

Rekomendacje doboru testów do oznaczania wrażliwości bakterii na antybiotyki i chemioterapeutyki 2010

Oznaczanie wrażliwości ziarniaków Gram-dodatnich

z rodzaju *Staphylococcus* spp.

Dorota Żabicka¹, Waleria Hryniewicz^{1,2}

1. Zakład Epidemiologii i Mikrobiologii Klinicznej, Narodowy Instytut Leków

2. Centralny Ośrodek Badań Jakości w Diagnostyce Mikrobiologicznej

8. Oznaczanie wrażliwości *Staphylococcus* spp.

8.1. Najważniejsze mechanizmy oporności

8.1.1 Mechanizmy oporności na antybiotyki β -laktamowe

U gronkowców wyróżnia się dwa mechanizmy oporności na antybiotyki β -laktamowe:

- produkcję β -laktamaz, skutkującą opornością na penicyliny naturalne, amino- i ureidopenicyliny
- produkcję nowego białka ,PBP2a, zwanego także PBP2' o niskim powinowactwie do antybiotyków β -laktamowych skutkującą opornością na wszystkie antybiotyki β -laktamowe obecnie stosowane w leczeniu i określaną mianem oporności na metycylinę.

W rutynowych oznaczeniach w laboratorium mikrobiologicznym można pominąć oznaczanie wrażliwości na penicylinę, ponieważ ocenia się, że 80-90% szczepów gronkowców jest zdolnych do wytwarzania β -laktamaz. Produkcja β -laktamaz ma najczęściej charakter indukowalny, a więc zachodzi w obecności antybiotyku β -laktamowego. Szczepy gronkowców produkujące β -laktamazę są odporne na penicylinę, ampicylinę, amoksycylinę, oraz ureidopenicyliny (np. piperacylinę) i tikarcylinę. Szczepy wytwarzające β -laktamazę, ale wrażliwe na metycylinę są wrażliwe na: tzw. penicyliny przeciwgronkowcowe, które są odporne na działanie penicylinaz gronkowcowych, takie jak metycylina (obecnie nie

stosowana), nafcylina oraz penicyliny izoksazolilowe: oksacylina, kloksacylina (jedyna dostępna w Polsce, Syntarpen), dikloksacylina, flukloksacylina., a także na cefalosporyny (największą aktywność wykazują cefalosporyny I i II generacji), penicyliny z inhibitorami i karbapenemy. Szczepy wrażliwe na metycylinę oznaczane są skrótem MSSA (metycylinowrażliwe *S.aureus*), MSCNS (metycylinowrażliwe gronkowce koagulazo-ujemne). Sposób wykonania oznaczenia wrażliwości na penicylinę omówiono w punkcie 8.5.1.

Z klinicznego i epidemiologicznego punktu widzenia najważniejszym obecnie mechanizmem oporności na antybiotyki β -laktamowe u *Staphylococcus* spp. jest oporność na metycylinę (określana w literaturze także jako oporność na oksacylinę), która oznacza brak wrażliwości klinicznej na wszystkie antybiotyki β -laktamowe dotychczas stosowane w terapii. Gronkowce odporne na metycylinę określane są skrótami: MRSA w przypadku metycylinoopornych szczepów *Staphylococcus aureus* oraz MRCNS w przypadku metycylinoopornych szczepów gronkowców koagulazo-ujemnych, a także MRSE w przypadku metycylinoopornych *Staphylococcus epidermidis*. Oporność na metycylinę warunkowana jest obecnością nowego białka wiążącego penicylinę zwanego PBP2a lub PBP2', kodowanego przez gen *mecA* zlokalizowany w chromosomie i stanowiący część regionu noszącego nazwę SCC*mec* (gronkowcowa kasetta chromosomalna *mec*, ang. staphylococcal cassette chromosome *mec*). W odróżnieniu od pozostałych białek PBP, białko PBP2a nie ulega hamowaniu przez antybiotyki β -laktamowe z powodu obniżonego powinowactwa do tych antybiotyków. Białko PBP2a zachowuje swoją funkcję enzymatyczną i uczestniczy w syntezie ściany komórkowej, ale jego ekspresja zachodzi tylko w obecności β -laktamu. Oporność na metycylinę może mieć charakter homogeny, gdy wszystkie komórki danej populacji gronkowca oznaczanych w badaniach *in vitro* wykazują fenotyp oporności lub heterogeny, gdy tylko część komórek danej populacji wykazuje fenotyp oporności [1, 2]. **Zarówno szczepy o homogennej jak i heterogennej oporności na metycylinę są klinicznie odporne na wszystkie antybiotyki β -laktamowe.**

Metycylinooporne *S.aureus* (MRSA) i metycylinooporne gronkowce koagulazo-ujemne (MRCNS) mogą być izolowane zarówno od pacjentów szpitalnych jak i z zakażeń pozaszpitalnych. Szczepy *S.aureus* odporne na metycylinę izolowane dotychczas od pacjentów szpitalnych (HA-MRSA ang. hospital acquired MRSA) są z definicji wielooporne, najczęściej niewrażliwe na tetracykliny, aminoglikozydy, makrolidy i linkosamidy, a często również na fluorochinolony, chloramfenikol, trimetoprim/sulfametoksazol, kwas fusydowy i rifampicynę [1, 10, 11, 17]. Opisano także gronkowce odporne na wankomycynę, linezolid,

chinuprystynę/dalfoprystynę oraz daptomycynę [7, 17., 19, 21]. Natomiast szczepy *S.aureus* odporne na metycylinę izolowane z typowych zakażeń pozaszpitalnych (CA-MRSA *ang.* community acquired MRSA) są z definicji odporne na wszystkie β -laktamy, a dodatkowo na tetracykliny i niekiedy na makrolidy [1, 10, 16, 18]. Szczepy CA-MRSA wywołują najczęściej pierwotne zakażenia skóry i tkanek miękkich (ropnie, czyraki) oraz rzadziej martwicze zapalenie płuc. Związane jest to z wytwarzaniem toksyny - leukocydyny Panton-Valentine (PVL) [16, 18]. CA-MRSA mogą sprawiać trudności diagnostyczne, ponieważ często wykazują bardzo wysoce heterogenną ekspresję oporności na metycylinę. W ciągu ostatnich lat pojawiły się także doniesienia o występowaniu MRSA u zwierząt gospodarskich (świnie, konie, bydło) i domowych (koty, psy), przy czym zwierzęta domowe są najczęściej kolonizowane i zakażane przez szczepy MRSA pochodzenia ludzkiego. Obserwowano również nosicielstwo i zakażenia u ludzi wywoływane przez odporne na metycylinę szczepy *S. aureus* pochodzenia zwierzęcego, charakterystyczne dla zwierząt gospodarskich. Najwięcej badań poświęcono jak dotąd szczepom MRSA izolowanym od świń, bydła i koni. Szczepy izolowane ze środowiska chlewni oraz z przypadków kolonizacji u hodowców świń, pracowników chlewni, rzeźni i lekarzy weterynarii, nazywane FA-MRSA (*ang.* farm associated MRSA) lub LA-MRSA (*ang.* livestock associated MRSA) należały do jednego kompleksu klonalnego ST398 i charakteryzowały się opornością na tetracykliny, a niekiedy również erytromycynę, linkomycynę, kanamycynę i gentamicynę [23].

Oznaczanie wrażliwości na metycylinę u wszystkich gatunków gronkowców wykonuje się z użyciem krążka z cefoksytyną 30 μ g [2, 13, 14, 15]. Interpretację wyników oznaczania wrażliwości na metycylinę z użyciem krążka z cefoksytyną 30 μ g podano w tab. 8.1. Odczytu wyników oznaczania oporności na metycylinę dokonuje się po 24 godz. inkubacji w temperaturze 35°C. Utrzymanie inkubacji do 24 godzin umożliwi wykrycie szczepów o heterogennym fenotypie oporności na metycylinę. Wynik oznaczania wrażliwości na metycylinę jest jednocześnie wynikiem dla wszystkich antybiotyków β -laktamowych i nie należy oznaczać wrażliwości na inne leki z tej grupy, a wykonanie takiego oznaczenia może prowadzić do uzyskiwania niewiarygodnych wyników (aktywność *in vitro*, przy braku skuteczności klinicznej) i poważnych skutków klinicznych i epidemiologicznych. Szczepy odporne na metycylinę są klinicznie odporne na wszystkie antybiotyki β -laktamowe dotychczas stosowane w terapii, czyli na penicyliny, aminopenicyliny, penicyliny izoksazolilowe (oksacylina, kloksacylina, dikloksacylina, flukloksacylina), nafcylinę, cefalosporyny, penicyliny z inhibitorami, cefalosporyny z

inhibitorami i karbapenemy. Nadzieje wiąże się z niezarejestrowanymi dotychczas w krajach UE nowymi cefalosporynami o aktywności anty-MRSA takimi jak ceftobiprol, które wykazują aktywność *in vitro* wobec szczepów MRSA.

Do grupy szczepów opornych na oksacylinę, oprócz szczepów wykazujących ekspresję genu *mecA* i produkujących białko PBP2a zaliczane są również tzw. szczepy MOD-SA (*ang. modified S.aureus*). Szczepy MOD-SA występują bardzo rzadko, charakteryzują się wartościami MIC oksacyliny ≥ 4 mg/L i wykazują oporność na oksacylinę w wyniku zmiany powinowactwa do oksacyliny innych niż PBP2A białek wiążących penicylinę, występujących w ścianie komórkowej gronkowca.

Uwaga!

Do identyfikacji oporności na metycylinę zarówno u *S.aureus* jak i u gronkowców koagulazo-ujemnych spośród metod dyfuzyjno-krażkowych zalecana jest obecnie metoda z użyciem krążka z cefoksytiną 30 μ g [2,15]. Interpretację wyników oznaczania wrażliwości na metycylinę z użyciem krążka z cefoksytiną 30 μ g u *Staphylococcus lugdunensis* wykonuje się z zastosowaniem wartości granicznych dla *S.aureus*. Interpretację wyników oznaczania wrażliwości na metycylinę z użyciem krążka z cefoksytiną 30 μ g u pozostałych gatunków gronkowców koagulazo-ujemnych (z wyjątkiem *S.lugdunensis*) wykonuje się według osobnych kryteriów. Wartości graniczne dla metody dyfuzyjno-krażkowej z zastosowaniem krążka z cefoksytiną 30 μ g przedstawiono w tabeli 8.1.

Metoda przeglądowa do oznaczania oporności na metycylinę z oksacyliną w podłożu może być stosowana jako metoda wykrywania oporności na metycylinę jedynie u *S.aureus*. W przypadku niejednoznacznych wyników w metodzie przeglądowej z oksacyliną w podłożu, wynik należy potwierdzić stosując testy wykrywające białko PBP2a, produkt genu *mecA*. Należy pamiętać, że dostępne testy oparte o metodę aglutynacji lateksowej wykrywające białko PBP2a dają miarodajne wyniki jedynie w przypadku izolatów *S aureus*.

Wykrywanie obecności genu *mecA* metodą PCR jest nadal uznawane za "złoty standard" i powinno być wykonywane w przypadku uzyskania niejednoznacznych wyników w metodach fenotypowych, zarówno w przypadku *S.aureus* jak i gronkowców koagulazo-ujemnych. Izolaty z ciężkich zakażeń inwazyjnych podejrzane o fenotyp

MRSA i sprawiające trudności diagnostyczne należy przesłać w celu potwierdzenia do KORLD.

Ośrodki III stopnia referencyjności powinny przechowywać szczepy MRSA jako patogenów alarmowych w przypadku ich izolacji z zakażeń inwazyjnych.

Tab. 8.1. Interpretacja wyników oznaczenia wrażliwości na metycylinę izolatów *Staphylococcus* spp. w metodzie dyfuzyjno-krażkowej (średnica strefy w mm). **Odczyt po 24h inkubacji w temp. 33-35°C, nie przekraczać 35°C [15].**

Krażek z antybiotykiem	<i>Staphylococcus aureus</i> i <i>Staphylococcus lugdunensis</i>		Koagulazo-ujemne gronkowce, (CNS <i>ang. coagulase- negative staphylococci</i>) (z wyjątkiem <i>S. lugdunensis</i>)	
	oporny	wrażliwy	oporny	wrażliwy
Cefoksytyna 30 µg	≤21	≥22	≤24	≥25

8.1.2. Oporność na glikopeptydy

W przypadku izolacji szczepów MRSA lub nadwrażliwości na β-laktamy antybiogram powinien uwzględniać oznaczenie wrażliwości na wankomycynę. **Należy zawsze wykonać oznaczenie MIC wankomycyny (minimalnego stężenia hamującego), ponieważ metoda dyfuzyjno-krażkowa nie daje wiarygodnych wyników.** Szczepy *S.aureus* izolowane w Polsce charakteryzują się wartościami MIC wankomycyny w zakresie 0,5-2,0 µg/mL [10, 11]. Sporadycznie pojawiają się szczepy o obniżonej wrażliwości na wankomycynę i teikoplaninę nazywane VISA (*ang. vancomycin-intermediate S.aureus*) lub bardziej prawidłowo GISA (*ang. glycopeptide-intermediate S.aureus*). Szczepy takie charakteryzują się homogeną (GISA) lub heterogeną ekspresją oporności (hGISA) na glikopeptydy. W przypadku szczepów GISA stwierdza się wartości MIC wankomycyny w zakresie 2-8 µg/mL i teikoplaniny ≥ 8 µg/mL., a w przypadku szczepów hGISA wartości MIC wankomycyny w zakresie 1-4 µg/mL i teikoplaniny w zakresie 0,5-8 µg/mL. Obecnie uważa się, że szczep można zaliczyć do grupy tzw. prawdziwych VISA (*ang. true VISA*), jeśli charakteryzuje się MIC wankomycyny ≥4 mg/L w oznaczeniu metodą rozcieńczeń w bulionie. Wielu badaczy

zwraca uwagę na fakt, że terminy VISA i GISA stopniowo stają się terminami historycznym, ze względu na fakt, że zalecenia EUCAST, obowiązujące w wielu krajach Unii Europejskiej, w tym także w Polsce od 1 stycznia 2011 roku, podają jedynie kliniczną wartość graniczną wankomycyny i teikoplaniny dla szczepów wrażliwych ≤ 2 mg/L, a wszystkie szczepy o wartościach MIC > 2 mg/L zaliczane są do kategorii „oporny”. **Wszystkie szczepy *S.aureus* o wartościach MIC wankomycyny > 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ należy badać w kierunku obniżonej wrażliwości na glikopeptydy (metodyka punkt 8.5.5.) i przesłać do KORLD w celu potwierdzenia.**

Jak dotąd rejestrowano jedynie sporadycznie i to wyłącznie w USA zakażenia wywoływane przez szczepy *S.aureus* odporne na wankomycynę (VRSA – ang. vancomycin-resistant *S.aureus*). W kilku przypadkach udało się ustalić, że oporność na wankomycynę była u tych szczepów warunkowana obecnością genu *vanA*, przeniesionego od enterokoków. Szczepy *S.aureus* posiadające gen *vanA* charakteryzowały się wysokimi wartościami MIC wankomycyny (128-256 $\mu\text{g}/\text{mL}$) [12]. W przypadku kilku szczepów VRSA systemy automatyczne nie wykryły u nich oporności na wankomycynę. Biorąc to pod uwagę **zaleca się oznaczanie MIC wankomycyny metodą mikrorozcieńczeń w bulionie lub metodą dyfuzji z paska zawierającego gradient antybiotyku dla wszystkich szczepów izolowanych z ciężkich zakażeń od pacjentów z długo stosowaną terapią glikopeptydami. W przypadku stwierdzenia braku poprawy stanu klinicznego u pacjenta leczonego długo glikopeptydami oznaczenie MIC wankomycyny należy powtórzyć dla kolejnych izolatów *S.aureus* hodowanych od takiego pacjenta.**

Gronkowce koagulazo-ujemne charakteryzują się wyższymi wartościami MIC glikopeptydów niż *S. aureus*. CLSI dla gronkowców koagulazo-ujemnych proponuje następujące kliniczne wartości graniczne: wankomycyna wrażliwy ≤ 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$, oporny ≥ 32 $\mu\text{g}/\text{mL}$; teikoplanina wrażliwy ≤ 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$, oporny ≥ 32 $\mu\text{g}/\text{mL}$ [15]. EUCAST proponuje natomiast następujące wartości graniczne: wankomycyna wrażliwy ≤ 2 mg/L, oporny > 2 mg/L, teikoplanina wrażliwy ≤ 4 mg/L, oporny > 4 mg/L.

8.2. Metody

Stosowane podłoże MHA, zawiesina bakteryjna o gęstości 0,5 McFarlanda inkubacja w atmosferze tlenowej 16-18h w temp. 33-35°C, nie przekraczać 35°C. **W przypadku cefoksytyny i wankomycyny inkubacja 24h.** Metody wykonania oznaczeń opisano

dokładnie w tym opracowaniu w rozdziale 8.5: „Metody oznaczania lekowrażliwości i mechanizmów oporności u *Staphylococcus spp.*”.

8.3. ANTYBIOGRAM PODSTAWOWY

W przypadku izolacji bakterii z rodzaju *Staphylococcus spp.* **obowiązkowe jest dokładne określenie gatunku oraz wykonanie oznaczenia wrażliwości na metycylinę** dla wszystkich szczepów wyhodowanych z przypadków zakażeń oraz dla szczepów *S.aureus* izolowanych w badaniach na nosicielstwo.

Tab. 8.2. ANTYBIOGRAM PODSTAWOWY

Antybiotyk	Krażek	Uwagi
Cefoksytyna	30 µg	Krażek z cefoksytiną najlepiej wykrywa oporność na metycylinę, która jest warunkowana obecnością genu <i>mecA</i> zarówno u <i>S.aureus</i> jak i u gronkowców koagulazo-ujemnych [2, 14, 15]. Jednak w wyniku oznaczania lekowrażliwości należy podawać informację o oporności szczepu na metycylinę, czyli wszystkie antybiotyki β-laktamowe. Interpretacja wyników oznaczania lekowrażliwości patrz tab. 8.1.
Erytromycyna	15 µg	Wynik oznaczania wrażliwości na erytromycynę jest reprezentatywny dla roksytromycyny, klarytromycyny i azytromycyny. Metoda dwóch krążków i interpretacja fenotypów oporności patrz punkt 8.5.2.
Klindamycyna	2 µg	Oznaczenie indukcyjnej oporności na klindamycynę metodą dwóch krążków. Metoda i interpretacja fenotypów oporności patrz punkt 8.5.2

Tab. 8.3. ANTYBIOGRAM PODSTAWOWY DLA SZCZEPÓW IZOLOWANYCH Z MOCZU

Antybiotyk	Krażek	Uwagi
Cefoksytyna	30 µg	Oznaczenie wrażliwości na antybiotyki β-laktamowe - patrz tabela 8.1.
Norfloksacyna	10 µg	Wrażliwość na norfloksacynę oznacza wrażliwość na ciprofloksacynę, ofloksacynę, lewofloksacynę, i moksifloksacynę. W przypadku stwierdzenia oporności na norfloksacynę należy oznaczyć wrażliwość dla leku, który ma być zastosowany w terapii.
Nitrofurantoina	300 µg	

Trimetoprim	5 µg	
Trimetoprim/sulfametoksazol	1,25/23,75 µg	

Uwaga: Dla *Staphylococcus saprophyticus* izolowanego z moczu nie jest konieczne rutynowe oznaczanie lekowrażliwości, ponieważ zakażenie to dobrze odpowiada na leczenie standardowymi dawkami leków stosowanych w leczeniu ostrych zapaleń pęcherza moczowego (np. nitrofurantoina, fluorochinolony, trimetoprimu/sulfametoksazol, trometamol fosfomycyny).

8.4 ANTYBIOGRAM ROZSZERZONY

We wszystkich ciężkich zakażeniach oraz w przypadku niepowodzeń terapeutycznych należy bezwzględnie oznaczać MIC (minimalne stężenie hamujące leku). Ośrodki III stopnia referencyjności powinny przechowywać szczepy MRSA jako patogenów alarmowych w przypadku ich izolacji z zakażeń inwazyjnych.

Tab. 8.4. ANTYBIOGRAM ROZSZERZONY

Antybiotyk	Krażek	Uwagi
Wankomycyna	wyłącznie oznaczanie MIC	Lek stosowany głównie w leczeniu zakażeń o etiologii MRSA. Należy zawsze wykonać oznaczenie MIC. Metoda dyfuzyjno-krażkowa nie pozwala na odróżnienie wrażliwych izolatów <i>S.aureus</i> i gronkowców koagulazo-ujemnych od średniowrażliwych i z obniżoną wrażliwością na glikopeptydy (GISA). Schemat oznaczania wrażliwości na wankomycynę dla <i>S.aureus</i> – patrz punkt 8.5.5. Szczepy o wartościach MIC>2µg/mL należy przesłać do KORLD.
Teikoplanina	wyłącznie oznaczanie MIC	Należy zawsze wykonać oznaczenie MIC. Metoda dyfuzyjno-krażkowa może dawać niewiarygodne wyniki. Teikoplanina jest mniej aktywna od wankomycyny wobec szczepów gronkowców koagulazo-ujemnych zwłaszcza <i>S.haemolyticus</i> .
Daptomycyna	wyłącznie oznaczanie MIC	Lek stosowany w leczeniu skomplikowanych zakażeń o etiologii MRSA. Należy zawsze wykonać oznaczenie MIC. Metoda dyfuzyjno-krażkowa nie jest wiarygodna. Aktywność leku jest zależna od obecności jonów wapnia w podłożu; metodyka wykonania oznaczenia patrz punkt 8.5.3. Szczepy o wartościach MIC≥1 µg/mL należy przesłać do KORLD.
Tetracyklina	30 µg	Szczepy wrażliwe na tetracyklinę należy uważać za wrażliwe na doksycyklinę. Szczepy średniowrażliwe lub odporne na tetracyklinę mogą być wrażliwe na doksycyklinę, minocyklinę (niedostępna w Polsce) lub tigecyklinę.
Tigecyklina	15 µg	Lek stosować w leczeniu skomplikowanych zakażeń o etiologii MRSA. Oznaczanie metodą dyfuzyjno-krażkową i oznaczanie MIC metodą rozcieńczeniową zgodnie ze standardową metodyką CLSI, oznaczanie

		MIC metodą dyfuzji z paska zawierającego gradient antybiotyku wg instrukcji producenta [3, 14, 15]. Metodyka oznaczenia MIC metodą rozcieńczeń w bulionie lub w agarze patrz punkt 8.5.4. Szczepy wrażliwe strefa zahamowania wzrostu ≥ 18 mm, niewrażliwe < 18 mm [4]. Zgodnie z zaleceniami EUCAST i FDA szczepy wrażliwe $MIC \leq 0,5$ $\mu\text{g/mL}$, niewrażliwe $MIC > 0,5$ $\mu\text{g/mL}$ [4, 5]. Wszystkie szczepy o wartościach $MIC > 0,5$ $\mu\text{g/mL}$ należy przesłać do KORLD.
Chloramfenikol	30 μg	Stosować wyjątkowo (ze względu na działania niepożądane) wobec szczepów izolowanych z płynu mózgowo-rdzeniowego lub niewrażliwych na wszystkie inne antybiotyki (należy oznaczyć MIC). Lek niedostępny w Polsce do działania ogólnego
Ciprofloksacyna lub Ofloksacyna	5 μg 5 μg	Należy pamiętać o możliwości szybkiego narastaniu oporności na fluorochinolony u gronkowców w ciągu trzech do czterech dni od rozpoczęcia terapii; nie stosować w przypadku MRSA.
Rifampicyna	5 μg	Stosować wyjątkowo, wyłącznie w ciężkich zakażeniach wobec szczepów wieloopornych; nigdy nie stosować w monoterapii.
Gentamicyna lub Amikacyna Tobramycyna Netilmycyna Kanamycyna	10 μg 30 μg 10 μg 30 μg 30 μg	Oporność na gentamicynę oznacza kliniczną oporność na wszystkie aminoglikozydy (niezależnie od wyników uzyskanych <i>in vitro</i> dla pozostałych preparatów) z wyjątkiem streptomycyny. Wrażliwość na gentamicynę nie oznacza wrażliwości na pozostałe aminoglikozydy. W takim przypadku można oznaczać wrażliwość dla innych niż gentamicyna aminoglikozydów. Oporność na kanamycynę oznacza także oporność na amikacynę (używać krążka z kanamycyną). Oporność na tobramycynę zawsze oznacza oporność na kanamycynę i amikacynę [4].
Trimetoprim/ sulfametoksazol	1,25/23,75 μg	
Mupirocyna TO PRZENIEŚĆ NA KONIEC TABELI	200 μg	Służy do likwidacji nosicielstwa MRSA w nosie (tylko preparat na bazie parafiny), należy wyeliminować stosowanie w szpitalach we wskazaniach dermatologicznych (preparat na bazie glikolu polietylenowego) ze względu na zidentyfikowanie w Polsce epidemicznego, szpitalnego szczepu MRSA o wysokiej oporności na mupirocynę. Brak strefy zahamowania wzrostu wokół krążka świadczy o wysokiej oporności.
Linezolid	30 μg	Lek może być skuteczny w leczeniu zakażeń o etiologii MRSA, GISA, VRSA. Szczepy identyfikowane jako niewrażliwe należy przesłać do KORLD. Odczyt wyników w świetle przechodzącym. Oznaczając MIC linezolidu metodą dyfuzji w agarze z paska nasączonego gradientem antybiotyku należy pamiętać o prawidłowym odczycie strefy zahamowania wzrostu (strefa jest rozmyta i odczyt MIC wykonuje się biorąc pod uwagę wzrost 80% kolonii z zawiesiny)
Kwas fusidowy	10 μg	Szczepy odporne - strefa zahamowania < 22 mm., wrażliwe ≥ 22 mm [4]. Nie stosować w monoterapii.
Chinupristyna/ dalfopristyna	15 μg	Lek może być zastosowany do leczenia zakażeń o etiologii GISA, VRSA. Wobec szczepów opornych na makrolidy w mechanizmie MLS_B nie wykazuje działania bakteriobójczego. Wiele działań niepożądanych.. Lek niedostępny w Polsce do stosowania ogólnego.

8.5. Metody oznaczania lekowrażliwości i mechanizmów oporności *Staphylococcus spp.*

8.5.1 Wykrywanie oporności na antybiotyki β -laktamowe

8.5.1.1. Oznaczanie wrażliwości na penicylinę

Oznaczanie wrażliwości na penicylinę wykonuje się stosując krążek z penicyliną 10 UI (dla wszystkich wrażliwych szczepów gronkowców wielkość strefy ≥ 29 mm). **Wrażliwość na penicylinę** należy potwierdzić u szczepów o wielkości strefy zahamowania wzrostu wokół krążka z penicyliną 10 UI ≥ 29 mm lub wartości MIC penicyliny $\leq 0,12$ $\mu\text{g/mL}$ wykonując test cefinazowy wykrywający produkcję indukowalnej β -laktamazy. Materiał do wykonania testu zbiera się z krawędzi strefy zahamowania wzrostu wokół krążka z penicyliną, tak aby oznaczenie wykonać z populacją komórek z indukcją produkcji β -laktamazy. Jako kontrole stosuje się szczepy: *S.aureus* ATCC 29213 jako kontrolę dodatnią oraz *S.aureus* ATCC 25923 jako kontrolę ujemną [14, 15].

8.5.1.2. Oznaczanie wrażliwości na meticylinę. Metoda dyfuzyjno-krążkowa z cefoksytyną [15]

- Podłoże: MHA (Muller Hinton agar)
- Zawiesina bakteryjna o gęstości 0,5 McFarlanda
- Nanieść zawiesinę na podłoże jałową wymazówką
- Nanieść krążek z cefoksytyną 30 μg
- Inkubacja: 24h w temp. 33-35°C, w atmosferze tlenowej.

Odczyt: wykonać pomiar strefy zahamowania wzrostu (zwrócić szczególną uwagę na pojedyncze kolonie w strefie). Odczyt przeprowadzić w świetle odbitym,. Interpretować wg zaleceń CLSI - patrz tabela 8.1. A EUCAST!!!

8.5.1.3. Oznaczanie wrażliwości *S aureus* na meticylinę. Metoda przeglądowa z oksacyliną w podłożu [15].

- Podłoże: MHA z oksacyliną w stężeniu 6 $\mu\text{g/mL}$ i dodatkiem 4% NaCl.
- Zawiesina bakteryjna o gęstości 0,5 McFarlanda.
- Sposób wykonania:
 - 1. zanurzyć wykalibrowaną eżę (1 μL) w zawieszynie bakteryjnej, a następnie nanieść ją na podłoże i rozprowadzić w postaci plamki o średnicy 10-15 mm; **lub**

- 2. zanurzyć wymazówkę w zawieszynie bakteryjnej i rozprowadzić w postaci plamki o średnicy 10-15 mm lub na całej płytce.
- Inkubacja: 24h w 35°C, w atmosferze tlenowej.
- Odczyt: wzrost więcej niż jednej kolonii oznacza oporność na metycylinę; odczytywać w świetle przechodzącym.

8.5.1.4. Testy wykrywające białko PBP2a (PBP2') u *S.aureus*

Stosowane są testy aglutynacji lateksowej umożliwiające wykrywanie białka PBP2a, produktu genu *mecA* warunkującego oporność na metycylinę. Dostępne testy różnych producentów (np. Slidex® MRSA Detection - BioMerieux, Oxoid PBP2' Test - Oxoid) umożliwiają wykonanie oznaczenia jedynie u izolatów *S. aureus*. Wykonanie testu zgodnie z zaleceniami producenta.

8.5.1.5. Oznaczanie MIC (minimalnego stężenia hamującego) oksacyliny

Stosowana jest metoda mikrorozcieńczeń w bulionie [12] lub metoda dyfuzji z paska zawierającego gradient antybiotyku [3, 20].

- **Metoda mikrorozcieńczeń w bulionie:**
 - Seryjne rozcieńczenia oksacyliny w bulionie Mueller-Hinton z odpowiednim stężeniem kationów (CAMHB) i z dodatkiem 2% NaCl.
 - Zalecane inokulum wynosi 5×10^5 CFU/mL
 - Inkubacja 24h w 35°C, w atmosferze tlenowej
- **Metoda dyfuzji z paska zawierającego gradient antybiotyku** – wykonanie zgodnie z zaleceniami producenta [3, 20].
 - Do oznaczenia stosuje się podłoże MHA (Mueller Hinton agar) z dodatkiem 2% NaCl
 - Zawiesina bakteryjna o gęstości 0,5 McFarlanda
 - Nanieść zawiesinę wymazówką na płytkę rozprowadzającą w trzech kierunkach; stosować jedną wymazówkę na płytkę
 - Nanieść pasek nasączony gradientem antybiotyku.
 - Inkubacja 24h w 35°C, w atmosferze tlenowej.
 - Odczyt w świetle przechodzącym z użyciem lupy. Obecność pojedynczych kolonii i podrost w strefie zahamowania wzrostu wokół paska traktować jako oporność na dane stężenie antybiotyku.

- W przypadku oznaczania MIC u *Staphylococcus epidermidis* odczytu należy dokonać po 48 godzinach inkubacji.

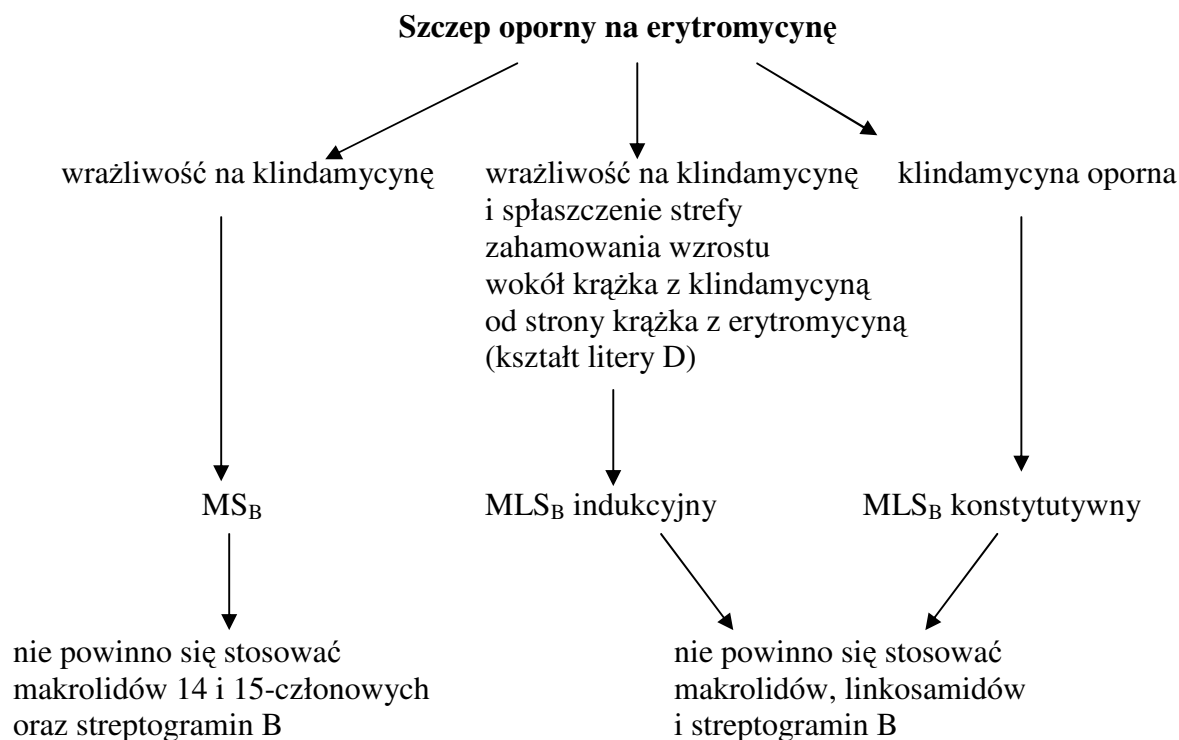
8.5.2. Oznaczanie wrażliwości na makrolidy i linkosamidy

Zawsze należy wykonać oznaczenie metodą dwóch krążków, bo jedynie metoda dyfuzyjno-krążkowa pozwala wykryć indukcyjny mechanizm oporności na makrolidy, linkosamidy i streptograminy B.

- Podłoże MHA.
- Zawiesina bakteryjna o gęstości 0,5 McFarlanda.
- Nanosimy zawiesinę na podłoże jałową wymazówką, nakładamy krążki z erytromycyną 15 µg i klindamycyną 2 µg w odległości 15-26 mm od krawędzi krążków.
- Inkubacja: 16-18 h w temp. 33-35°C, w atmosferze tlenowej.
- Odczyt i interpretacja kliniczna – patrz rycina 8.1 W przypadku oporności na erytromycynę należy zwracać uwagę na spłaszczenie strefy zahamowania wzrostu dookoła krążka z klindamycyną od strony krążka z erytromycyną (kształt litery D) świadczące o indukcyjnym mechanizmie oporności MLS_B [4, 6, 9].

Ryc. 8.1. Identyfikacja i interpretacja fenotypów oporności na makrolidy, linkosamidy i streptograminy B u gronkowców [6, 9].





8.5.3. Oznaczanie MIC tigecykliny

Tigecyklina jest stosowana do leczenia zakażeń o etiologii MRSA (rejestracja: skomplikowane zakażenia skóry i tkani podskórnej i zakażenia w obrębie jamy brzusznej). Oznaczanie MIC tigecykliny metodą rozcieńczeniową wykonuje się zgodnie ze standardową metodyką CLSI [12]. Oznaczając MIC tigecykliny metodą mikrorozcieńczeń w bulionie lub rozcieńczeń w agarze, standard tigecykliny należy dodać do podłoża w dniu badania. Ponadto, jeśli oznaczamy MIC metodą mikrorozcieńczeń w bulionie podłoże musi być przygotowane nie wcześniej niż w ciągu 24 godz. przed badaniem lub, jeśli jest starsze, powinno zostać zagotowane (i ostudzone) tuż przed dodaniem tigecykliny w celu usunięcia tlenu z podłoża [8]. Oznaczanie MIC tigecykliny metodą dyfuzji z paska zawierającego gradient antybiotyku wykonuje się zgodnie z zaleceniami producenta. Należy pamiętać o stosowaniu świeżego podłoża Mueller-Hinton agar, nie należy stosować podłoża na granicy terminu ważności. Odczyt strefy zahamowania wzrostu może być utrudniony ze względu na niewyraźną granicę zahamowania wzrostu, podobnie jak w przypadku linezolidu i innych leków bakteriostatycznych. Odczytu wartości MIC należy dokonywać przy zahamowaniu wzrostu 80% komórek z wyjściowej zawiesiny.

Krajowy Ośrodek Referencyjny ds. Lekowrażliwości Drobnoustrojów, Narodowy Instytut Leków
Centralny Ośrodek Badań Jakości w Diagnostyce Mikrobiologicznej

8.5.4. Oznaczanie wrażliwości *Staphylococcus spp.* na daptomycynę

Lek jest zarejestrowany do leczenia skomplikowanych zakażeń skóry i tkanki podskórnej oraz prawostronnego zapalenia wsierdza o etiologii MRSA. Daptomycyna do swojej aktywności wymaga odpowiedniego stężenia jonów wapnia. Zawsze należy oznaczyć MIC, ponieważ metoda dyfuzyjno-krażkowa nie pozwala w sposób wiarygodny odróżnić szczepów wrażliwych od opornych [15]. Obecnie zalecane są jedynie dwie metody oznaczania MIC daptomycyny: metoda Etest® i metoda rozcieńczeń w bulionie [3, 4, 12].

8.5.4.1. Metoda rozcieńczeń w bulionie

- Seryjne rozcieńczenia daptomycyny w bulionie Mueller-Hinton z odpowiednim stężeniem kationów (CAMHB) wzbogaconym jonami wapnia w stężeniu 50 µg/mL.
- Zalecane inokulum wynosi 5×10^5 CFU/mL
- Inkubacja 16-20 h w 35°C, w atmosferze tlenowej

8.5.4.2. Metoda Etest®

- W metodzie z zastosowaniem Etest® nie ma potrzeby dodatkowego wzbogacania gotowych podłoży Mueller-Hinton w jony wapnia, ze względu na fakt, że pasek Etest® oprócz gradientu antybiotyku został dodatkowo nasączony jonami wapnia w stężeniu odpowiadającym 40 µg/mL.
- Podłoże MHA (używać tylko podłoży z zawartością jonów wapnia 25-40 µg/mL)
- Zawiesina bakteryjna o gęstości 0,5 McFarlanda.
- Nanieść zawiesinę na podłoże jałową wymazówką, nałożyć Etest® z daptomycyną
- Inkubacja 16-20 h w 35°C, w atmosferze tlenowej. Obecność pojedynczych kolonii i podrost w strefie zahamowania wzrostu wokół paska traktować jako oporność na dane stężenie antybiotyku.

8.5.5. Oznaczanie wrażliwości *S.aureus* na glikopeptydy.

8.5.5.1. Metoda przeglądowa z wankomycyną [15].

- Podłoże: BHIA (BHI agar) z wankomycyną o stężeniu 6 µg/ml.
- Zawiesina bakteryjna o gęstości 0,5 McFarlanda.
- Nanieść punktowo 10 µl zawiesiny na agar z antybiotykiem, lub zanurzyć jałową wymazówkę w zawieszynie bakteryjnej i rozprowadzić w postaci plamki o średnicy 10-15 mm lub na całej płycie.

- Inkubować: 24h, w temp. 35°C, w atmosferze tlenowej.

Odczyt: oceniać w świetle przechodzącym, wzrost więcej niż jednej kolonii **lub delikatny wzrost** - podejrzenie VISA/VRSA

8.5.5.2. Oznaczanie MIC glikopeptydów

Stosowana jest metoda mikrorozcieńczeń w bulionie [12] lub metoda dyfuzji w agarze z paska nasączonego gradientem antybiotyku. [3, 20].

- **Metoda mikrorozcieńczeń w bulionie:**
 - Seryjne rozcieńczenia wankomycyny lub teikoplaniny w bulionie Mueller-Hinton z odpowiednim stężeniem kationów (CAMHB)
 - Zalecane inokulum wynosi 5×10^5 CFU/ml
 - Inkubacja 24 H w 35°C, w atmosferze tlenowej
- **Metoda dyfuzji w agarze z paska nasączonego gradientem antybiotyku** – wykonanie zgodnie z zaleceniami producenta [3, 20].
 - Podłoże MHA
 - Zawiesina bakteryjna o gęstości 0,5 McFarlanda
 - Nanieść 100 µl zawiesiny na płytkę i rozprowadzić w trzech kierunkach lub nanieść zawiesinę wymazówką na płytkę rozprowadzając w trzech kierunkach; stosować jedną wymazówkę na jedną płytkę.
 - Nanieść pasek z wankomycyna lub teikoplaniną.
 - Inkubować w 35°C w atmosferze tlenowej przez 48 godzin
 - Odczyt w świetle przechodzącym z użyciem lupy po 24 i 48 godzinach. Obecność pojedynczych kolonii i podrost w strefie zahamowania wzrostu wokół paska traktować jako oporność na dane stężenie antybiotyku.

8.5.5.3. Metoda identyfikacji szczepów o obniżonej wrażliwości na glikopeptydy GISA (*ang. Glycopeptide Intermediate Staphylococcus aureus*) i hGISA (*ang. hetero-Glycopeptide Intermediate Staphylococcus aureus*)

Potwierdzenie fenotypu GISA należy wykonać u wszystkich izolatów *S.aureus* o wartościach MIC wankomycyny >2 µg/mL. Przed wykonaniem oznaczenia należy sprawdzić czystość hodowli i potwierdzić identyfikację. Do oznaczeń fenotypu GISA stosowane są dwie metody; tzw. makrometoda Etest® [3, 22] i metoda z zastosowaniem Etest®GRD [3, 24]. Wykonanie

oznaczenia fenotypu GISA z zastosowaniem każdej z tych metod opisano poniżej. Metoda Etest®GRD zgodnie z danymi literaturowymi daje wyniki porównywalne z wynikami uzyskanymi metodą analizy populacyjnej [24]. **Wyniki uzyskiwane z zastosowaniem Etest®GRD lub makrometody Etest® nie są prawdziwymi wartościami MIC danego izolatu, a tylko wskaźnikami, że dany izolat może prezentować fenotyp GISA [22, 24].** Wszystkie szczepy podejrzane o fenotyp GISA lub hGISA powinny być przesłane do KORLD w celu potwierdzenia fenotypu.

- **Makrometoda Etest®**

- Podłoże BHIA (BHI agar)
- Zawiesina bakteryjna o gęstości 2,0 McFarlanda
- Nanieść 100 µl zawiesiny na płytkę i rozprowadzić w trzech kierunkach lub nanieść zawiesinę wymazówką na płytkę rozprowadzając w trzech kierunkach; stosować jedną wymazówkę na jedną płytkę.
- Nanieść Etest® z wankomycyna lub teikoplaniną.
- Inkubować w 35°C w atmosferze tlenowej przez 48 godzin
- Odczyt w świetle przechodzącym z użyciem lupy po 24 i 48 godzinach. Obecność pojedynczych kolonii i podrost w strefie zahamowania wzrostu wokół paska traktować jako oporność na dane stężenie antybiotyku.
- Interpretacja wyników:
 - szczep GISA lub hGISA:
 - MIC wankomycyny ≥ 6 µg/ml oraz
 - w oznaczeniu z użyciem makrometody: teikoplanina MIC ≥ 12 µg/ml lub wankomycyna MIC ≥ 8 µg/ml i teikoplanina MIC ≥ 8 µg/ml
 - szczep GRSA:
 - wankomycyna MIC ≥ 32 µg/ml oraz
 - w oznaczeniu z użyciem makrometody teikoplanina MIC ≥ 12 µg/ml lub wankomycyna MIC ≥ 8 µg/ml i teikoplanina MIC ≥ 8 µg/ml

- **Metoda z zastosowaniem Etest®GRD**

- Podłoże MHA z 5% krwi
- Zawiesina bakteryjna o gęstości 0,5 McFarlanda w bulionie Mueller-Hinton Broth
- Nanieść zawiesinę wymazówką na płytkę rozprowadzając w trzech kierunkach; stosować jedną wymazówkę na jedną płytkę.

- Nanieść Etest®GRD
- Inkubować w 35°C w atmosferze tlenowej przez 48 godzin
- Odczyt w świetle przechodzącym z użyciem lupy po 24 i 48 godzinach Obecność pojedynczych kolonii i podrost w strefie zahamowania wzrostu wokół paska traktować jako oporność na dane stężenie antybiotyku.
- Interpretacja wyników:
 - wynik dodatni w teście Etest®GRD (szczep GISA lub hGISA):
 - MIC wankomycyny lub teikoplaniny w teście Etest®GRD ≥ 8 mg/L
 - szczep GISA:
 - wankomycyna MIC ≥ 4 $\mu\text{g/ml}$ w teście standardowym oraz
 - wynik dodatni w oznaczeniu z użyciem Etest®GRD czyli wankomycyna MIC ≥ 8 $\mu\text{g/ml}$ lub teikoplanina MIC ≥ 8 $\mu\text{g/ml}$
 - szczep hGISA:
 - wankomycyna MIC < 4 $\mu\text{g/ml}$ oraz
 - wynik dodatni w oznaczeniu z użyciem Etest®GRD czyli wankomycyna MIC ≥ 8 $\mu\text{g/ml}$ lub teikoplanina MIC ≥ 8 $\mu\text{g/ml}$

8.6. Szczepy wzorcowe:

8.6.1. Metoda dyfuzyjno-krażkowa:

Staphylococcus aureus ATCC 25923 - wrażliwy na metycylinę

8.6.2. Metoda przeglądowa z oksacyliną w podłożu:

Staphylococcus aureus ATCC 29213 - wrażliwy na metycylinę

Staphylococcus aureus ATCC 43300 - oporny na metycylinę lub

Staphylococcus aureus MIKROBANK 14.001 - służy do kontroli jakości oznaczania wrażliwości na metycylinę w metodzie przeglądowej z oksacyliną w podłożu, szczep o heterogennej ekspresji oporności na metycylinę (kontrola dodatnia)

Staphylococcus aureus MIKROBANK 14.002 – służy do kontroli jakości oznaczania wrażliwości na metycylinę w metodzie przeglądowej z oksacyliną w podłożu, szczep o homogennej ekspresji oporności na metycylinę (kontrola dodatnia)

8.6.3. Metoda dwóch krążków – oznaczanie wrażliwości na makrolidy i linkosamidy:

Staphylococcus aureus ATCC BAA-977

Staphylococcus aureus ATCC BAA-976 lub

Streptococcus pyogenes MIKROBANK 15.001 – służy do kontroli jakości oznaczania wrażliwości na makrolidy metodą dwóch krążków, szczep o fenotypie iMLS_B

Streptococcus pyogenes MIKROBANK 15.002 - służy do kontroli jakości oznaczania wrażliwości na makrolidy metodą dwóch krążków, szczep o fenotypie kMLS_B

8.6.4. Metoda przeglądowna z wankomycyną w podłożu oraz oznaczanie MIC wankomycyny:

Enterococcus faecalis ATCC 29212 - wrażliwy na glikopeptydy

Enterococcus faecalis ATCC 51299 - oporny na glikopeptydy

Piśmiennictwo

1. Boucher H. W., G. R. Corey. Epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Clin. Infect. Dis., 1;46, Suppl 5, S344-349, (2008)
2. Broekema N. M., T. T. Van, T. A. Monson, S.A. Marshall, D. M. Warshauer. Comparison of cefoxitin and oxacillin disk diffusion methods for detection of *mecA*-mediated resistance in *Staphylococcus aureus* in a large-scale study. J. Clin. Microbiol., 47, 217-219, (2009)
3. ETM, Etest Technical Manual www.abbiotest.com
4. EUCAST documents www.eucast.org
5. FDA charakterystyka leków www.fda.gov
6. Fiebelkorn K. R., S. A. Crawford, M. L. McElmeel, J. H. Jorgensen. Practical disc-diffusion method for detection of inducible clindamycin resistance in *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative *Staphylococci*. J. Clin. Microbiol., 41, 4740-4744 (2003)
7. Hayden M. K., K. Rezai., R. A. Hayes, K. Lolans, J. P. Quinn, R. A. Weinstein. Development of daptomycin resistance *in vivo* in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. J. Clin. Microbiol., 43, 5285-5287 (2005)
8. Hope R., M. Warber, S. Mushtaq, M. E. Ward, T. Parsons, D. M. Livermore. Effect of medium type, age and aeration on the MICs of tigecycline and classical tetracyclines. J. Antimicrob. Chemother., 56, 1042-1046 (2005)

9. Leclercq R. Mechanisms of resistance to macrolides and linkosamides: nature of the resistance elements and their clinical implications. *Clin. Infect. Dis.*, **34**, 482-492 (2002)
10. Łuczak-Kadłubowska A., A. Sulikowska, J. Empel, A. Piasecka, M. Orczykowska, A. Kozińska, W. Hryniewicz. Countrywide molecular survey of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains in Poland. *J. Clin. Microbiol.*, 46, :2930-2937 (2008)
11. Łuczak-Kadłubowska A, J. Krzysztoń-Russjan, W. Hryniewicz. Characteristics of *Staphylococcus aureus* strains isolated in Poland in 1996 to 2004 that were deficient in species-specific proteins. *J. Clin. Microbiol.*, 44, 4018-2404 (2006)
12. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard – eighth edition. M07-A8, Vol. 29, No. 2 (2009)
13. Perazzi B., M. R. Fermepin, A. Malimovka, S. D. García, M. Orgambide, C. A. Vay CA, R. de Torres, A. M. Famiglietti. Accuracy of cefoxitin disk testing for characterization of oxacillin resistance mediated by penicillin-binding protein 2a in coagulase-negative staphylococci. *J. Clin. Microbiol.*, 44, 3634-3639 (2006)
14. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests; approved standard – tenth edition. CLSI M02-A10, Vol. 29, No. 1 (2009)
15. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twentieth informational supplement. CLSI M100-S20, Vol. 30, No.1 (2010)
16. Rybak M. J., D. K. L. Pharm. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a review. *Pharmacotherapy*, 25, 74-85 (2005)
17. Sakoulas G., R. C. Moellering, Jr. Increasing antibiotic resistance among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. *Clin. Infect. Dis.*,1;46, Suppl 5, S360-367 (2008)
18. Stryjewski M.E., H. F. Chambers. Skin and soft-tissue infections caused by community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clin. Infect. Dis.*,1;46, Suppl 5, S368-375 (2008)
19. Tsiordas S., Gold H. S., Sakoulas G. Linezolid resistance in clinical isolate of *Staphylococcus aureus*. *Lancet.*, **358**, 207-208 (2001)
20. www.oxid.com
21. Werner G., C. Cuny, F. J. Schmitz, W. Witte. Methicillin-resistant, quinupristin-dalfopristin-resistant *Staphylococcus aureus* with reduced sensitivity to glycopeptides. *J. Clin. Microbiol.*, 39, 3586-3590 (2001)

22. Wootton M, A. P. MacGowan AP, T. R. Walsh, R. A. Howe. A multicenter study evaluating the current strategies for isolating *Staphylococcus aureus* strains with reduced susceptibility to glycopeptides. J. Clin. Microbiol., 45, 329-332 (2007)
23. van Belkum A, D. C. Melles, J. K. Peeters, W. B. van Leeuwen, E. van Duijkeren, X. W. Huijsdens, E. Spalburg, A. J. de Neeling, H. A. Verbrugh, Dutch Working Party on Surveillance and Research of MRSA-SOM. Methicillin-resistant and -susceptible *Staphylococcus aureus* sequence type 398 in pigs and humans. Emerg. Infect. Dis., 14, 479-483 (2008)
24. Yusof A, A. Engelhardt, A. Karlsson, L. Bylund, P. Vidh, K. Mills, M. Wootton, T. R. Walsh. Evaluation of a new Etest vancomycin-teicoplanin strip for detection of glycopeptide-intermediate *Staphylococcus aureus* (GISA), in particular, heterogeneous GISA. J. Clin. Microbiol., 46, 3042-3047 (2008).