POST. MIKROBIOL.,
2018, 57, 3, 270–277
http://www.pm.microbiology.pl

AKTUALNE WYZWANIA WETERYNARYJNEJ DIAGNOSTYKI MIKROBIOLOGICZNEJ DOTYCZĄCEJ OZNACZANIA LEKOWRAŻLIWOŚCI GRONKOWCÓW

Magdalena Kizerwetter-Świda*, Dorota Chrobak-Chmiel, Magdalena Rzewuska

Zakład Mikrobiologii, Katedra Nauk Przedklinicznych, Wydział Medycyny Weterynaryjnej,
Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

Wpłynęło w kwietniu, zaakceptowano w maju 2018 r.

Streszczenie: Gronkowce należą do bakterii często izolowanych z materiału klinicznego pobieranego od zwierząt. W weterynarii z próbek klinicznych oprócz *Staphylococcus aureus* izolowane są także inne gatunki gronkowców koagulazo-dodatnich. Ponadto, coraz częściej rozpoznawane są także gronkowce koagulazo-ujemne. Taksonomia rodzaju *Staphylococcus* ulegała ostatnio aktualizacji, wyodrębniono kilka nowych gatunków, które mogą również występować u zwierząt. Powoduje to pewne trudności w precyzyjnej identyfikacji gronkowców. Dokładna identyfikacja gatunków z rodzaju *Staphylococcus* jest niezwykle istotna, ponieważ, zgodnie z zaleceniami EUCAST i CLSI, interpretacja wyników badań lekowrażliwości *S. aureus* i gronkowców koagulazo-ujemnych jest różna. Ponadto oporność na metycylinę wśród szczepów *S. aureus* wykrywa się przy pomocy krążków z cefoksytyną, natomiast w przypadku *Staphylococcu pseudintermedius* – z użyciem oksacyliny. Ważnym problemem weterynaryjnych laboratoriów mikrobiologicznych jest ograniczona liczba ujednoliconych wytycznych dotyczących metodologii badań oraz wytycznych określających interpretację wyników oznaczania wrażliwości na antybiotyki. Wytyczne takie powinny dotyczyć różnych gatunków bakterii, w tym także gronkowców, izolowanych od różnych gatunków zwierząt. Aktualne wytyczne CLSI z roku 2015 zwierają takie zalecenia, choć w organicznym zakresie. Rekomendacje opracowane przez EUCAST są przeznaczone dla mikroorganizmów izolowanych od ludzi i nie powinny być stosowane przez laboratoriach weterynaryjnych. Ponadto dostępne zalecenia nie uwzględniają nowych gatunków gronkowców. Istniej pilna potrzeba harmonizacji metod stosowanych w weterynaryjnych laboratoriach mikrobiologicznych oraz opracowania wytycznych dotyczących interpretacji wyników oznaczania lekowrażliwości dla różnych bakterii, w tym różnych gatunków gronkowców izolowanych od poszczególnych gatunków zwierząt.

1. Wstęp. 2. Trudności w identyfikacji gronkowców izolowanych od zwierząt. 3. Oznaczanie lekowrażliwości gronkowców – metody tradycyjne. 4. Alternatywne metody określania lekowrażliwości gronkowców. 5. Wykrywanie oporności gronkowców na metycylinę. 6. Interpretacja wyników badania lekowrażliwości patogenów weterynaryjnych. 7. Przeciwdziałanie narastaniu oporności drobnoustrojów na antybiotyki. 8. Podsumowanie

Current challenges of veterinary microbiological diagnostics concerning the susceptibility of staphylococci to antibiotics

Abstract: Staphylococci are pathogenic bacteria often isolated from clinical material obtained from animals. Unlike in human medicine, in veterinary sciences various species of coagulase-positive staphylococci have been isolated from clinical specimens. In addition to *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus pseudintermedius*, other species are also often identified. Recently, the taxonomy of staphylococci has been updated, therefore, it is now important to recognize also the new species. Currently, coagulase-negative staphylococci are considered an important group of opportunistic pathogens. The accurate identification of species within the genus *Staphylococcus* is important because, according to the EUCAST and CLSI recommendations, the interpretation of the results of susceptibility testing for *S. aureus* and coagulase-negative staphylococci is different. Furthermore, the resistance to methicillin in *S. aureus* strains is detected using a cefoxitin disk, whereas in *S. pseudintermedius* – using an oxacillin disk. An important problem for veterinary microbiological laboratories is a limited number of unified guidelines on methodology and guidelines specifying the interpretation of the results of antibiotic susceptibility testing. The lack of available recommendations for some antibiotics testing results in veterinary laboratories often using the guidelines established for human pathogens. There is an urgent need to harmonize the methods and develop guidelines for the interpretation of results of susceptibility testing for different bacteria, including various species of staphylococci isolated from an individual animal host.

1. Introduction. 2. Problems with the identification of staphylococci isolated from animals. 3. Determination of susceptibility of staphylococci – traditional methods. 4. Alternative methods for determining the susceptibility of staphylococci. 5. Detection of staphylococcal resistance to methicillin. 6. Interpretation of the results of the susceptibility testing of veterinary pathogens. 7. Prevention of the antimicrobial resistance. 8. Summary

Słowa kluczowe: mikrobiologia weterynaryjna, oporność na antybiotyki, *Staphylococcus* spp., wykrywanie oporności na metycylinę
Key words: antimicrobial resistance, methicillin resistance testing, *Staphylococcus* spp., veterinary microbiology

1. Wstęp

Stały rozwój diagnostyki mikrobiologicznej skutkuje nowymi wyzwaniami dla laboratoriów diagnostycznych. Weterynaryjna diagnostyka mikrobiologiczna polega na badaniu materiału klinicznego pochodzącego od różnych gatunków zwierząt, co znacznie zwiększa liczbę gatunków drobnoustrojów patogennych, które należy rozpoznawać. Spośród gronkowców koagulazo-dodatnich (Coagulase-Positive Staphylococci, CPS) izolowanych z materiałów klinicznych pobranych od ludzi największe znaczenie ma *Staphylococcus aureus* [11]. U zwierząt znacznie częściej występują i są istotne klinicznie także pozostałe gatunki CPS [21, 33, 47].

* Autor korespondencyjny: Dr Magdalena Kizerwetter-Świda, Zakład Mikrobiologii, Katedra Nauk Przedklinicznych, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie, ul. Ciszewskiego 8, 02-786 Warszawa, tel.: 22 5936028; e-mail: magdalena_kizerwetter_swida@sggw.pl

Ponadto, w mikrobiologii klinicznej coraz większe znaczenie mają gronkowce koagulazo-ujemne (Coagulase--Negative Staphylococci, CNS) izolowane zarówno od ludzi, jak i od zwierząt [7, 53]. Wobec ostatnich zmian w taksonomii oraz aktualnej wiedzy dotyczącej chorobotwórczości gronkowców, weterynaryjne laboratoria diagnostyczne powinny precyzyjnie rozpoznawać gatunki tych bakterii, ponieważ w wielu wypadkach warunkuje to prawidłową interpretację wyników oznaczania lekowrażliwości, w tym sposób wykrywania oporności na metycylinę.

2. Trudności w identyfikacji gronkowców izolowanych od zwierząt

Podstawowym celem weterynaryjnej diagnostyki mikrobiologicznej jest identyfikacja czynnika zakaźnego. Prawidłowe i szybkie rozpoznanie drobnoustrojów wyizolowanych z materiału klinicznego umożliwia przeprowadzanie wiarygodnego badania ich lekowrażliwości, co z kolei decyduje o wyborze skutecznej antybiotykoterapii [12, 35]. Tradycyjne procedury identyfikacji mikroorganizmów, w tym gronkowców, oparte są w głównej mierze na metodach hodowlanych, w których oceniane są cechy fenotypowe bakterii [15]. Systemy identyfikacji gronkowców oparte na badaniu ich aktywności biochemicznej są opracowywane głównie na podstawie wyników uzyskiwanych dla szczepów wyizolowanych od ludzi. Z tego względu ich przydatność do identyfikacji izolatów pochodzących od zwierząt jest ograniczona. Na przykład, wiadomo, że *Staphylococcus pseudintermedius* może być często błędnie rozpoznawany jako *S. aureus* [48, 56]. Podobnie fenotypowa identyfikacja *Staphylococcus delphini*, *Staphylococcus intermedius* [9] oraz gronkowców z grupy CNS może być trudna [38, 57].

Pomimo stałego udoskonalania metod diagnostycznych stosowanych w mikrobiologii prawidłowe rozpoznanie gatunków gronkowców blisko ze sobą spokrewnionych, o zbliżonych cechach fenotypowych, nie jest proste. Znakomitym przykładem są trzy gatunki: *S. pseudintermedius*, *S. intermedius* oraz *S. delphini*, należące do grupy SIG (*Staphylococcus intermedius* Group – SIG) [32, 33]. Cechują się one zbliżonymi właściwościami fenotypowymi, a podobieństwo sekwencji genu 16S rRNA wynosi u nich ponad 99% [9, 32, 51]. Także w przypadku nowych gatunków gronkowców opisanych w ciągu ostatniej dekady, jak np.: istotnego w weterynarii *Staphylococcus agnetis*, precyzyjna identyfikacja stanowi obecnie wyzwanie dla laboratorium diagnostycznego [2, 54]. Szczegółowe badania gronkowców oparte na analizie molekularnej pozwalają na identyfikację poszczególnych gatunków oraz na ustalenia pokrewieństwa szczepów [30, 45, 51]. Choć rutynowo do identyfikacji tych bakterii coraz częściej wykorzystywane są techniki molekularne, to wiele z metod opisanych w literaturze nie nadaje się do codziennego zastosowania w laboratoriach diagnostycznych [56]. Precyzyjną identyfikację umożliwia również spektrometria masowa MALDI--TOF-MS (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry), coraz częściej stosowana także w laboratoriach weterynaryjnych [4, 17].

Ostatnie lata przyniosły pewne zmiany w taksonomii bakterii z rodzaju *Staphylococcus*. szczegółowe badania z użyciem metod biologii molekularnej pozwoliły na wyodrębnienie kilku nowych gatunków, wyizolowanych od ludzi, jak również od zwierząt oraz ze środowiska. Nowe gatunki gronkowców koagulazo-dodatnich, które mogą występować u zwierząt to *Staphylococcus argentus*, *Staphylococcus schweitzeri* [54] oraz koagulazo-zmienny *S. agnetis* [53]. Do grupy gronkowców koagulazo-ujemnych dołączyły gatunki *Staphylococcus rostri* wyizolowany od świń [42], *Staphylococcus devriesei* uzyskany z mleka krów [49] oraz *Staphylococcus microti* [37] i *Staphylocoocus stepanovicii* [25] pochodzące od gryzoni. Ich znaczenie chorobotwórcze dla zwierząt nie jest obecnie znane, z wyjątkiem *S. agnetis*, gatunku opisanego w roku 2012. Początkowo wyizolowany był on z przypadków *mastitis* u bydła, obecnie wiadomo, że może być także czynnikiem etiologicznym *osteomyelitis*, zapalenia wsierdzia oraz posocznicy u broilerów kurzych [1, 39]. Identyfikacja *S. agnetis* oraz innych nowo opisanych gatunków gronkowców raczej nie jest rutynowo wykonywana w laboratoriach mikrobiologicznych [2]. Laboratoria przy ośrodkach naukowych lub akademickich, prowadzących badania dotyczące nowych gatunków, mogą oferować możliwość ich identyfikacji.

Prawidłowe rozpoznanie gatunków w obrębie rodzaju *Staphylococcus* jest niezwykle istotne, ponieważ zgodnie z rekomendacjami European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) oraz Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) interpretacja wyników oznaczania lekowrażliwości dla *S. aureus* oraz gronkowców koagulazo-ujemnych jest różna [10, 19]. Wszelkie badania diagnostyczne wymagają przestrzegania określonych procedur, jak również interpretacji uzyskanych wyników zgodnie z ujednoliconymi zaleceniami. W weterynaryjnej diagnostyce mikrobiologicznej często brakuje szczegółowych wytycznych odnośnie sposobu identyfikacji niektórych gatunków gronkowców [23].

3. Oznaczanie lekowrażliwości gronkowców – metody tradycyjne

Do oznaczania lekowrażliwości bakterii najczęściej stosowane są metody krążkowo-dyfuzyjna, seryjnych rozcieńczeń lub metoda paskowo-dyfuzyjna przy

użyciu pasków gradientowych [15, 35]. Wyznaczenie minimalnego stężenia danej substancji hamującego (Minimal Inhibitory Concentration, MIC) wzrost drobnoustrojów przy pomocy metody rozcieńczeń antybiotyku w podłożu płynnym jest uznawane za tzw. złoty standard w oznaczaniu lekowrażliwości [19]. Znaczne usprawnienie wykonania oznaczenia i obniżenie kosztów pojedynczego badania możliwe jest dzięki zastosowaniu płytek z gotowymi rozcieńczeniami antybiotyków oraz automatycznemu odczytowi posiewów. Dla gronkowców są to np.: Sensititre Gram Positive MIC Plate (Thermo Scientific) oraz Microlatest MIC STAPHY (Erba Mannheim).

Oznaczając lekowrażliwość przy pomocy metody krążkowo-dyfuzyjnej ustala się wielkość średnic stref zahamowania wzrostu badanych szczepów bakteryjnych wokół krążków z antybiotykami. Wyniki interpretuje się porównując uzyskane wartości stref (mierzonych w milimetrach) z rekomendowanymi jako wartości graniczne (breakpoint). W metodzie tej szczepy klasyfikowane są do kategorii klinicznie oporny, wrażliwy lub średniowrażliwy. Mankamentem tych metod jest stosunkowo długi czas oczekiwania na wynik, związany z koniecznością wyizolowania szczepów, przygotowania czystych kultur, a następnie wykonania właściwego oznaczenia wrażliwości na antybiotyki. Uzyskanie wiarygodnych wyników przy zastosowaniu obu powyższych metod wymaga zachowania określonych standardów jakości wykonania, takich jak odpowiednia gęstość inokulum, rodzaj stosowanego podłoża, warunki inkubacji, które wskazane są w powszechnie stosowanych wytycznych EUCAST czy CLSI [40]. W laboratoriach diagnostycznych do wyznaczania wartości MIC często stosuje się metodę paskowo-dyfuzyjną, która jest mniej pracochłonna od metody rozcieńczeń. Wytyczne CLSI oraz EUCAST nie uwzględniają jednak wyników uzyskanych przy pomocy tej metody. Wiadomo również, że wartość MIC wyznaczana przy pomocy pasków gradientowych dla szczepów *S. aureus* opornych na metycylinę (Methicillin-resistant *S. aureus*, MRSA) może być zawyżona o 0,5 do 1,5 $\log_2$ w porównaniu do wartości określanej przy pomocy rozcieńczeń [44].

4. Alternatywne metody określania lekowrażliwości gronkowców

Obecnie w diagnostyce mikrobiologicznej wyraźnie zaznacza się tendencja do skracania czasu oczekiwania na wynik badania. W przypadku oznaczania lekowrażliwości bakterii możliwe jest to przez wykonanie oznaczenia bezpośrednio z próbek klinicznych, z pominięciem etapu izolacji. Postępowanie takie bywa jednak zawodne np. w przypadku zakażeń o mieszanej etiologii. W medycynie ludzkiej określanie lekowrażliwości drobnoustrojów bezpośrednio z próbek klinicznych jest szczególnie istotne w przypadku pacjentów w stanie krytycznym. Skrócenie czasu oczekiwania na wynik badania lekowrażliwości wymaga zastosowania metod alternatywnych, bazujących na technice PCR lub MALDI-TOF SM. Badania te można przeprowadzić bezpośrednio z użyciem pobranego materiału klinicznego lub po wstępnym namnożeniu drobnoustrojów [4, 6, 16].

Metody oparte na standardowej technice PCR lub RealTime PCR umożliwiają wykrycie specyficznych genów determinujących oporność mikroorganizmów na określone antybiotyki. Opisano wiele zastosowań tych metod dla różnych drobnoustrojów, w tym również dla gronkowców i różnych antybiotyków. W praktyce laboratoryjnej najczęściej wykorzystywane jest wykrywanie obecności szczepów *S. aureus* opornych na metycylinę na podstawie obecności genu *mecA* w badanych próbkach [40]. Dostępne są zautomatyzowane systemy wykorzystujące technikę RealTime PCR, jak BD GeneOhm MRSA (Becton Dickinson) oraz GeneXpert (Cepheid). Szybkie potwierdzenie obecności MRSA we krwi pacjentów jest szczególnie istotne na oddziałach intensywnej terapii dla niezwłocznego podjęcia skutecznego leczenia [61].

Początkowo MALDI-TOF MS wykorzystywano jedynie do identyfikacji drobnoustrojów. Obecnie zakres zastosowań tej techniki obejmuje także wykrywanie bakterii opornych na antybiotyki, pod warunkiem, że widma białkowe szczepów opornych i wrażliwych są różne [4]. Potwierdzono skuteczność spektrometrii mas w wykrywaniu gronkowców opornych na metycylinę [41]. Aktualnie metody te nie znajdują jeszcze zastosowania w rutynowej diagnostyce weterynaryjnej.

Najbardziej innowacyjną i efektywną metodą sekwencjonowania jest sekwencjonowanie nowej generacji (Next Generation Sequencing, NSG) umożliwiające wykrycie obecności wszystkich znanych genów oporności podczas pojedynczej analizy [52]. Upowszechnienie NGS pozwoliło na szybki rozwój sekwencjonowania całych genomów (Whole Genome Sequencing, WGS). Występowanie określonych genów u badanego szczepu bakterii wskazuje na profil jego oporności na antybiotyki. Wysoką zgodność przewidywania profilu oporności na podstawie genotypu badanego szczepu w porównaniu do jego właściwości fenotypowych wykazano dla *S. aureus* [22] oraz wielu innych drobnoustrojów, w tym również *Staphylococcus epidermidis* [34].

Wadą zastosowania sekwencjonowania nowej generacji do oznaczania lekowrażliwości badanych szczepów jest możliwość uzyskania wyników fałszywie dodatnich. W przypadku obecności niefunkcjonalnych pseudogenów lub represji genów kodujących pompy typu efflux, uzyskuje się wyniki fałszywie dodatnie wskazując na oporność. Obecnie panuje pogląd, że w najbliższej

przyszłości sekwencjonowanie WGS nie stanie się jednak podstawowym narzędziem diagnostycznym w wykrywaniu oporności wśród gronkowców oraz innych bakterii. Choć sekwencjonowanie całych genomów patogenów izolowanych z materiału klinicznego jest technicznie możliwe, to w porównaniu do rutynowego badania lekowrażliwości, nadal pozostaje kosztowne. Co najważniejsze, zgodnie z aktualną opinią EUCAST obecnie zbyt mało danych potwierdza możliwość wykorzystania wyników WGS do przewidywania lekooporności drobnoustrojów oraz wyboru skutecznej terapii [18]. W rutynowej diagnostyce mikrobiologicznej sekwencjonowanie nowej generacji nie jest jeszcze stosowane.

5. Wykrywanie oporności gronkowców na metycylinę

Prawidłowe rozpoznanie gatunku gronkowca jest niezwykle istotne, ponieważ ma decydujący wpływ na dobór antybiotyku użytego w metodzie krążkowo-dyfuzyjnej do wykrywania oporności na metycylinę. Krążek z oksacyliną jest zalecany do oznaczania oporności na metycylinę u szczepów *S. pseudintermedius*, patogenu izolowanego głównie od psów, gdyż wykazano jego większą skuteczność w wykrywaniu tego mechanizmu oporności, w porównaniu do krążka z cefoksytyną, który jest zalecany dla *S. aureus* [8, 10, 19]. Chociaż, u niektórych szczepów *S. pseudintermedius* opornych na metycylinę (Methicillin-resistant *S. pseudintermedius*, MRSP) należących do typu sekwencyjnego 258 stwierdzono niskie wartości MIC oksacyliny (0,5–4 µg/ml), co może powodować uzyskanie wyników wątpliwych w metodzie krążkowo-dyfuzyjnej z oksacyliną [14, 20, 60]. W takich przypadkach, o potwierdzeniu oporności na metycylinę decyduje obecność genu *mecA* warunkującego ten typ oporności. Co więcej, niektóre izolaty MRSP cechuje heterogenna ekspresja genu *mecA*, kiedy wokół krążka z oksacyliną występuje strefa zahamowania wzrostu, a wokół krążka z cefoksytyną pojawia się strefa zahamowania wzrostu o średnicy pozwalającej na zakwalifikowanie tego szczepu jako metycylino-wrażliwego [46].

Rekomendacje CLSI oraz EUCAST odnośnie wykrywanie oporności na metycylinę uwzględniają jedynie *S. aureus*, *S. pseudintermedius* oraz CNS, z wyszczególnieniem *S. lugdunensis* i *S. epidermidis* [10, 19]. Brakuje zaleceń dotyczących innych gatunków gronkowców koagulazo-dodatnich, takich jak *Staphylococcus schleiferi* subsp. *coagulans*, *S. delphini*, *S. intermedius*, jak również koagulazo-zmiennych *Staphylococcus hyicus* oraz *S. agnetis*. Oporność na metycylinę wśród szczepów *S. schleiferi* subsp. *coagulans* może występować nawet u 40% izolatów [36]. Wyniki badań przedstawione przez Huse i wsp. (2018) wskazują, że wyniki uzyskane z użyciem metody krążkowo-dyfuzyjnej z oksacyliną oraz wyznaczanie wartości MIC dla oksacyliny interpretowane według kryteriów zalecanych dla *S. pseudintermedius* są także skuteczne w identyfikacji metycylino-opornych szczepów *S. schleiferi* [27]. Gen *mecA* może występować również u gronkowców zaliczanych do CNS izolowanych zarówno od zwierząt hodowlanych [7, 54], jak i towarzyszących [13]. Oporność na metycylinę szczególnie często występuje u *Staphylcoccus haemolyticus* (61%) oraz *S. epidermidis* (55%) [13].

6. Interpretacja wyników badania lekowrażliwości patogenów weterynaryjnych

Nieodzownym elementem diagnostyki mikrobiologicznej jest ocena lekowrażliwości wyizolowanych patogenów. W tej kwestii mikrobiologia weterynaryjna napotyka na pewne trudności, ponieważ w przypadku gronkowców, jak również innych drobnoustrojów izolowanych od zwierząt, wytyczne odnośnie interpretacji wyników są niepełne lub nieopracowane [23]. Powstało wiele ogólnych standardów i zaleceń międzynarodowych dotyczących sposobu wykonania badań, które można stosować badając materiał pochodzący od zwierząt [12, 28, 59]. Jednak interpretacja wyników badania lekowrażliwości stanowi nadal problem, ponieważ brakuje rekomendacji dla wielu patogenów izolowanych od zwierząt. Wyniki uzyskane metodą krążkowo-dyfuzyjną lub oznaczania wartość MIC interpretuje się najczęściej zgodnie z rekomendacjami opracowanymi przez EUCAST lub CLSI, jako aktualnie obowiązujące [10, 19]. Działający w naszym kraju Krajowy Ośrodek Referencyjny ds. Lekowrażliwości Drobnoustrojów (KORLD) opracowuje rekomendacje do interpretacji wyników oznaczania lekowrażliwości drobnoustrojów na podstawie zaleceń EUCAST, dotyczą one drobnoustrojów występujących u ludzi i nie zawierają odrębnych klinicznych wartości granicznych dla patogenów weterynaryjnych. Wartości graniczne dla szczepów izolowanych od ludzi nie są odpowiednie i nie powinny być stosowane dla izolatów pochodzących od różnych gatunków zwierząt. Wartości te uwzględniają dawkowanie oraz parametry PK/PD antybiotyków stosowanych u ludzi. Jako pewną alternatywę dla badań szczepów izolowanych od zwierząt eksperci z EUCAST zalecają stosowanie epidemiologicznych wartości granicznych (epidemiological cut-off, ECOFF). Jednak wartości te wyznaczono również dla patogenów ludzkich, zatem postępowanie takie mimo zaleceń ekspertów nie jest właściwe. Ponadto, w rekomendacjach przeznaczonych dla medycyny ludzkiej nie uwzględnia się antybiotyków stosowanych jedynie u zwierząt, takich jak: ceftiofur, cefowecyna, cefquinom czy florfenikol. Do tej pory jedynie rekomendacje CLSI z roku 2015 podają

kliniczne wartości graniczne dla głównych patogenów weterynaryjnych oraz dla wybranych antybiotyków [10]. Brakuje w nich jednak wielu danych, przykładowo dla gronkowców izolowanych od zwierząt nie podano wartości granicznych dla chloramfenikolu, rifampicyny, trimetoprimu z sulfametoksazolem oraz tikarcyliny z kwasem klawulanowym [10].

W ramach EUCAST w roku 2015 utworzono podkomitet weterynaryjny (Vet-CAST), którego działalność ma na celu ujednolicenie metod badania oraz interpretacji wyników oceny wrażliwości na antybiotyki, dla bakterii izolowanych od zwierząt lub bakterii o potencjale zoonotycznym w Europie. Podobnie, w obrębie Europejskiego Towarzystwa Mikrobiologii Klinicznej i Chorób Zakaźnych (European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, ESCMID) utworzono w 2015 roku Grupę Badawczą Mikrobiologii Weterynaryjnej (European Study Group for Veterinary Microbiology, ESGVM), której działanie ma na celu harmonizację metod identyfikacji oraz badania wrażliwości patogenów weterynaryjnych. Prace nad przygotowaniem rekomendacji dla patogenów weterynaryjnych w Europie nadal trwają. Wiarygodne wartości graniczne powinny być wkrótce ustalone dla różnych drobnoustrojów izolowanych od poszczególnych gatunków zwierząt. Z uwagi na zjawisko rozprzestrzeniania się wśród zwierząt różnych gatunków patogenów wielolekoopornych, istnieje pilna potrzeba opracowania takich danych, aby interpretacja wyników antybiogramów była prawidłowa.

7. Przeciwdziałanie narastaniu oporności drobnoustrojów na antybiotyki

Aktualnie, jednym z głównych wyzwań mikrobiologii, w tym również weterynaryjnej jest stale narastająca oporność drobnoustrojów na antybiotyki. Programy polityki antybiotykowej (antimicrobial stewardship programmes) są jednym z wielu działań podejmowanych w celu przeciwdziałania temu zjawisku. Stosowane są one w wielu szpitalach medycyny ludzkiej, uwzględniają szczegółowe zasady współpracy lekarzy klinicystów z zespołem ds. antybiotykoterapii w obrębie konkretnych placówek [26]. Programy takie obecnie jeszcze rzadko stosowane są w lecznicach i klinikach weterynaryjnych, w których zwierzęta mogą przebywać na leczeniu stacjonarnym [24]. Ponadto, także w weterynarii należy dążyć do racjonalizacji antybiotykoterapii. Działania mające na celu przeciwdziałanie narastaniu oporności drobnoustrojów, w tym także gronkowców, na antybiotyki muszą obejmować zarówno obszar medycyny ludzkiej, jak i weterynarii, aby były w pełni skuteczne powinny być postrzegane jako problem globalny [3].

Znaczne kontrowersje związane są ze stosowaniem w weterynarii antybiotyków zaliczonych przez Światową Organizację Zdrowia (World Health Organization, WHO) do krytycznie istotnych dla zdrowia publicznego (Critically Important Antimicrobials, CIA). Obecnie w weterynarii coraz częściej izolowane są drobnoustroje wielolekooporne. Obok wielu Gram-ujemnych pałeczek, są to także oporne szczepy gronkowców. Mechanizm oporności związany z obecnością genu *mecA* najczęściej stwierdzany jest wśród szczepów *S. pseudintermedius* oraz *S. aureus* [29], które na ogół wykazują również wielolekooporność [31]. Wobec braku opcji terapeutycznych lekarze weterynarii mogą zatem sięgać po linezolid lub inne środki przeciwdrobnoustrojowe, zaliczane do antybiotyków krytycznie istotnych dla zdrowia publicznego. Panuje pogląd, że antybiotyki z grupy CIA powinny być zarezerwowane do użycia wyłącznie w medycynie ludzkiej, do leczenia zakażeń wywoływanych przez drobnoustroje wielolekooporne [21]. W Polsce jak dotąd problem ten nie został uregulowany krajowymi rekomendacjami dla lekarzy weterynarii. W racjonalnym stosowaniu antybiotyków oraz przeciwdziałaniu narastaniu oporności istotną rolę odrywają także weterynaryjne laboratoria mikrobiologiczne. W pewnym zakresie mają one wpływ na promowanie środków przeciwdrobnoustrojowych z grupy CIA do leczenia zwierząt, o ile są uwzględniane w badaniu lekowrażliwości. Jednak ostateczna decyzja o ich stosowaniu pozostaje w gestii lekarza weterynarii. Zgodnie z ogólnymi rekomendacjami opracowane przez ekspertów z Międzynarodowego Stowarzyszenia Chorób Zakaźnych Zwierząt Towarzyszących (International Society for Companion Animal Infectious Diseases, ISCAID), wankomycyna, kabapenemy oraz linezolid (zaliczane do CIA) nie powinny być stosowane w weterynarii. W wyjątkowych przypadkach dopuszczalne jest ich użycie, o ile spełnionych zostanie kilka warunków. Należy potwierdzić etiologię zakażenia wynikiem hodowli bakteriologicznej oraz udokumentować brak innych opcji terapeutycznych dla wyizolowanego szczepu. Leki z grupy CIA można stosować u zwierząt jedynie przy realnej szansie na powodzenie leczenia, ponadto zalecana jest konsultacja ze specjalistą w dziedzinie chorób zakaźnych zwierząt oraz antybiotykoterapii, która powinna ocenić zasadność terapii oraz sprecyzować dawkowanie oraz czas trwania leczenia [58]. Krajowe rekomendacje odnośnie racjonalnej antybiotykoterapii u zwierząt towarzyszących człowiekowi opracowane w Danii oraz Szwecji, dotyczące możliwości leczenia zakażeń wywoływanych przez szczepy MRSP również nie zalecają stosowania CIA. Dopuszczalne jest ich użycie jedynie w wyjątkowych okolicznościach i po spełnienie wymienionych powyżej warunków [5, 50].

Prawne ograniczenia stosowania antybiotyków dotyczą obecnie tylko zwierząt hodowlanych. Zgodnie z roz-

porządzeniem Unii Europejskiej nr 1831/2003 stosowanie antybiotyków jako stymulatorów wzrostu u zwierząt hodowlanych jest zabronione od roku 2006 [43]. Niektóre kraje europejskie wprowadzają dalsze ograniczenia obowiązujące na ich terytoriach. W Danii i Holandii dotyczą one stosowania u zwierząt hodowlanych fluorochinolonów oraz cefalosporyn trzeciej i czwartej generacji. Można przypuszczać, że szereg działań podejmowanych w skali globalnej w celu racjonalnego stosowania antybiotyków doprowadzi w przyszłości do ograniczeń lub zakazu stosowania pewnych klas antybiotyków także u zwierząt towarzyszących człowiekowi.

8. Podsumowanie

Weterynaryjne laboratorium diagnostyczne odgrywa kluczową rolę w rozpoznawaniu czynników wywołujących choroby zakaźne. Wprowadzenie nowoczesnych metod diagnostyki opartych na analizie materiału genetycznego lub profilu białek znacznie skraca czas potrzebny do wykrycia bakterii oraz ułatwia prawidłowe rozpoznanie patogenów, co jest szczególnie ważne w przypadku izolatów od zwierząt, których identyfikacja przy użyciu tradycyjnych metod biochemicznych w wielu przypadkach jest trudna lub nawet niemożliwa. Mimo ciągłego rozwoju metod stosowanych w diagnostyce mikrobiologicznej, laboratoria weterynaryjne, na ogół nadal bazują na tradycyjnych metodach hodowlanych stosowanych do identyfikacji izolatów oraz do badania lekowrażliwości.

Obecnie zasadniczym wyzwaniem dla weterynaryjnej diagnostyki mikrobiologicznej jest brak ujednoliconych metod określania lekowrażliwości drobnoustrojów izolowanych od zwierząt oraz brak wartości granicznych specyficznych dla poszczególnych antybiotyków, gatunków drobnoustrojów pochodzących od różnych gatunków zwierząt. Nieodzownym elementem skutecznego zwalczania chorób zakaźnych jest także wdrożenie racjonalnej antybiotykoterapii w lecznicach oraz klinikach weterynaryjnych. Konieczny jest ciągły proces szkoleń podnoszący kwalifikacje personelu zatrudnionego w laboratoriach weterynaryjnych. Zalecenia dotyczące metodyki badań oraz interpretacji wyników, odnoszące się do weterynaryjnej diagnostyki mikrobiologicznej są pilnie potrzebne i w najbliższym czasie prawdopodobnie zostaną opracowane przez Vet-CAST oraz ESGVM.

Piśmiennictwo

1. Adkins P.R.F., Middleton J.R., Calcutt M.J., Stewart G.C., Fox L.K.: Species Identification and Strain Typing of *Staphylococcus agnetis* and *Staphylococcus hyicus* Isolates from Bovine Milk by Use of a Novel Multiplex PCR Assay and Pulsed-Field Gel Electrophoresis. *J. Clin. Microbiol.* **55**, 1778–1788 (2017)
2. Al-Rubaye A.A., Couger M.B., Ojha S., Pummill J.F., Koon J.A., Wideman R.F. Jr, Rhoads D.D.: Genome Analysis of *Staphylococcus agnetis*, an Agent of Lameness in Broiler Chickens. *PLoS One*, **25**, e0143336 (2015)
3. American Veterinary Medical Association (AVMA): Judicious therapeutic use of antimicrobials, https://www.avma.org/KB/Policies/Pages/Judicious-Therapeutic-Use-of-Antimicrobials.aspx (14.02.2018)
4. Angeletti S.: Matrix assisted laser desorption time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) in clinical microbiology. *J. Microbiol. Methods.* DOI: 10.1016/j.mimet.2016.09.003 (2017)
5. Antibiotic Use Guidelines for Companion Animal Practice. https://www.ddd.dk/sektioner/familiedyr/antibiotikavejledning/Documents/AntibioticGuidelines%20-%20v1.4_jun15.pdf (27.03.2018)
6. Barreiro J.R., Gonçalves J.L., Braga P.A., Dibbern A.G., Eberlin M.N., Veiga Dos Santos M.: Non-culture-based identification of mastitis-causing bacteria by MALDI-TOF mass spectrometry. *J. Dairy Sci.* **100**, 2928–2934 (2017)
7. Becker K., Heilmann C., Peters G.: Coagulase-negative staphylococci. *Clin. Microbiol. Rev*. **27**, 870–926 (2014)
8. Bemis D.A., Jones R.D., Videla R., Kania S.A.: Evaluation of cefoxitin disk diffusion breakpoint for detection of methicillin resistance in *Staphylococcus pseudintermedius* isolates from dogs. *J. Vet. Diagn. Invest*. **24**, 964–967 (2012)
9. Bond R., Loeffler A.: What's happened to *Staphylococcus intermedius*? Taxonomic revision and emergence of multi-drug resistance. *J. Small Anim. Pract.* **53**, 147–54 (2012)
10. Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI): Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals. 3rd ed. Wayne, PA: CLSI Supplement; VET01S (2015).
11. Coates R., Moran J., Horsburgh M.J.: Staphylococci: colonizers and pathogens of human skin. *Future Microbiol*. **9**, 75–91 (2014)
12. Cornaglia G., Courcol R., Herrmann J.-L., Kahlmeter G., Peigue-Lafeuille H., Vila J.: European Manual of Clinical Microbiology. European Society of Clinical Microbiology and Societe Francaise de Microbiologie, 2012
13. Couto N., Monchique C., Belas A., Marques C., Gama L.T., Pomba C:. Trends and molecular mechanisms of antimicrobial resistance in clinical staphylococci isolated from companion animals over a 16 year period. *J. Antimicrob. Chemother*. **71**, 1479–1487 (2016)
14. Damborg P., Moodley A., Aalbæk B., Ventrella G., Dos Santos T.P., Guardabassi L.: High genotypic diversity among methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* isolated from canine infections in Denmark. *BMC Vet. Res*. **12**: 131. DOI: 10.1186/s12917-016-0756-y (2016)
15. Dargatz D.A., Erdman M.M., Harris B.: A survey of methods used for antimicrobial susceptibility testing in veterinary diagnostic laboratories in the United States. *J. Vet. Diagn. Invest*. **29**, 669–675 (2017)
16. Elbehiry A., Al-Dubaib M., Marzouk E., Osman S., Edrees H.: Performance of MALDI biotyper compared with Vitek™ 2 compact system for fast identification and discrimination of *Staphylococcus* species isolated from bovine mastitis. *Microbiologyopen*, **5**, 1061–1070 (2016)
17. El-Bouri K., Johnston S., Rees E., Thomas I., Bome-Mannathoko N., Jones C., Reid M., Ben-Ismaeil B., Davies A.R., Harris L.G., Mack D.: Comparison of bacterial identification by MALDI-TOF mass spectrometry and conventional diagnostic microbiology methods: agreement, speed and cost implications. *Br. J. Biomed. Sci*. **69**, 47–55 (2012)

18. Ellington M.J., Woodford N. i wsp.: The role of whole genome sequencing in antimicrobial susceptibility testing of bacteria: report from the EUCAST Subcommittee. *Clin. Microbiol. Infect*. **23**, 2–22 (2017)
19. Europejski Komitet ds. Oznaczania Lekowrażliwości, European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing, EUCAST, http://www.eucast.org (14.02.2018)
20. Feng Y., Tian W., Lin D., Luo Q., Zhou Y., Yang T., Deng Y., Liu Y.H., Liu J.H.: Prevalence and characterization of methicillin--resistant *Staphylococcus pseudintermedius* in pets from South China. *Vet. Microbiol*. **160**, 517–524 (2012)
21. Frank L.A., Loeffler A.: Meticillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius*: clinical challenge and treatment options. *Vet. Dermatol*. **23**, 283–291 (2012)
22. Gordon N.C., Golubchik T. i wsp.: Prediction of *Staphylococcus aureus* antimicrobial resistance by whole-genome sequencing. *J. Clin. Microbiol*. **52**, 1182–1191 (2014)
23. Guardabassi L., Damborg P., Stamm I., Kopp P.A., Broens E.M., Toutain P.L.: ESCMID Study Group for Veterinary Microbiology. Diagnostic microbiology in veterinary dermatology: present and future. *Vet. Dermatol*. **28**, 146–e30 (2017)
24. Guardabassi L., Prescott J.F.: Antimicrobial stewardship in small animal veterinary practice: from theory to practice. *Vet. Clin. North. Am. Small. Anim. Pract*. **45**, 361–376 (2015).
25. Hauschild T., Stepanović S., Zakrzewska-Czerwińska J.: *Staphylococcus stepanovicii* sp. nov., a novel novobiocin-resistant oxidase-positive staphylococcal species isolated from wild small mammals. *Syst. Appl. Microbiol*. **33**, 183–187 (2010)
26. Hryniewicz W., Ozorowski T.: Szpitalna Polityka Antybiotykowa Propozycje dla polskich do szpitali. Narodowy Program Ochrony Antybiotyków, Warszawa 2011, http://www.antybiotyki.edu.pl/pdf/szpitalna/Szp-polit-antyb-MZ.pdf (14.02.2018)
27. Huse H.K., Miller S.A., Chandrasekaran S., Hindler J.A., Lawhon S.D., Bemis D.A., Westblade L.F., Humphries R.M.: Evaluation of Oxacillin and Cefoxitin Disk Diffusion and MIC Breakpoints Established by the Clinical and Laboratory Standards Institute for Detection of *mecA*-Mediated Oxacillin Resistance in *Staphylococcus schleiferi*. *J. Clin. Microbiol*. **56**, e01653–17 (2018)
28. Jorgensen J.H., Pfaller M.A., Carroll K.C., Funke G., Marie Louise Landry M.L., Richter S.S., Warnock D.W.: Manual of Clinical Microbiology. 11th edition. American Society for Microbiology, 2015
29. Kadlec K., Schwarz S.: Antimicrobial resistance of *Staphylococcus pseudintermedius*. *Vet. Dermatol*. **23**, 276–282 (2012)
30. Kizerwetter-Świda M., Chrobak-Chmiel D., Rzewuska M., Antosiewicz A., Dolka B., Ledwoń A., Czujkowska A., Binek M.: Genetic characterization of coagulase-positive staphylococci isolated from healthy pigeons. *Pol. J. Vet. Sci*. **18**, 627–634 (2015)
31. Kizerwetter-Świda M., Chrobak-Chmiel D., Rzewuska M., Binek M.: Resistance of canine methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* strains to pradofloxacin. *J. Vet. Diagn. Invest*. **28**, 514–518 (2016)
32. Kizerwetter-Świda M., Chrobak-Chmiel D., Rzewuska M., Binek M:. *Staphylococcus pseudintermedius* – trudno rozpoznawalny patogen. *Post. Mikrobiol*. **54**, 103–114 (2015)
33. Kmieciak W., Szewczyk E.M.: Gatunki koagulazododatnie rodzaju *Staphylococcus* – taksonomia, chorobotwórczość *Post. Mikrobiol*. **52**, 233–244 (2017)
34. Lazaris A., Coleman D.C., Kearns A.M., Pichon B., Kinnevey P.M., Earls M.R., Boyle B., O'Connell B., Brennan G.I., Shore A.C.: Novel multiresistance *cfr* plasmids in linezolid--resistant methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* and vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* (VRE) from a hospital outbreak: co-location of *cfr* and *optrA* in VRE. *J. Antimicrob. Chemother*. **72**, 3252–3257 (2017)
35. Matuschek E., Brown D. F., Kahlmeter G. Development of the EUCAST disk diffusion antimicrobial susceptibility testing method and its implementation in routine microbiology laboratories. *Clin. Microbiol. Infect*. **20**, O255–O256 (2014)
36. Morris D.O., Rook K.A., Shofer F.S., Rankin S.C.: Screening of *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus intermedius*, and *Staphylococcus schleiferi* isolates obtained from small companion animals for antimicrobial resistance: a retrospective review of 749 isolates (2003–2004). *Vet. Dermatol*. **17**, 332–227 (2006)
37. Nováková D., Pantůcek R., Hubálek Z., Falsen E., Busse H.J., Schumann P., Sedlácek I.: *Staphylococcus microti* sp. nov., isolated from the common vole (Microtus arvalis). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol*. **60**, 566–573 (2010)
38. Park J.Y., Fox L.K., Seo K.S., McGuire M.A., Park Y.H., Rurangirwa F.R., Sischo W.M., Bohach G.A.: Comparison of phenotypic and genotypic methods for the species identification of coagulase-negative staphylococcal isolates from bovine intramammary infections. *Vet. Microbiol*. **147**, 142–148 (2011)
39. Poulsen L.L., Thøfner I., Bisgaard M., Olsen R.H., Christensen J.P., Christensen H.: *Staphylococcus agnetis*, a potential pathogen in broiler breeders. *Vet. Microbiol*. **212**, 1–6 (2017)
40. Pulido M.R., García-Quintanilla M., Martín-Peña R., Cisneros J.M., McConnell M.J.: Progress on the development of rapid methods for antimicrobial susceptibility testing. *J. Antimicrob. Chemother*. **68**, 2710–2717 (2013)
41. Rhoads D.D., Wang H., Karichu J., Richter S.S.: The presence of a single MALDI-TOF mass spectral peak predicts methicillin resistance in staphylococci. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis*. **86**, 257–261 (2016)
42. Riesen A., Perreten V.: *Staphylococcus rostri* sp. nov., a haemolytic bacterium isolated from the noses of healthy pigs. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol*. **60**, 2042–2047 (2010)
43. Rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) 1831/2003 z dnia 22 września 2003 r. w sprawie dodatków stosowanych w żywieniu zwierząt.
44. Sader H.S., Jones R.N.: Evaluation of vancomycin and daptomycin potency trends (MIC creep) against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates collected in nine U.S. medical centers from 2002 to 2006. *Antimicrob. Agents Chemother*. **53**, 4127–4132 (2009)
45. Sasaki T., Tsubakishita S., Tanaka Y., Sakusabe A., Ohtsuka M., Hirotaki S., Kawakami T., Fukata T., Hiramatsu K.: Multiplex--PCR method for species identification of coagulase-positive staphylococci. *J. Clin. Microbiol*. **48**, 765–769 (2010)
46. Savini V., Di Giuseppe N., Fazii P., D'Amario C., D'Antonio D., Carretto E.: *Staphylococcus pseudintermedius* heterogeneously expresses the *mecA* gene. *Vet. Microbiol*. **165**, 489–490 (2013)
47. Savini V., Passeri C., Mancini G., Iuliani O., Marrollo R., Argentieri A.V., Fazii P., D'Antonio D., Carretto E.: Coagulase-positive staphylococci: my pet's two faces. *Res Microbiol*. **164**, 371–374 (2013)
48. Silva M.B., Ferreira F.A., Garcia L.N., Silva-Carvalho M.C., Botelho L.A., Figueiredo A.M., Vieira-da-Motta O.: An evaluation of matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry for the identification of *Staphylococcus pseudintermedius* isolates from canine infections. *J. Vet. Diagn. Invest*. **27**, 231–235 (2015)
49. Supré K., De Vliegher S., Cleenwerck I., Engelbeen K., Van Trappen S., Piepers S., Sampimon O.C., Zadoks R.N., De Vos P., Haesebrouck F.: *Staphylococcus devriesei* sp. nov., isolated from teat apices and milk of dairy cows. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol*. **60**, 2739–2744 (2010)
50. Swedish strategy to combat antibiotic resistance. http://www.government.se/contentassets/168838e186de455

ca7fe868bee92d209/swedish-strategy-to-combat-antibiotic-resistance.pdf (27.03.2018)
51. Szczuka E., Makowska N., Kaznowski A.: Molekularne metody identyfikacji bakterii z rodzaju *Staphylococcus*. *Post. Mikrobiol.* **52**, 211–218 (2013)
52. Tagini F., Greub G.: Bacterial genome sequencing in clinical microbiology: a pathogen-oriented review. Eur. *J. Clin. Microbiol. Infect. Dis*. DOI: 10.1007/s10096-017-3024-6 (2017)
53. Taponen S., Nykäsenoja S., Pohjanvirta T., Pitkälä A., Pyörälä S.: Species distribution and in vitro antimicrobial susceptibility of coagulase-negative staphylococci isolated from bovine mastitic milk. *Acta Vet Scand*. DOI: 10.1186/s13028-016-0193-8 (2016)
54. Taponen S., Supré K., Piessens V., Van Coillie E., De Vliegher S., Koort J.M.: *Staphylococcus agnetis* sp. nov., a coagulase-variable species from bovine subclinical and mild clinical mastitis. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **62**, 61–65 (2012)
55. Tong S.Y, Giffard P.M. i wsp.: Novel staphylococcal species that form part of a *Staphylococcus aureus*-related complex: the non-pigmented *Staphylococcus argenteus* sp. nov. and the non-human primate-associated *Staphylococcus schweitzeri* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **65**, 15–22 (2015)
56. van Duijkeren E., Törneke K. i wsp.: Scientific Advisory Group on Antimicrobials (SAGAM). Review on methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius*. *J. Antimicrob. Chemother.* **66**, 2705–2714 (2011)
57. Vanderhaeghen W., Piepers S., Leroy F., Van Coillie E., Haesebrouck F., De Vliegher S.: Identification, typing, ecology and epidemiology of coagulase negative staphylococci associated with ruminants. *Vet . J*. **203**, 44–51 (2015)
58. Weese J.S., Sykes J.E. i wsp.: Antimicrobial use guidelines for treatment of urinary tract disease in dogs and cats: antimicrobial guidelines working group of the international society for companion animal infectious diseases. *Vet. Med. Int*. DOI: 10.4061/2011/263768 (2011)
59. World Organization of Animal Health (OIE). Laboratory methodologies for bacterial antimicrobial susceptibility testing. In: Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. http://www.oie.int/en/international-standard-setting/terrestrial-manual/access-online (14.02.2018)
60. Wu M.T., Burnham C.A., Westblade L.F., Dien Bard J., Lawhon S.D., Wallace M.A., Stanley T., Burd E., Hindler J., Humphries R.M.: Evaluation of Oxacillin and Cefoxitin Disk and MIC Breakpoints for Prediction of Methicillin Resistance in Human and Veterinary Isolates of *Staphylococcus intermedius* Group. *J. Clin. Microbiol*. **54**, 535–542 (2016)
61. Yossepowitch O., Dan M., Kutchinsky A., Gottesman T., Schwartz-Harari O.: A cost-saving algorithm for rapid diagnosis of *Staphylococcus aureus* and susceptibility to oxacillin directly from positive blood culture bottles by combined testing with BinaxNOW® S. aureus and Xpert MRSA/SA Assay. *Diagn. Microbiol. Infect Dis.* **78**, 352–355 (2014)