych komórek uniemożliwia wypłukanie bakterii przez przepływające mleko. Adhezja bakterii do powierzchni komórek eukariotycznych lub materiałów abiotycznych jest procesem niezmiernie złożonym. Zaangażowane są odmienne mechanizmy, a cechą wspólną jest to, że są zależne od struktur występujących na powierzchni bakterii, które wchodzi w reakcje z odpowiednimi receptorami na powierzchni komórki eukariotycznej (6). W procesie adhezji można wyróżnić kilka etapów. Początkowo są to oddziaływania fizyczne, powodujące przemieszczenie się bakterii ze środowiska płynnego w kierunku powierzchni docelowej. Na tym etapie ważną rolę odgrywają siły hydrodynamiczne, dyfuzja i grawitacja. Skutkiem tych oddziaływań jest wystąpienie adhezji, początkowo nieswoistej, a później swoistej. W adhezji nieswoistej, nazywanej też odwracalną, komórki bakterii wiążą się z powierzchnią tkanek głównie przez siły elektrostatyczne, takie jak: siły Van

der Waalsa, siły termodynamiczne, napięcie powierzchniowe i hydrofobowość. Najistotniejsze na tym etapie są siły Van der Waalsa i związane z nimi oddziaływania hydrofobowe. Pozwalają one pokonać niekorzystne oddziaływania i umożliwiają zbliżenie się komórki bakterii do powierzchni tkanek lub innych powierzchni. Jeżeli bakteria zbliży się do powierzchni na odległość mniejszą niż 1,5 nm, pojawiają się oddziaływania swoiste (13). Adhezja swoista bakterii (adhezja nieodwracalna) uwarunkowana jest procesami, w których występują interakcje pomiędzy swoistymi ligandami gronkowcowymi a odpowiednimi receptorami na powierzchni komórek. Ligandami bakteryjnymi mogą być białka powierzchniowe (adhezyny) i polisacharydy zewnątrzkomórkowe (6).

Pierwszą grupą czynników uczestniczących w procesie adhezji swoistej bakterii do komórek są ich adhezyny powierzchniowe należące do rodziny białek MSCRAMMs (microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules). Umożliwiają one gronkowcom łączenie się z elementami macierzy zewnątrzkomórkowej ECM (extracellular matrix components), takimi jak: fibronektyna, witronektyna, kolagen, trombospondyna czy fibrynogen (23). Do adhezyn powierzchniowych *S. aureus* zaliczane są białka wiążące: fibronektynę FnBP (fibronectin-binding

protein), kolagen CnBP (collagen-binding protein), witronektynę VbBP (vitronectin-binding protein), trombospondynę ThBP (thrombospondine binding protein), lamininę LnBP (laminine-binding protein) i fibrynogen FbBP (fibrynogen-binding protein). Wiązanie bakterii do białek macierzy zewnątrzkomórkowej może prowadzić do kolonizacji tkanek dwiema drogami: bezpośredniego wiązania bakterii do białek zewnątrzkomórkowej macierzy lub adhezji do uwidoczonych elementów macierzy komórkowej w uszkodzonych tkankach (20). Występowanie urazów, otarć w okolicach wejścia do kanału strzykowego zdecydowanie zwiększa adhezję bakterii i częściej prowadzi do wystąpienia zapalenia gruczołu mlekowego u krów (28, 32). Również zakażenie bydła wirusem IBR/IPV zwiększa adhezję bakterii do komórek nabłonkowych.

Ważną rolę w procesie adhezji odgrywa fibronektyna. Jest to glikoproteina, która występuje w rozpuszczalnej formie w surowicy i płynach ustrojowych, a w formie nierozpuszczalnej jako składnik macierzy zewnątrzkomórkowej (19). Bierze ona udział w procesach fagocytozy oraz stabilizacji skrzepów. *S. aureus* wykorzystuje fibronektynę jako pomost łączący go z tkankami gospodarza. Białko wiążące fibronektynę (FnBP) jest zakotwiczone w błonie cytoplazmatycznej, składa się z 2 podjednostek FnBP-A i FnBP-B, liczy 1018 aminokwasów. Region nazywany D1-D4 jest odpowiedzialny za wiązanie się z fibronektyną. Białko wiążące fibronektynę ma zasadnicze znaczenie w adhezji gronkowców do komórek nabłonkowych i inwazji do ich wnętrza, jak również pomaga w agregacji komórek bakteryjnych (22). Potwierdzają to badania prowadzone przez Lammersa i wsp. (21) i niezależnie Brouillette i wsp. (7). Użycie w doświadczeniu szczepu *S. aureus* DU5883 z zablokowanym białkiem FnBP wykazało znaczne zmniejszenie jego zdolności przylegania do komórek nabłonkowych.

Białko wiążące fibrynogen (FbBP) ułatwia kolonizację nabłonka naczyń krwionośnych. W ten sposób może powodować uszkodzenie tkanek i przyczynić się do rozprzestrzeniania zakażenia.

S. aureus ma na swojej powierzchni inne białka powierzchniowe, takie jak: białko wiążące witronektynę (VbBP), trombospondynę (ThBP), lamininę (FnBP) i kolagen (CnBP). Rola tych białek jest dobrze udokumentowana w zakażeniach gronkowcowych u ludzi, niestety, nie jest jeszcze dokładnie zbadane ich znaczenie w wywoływaniu zapalenia gruczołu mlekowego u krów. Mylly i wsp. (28) wykazali, że szczepy *S. aureus*, które wiązały nie tylko fibronektynę, fibrynogen, ale również lamininę, witronektynę, trombospondynę, *in vitro* wykazywały silniejsze przyleganie do komórek nabłonkowych gruczołu mlekowego niż szczepy łączące się wyłącznie z fibronektyną.

Drugą grupę czynników uczestniczących w procesie adhezji stanowią polisacharydy zewnątrzkomórkowe. Są one związane ze ścianą komórkową bakterii, ułatwiają przyłączanie się do komórek nabłonkowych

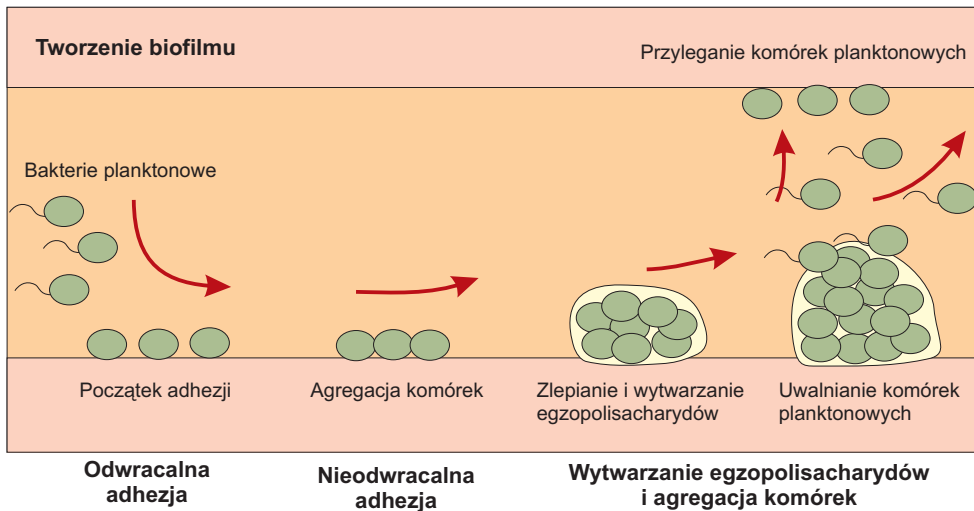
i uczestniczą w tworzeniu biofilmu (12). Polisacharydy mogą tworzyć wokół komórki bakteryjnej otoczkę, pseudootoczkę lub śluz otaczający pojedyncze komórki (4, 5). U gronkowców wyróżniono dwa rodzaje polisacharydów: PS/A i PIA. Otoczkowa adhezyna polisacharydowa PS/A (capsular polysaccharide adhesin) jest odpowiedzialna za przyleganie do powierzchni komórek bądź materiałów abiotycznych, natomiast PIA (polysaccharide intercellular adhesin – polisacharydowa międzykomórkowa adhezyna) powoduje agregację komórek bakteryjnych i uczestniczy w tworzeniu biofilmu (3, 33, 34).

Szczegółowe badania molekularne egzopolisacharydów wykazały, że PS/A i PIA mają podobną strukturę chemiczną i właściwości immunologiczne. PS/A jest wielkocząsteczkowym polisacharydem (m.c. 500 000 kDa) zawierającym w swoim składzie galaktozę i glukozaminę. PIA jest polisacharydową cząsteczką (m.c. 100 000 kDa) składającą się z glukozy i bogatą w N-acetylo-glukozaminę (20). Ostatnie badania przeprowadzone przez Maira-Litran i wsp. (25) wykazały, że obydwie adhezyny zbudowane są z polisacharydu N-acetyloglukozoaminowego (PNAG – polysaccharide $\beta(1-6)$ -linked N-acetyloglukozamine). PNAG może występować w dwóch (24) lub nawet trzech frakcjach (25) różniących się masą cząsteczkową.

Rola adhezji *S. aureus* w patogenezie zapalenia gruczołu mlekowego u krów oraz znaczenie poszczególnych czynników były analizowane przez wielu autorów w badaniach prowadzonych *in vivo* (5, 15, 30) i *in vitro* (2, 5, 15, 21, 29). W celu oceny adhezji w badaniach *in vitro* stosowano: świeżo pobrane komórki nabłonka gruczołu mlekowego (15, 16, 29), hodowle jednowarstwowe nabłonka gruczołu mlekowego (10, 17, 22), linie komórkowe nabłonka gruczołu mlekowego (18) oraz hodowle tkankowe gruczołu mlekowego (30).

Zdolność adhezji szczepów *S. aureus*, jak wykazano w licznych badaniach, jest bardzo zróżnicowana i może wynosić od jednej komórki bakteryjnej przylegającej do komórki nabłonka do nawet kilkudziesięciu lub więcej (15, 17, 22). Ta zmienność związana jest z miejscem pochodzenia i rodzajem komórek nabłonkowych, sposobem badania adhezji, jak również z właściwościami badanych szczepów *S. aureus*. Wykazano, że szczepy *S. aureus* namnażane w pożywkach z dodatkiem serwatki wykazywały zdecydowanie większą zdolność do adhezji (17). Szczepy będące w fazie logarytmicznego wzrostu miały większą siłę przylegania (16, 18, 22). Wytwarzanie przez szczepy śluzu (1, 5) lub otoczki (17) zwiększało zdolność przylegania do nabłonka gruczołu mlekowego. Ważnym elementem, który decyduje o uzyskanym wyniku badania jest zastosowana metoda badawcza oraz rodzaj komórek nabłonkowych użytych w doświadczeniu.

Badania nad zdolnością adhezji *S. aureus* do komórek nabłonkowych gruczołu mlekowego rozpoczął



Ryc. 1. Etapy tworzenia biofilmu (wg Melchior i wsp., 2006)

Frost w 1975 (15). Wykorzystał on świeżo pobrane komórki nabłonkowe wyizolowane z przewodów mlecznych gruczołu mlekowego krów i stwierdził, że do 50 komórek nabłonkowych przylegały 552 komórki *S. aureus*, w związku z tym średnia liczba bakterii przylegająca do pojedynczej komórki wynosiła 11,04. Potwierdzają to wyniki badań innych autorów (18, 28). Zdolność przylegania bakterii do tkanek zależna była od szczepu i komórek nabłonka. Adhezja do świeżo pobranych komórek nabłonka gruczołu mlekowego była silniejsza niż do komórek z hodowli tkankowej czy linii komórkowej (29). Prawdopodobnie inkubacja komórek w pożywce zawierającej FCS (fetal calf serum – płodowa surowica bydlęca) ogranicza przyleganie bakterii. Dodatkowo Opdebeeck i wsp. (29) stwierdzili, że zdolność przylegania zmniejsza się wraz ze spadkiem żywotności komórek. Frost i wsp. (16) wykazali, że komórki nabłonkowe pobierane z zatoki mlecznej i przewodów mlecznych były bardziej podatne na adhezję niż komórki pobrane z zatoki strzykowej. Im z wyższej partii gruczołu pochodziły komórki nabłonkowe, tym większa liczba bakterii przylegała do nich. Najsilniejszą adhezję wykazywały gronkowce do tkanki gruczołowej w pęcherzykach mlecznych i w takich przypadkach do pojedynczej komórki nabłonkowej przylegało nawet 300 bakterii (22).

W pęcherzykach gruczołu mlekowego występują dwa rodzaje komórek nabłonkowych: sześciennie i walcowate. *S. aureus* przylega głównie do komórek walcowatych pęcherzyka, nie stwierdzono przylegania do komórek sześciennych. Może być to związane z tym, że histologicznie komórki walcowate wykazują podobieństwo w budowie do komórek mioepitelialnych i mogą zawierać na powierzchni błony komórkowej integryny $\beta 1$ (receptory umożliwiające wiązanie z fibronektyną) (21). W badaniach z użyciem mikroskopu elektronowego wykazano (16, 22), że w początkowych odcinkach w zatoce mlecznej i przewodach komórki walcowate występują sporadycznie. W badaniach Frossta (15) *in vivo* przyleganie *S. aureus* do komórek na-

błonka przewodów wyprowadzających było znacznie słabsze niż *in vitro*. W przyleganiu na tym poziomie mogą uczestniczyć głównie mechanizmy nieswoiste, takie jak: siły Van der Waalsa czy hydrofobowość (13). Znaczenie hydrofobowości w adhezji *S. aureus* do komórek nabłonka gruczołu mlekowego jest jednak kwestionowane przez Itturalde i wsp. (18). W badaniach Thomasa i wsp. (31) żaden z badanych szczepów nie był zdolny do adhezji do nieuszkodzonych komórek nabłonka przewodu mlecznego. Szczepy te wykazywały nato-

miast silny tropizm do odsłoniętych elementów tkanki łącznej. Inni autorzy (28, 32) wykazali, że występowanie urazów w okolicy skóry strzyka czy wejścia do kanału strzykowego powoduje silne przyleganie bakterii do tkanek i przyczynia się do wystąpienia wewnątrzwymieniowego zakażenia. Zdolność wytwarzania przez gronkowce hemolizyn znacznie zwiększa adhezję bakterii do tkanek. Toksyny uszkodzają tkanki gruczołu mlekowego, umożliwiając dostęp do komórek macierzy zewnątrzkomórkowej (10), której jednym z głównych składników jest fibronektyna. Wykazuje to znaczenie białek powierzchniowych, a szczególnie białka wiążącego fibronektynę w patogenezie *mastitis* wywoływanego przez *S. aureus*.

Warto podkreślić, że w doświadczeniach wielu autorów (2, 5, 15) szczepy *S. aureus* wykazywały zdolność przylegania do zdrowego nabłonka gruczołu mlecznego. Związane może to być ze zdolnością wytwarzania przez gronkowce egzopolisacharydów, które ułatwiają przyleganie bakterii do komórek gospodarza czy materiałów abiotycznych (1, 5). W badaniach Baselgi i wsp. (5) po eksperymentalnym zakażeniu gruczołu mlecznego owiec, szczepy *S. aureus* wytwarzające śluz (SP) wykazywały większą zdolność kolonizacji tkanek niż szczepy nie wytwarzające śluzu (NSP). Dodanie egzopolisacharydów do hodowli bakteryjnej powodowało większą częstość przylegania *S. aureus* do komórek nabłonkowych gruczołu mlecznego owiec (1). Bakterie wytwarzające śluz mogą łączyć się między sobą w mikrokolonie lub wytwarzać biofilm.

Biofilm, według definicji Costertona i wsp. (11), jest to zgrupowanie komórek jednego lub wielu gatunków bakterii przylegających do siebie i do powierzchni stałej, otoczone egzopolisacharydowym śluzem. Tworzenie biofilmu składa się z dwóch etapów. Pierwszym etapem jest przyleganie pojedynczych, swobodnie przemieszczających się komórek bakteryjnych (tzn. komórek planktonowych) do powierzchni wrażliwych tkanek gospodarza lub do powierzchni abiotycznych.

W drugim etapie tworzenia biofilmu bakterie namnażają się i wytwarzają egzopolisacharydy międzykomórkowej adhezji (PI/A), które łączą komórki między sobą, tworząc trójwymiarową strukturę otoczoną glikokaliksem. Z powierzchni biofilmu stale uwalniane są do fazy wodnej komórki potomne. Komórki te mogą rozprzestrzeniać się w gruczole i zakażać nowe obszary (27). Mechanizm powstawania biofilmu przedstawia ryc. 1.

Początkowo pojęcia śluz i biofilm były stosowane zamiennie (4), obecnie są one dokładnie rozgraniczone. Badanie nad wytwarzaniem biofilmu przez gronkowce rozpoczął Christensen (8) i opracował metodę próbkową dla oceny zdolności wytwarzania biofilmu na podstawie przylegania gronkowców koagulujących do ścianek próbki. Jednak ta metoda nie jest zbyt czuła i powtarzalna. Aktualnie częściej stosuje się metodę płytkową opracowaną przez Cucarella i wsp. (12), która jest dokładniejsza i bardziej wiarygodna. Obecnie coraz częściej w określaniu zdolności szczepów *S. aureus* do wytwarzania śluzu i biofilmu wykorzystuje się badania genetyczne. Określa się występowanie genów ica A i ica D, które kodują syntezę białek PIA i PS/A, przez co odgrywają zasadniczą rolę w tworzeniu biofilmu (33).

Zdolność do adhezji oraz wytwarzanie śluzu i biofilmu są ważnymi czynnikami chorobotwórczości szczepów *S. aureus* wywołujących zapalenie gruczołu mlekowego. Przyczyniają się one do powstawania przewlekłych zapaleń gruczołu mlekowego i powodują trudności w ich leczeniu (2, 5, 12, 14, 33). Tworzenie biofilmu przez gronkowce sprzyja utrzymywaniu się stanu zakażenia w gruczole mlekowym, poprzez zmniejszenie wrażliwości bakterii na fagocytosę oraz na leki przeciwbakteryjne.

Piśmiennictwo

1. Aguilar B., Amorena B., Iturralde M.: Effect of slime on adherence of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine and ovine mastitis. *Vet. Microbiol.* 2001, 78, 183-191.
2. Aguilar B., Iturralde M.: Binding of a surface protein of *Staphylococcus aureus* to cultured ovine mammary gland epithelial cells. *Vet. Microbiol.* 2001, 82, 165-175.
3. Bartoszewicz-Potyrala M., Przondo-Mordarska A.: Cechy gronkowców koagulazujących warunkujące ich chorobotwórczość. *Post. Mikrobiol.* 2002, 41, 351-366.
4. Baselga R., Albizu I., Amorena B.: *Staphylococcus aureus* capsule and slime as virulence factors in ruminant mastitis. A review. *Vet. Microbiol.* 1994, 39, 195-204.
5. 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.
6. Belkum van A., Kools-Sijmons M., Verbrugh H.: Attachment of *Staphylococcus aureus* to eukaryotic cells and experimental pitfalls in staphylococcal adherence assays: a critical appraisal. *J. Microbiol. Methods* 2002, 48, 19-42.
7. Brouillette E., Grodin G., Shkreta L., Lacasse P., Talbot B. G.: In vivo and in vitro demonstration that *Staphylococcus aureus* is an intracellular pathogen in the presence or absence of fibronectin-binding proteins. *Microbial Path.* 2003, 35, 159-168.
8. Christensen G. D., Simpson W. A., Bisno A. L., Beachey E. H.: Adherence of slime-producing strains of *Staphylococcus epidermidis* to smooth surface. *Infect. Immun.* 1982, 37, 318-326.
9. Cifrian E., Guidry A. J., Bramley A. J., Norcross N. L., Bastida-Corcuera F. D., Marquardt W. W.: Effect of staphylococcal β toxin on the cytotoxicity, proliferation and adherence of *Staphylococcus aureus* to bovine mammary epithelial cells. *Vet. Microbiol.* 1996, 48, 187-198.
10. Cifrian E., Guidry A. J., O'Brien C. N., Nickerson S. C., Marquardt W. W.: Adherence of *S. aureus* to cultured bovine mammary epithelial cells. *J. Dairy Sci.* 1994, 77, 970-983.
11. Costerton J. W., Stewart P. S., Greenberg E. P.: Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 1999, 21, 1318-1322.
12. Cucarella C., Solano C., Vvalle J., Amorena B., Lasa I., Penades J. R.: Bap, a *Staphylococcus aureus* surface protein involved in biofilm formation. *J. Bacteriol.* 2001, 183, 2888-2896.
13. Czaczuk K.: Czynniki warunkujące adhezję drobnoustrojów do powierzchni abiotycznych. *Post. Mikrobiol.* 2004, 43, 267-283.
14. Fox L. K., Zadoks R. N., Gaskins C. T.: Biofilm production by *Staphylococcus aureus* associated with intramammary infection. *Vet. Microbiol.* 2005, 107, 295-299.
15. Frost A. J.: Selective adhesion of microorganisms to the ductular epithelium of bovine mammary gland. *Infect. Immun.* 1975, 12, 1154-1156.
16. Frost A. J., Wanasinghe D. D., Woolcock J. B.: Some factors affecting selective adherence of microorganisms in the bovine mammary gland. *Infect. Immun.* 1977, 15, 245-253.
17. Hensen S. M., Pavicic M. J., Lohuis J. A., Poutrel B.: Use of bovine primary epithelial cells for the comparison adherence and invasion ability of *Staphylococcus aureus* strains. *J. Dairy Sci.* 2000, 83, 418-429.
18. Iturralde M., Aguilar B., Baselga R., Amorena B.: Adherence of ruminant mastitis *Staphylococcus aureus* strains to epithelial cells from ovine mammary gland primary cultures and from a rat intestinal cell line. *Vet. Microbiol.* 1993, 38, 115-127.
19. Kerro-Dego O., Dijk van J. E., Nederbragt H.: Factors involved in the early pathogenesis of bovine *Staphylococcus aureus* mastitis with emphasis on bacteria adhesion and invasion. A review. *Vet. Q.* 2002, 24, 181-198.
20. Krajewska-Pietrasik D., Różalska B., Różalski A.: Adhezja bakteryjna w świetle najnowszych badań. *Post. Mikrobiol.* 1993, 23, 271-287.
21. Lammers A., Nuijten P. J., Smith H. E.: The fibronectin binding proteins of *Staphylococcus aureus* are required for adhesion to and invasion of bovine mammary gland cells. *FEMS Microbiol. Letters* 1999, 180, 103-109.
22. Lammers A., Nuijten P. J., Stockhofe-Zurwieden N., Vecht U., Smith H. E., Zijdeveld F. G.: Cell tropism of *Staphylococcus aureus* in bovine mammary gland cell cultures. *Vet. Microbiol.* 1999, 67, 77-89.
23. Łopaciuk U., Dzierżanowska D.: Gronkowce metycylinooporne: mechanizmy oporności, czynniki zjadliwości oraz metody genotypowania. *Post. Mikrobiol.* 2001, 41, 401-418.
24. Mack D., Fisher M., Krokotsch A., Leopold K., Hartmann R., Egge H., Laufs R.: The intercellular adhesin involved in biofilm accumulation of *Staphylococcus epidermidis* is a linear β -1,6 linked glucosaminoglycan purification and structural analyses. *J. Bacteriol.* 1996, 178, 175-183.
25. Maira-Litran T., Kropiec A., Abeygunawardana C., Joyce J., Mark G., Goldmann D. A., Pier G. B.: Immunochemical properties of staphylococcal poly-N-acetyloglucosamine surface polysaccharide. *Infect. Immun.* 2002, 70, 4433-4440.
26. Mamo W., Froman G.: Adhesion of *Staphylococcus aureus* to bovine mammary epithelial cells induced by growth in milk whey. *Microbiol. Immunol.* 1994, 38, 305-308.
27. Melchior M. B., Vaarkamp H., Fink-Gremmels J.: Biofilm: A role in recurrent mastitis infection? *Vet. J.* 2006, 171, 398-407.
28. Myllys V., Honkanen-Buzalski T.: Effect of abrasion of teat orifice epithelium on development of bovine staphylococcal mastitis. *J. Dairy Sci.* 1994, 77, 446-452.
29. Opdebeeck J. P., Frost A. J., O'Boyle D.: Adhesion of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* to bovine udder epithelial cells. *Vet. Microbiol.* 1988, 16, 77-86.
30. Sordillo L. M., Nickerson S. C., Akers R. M.: Pathology of *Staphylococcus aureus* mastitis during lactogenesis: relationships with bovine mammary structure and function. *J. Dairy Sci.* 1989, 72, 228-240.
31. Thomas L. H., Leigh J. A., Bland A. P., Cook R. S.: Adherence and colonization by bacterial pathogens in explant cultures of bovine mammary tissues. *Vet. Res. Commun.* 1992, 16, 87-96.
32. Trinidad P., Nickerson S. C., Alley T. K.: Prevalence of intramammary infection and teat canal colonisation in unbred and primigravid dairy heifers. *J. Dairy Sci.* 1990, 73, 107-114.
33. 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.
34. Waldon E., Szweczyk E. M.: Zdolność adhezji do komórek nabłonkowych i powierzchni tworzyw szczepów *Staphylococcus cohnii* zasiedlających środowisko szpitalne. *Med. Dośw. Mikrobiol.* 2002, 54, 109-118.

Adres autora: dr Małgorzata Dziekiewicz-Mrugasiewicz, ul. Nowoursynowska 159c, 02-787 Warszawa; e-mail: dziekiewicz@m02.pl