

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

Division of Microbiology, Department of Preclinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine,
Warsaw University of Life Sciences-SGGW, Poland

Submitted in April, accepted in May 2018

Abstract: Staphylococci belong to bacteria often isolated from clinical material obtained from animals. Unlike in human medicine, in veterinary, different species of coagulase-positive staphylococci are isolated from clinical specimens, and except *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus pseudintermedius*, and other species are also often recognized. Recently, the taxonomy of staphylococci has been updated, therefore, now it is necessary to recognize the new species as well. 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 the case of *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 the fact that veterinary laboratories often use the guidelines established for human pathogens. There is an urgent necessity for harmonization of methods and to develop guidelines for the interpretation of results of susceptibility testing for different bacteria, including various species of staphylococci from the 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

Aktualne wyzwania weterynaryjnej diagnostyki mikrobiologicznej dotyczącej oznaczania lekowrażliwości gronkowców

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 *Staphylococcus 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 zawierają takie zalecenia, choć w organicznym zakresie. Rekomendacje opracowane przez EUCAST są przeznaczone dla mikroorganizmów izolowanych od ludzi i nie powinny być stosowane przez laboratoria weterynaryjnych. Ponadto dostępne zalecenia nie uwzględniają nowych gatunków gronkowców. Istnieje 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

Key words: antimicrobial resistance, methicillin resistance testing, *Staphylococcus* spp., veterinary microbiology

Słowa kluczowe: oporność na antybiotyki, wykrywanie oporności na metycylinę, *Staphylococcus* spp., mikrobiologia weterynaryjna

1. Introduction

The constant development of microbiological diagnostics results in new challenges for diagnostic laboratories. Veterinary microbiological diagnostics involves

the examination of clinical material from different animal species, which significantly increases the number of pathogenic microorganisms that should be recognized. Amongst the Coagulase-Positive Staphylococci (CoPS) isolated from clinical materials collected from

* Corresponding author: dr. Magdalena Kizerwetter-Świda, Division of Microbiology, Department of Preclinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Warsaw University of Life Sciences-SGGW, Ciszewskiego Str. 8, 02-786 Warsaw, Poland; tel.: +48 22 593 60 28; e-mail: magdalena_kizerwetter_swida@sggw.pl

humans, *Staphylococcus aureus* is the most important one [11]. In animals, the remaining species of CoPS are far more common and clinically relevant [21, 33, 47]. In addition, Coagulase-Negative Staphylococci (CNS) isolated from both humans and animals are increasingly important in clinical microbiology [7, 53]. Due to the recent changes in the taxonomy and current knowledge about the staphylococcal pathogenicity, veterinary diagnostic laboratories should precisely identify species of these bacteria, because in many cases this determines the correct interpretation of the results of susceptibility testing, including methods used for methicillin resistance detection.

2. Problems with the identification of staphylococci isolated from animals

The basic objective of veterinary microbiological diagnostics is the identification of the infectious agent. Proper and rapid identification of microorganisms isolated from the clinical material enables reliable testing of their susceptibility, which in turn determines the choice of effective antibiotic treatment [12, 35]. Traditional procedures used for the identification of microorganisms, including staphylococci, are mainly based on the culture methods in which phenotypic characteristics of bacteria are assessed [15]. Biochemical profile-based staphylococcal identification systems are mainly developed on the basis of the results obtained from human strains. Therefore, their usefulness for the identification of isolates obtained from animals is limited. For example, it is known that *Staphylococcus pseudintermedius* can often be misidentified as *S. aureus* [48, 56]. Similarly, phenotypic identification of *Staphylococcus delphini*, *Staphylococcus intermedius* [9] and staphylococci from the CNS group may be difficult [38, 57].

Despite constant development of diagnostic methods used in microbiology, the correct identification of closely related species of staphylococci with similar phenotypic features is still complex, a good example of which are the following four species: *S. pseudintermedius*, *S. intermedius*, *S. delphini* and newly described *S. cornubiensis*, which belong to the SIG group (*Staphylococcus intermedius* Group) [32, 33]. They are characterized by similar phenotypic features, and the homology of the 16S rRNA gene sequence exceeds 99% [9, 32, 51]. Additionally, precise identification of *Staphylococcus agnetis* which is also important in veterinary medicine, is still a challenge for a diagnostic laboratory [2, 54]. Detailed research on staphylococci based on molecular analysis allows for the identification of individual species and determination of the relationship between the strains [30, 45, 51]. Although molec-

ular techniques are routinely used to identify these bacteria, many methods described in the literature are not suitable for everyday use in diagnostic laboratories [56]. However, increasingly used in veterinary laboratories MALDI-TOF-MS (Matrix Assisted Laser Desorption) mass spectrometry has lately emerged as an accurate method for staphylococcal identification which is also [4, 17].

Recent years have brought some changes in the taxonomy of the bacteria within the *Staphylococcus* genus. Detailed studies using molecular biology methods have enabled the description of several new species isolated from humans, from animals and the environment. Thus, new species of coagulase-positive staphylococci which have been lately found in animals are: *Staphylococcus argenteus*, *Staphylococcus schweitzeri* [54] and coagulase-variable *S. agnetis* [53]. Some of the newly discovered coagulase-negative staphylococci are *Staphylococcus rostri* isolated from pigs [42], *Staphylococcus devriesei* obtained from cow's milk [49], *Staphylococcus microti* [37] and *Staphylococcus stepanovicii* [25] derived from rodents. Their pathogenic significance for animals is currently unknown, except described in 2012 *S. agnetis*. Initially, it was isolated from the cases of mastitis in cattle. However, it is also known to be an etiological agent of osteomyelitis, endocarditis, and sepsis in chicken broilers [1, 39]. Identification of *S. agnetis* and other newly described species of staphylococci is rather not routinely performed in microbiological laboratories [2]. It seems that laboratories at scientific or academic centers conducting research on new species may offer the possibility of their identification.

According to the recommendations of the European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) and Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) the interpretation of the results of susceptibility testing for *S. aureus* and Coagulase-Negative Staphylococci is different, thus the correct species recognition within the *Staphylococcus* genus is extremely important [10, 19]. All diagnostic tests require compliance with specific procedures as well as interpretation of the results obtained in accordance with the harmonized recommendations. In the veterinary microbiological diagnostics, there are often no detailed guidelines related to the identification of some species within the *Staphylococcus* genus [23].

3. Determination of susceptibility of staphylococci – traditional methods

The disk-diffusion method, serial broth micro-dilution method, and a strip-diffusion method are used the most often in antimicrobial susceptibility testing [15, 35]. Determination of the Minimum Inhibitory

Concentration (MIC) using the broth micro-dilution method is considered as the gold standard in susceptibility testing [19]. Determination of the MIC values is considered to be much easier and cheaper with the use of commercial plates with a fixed composition of antimicrobials. Moreover, they provide trusted results since such plates are also designed for automated reading. For staphylococci, Sensititre Gram Positive MIC Plate (Thermo Scientific) and Microlatest MIC STAPHY (Erba Mannheim) may be used.

Antimicrobial susceptibility testing using the disk-diffusion method is based on the determination of the diameters of bacterial growth inhibition zones around the antimicrobial impregnated disks. The results are interpreted by comparing the obtained zone diameter values (measured in millimeters) with those recommended as breakpoints. In this method, strains are classified as clinically resistant, susceptible or intermediate. The major disadvantages of this procedure is relatively long turnaround time, resulting from the necessity to isolate the strains in pure cultures in preparation of antibiograms. Obtaining reliable results using methods mentioned above requires maintaining certain quality standards, such as appropriate inoculum density, medium, incubation conditions, which are specified in EUCAST or CLSI guidelines [40]. In diagnostic laboratories, in order to determine the MIC value, the strip-diffusion method is often used, which is less laborious than the broth micro-dilution method. However, the guidelines provided by the CLSI and EUCAST do not include the results obtained using this method. It is also known that the MIC determined using gradient strips for *S. aureus*, including MRSA strains can be overstated by 0.5 to 1.5 log₂ compared to the value determined using dilutions [44].

4. Alternative methods for determining the susceptibility of staphylococci

Currently, the trend to reduce turnaround time is clearly visible in the microbiological diagnostics. In the case of bacterial susceptibility testing, clinical specimens may be used directly for identification and susceptibility testing, without the isolation step. However, this procedure may be unreliable, e.g. in the case of mixed infections. In human medicine, the determination of bacterial susceptibility directly from clinical specimens is particularly important for critically ill patients. Shortening the wait time for the results of antimicrobial susceptibility testing requires the use of alternative methods based on the PCR or MALDI-TOF SM techniques. These methods can be performed directly using the collected clinical material or after preliminary multiplication of microorganisms [4, 6, 16].

Methods based on standard PCR or RealTime PCR techniques enable the detection of specific genes determining the susceptibility of microorganisms to specific antibiotics. Many applications of these methods have been described for different antimicrobials and different microorganisms, including staphylococci. For instance, to assess the methicillin-resistant *S. aureus* strains the PCR technique is used for the detection of *mecA* gene [40]. Automated systems using the Real-Time PCR technique, such as BD GeneOhm MRSA (Becton Dickinson) and GeneXpert (Cepheid) are commercially available. Rapid detection of MRSA in blood is particularly important in intensive care units for immediate and effective treatment [61].

MALDI-TOF MS was initially used only for identification of microorganisms. Currently, the range of the application of this technique also includes the detection of bacteria resistant to antibiotics, provided that the protein spectra of resistant and sensitive strains are different [4]. The effectiveness of mass spectrometry in the detection of methicillin-resistant staphylococci has been confirmed [41]. However, currently, these methods are not routinely used in veterinary diagnostics.

The most innovative and effective sequencing method is Next-Generation Sequencing (NSG) enabling the screening for the presence of all known resistance genes in a single analysis [52]. The increasing availability of NGS led to the development of whole genome sequencing (Whole Genome Sequencing, WGS). The presence of specific genes in the tested bacterial strain indicates the profile of its resistance to antimicrobials. High compliance of the resistance profile prediction based on the genotype of the tested strain compared to its phenotypic properties has been demonstrated for *S. aureus* [22] and many other microorganisms, including *Staphylococcus epidermidis* [34].

The disadvantage of the application of next-generation sequencing for marking the drug susceptibility of the tested strains is the possibility of obtaining false-positive results. In the case of presence of non-functional pseudogenes or repression of genes encoding efflux pumps, false-positive results indicating resistance, are obtained. At present, the opinion is that in the nearest future WGS sequencing will not become a basic diagnostic tool in detecting the antimicrobial resistance among staphylococci and other bacteria. Although sequencing the entire genomes of pathogens isolated from the clinical material is technically possible, it is still expensive compared to routine antimicrobial susceptibility testing. Most importantly, according to the current EUCAST opinion, too little data confirms the possibility of using WGS results to predict antibiotic resistance of microorganisms and the choice of effective therapy [18]. In routine microbiological diagnostics, sequencing of the new generation is not yet used.

5. Detection of staphylococcal resistance to methicillin

The accurate species identification within the *Staphylococcus* genus is extremely important because it has a crucial impact on the selection of the antibiotic used in the disc-diffusion method to detect methicillin resistance. The oxacillin disc is recommended for detection of methicillin resistance in *S. pseudintermedius*, a pathogen isolated mainly from dogs. It has been demonstrated to be more effective in the detection of this mechanism of resistance, as compared to the cefoxitin disc, which is recommended for *S. aureus* [8, 10, 19]. However, some methicillin-resistant *S. pseudintermedius* strains (Methicillin-Resistant *S. pseudintermedius*, MRSP) belonging to the sequence type 258 showed low oxacillin MIC values (0.5–4 µg/ml), which may cause questionable results in the disc-diffusion method with oxacillin [14, 20, 60]. In these cases, the presence of the *mecA* gene determines methicillin resistance. Moreover, some MRSP isolates are characterized by heterogeneous gene expression of the *mecA* while the zones of growth inhibition around the disc with oxacillin and cefoxitin are observed, with diameters allowing to qualify them as methicillin-susceptible [46].

CLSI and EUCAST recommendations regarding the detection of methicillin resistance consider only *S. aureus*, *S. pseudintermedius*, and CNS such as *S. lugdunensis* and *S. epidermidis* [10, 19]. There are no recommendations for other coagulase-positive staphylococci such as *Staphylococcus schleiferi* subsp. *coagulans*, *S. delphini*, *S. intermedius*, as well as coagulase-variables *Staphylococcus hyicus* and *S. agnetis*. It was proven that as high as 40% of *S. schleiferi* subsp. *coagulans* isolates were methicillin-resistant [36]. Based on the results obtained by Huse et al. (2018) the criteria recommended for *S. pseudintermedius* are also effective in identifying methicillin-resistant *S. schleiferi* [27]. The *mecA* gene may also be present in CNS isolated from both farm and companion animals [7, 54] [13]. Methicillin resistance is particularly common in *Staphylococcus haemolyticus* (61%) and *S. epidermidis* (55%) [13].

6. Interpretation of the results of the susceptibility testing of veterinary pathogens

An integral element of microbiological diagnostics is the antimicrobial susceptibility testing of isolated pathogens. In this matter, veterinary microbiology faces some difficulties regarding staphylococci, as well as other microorganisms isolated from animals, because the guidelines for the interpretation of results are incomplete or not developed [23]. Many general standards and international recommendations con-

cerning the way of performing microbiological analyses were drafted, and can be also used for the clinical materials obtained from animals [12, 28, 59]. However, the interpretation of the results of the drug susceptibility is still a problem, as there are no recommendations for many pathogens isolated from animals. The results obtained by the disc-diffusion method or the determination of the MIC value are usually interpreted in accordance with the recommendations developed by EUCAST or CLSI [10, 19]. The National Reference Centre for Susceptibility Testing (NRCST) at the National Medicines Institute (NMI) in our country is responsible for forming recommendations for the interpretation of the results of antimicrobial susceptibility based on EUCAST guidelines. Nevertheless, they refer only microorganisms of human origin, and do not contain separate clinical breakpoint values for veterinary pathogens. Breakpoint values for strains isolated from humans are not suitable and should not be used for isolates derived from different animal species. These values consider the dosage and PK/PD parameters of antibiotics used in humans. As an alternative method for bacterial strains isolated from animals, EUCAST experts recommend the use of epidemiological cut-offs (ECOFF). However, these values have also been determined for human pathogens, so this is not an appropriate procedure despite expert opinion. In addition, the recommendations for human medicine do not include antibiotics used only in animals such as ceftiofur, cefovecin, cefquinome or florfenicol. Until now, only CLSI recommendations from 2015 provide clinical breakpoint values for major veterinary pathogens and for selected antibiotics [10]. Nonetheless, part of the data are missing, for example, there are no breakpoint values for chloramphenicol, rifampicin, trimethoprim with sulfamethoxazole and ticarcillin with clavulanic acid for staphylococci isolated from animals [10].

Within EUCAST structures, a veterinary subcommittee (Vet-CAST) was established in 2015 to unify testing methods and interpretation of the results of antimicrobial susceptibility testing for bacteria isolated from animals or bacteria with zoonotic potential in Europe. Similarly, in 2015, the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID) created a Research Group of Veterinary Microbiology (ESGVM) whose aim is to harmonize the methods of identification and testing of the susceptibility of veterinary pathogens. Work on the preparation of recommendations for veterinary pathogens in Europe is still in progress. Reliable breakpoint values should soon be established for different microorganisms isolated from different animal species. Due to the spread of multi-resistant pathogens among different animal species, there is an urgent need to assemble such data so that antibiogram results are more sensitive and specific.

7. Prevention of the antimicrobial resistance

Currently, one of the main challenges of microbiology, including veterinary, is the constantly increasing resistance of microorganisms to antibiotics. Antimicrobial stewardship programmes are one of many measures undertaken to counteract this process. They are used in many human hospitals and include detailed rules of cooperation between clinicians and the antibiotic therapy team within a specific institution [26]. Such programmes are currently rarely used in veterinary clinics where animals can be treated with stationary treatment [24]. In addition, also in veterinary medicine particular attention should be paid to the rationale antimicrobial use. Actions aimed at counteracting the increase in microbial resistance to antibiotics, including staphylococci, must cover both the area of human medicine and veterinary medicine in order to be fully effective. Furthermore, antimicrobial resistance should be perceived as a global problem [3].

Considerable controversy is related to the use of antibiotics in the veterinary medicine which is recognized by the World Health Organisation (WHO) as critically important for public health (Critically Important Antimicrobials, CIA). Currently, multi-drug resistant microorganisms are isolated more frequently in veterinary medicine. Apart from many gram-negative rods, staphylococci are also often multidrug resistant. The mechanism of resistance associated with the presence of the *mecA* gene is mainly linked to the *S. pseudintermedius* and *S. aureus* strains [29]. Such strains are in general resistant to antibiotics from various groups. [31]. In the absence of therapeutic options, veterinarians may, therefore, use linezolid or other antimicrobials classified as critically important for public health. The view is that antibiotics from the CIA group should be reserved for use only in human medicine, for the treatment of infections caused by multi-drug resistant microorganisms [21]. In Poland this problem has not been regulated by national recommendations for veterinarians so far. Veterinary microbiological laboratories also play an important role in the rational use of antibiotics and counteracting the increase in microbial resistance. To some extent, they have an impact on the promotion of CIA antimicrobials for animal treatment, if they are included in the susceptibility test. However, the final decision on their application remains in the hands of the veterinarian. According to general recommendations developed by experts from the International Society for Companion Animal Infectious Diseases (ISCAID), vancomycin, carbapenems, and linezolid (included in the CIA) should not be used in veterinary medicine. In exceptional cases, their use is allowed, provided that several conditions are met. It is necessary to confirm the aetiology of infection and

to document the lack of other therapeutic options for the isolated strain. Antibiotics from the CIA group can be used in animals only in case of possibility of successful treatment. It is recommended to consult a specialist in the field of animal infectious diseases and antimicrobial therapy, who should assess the rationality of therapy and plan the regimen of treatment [58]. National Danish and Swedish recommendations regarding rational antibiotic therapy in companion animals, suffering from infections caused by MRSP also do not recommend the use of CIA. It is acceptable to use them only in exceptional circumstances and after fulfilling the conditions listed above [5, 50].

Legal restrictions on the use of antibiotics currently apply only to farm animals. In accordance with European Union Regulation No. 1831/2003, the use of antibiotics as growth promoters in farm animals has been banned since 2006 [43]. Some European countries introduce further restrictions in their territories. In Denmark and the Netherlands, there is concern about the use of fluoroquinolones and third and fourth generation cephalosporins in farm animals. It can be assumed that a number of actions undertaken for rational use of antibiotics will in the future lead to restrictions or prohibition of the use of certain classes of antibiotics also in companion animals.

8. Summary

Veterinary diagnostic laboratory plays a key role in the identification of microorganisms causing infectious diseases. The introduction of modern diagnostic methods based on the analysis of genetic material or protein profile significantly reduces the time needed to detect bacteria and facilitates the correct diagnosis of pathogens. This is particularly important for isolates from animals in whom identification using traditional biochemical methods in many cases is difficult or even impossible. Despite the development of methods used in microbiological diagnostics veterinary laboratories, in general, continue to employ traditional culture methods for identification and antimicrobial susceptibility testing.

Currently, the basic challenge for the veterinary microbiological diagnostics is the lack of unified methods for determining the susceptibility of microorganisms isolated from animals and the absence of breakpoint values specific for individual antibiotics and species of microorganisms obtained from different animal species. An integral element of effective infectious diseases control is the implementation of a rational antibiotic therapy in veterinary clinics. A continuous training process is needed to improve the qualifications of staff employed in veterinary laboratories. Recommendations regarding test methodology and interpre-

tation of results relating to veterinary microbiological diagnostics are urgently needed and soon, they will probably be developed by Vet-CAST and ESGVM.

Acknowledgements

The article was translated by EURO-ALPHABET from Polish into English under agreement 659/P-DUN/2018 and funded by the Ministry of Science and Higher Education.

References

- 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)
- 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)
- 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)
- 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)
- Antibiotic Use Guidelines for Companion Animal Practice. https://www.ddd.dk/sektioner/familiedyr/antibiotikavejledning/Documents/AntibioticGuidelines%20-%20v1.4_jun15.pdf (27.03.2018)
- 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)
- Becker K., Heilmann C., Peters G.: Coagulase-negative staphylococci. *Clin. Microbiol. Rev.* **27**, 870–926 (2014)
- 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)
- Bond R., Loeffler A.: What's happened to *Staphylococcus intermedius*? Taxonomic revision and emergence of multi-drug resistance. *J. Small Anim. Pract.* **53**, 147–154 (2012)
- 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).
- Coates R., Moran J., Horsburgh M.J.: Staphylococci: colonizers and pathogens of human skin. *Future Microbiol.* **9**, 75–91 (2014)
- 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
- 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)
- 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)
- 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)
- 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)
- El-Bouri K., Johnston S., Rees E., Thomas I., Bome-Manathoko N., Jones C., Reid M., Ben-Ismael 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)
- 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)
- Europejski Komitet ds. Oznaczenia Lekowrażliwości, European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing, EUCAST, <http://www.eucast.org> (14.02.2018)
- 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)
- Frank L.A., Loeffler A.: Methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius*: clinical challenge and treatment options. *Vet. Dermatol.* **23**, 283–291 (2012)
- Gordon N.C., Golubchik T. i wsp.: Prediction of *Staphylococcus aureus* antimicrobial resistance by whole-genome sequencing. *J. Clin. Microbiol.* **52**, 1182–1191 (2014)
- 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)
- 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).
- 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)
- 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)
- 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 break-points 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)
- 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
- Kadlec K., Schwarz S.: Antimicrobial resistance of *Staphylococcus pseudintermedius*. *Vet. Dermatol.* **23**, 276–282 (2012)
- 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. Kmiecik 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 *cf*r plasmids in linezolid-resistant methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* and vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* (VRE) from a hospital outbreak: co-location of *cf*r and *op*trA 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., Pantůček R., Hubálek Z., Falsen E., Busse H.J., Schumann P., Sedláček 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., Hirota 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 Vliegheer 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/168838e186de455ca7fe868bee92d209/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 Vliegheer 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 Vliegheer 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)

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

Zakład Mikrobiologii, Katedra Nauk Przedklinikcznych, 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 *Staphylococcus pseudintermedius* – z użyciem oksacyliny. Ważnym problemem weterynaryjnych laboratoriów mikrobiologicznych jest ograniczona liczba ujednoczonych 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 zawierają takie zalecenia, choć w organicznym zakresie. Rekomendacje opracowane przez EUCAST są przeznaczone dla mikroorganizmów izolowanych od ludzi i nie powinny być stosowane przez laboratoria weterynaryjne. Ponadto dostępne zalecenia nie uwzględniają nowych gatunków gronkowców. Istnieje 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 Przedklinikcznych, 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 przeprowadzenie 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 *Staphylococcus 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 ujednoczonymi 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 odporne, wrażliwe lub średniowrażliwe. 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 log₂ 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 leko-

wrażliwości 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 wskazujące 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 cefoksytiną, 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 cefoksytiną pojawia się strefa zahamowania wzrostu o średnicy pozwalającej na zakwalifikowanie tego szczepu jako metycylino-wrażliwego [46].

Rekomendacje CLSI oraz EUCAST odnośnie wykrywania 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 uży-

ciem metody krążkowo-dyfuzyjnej z oksacyliną oraz wyznaczenie 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 *Staphylococcus 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 wartości 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 ujednoczenie 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 klinicyków 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 odporne 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 spełnieniu 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

- 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)
- 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)
- 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)
- 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)
- Antibiotic Use Guidelines for Companion Animal Practice. https://www.ddd.dk/sektioner/familiedyr/antibiotikavejledning/Documents/AntibioticGuidelines%20-%20v1.4_jun15.pdf (27.03.2018)
- 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)
- Becker K., Heilmann C., Peters G.: Coagulase-negative staphylococci. *Clin. Microbiol. Rev.* **27**, 870–926 (2014)
- 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)
- 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)
- 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).
- Coates R., Moran J., Horsburgh M.J.: Staphylococci: colonizers and pathogens of human skin. *Future Microbiol.* **9**, 75–91 (2014)
- 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
- 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)
- 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)
- 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)
- 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)
- El-Bouri K., Johnston S., Rees E., Thomas I., Bome-Manathoko N., Jones C., Reid M., Ben-Ismael 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)

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

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. Oznaczenia 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.: Methicillin-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., Biniek 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., Biniek 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., Biniek M.: *Staphylococcus pseudintermedius* – trudno rozpoznawalny patogen. *Post. Mikrobiol.* **54**, 103–114 (2015)
33. Kmiecik 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., Pantůček R., Hubálek Z., Falsen E., Busse H.J., Schumann P., Sedláček 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., Hirotsuki 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 Vlieghe 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)