

Ziarenkowce Gram-dodatnie z rodzaju *Staphylococcus*

Oznaczanie wrażliwości i wykrywanie mechanizmów oporności na antybiotyki β -laktamowe

Pod redakcją:

dr n. biol. Joanny Empel

dr n. med. Doroty Żabickiej

prof. dr hab. n. med. Walerii Hryniewicz



Ziarenkowce Gram-dodatnie z rodzaju *Staphylococcus*

Oznaczenie wrażliwości i wykrywanie mechanizmów oporności na antybiotyki β -laktamowe

Copyright 2020 by:

**dr n. biol. Joanna Empel
dr n. med. Dorota Żabicka
prof. dr hab. n. med. Waleria Hryniewicz**

Warszawa 2021

All rights reserved
Wszystkie prawa zastrzeżone

Wydanie pierwsze

**Wydawca:
Narodowy Instytut Leków, Warszawa**

Wydawnictwo sfinansowane ze środków będących w dyspozycji Ministra Zdrowia w ramach programu polityki zdrowotnej pn.: „Narodowy Program Ochrony Antybiotyków na lata 2016-2020”

Projekt okładki, łamanie:
Magdalena Borek

ISBN 978-83-949636-6-8

Ziarenkowce Gram-dodatnie z rodzaju *Staphylococcus*

Oznaczenie wrażliwości i wykrywanie mechanizmów oporności na antybiotyki β -laktamowe

Zespół autorów:

dr n. biol. Joanna Empel

Zespół ds. Gronkowców,
Zakład Epidemiologii i Mikrobiologii Klinicznej,
Narodowy Instytut Leków w Warszawie

dr n. med. Dorota Żabicka

Krajowy Ośrodek Referencyjny ds. Lekowrażliwości Drobnoustrojów (KORLD),
Zakład Epidemiologii i Mikrobiologii Klinicznej,
Narodowy Instytut Leków w Warszawie

prof. dr hab. n. med. Waleria Hryniewicz

Zakład Epidemiologii i Mikrobiologii Klinicznej,
Narodowy Instytut Leków w Warszawie
Centralny Ośrodek Badań Jakości w Diagnostyce Mikrobiologicznej w Warszawie

Spis treści

Wykaz stosowanych skrótów	7
Wstęp	9
1. Oporność na antybiotyki β -laktamowe	10
1.1. Mechanizmy oporności na antybiotyki β -laktamowe.....	10
1.2. Epidemiologia MRSA	12
1.3. <i>S. aureus</i> o granicznej wartości MIC oksacyliny.....	14
1.4. Wykrywanie MRSA i MRCNS.....	14
2. Metody oznaczania lekowrażliwości i wykrywania mechanizmów oporności <i>Staphylococcus</i> spp. na antybiotyki β -laktamowe	16
2.1. Oznaczanie wrażliwości <i>S. aureus</i> i <i>S. lugdunensis</i> na penicylinę	17
Metoda dyfuzyjno-krążkowa	
Metoda mikrorozcieńczeń w podłożu płynnym	
2.2. Oznaczanie wrażliwości <i>S. saprophyticus</i> na ampicylinę.	17
Metoda dyfuzyjno-krążkowa	
2.3. Oznaczanie wrażliwości <i>Staphylococcus</i> spp. na metycylinę	18
Metoda dyfuzyjno-krążkowa	
2.4. Indukcja ekspresji genów <i>mec</i> przy użyciu krążka z cefoksytiną	19
2.5. Oznaczanie wrażliwości <i>S. aureus</i> na cefalosporyny V generacji	19
Metoda dyfuzyjno-krążkowa	
Metoda mikrorozcieńczeń w podłożu płynnym	
2.6. Oznaczanie wrażliwości <i>Staphylococcus</i> spp. na metycylinę (oksacylinę)	20
Metoda przeglądowa z oksacyliną w podłożu stałym	
2.7. Oznaczanie wrażliwości <i>Staphylococcus</i> spp na metycylinę (oksacylinę). Metoda określania wartości minimalnego stężenia hamującego	21
2.7.1. Oznaczanie wrażliwości <i>S. aureus</i> i <i>S. lugdunensis</i> na metycylinę	21
Metoda mikrorozcieńczeń cefoksyliny w podłożu płynnym	
Metoda mikrorozcieńczeń oksacyliny w podłożu płynnym	
2.7.2. Oznaczanie wrażliwości na metycylinę <i>Staphylococcus</i> spp. z wyjątkiem <i>S. aureus</i> i <i>S. lugdunensis</i>	22
Metoda mikrorozcieńczeń oksacyliny w podłożu płynnym	
2.7.3. Oznaczanie wrażliwości na metycylinę. Metoda dyfuzji z paska gradientowego z cefoksytiną lub oksacyliną.....	22
2.8. Oznaczanie wrażliwości <i>Staphylococcus</i> spp. na metycylinę – porównanie wartości granicznych zalecanych przez EUCAST i CLSI	23
2.9. Testy immunologiczne do wykrywania MRSA	25
2.10. Szczepy wzorcowe	25
Piśmiennictwo	26

Wykaz stosowanych skrótów

ATCC: Amerykańska Kolekcja Kultur Typowych (*ang.* American Type Culture Collection)

ATU: Obszar niepewności technicznej (*ang.* Area of Technical Uncertainty)

BORSA: *Staphylococcus aureus* o granicznej wartości MIC oksacyliny, który nie niesie genów *mec*; fenotyp oporności na oksacylinę wynika z nadprodukcji penicyliny (*ang.* borderline-oxacillin resistant *S. aureus*)

CAMHB: podłoże bulionowe Mueller-Hinton wzbogacone w kationy wapnia i magnezu (*ang.* Cation-adjusted Mueller-Hinton broth), zalecane do oznaczeń lekowrażliwości przez CLSI. Jest odpowiednikiem podłoża bulionowego Mueller-Hinton wzbogaconego w kationy wapnia i magnezu (*ang.* Mueller-Hinton broth, MHB) z zaleceń EUCAST.

CA-MRSA: pozaszpitalny *S. aureus* oporny na metycylinę (*ang.* community-associated MRSA); skrót może też oznaczać pozaszpitalne zakażenie szczepem MRSA

CC: kompleks klonalny grupujący szczepy *S. aureus* o typach sekwencyjnych (ST) posiadających wspólny profil co najmniej 5 z 7 alleli sekwencjonowanych fragmentów genów (*ang.* clonal complex)

CFU: jednostka tworząca kolonię (*ang.* Colony Forming Unit)

CLSI: Instytut Standardów Klinicznych i Laboratoryjnych (*ang.* Clinical and Laboratory Standards Institute)

CO-MRSA: szpitalne zakażenie szczepem MRSA, które rozpoczęło się poza szpitalem (*ang.* community-onset MRSA)

CoNS: gronkowce koagulazo-ujemne (*ang.* coagulase negative staphylococci)

EUCAST: Europejski Komitet ds. Oznaczania Lekowrażliwości (*ang.* European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing)

FA-MRSA: odzwierzęcy *S. aureus* (pochodzący od trzody chlewnej) oporny na metycylinę (*ang.* farm-associated MRSA)

HA-MRSA: szpitalny *S. aureus* oporny na metycylinę (*ang.* hospital-associated MRSA); skrót może też oznaczać szpitalne zakażenie szczepem MRSA

heMRSA: *S. aureus* o heterogennej ekspresji oporności na metycylinę (*ang.* heterogeneous MRSA)

hoMRSA: *S. aureus* o homogennej ekspresji oporności na metycylinę (*ang.* homogeneous MRSA)

HO-MRSA: szpitalne zakażenie szczepem MRSA, które rozpoczęło się w szpitalu (*ang.* hospital-onset MRSA)

KORLD: Krajowy Ośrodek Referencyjny ds. Lekowrażliwości Drobnoustrojów

LA-MRSA: odzwierzęcy *S. aureus* (pochodzący od zwierząt hodowlanych) oporny na metycylinę (*ang.* livestock-associated MRSA)

mecA-MRSA: *S. aureus* oporny na metycylinę, niosący gen *mecA*; analogicznie *mecC-MRSA* - niosący gen *mecC*

MHA: podłoże agarowe Mueller-Hinton (*ang.* Mueller-Hinton agar)

MHB: podłoże bulionowe Mueller-Hinton wzbogacone w kationy wapnia i magnezu (*ang.* Mueller-Hinton broth), zalecane do oznaczeń lekowrażliwości przez EUCAST. Jest odpowiednikiem podłoża bulionowego Mueller-Hinton wzbogaconego w kationy wapnia i magnezu (*ang.* Cation-adjusted Mueller-Hinton broth, CAMHB) z zaleceń CLSI.

MIC: najmniejsze stężenie hamujące (*ang.* minimal inhibitory concentration)

MLST: metoda typowania bakterii polegająca na analizie sekwencji nukleotydowych fragmentów kilku, wybranych dla danego gatunku, genów (*ang.* multilocus sequence typing)

MODSA: *S. aureus* o granicznej wartości MIC oksacyliny, który nie niesie genów *mec*; fenotyp oporności na oksacylinę wynika z obecności mutacji punktowych w genach kodujących naturalne białka PBP (*ang.* modified oxacillin resistant *S. aureus*)

MRCNS: gronkowce koagulazo-ujemne odporne na metycylinę (*ang.* methicillin-resistant coagulase negative staphylococci)

MRS: gronkowce odporne na metycylinę (*ang.* methicillin-resistant staphylococci)

MRSA: *S. aureus* oporny na metycylinę (*ang.* methicillin-resistant *S. aureus*)

MRSE: *Staphylococcus epidermidis* oporny na metycylinę (*ang.* methicillin-resistant *S. epidermidis*)

MSCNS: gronkowce koagulazo-ujemne wrażliwe na metycylinę (*ang.* methicillin-susceptible coagulase negative staphylococci)

MSSA: *S. aureus* wrażliwy na metycylinę (*ang.* methicillin-susceptible *S. aureus*)

MSSE: *S. epidermidis* wrażliwy na metycylinę (*ang.* methicillin-susceptible *S. epidermidis*)

NCTC: Narodowa Kolekcja Kultur Typowych (*ang.* National Collection of Type Cultures)

OS-MRSA: *S. aureus*, u którego potwierdzono obecność genu *mecA*, wrażliwy na cefoksytynę i oksacylinę ze względu na brak aktywności tego genu (*ang.* oxacillin-susceptible MRSA)

PBP: białko wiążące penicylinę (*ang.* penicillin binding protein)

PCR: reakcja łańcuchowa polimerazy (*ang.* polymerase chain reaction)

PRSA: *S. aureus* oporny na penicylinę wyłącznie w mechanizmie związanym z wytwarzaniem β -laktamaz (*ang.* penicillin-resistant *S. aureus*)

PVL: leukocydyna (cytotoksyna) Panton-Valentine'a (*ang.* Panton-Valentine leukocidin)

SCCmec: gronkowcowa kaseta chromosomalna *mec* (*ang.* staphylococcal cassette chromosome *mec*)

ST: typ sekwencyjny, określany na podstawie wyników uzyskanych metodą MLST oraz bazy danych MLST dla danego gatunku drobnoustroju (*ang.* sequence type)

TSA: agar tryptonowo-sojowy (*ang.* Trypticase Soy Agar)

Wstęp

Przedstawione w niniejszym opracowaniu Rekomendacje zostały przygotowane na podstawie Tabel interpretacji wartości granicznych najmniejszych stężeń hamujących oraz wielkości stref średnic zahamowania wzrostu bakterii w metodzie dyfuzyjno-krążkowej EUCAST, wersja 11.0, ważna od 2021-01-01¹. W przypadku braku opisu w w/w dokumencie niektórych, dodatkowo zamieszczonych metod, stosowano zalecenia przedstawione w innych, cytowanych publikacjach.

Według aktualnych zaleceń EUCAST¹ wartości graniczne, o ile nie wskazano inaczej, dotyczą wszystkich przedstawicieli rodzaju *Staphylococcus*.

- Wartości graniczne dla *S. aureus*, o ile nie wskazano inaczej, mają również zastosowanie do innych gatunków gronkowców koagulazo-dodatnich: *S. argenteus*, *S. schweitzeri*, *S. intermedius*, *S. pseudintermedius* i *S. coagulans* (wcześniej *S. schleiferi* podgatunek *coagulans*).
- Gronkowce koagulazo-ujemne obejmują następujące gatunki: *S. capitis*, *S. cohnii*, *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. hominis*, *S. hyicus*, *S. lugdunensis*, *S. pettenkoferi*, *S. saprophyticus*, *S. schleiferi*, *S. sciuri*, *S. simulans*, *S. warneri* i *S. xylosus*. W ich przypadku, o ile nie wskazano inaczej, należy stosować wartości graniczne dla „gronkowców koagulazo-ujemnych”.
- W przypadku *S. saccharolyticus* należy stosować metodologię i wartości graniczne dla Gram-dodatnich bakterii beztlepowych.

Bakterie z rodzaju *Staphylococcus*, tak jak inne bakterie Gram-dodatnie, są naturalnie odporne na aztreonam, temocylinę, polimyksynę B/ kolistynę i kwas nalidiksowy. Charakteryzują się ponadto opornością na ceftazydym, a niektóre gatunki, dodatkowo, naturalną opornością na fosfomycynę (*S. saprophyticus* i *S. capitis*), kwas fusydowy (*S. saprophyticus*) i nowobiocynę (*S. saprophyticus*, *S. cohnii* i *S. xylosus*)².

1. Oporność na antybiotyki β -laktamowe

Gronkowce posiadają wiele różnych mechanizmów oporności nabytej, wśród których największe znaczenie kliniczne i epidemiologiczne ma oporność na antybiotyki β -laktamowe.

1.1. Mechanizmy oporności na antybiotyki β -laktamowe

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

- **wytwarzanie β -laktamaz** (tzw. penicylinaz gronkowcowych), nadających oporność na penicyliny naturalne, aminoiureidopenicyliny; oraz
- **wytwarzanie nowych białek PBP**, PBP2a (PBP2'), PBP2b lub PBP2c, o niskim powinowactwie do β -laktamów, **nadających oporność na wszystkie antybiotyki β -laktamowe** stosowane obecnie w leczeniu, z **wyjątkiem ceftaroliny i ceftobiprolu**. Oporność ta określana jest jako **oporność na metycylinę**, ponieważ została zaobserwowana po raz pierwszy wobec metycyliny, tj. pierwszej półsyntetycznej penicyliny przeciwgronkowcowej.

Wytwarzanie β -laktamaz, wynikające z nabycia genu *blaZ*, ma najczęściej charakter indukowalny, co oznacza, że zachodzi w obecności antybiotyku β -laktamowego³. Szczepy *S. aureus* odporne na antybiotyki β -laktamowe, wyłącznie w mechanizmie związanym z produkcją penicylinaz gronkowcowych, nazywane są opornymi na penicylinę (*ang.* penicillin-resistant *S. aureus*, PRSA).

Szczepy gronkowców wytwarzające β -laktamazę są odporne na penicylinę, ampicylinę, amoksycylinę, oraz ureidopenicyliny (np. piperacylinę) i tikarcylinę.

Szczepy, których jedynym mechanizmem oporności na β -laktamy jest wytwarzanie β -laktamaz są wrażliwe na tzw. penicyliny przeciwgronkowcowe, odporne na działanie penicylinaz gronkowcowych, takie jak metycylina (obecnie niestosowana), nafcylina oraz penicyliny izoksazolilowe: oksacylina, kloksacylina (jedyna dostępna w Polsce, Syntarpen), dikloksacylina, flukloksacylina, **penicyliny z inhibitorami, a także na **wiele cefalosporyn** (największą aktywność wobec gronkowców wykazują **cefalosporyny I i II generacji**) i imipenem.**

UWAGA: Wrażliwość *in vitro* nie zawsze oznacza wrażliwość kliniczną.

Ocenia się, że około 80-90% szczepów *S. aureus* wytwarza β -laktamazy, dlatego w badaniach rutynowych, prowadzonych przez laboratoria mikrobiologiczne, oznaczanie wrażliwości na penicylinę dla tego gatunku można pominąć.

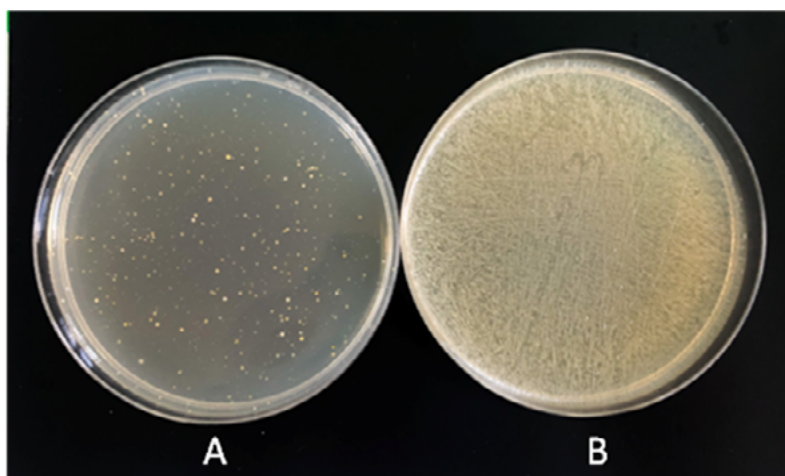
Z klinicznego i epidemiologicznego punktu widzenia **najważniejszym mechanizmem oporności na antybiotyki β -laktamowe u *Staphylococcus spp.* jest oporność na metycylinę** (opisywana w literaturze również jako oporność na oksacylinę). ***S. aureus* odporny na metycylinę jest klasyfikowany jako patogen alarmowy**. Gronkowce odporne na metycylinę oznaczane są skrótami: MRSA (*ang.* methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* lub methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*) - *S. aureus* odporny na metycylinę, MRSE (*ang.* methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis*) - *S. epidermidis* odporny na metycylinę lub MRCNS (*ang.* methicillin-resistant coagulase negative staphylococci) - gronkowce koagulazo-ujemne odporne na metycylinę. Dla odróżnienia, *S. aureus* wrażliwy na metycylinę określany jest skrótem MSSA (*ang.* methicillin-susceptible

S. aureus), *S. epidermidis* wrażliwy na metycylinę - MSSE (*ang.* methicillin-susceptible *S. epidermidis*), a gronkowce koagulo-ujemne wrażliwe na metycylinę - MSCNS (*ang.* methicillin-susceptible coagulase negative staphylococci).

Oporność na metycylinę u *S. aureus* warunkowana jest obecnością nabytych genów *mecA*, *mecB* lub *mecC* (wcześniej *mecA*_{GA251}) kodujących, odpowiednio, dodatkowe białko wiążące penicylinę (*ang.* penicillin binding protein, PBP): PBP2a (PBP2'), PBP2b lub PBP2c⁴⁻⁶. Geny *mecA* i *mecC* zlokalizowane są w chromosomie *S. aureus* i stanowią część gronkowcowej kasety chromosomalnej *mec* (*ang.* staphylococcal cassette chromosome *mec*, SCC*mec*), przy czym gen *mecC* zidentyfikowano dotychczas tylko w jednym z 13 typów opisanych kaset, SCC*mec*XI⁷. Najczęściej wykrywany na całym świecie gen *mecA* występuje w różnych liniach genetycznych, zarówno MRSA jak MRCNS, izolowanych od ludzi, w środowisku szpitalnym i pozaszpitalnym, oraz od zwierząt. Z kolei występowanie genu *mecC* jest ograniczone do kilku linii genetycznych *S. aureus* oraz kilku innych gatunków z rodzaju *Staphylococcus*. Szczepy *mecC*-MRSA występują u zwierząt, głównie krów, chociaż są również izolowane z nosicielstwa i zakażeń u ludzi^{6,8,9}. Gen *mecB*, opisany dotychczas w jednym szczepie MRSA, wyhodowanym z nosicielstwa u człowieka, zlokalizowany jest w plazmidzie⁵.

W odróżnieniu od aktywności naturalnych białek komórkowych PBP (PBP1, PBP2, PBP3 i PBP4), biorących udział w syntezie peptydoglikanu ściany komórkowej, aktywność enzymatyczna białek PBP2a-c nie jest hamowana przez β -laktamy z powodu ich obniżonego powinowactwa do tych antybiotyków. Nabyte białka PBP zachowują więc swoją funkcję i uczestniczą w syntezie ściany komórkowej, a ich wytwarzanie zachodzi w obecności β -laktamu. **Wyjątek stanowią cefalosporyny V generacji, ceftarolina i ceftobiprol, które skutecznie hamują aktywność białek PBP kodowanych przez geny *mecA*, *mecB* i *mecC*.**

Ekspresja oporności na metycylinę u *S. aureus* może mieć charakter heterogeny (*ang.* heterogeneous MRSA, heMRSA), gdy w badaniach *in vitro* w danej populacji komórek tylko nieznaczna ich frakcja (10^{-5} - 10^{-3} komórek) wykazuje fenotyp oporności, lub homogeny (*ang.* homogeneous MRSA, hoMRSA), gdy wszystkie komórki badanej populacji wykazują fenotyp oporności^{10,11}. Ekspozycja na antybiotyki β -laktamowe szczepów o heterogennej oporności na metycylinę prowadzi do selekcji mutantów o oporności homogennej¹². Zarówno szczepy o hetero- jak homogennej oporności na metycylinę są klinicznie odporne na wszystkie antybiotyki β -laktamowe, z wyjątkiem ceftaroliny i ceftobiprolu. Rozróżnienie hetero- i homogennej ekspresji oporności na metycylinę u *S. aureus*, a także określenie poziomu heterogenności, umożliwia metoda przeglądowa z metycyliną w podłożu^{13,14}. Przykładowy wzrost hodowli szczepów *S. aureus* o hetero- i homogennej ekspresji oporności na metycylinę przedstawia Ryc. 1, poniżej.



Rycina 1. Obraz wzrostu szczepów *S. aureus* MIKROBANK 14.001 o heterogennej (A) i MIKROBANK 14.002 o homogennej (B) ekspresji oporności na metycylinę; hodowla nocna bakterii (100 μ L) na podłożu TSA z metycyliną (25 mg/L).

Oporność na metycylinę oznacza brak wrażliwości klinicznej na wszystkie antybiotyki β -laktamowe stosowane w terapii, z wyjątkiem cefalosporyn V generacji – ceftaroliny i ceftobiprolu.

Szczepy z rodzaju *Staphylococcus* odporne na metycylinę są z definicji wielolekooporne, ponieważ wykazują niewrażliwość na co najmniej jeden antybiotyk z trzech lub większej liczby klas antybiotyków β -laktamowych¹⁵.

1.2. Epidemiologia MRSA

Zakażenia o etiologii MRSA występowały początkowo wyłącznie w szpitalach. Później zaczęto je również obserwować w zakładach opieki zdrowotnej oraz wśród osób mających zawodowy kontakt z tymi środowiskami. W latach 80. szczepy MRSA pojawiły się również u osób niemających kontaktu z placówkami opieki zdrowotnej, a częstość wywoływanych przez nie zakażeń zaczęła istotnie wzrastać. Wprowadzono wówczas podział zakażeń MRSA na szpitalne (*ang.* hospital-acquired MRSA, HA-MRSA) i pozaszpitalne (*ang.* community-acquired MRSA, CA-MRSA). Z czasem typowe pozaszpitalne szczepy MRSA zaczęły wywoływać ogniska epidemiczne w szpitalach i zaistniała wówczas konieczność stworzenia systemu klasyfikacji zakażeń wywoływanych przez szczepy *S. aureus* odporne na metycylinę. W Tab. 1 podano, zaproponowaną przez Klevens i wsp.¹⁶, najczęściej stosowaną klasyfikację epidemiologiczną zakażeń wywoływanych przez szczepy MRSA w zależności od miejsca nabycia zakażenia.

Tabela 1. Definicje stosowane w klasyfikacji epidemiologicznej zakażeń *Staphylococcus aureus* opornych na metycylinę (MRSA), w zależności od miejsca nabycia szczepu wg Klevens i wsp.¹⁶, zmodyfikowane.

Klasyfikacja epidemiologiczna	Definicja
Zakażenie związane z opieką zdrowotną (<i>ang.</i> healthcare-associated MRSA)	
Zakażenie o początku szpitalnym* (<i>ang.</i> hospital-onset MRSA, HO-MRSA)	Zakażenia zdiagnozowane po 48 godz. hospitalizacji ; Dopuszczalne jest wystąpienie czynników ryzyka, takich jak w zakażeniu CO-MRSA
Zakażenie o początku pozaszpitalnym (<i>ang.</i> community-onset MRSA, CO-MRSA)	Zakażenia zdiagnozowane w pierwszych 48 godz. hospitalizacji ; Udokumentowany co najmniej jeden czynnik ryzyka związany z opieką zdrowotną: (1) obecność cewnika, sondy dożołądkowej itp. (2) wcześniejsze zakażenie/kolonizacja MRSA; (3) wykonany zabieg chirurgiczny, hospitalizacja, dializy lub przebywanie w domu opieki długoterminowej w okresie 12 m-cy poprzedzających wyhodowanie MRSA
Zakażenie pozaszpitalne (<i>ang.</i> community-associated MRSA, CA-MRSA)	
	Zakażenia zdiagnozowane w pierwszych 48 godz. hospitalizacji ; Brak udokumentowanych czynników ryzyka związanych z opieką zdrowotną

* W literaturze określane też jako szpitalne zakażenie MRSA (*ang.* hospital-associated MRSA, **HA-MRSA**)

Szczepy **MRSA** izolowane z zakażeń szpitalnych (*ang.* hospital-associated MRSA, HA-MRSA), są często odporne na antybiotyki innych klas niż β -laktamy, takie jak tetracykliny, makrolidy, linkozamidy, aminoglikozydy, fluorochinolony, a również na trimetoprim/sulfametoksazol, kwas fusydowy, rifampicynę i chloramfenikol¹⁷⁻¹⁹. W grupie tej najczęściej opisywane są również gronkowce odporne na linezolid, chinuprystynę/dalfoprystynę i daptomycynę oraz o obniżonej wrażliwości lub odporne na glikopeptydy (wancomycynę i teikoplaninę)²⁰⁻²⁴. Ta powszechna oporność szczepów HA-MRSA na wiele klas antybiotyków jest następstwem selekcji różnych mechanizmów w wyniku szeroko stosowanej terapii antybiotykowej w środowisku związanym z opieką zdrowotną.

Szczepy MRSA izolowane z zakażeń pozaszpitalnych (*ang.* community-associated MRSA, **CA-MRSA**) charakteryzuje zazwyczaj **wrażliwość na antybiotyki inne niż β -laktamy**²⁵⁻²⁷, chociaż zdarzają się szczepy odporne na dodatkowe klasy antybiotyków, głównie tetracykliny, makrolidy, linkozamidy i fluorochinolony²⁷⁻²⁹. Szczepy CA-MRSA wywołują najczęściej pierwotne, ostre ropne zakażenia skóry i tkanek miękkich (ropnie, czyraki) oraz, rzadziej, martwicze zapalenie płuc, najczęściej jako powikłanie pogrypowe³⁰. Nie rozstrzygnięto dotychczas czy zmiany martwicze, obserwowane w obrazie klinicznym zakażeń wywoływanych przez szczepy CA-MRSA, związane są z wytwarzaniem leukocydyny Panton-Valentine'a (*ang.* Panton-Valentine leukocidin, PVL)³⁰, czy kluczową rolę w patogenezie odgrywają tło genetyczne i udział kilku czynników zjadliwości^{31,32}.

Szczepy HA-MRSA i CA-MRSA należą do odmiennych linii genetycznych, niosą różne kasety SCC*mec* i charakteryzują się zróżnicowanym wytwarzaniem toksyn^{33,34}. W Polsce wśród szczepów szpitalnych dominuje kompleks klonalny (*ang.* clonal complex, CC) CC5, a pozaszpitalnych - CC59. Izolaty z kompleksu CC59 niosą geny *lukS/lukF-PV*, kodujące leukocydynę PVL.

Szczepy MRSA występują również u zwierząt gospodarskich (świnie, bydło, konie, drób) i domowych (koty, psy), przy czym zwierzęta domowe są najczęściej kolonizowane i zakażane przez szczepy MRSA pochodzenia ludzkiego. Obserwowane jest także nosicielstwo i zakażenia u ludzi wywołwane przez odporne na metycylinę szczepy *S. aureus* pochodzące od zwierząt gospodarskich. Takie odzwierzęce szczepy MRSA, początkowo identyfikowane u trzody chlewnej i w środowisku chlewni oraz w przypadkach kolonizacji hodowców świń, pracowników chlewni, rzeźni i lekarzy weterynarii, charakteryzowały się unikatowymi cechami w typowaniu molekularnym i zostały określone jako FA-MRSA (*ang.* farm-associated MRSA). Po zidentyfikowaniu szczepów o podobnej charakterystyce molekularnej również u innych zwierząt hodowlanych nazwę tę zmieniono na **LA-MRSA** (*ang.* livestock-associated MRSA). W Europie, także w Polsce, przeważający odsetek szczepów LA-MRSA należy do jednego kompleksu klonalnego CC398, podczas gdy w Azji - głównie do CC9³⁵⁻³⁸. Szczepy LA-MRSA, poza opornością na β -laktamy, charakteryzują się z reguły opornością na tetracykliny, a niekiedy również na erytromycynę i linkozamidy (klindamycynę i linkomycynę) lub jedynie na linkozamidy, przy zachowanej wrażliwości na makrolidy³⁹. Sporadycznie opisywane są szczepy LA-MRSA odporne jednocześnie na kilka klas antybiotyków innych niż β -laktamy lub odporne na chinuprystynę/dalfoprystynę, chloramfenikol i linezolid^{40,41}.

Odrębną grupę wśród LA-MRSA stanowią *S. aureus* niosące gen *mecC*. Należą one do kilku linii genetycznych, z dominującym i najbardziej rozprzestrzenionym kompleksem klonalnym CC130^{42,43}. Szczepy niosące gen *mecC* opisywane są głównie w Europie, chociaż ostatnio coraz częściej pojawiają się doniesienia o ich obecności w innych częściach świata⁴⁴⁻⁴⁸. W Polsce dotychczas nie zidentyfikowano *mecC*-MRSA, co może wynikać z faktu, że odróżnienie izolatów *S. aureus* niosących gen *mecA* od niosących *mecC* jest w warunkach diagnostycznego laboratorium mikrobiologicznego trudne i wymaga zawsze potwierdzenia metodą PCR ze specyficznymi starterami⁴⁹ lub testami komercyjnymi⁵⁰. Szczepy MRSA niosące gen *mecA* lub *mecC* są odporne na cefoksytynę, ale w przeciwieństwie do szczepów *mecA*-MRSA, które z reguły są odporne również na oksacylinę, szczepy *mecC*-MRSA są często wrażliwe na ten antybiotyk⁵¹⁻⁵³. Różnica ta najprawdopodobniej wynika z faktu, że powinowactwo białka PBP2a do oksacyliny i cefoksytyny jest porównywalne, natomiast w przypadku PBP2c jest ono

czterokrotnie wyższe do oksacyliny niż cefoksytyny⁵⁴. Zróznicowanie profilu oporności na cefoksytynę i oksacylinę może ułatwić identyfikację szczepów niosących gen *mecC*, przy czym należy pamiętać, że wśród *mecA*-MRSA zdarzają się szczepy wrażliwe na oksacylinę, a wśród *mecC*-MRSA szczepy odporne na ten antybiotyk⁸. Ponieważ odsetek szczepów *mecC*-MRSA pochodzących od ludzi jest niski⁵⁵ wydaje się, że co najwyżej połowa szczepów MRSA o fenotypie „wrażliwy na oksacylinę/oporny na cefoksytynę” może nieść gen *mecC*⁵¹.

1.3. *S. aureus* o granicznej wartości MIC oksacyliny

W literaturze opisywane są również szczepy *S. aureus* charakteryzujące się graniczną wartością MIC oksacyliny, które nie niosą genów *mec*⁵⁶.

Szczepy takie występują rzadko i reprezentują fenotypy **BORSA** (*ang.* borderline-oxacillin resistant *S. aureus*) oraz **MODSA** (*ang.* modified *S. aureus*). Fenotyp BORSA wynika głównie z nadprodukcji penicyliny, a charakteryzujące się nim szczepy wykazują wrażliwość na inhibitory β -laktamaz. Fenotyp MODSA jest związany z obecnością mutacji w genach kodujących naturalne białka PBP, powodujących obniżenie powinowactwa tych białek do β -laktamów, lub mutacji w genach, których produkty wpływają na nadprodukcję białek PBP w komórce bakterii. Szczepy o tym fenotypie nie wykazują wrażliwości na inhibitory β -laktamaz. Niektórzy autorzy określają oba wspomniane fenotypy jako BORSA^{1,57}.

Identyfikacja fenotypu BORSA i MODSA jest trudna i opiera się przede wszystkim na wynikach określenia wartości najmniejszych stężeń hamujących (*ang.* minimal inhibition concentration, MIC) oksacyliny. Zazwyczaj szczepy o takich fenotypach charakteryzują się niskimi wartościami MIC oksacyliny (2 do 12 mg/L) i MIC cefoksytyny (4 do 8 mg/L)⁵⁷⁻⁶⁰. W przeszłości, kiedy do wykrywania szczepów *S. aureus* opornych na metycylinę stosowano metodę oznaczania MIC oksacyliny, szczepy BORSA błędnie identyfikowano jako MRSA, co miało bezpośrednie przełożenie na stosowaną terapię i postępowanie epidemiologiczne.

Zasadniczo, wytyczne EUCAST¹ nie zalecają przeprowadzania systematycznych badań przesiewowych *S. aureus* w kierunku fenotypu o granicznej wartości MIC oksacyliny. Chociaż, w przypadku jeśli badanie przesiewowe oporności na metycylinę z użyciem krążka z cefoksytyną (30 μ g) daje wynik ujemny i MIC oksacyliny jest > 4 mg/L, EUCAST zaleca badanie w kierunku fenotypu BORSA, o ile są ku temu wskazania kliniczne⁶¹.

1.4. Wykrywanie MRSA i MRCNS

Historycznie, izolaty z rodzaju *Staphylococcus* odporne na penicyliny przeciwgronkowcowe określano jako „izolaty odporne na metycylinę”. Dlatego nadal stosowane są wobec nich skrótory MRSA lub MRCNS, chociaż sama metycylina, najstarsza z półsyntetycznych penicylin przeciwgronkowcowych, ze względu na niską aktywność, małą stabilność i toksyczność, nie jest antybiotykiem z wyboru do testowania lub leczenia. Kolejną penicyliną przeciwgronkowcową używaną, przez wiele lat, do wykrywania oporności na metycylinę była oksacylina. Z jej wykorzystaniem opracowano kilka różnych, stosowanych do dzisiaj, metod wykrywania oporności i wprowadzono termin „izolaty odporne na oksacylinę”, stosowany zamiennie z terminem „izolaty odporne na metycylinę”. Obecnie, oporność na metycylinę jest wykrywana przede wszystkim za pomocą cefoksytyny (cefamycyna), chociaż w przypadku niektórych gatunków gronkowców nadal rekomendowane jest stosowanie oksacyliny. W zaleceniach EUCAST¹ używany jest termin „oporność na metycylinę”, a w CLSI⁵³ - „oporność na metycylinę (oksacylinę)”. **Termin „oporność na cefoksytynę” nie jest stosowany, ponieważ cefoksytyna nie jest wykorzystywana w leczeniu zakażeń gronkowcowych. Służy**

wyłącznie jako antybiotyk wskaźnikowy, który z wysoką czułością i specyficznością wykrywa oporność na metycylinę, w tym heterogenną, w szczepach niosących geny *mecA* lub *mecC*⁶². W antybiogramie, dla zaznaczenia oporności na metycylinę, należy użyć komentarza „szczep MRSA” i ewentualnie dodać informację „szczep oporny na kloksacylinę”.

Oporność na metycylinę u *S. aureus* można oznaczać różnymi metodami fenotypowymi, takimi jak: metoda dyfuzyjno-krążkowa z użyciem krążka z cefoksytyną, metoda przeglądowa z oksacyliną w podłożu, określenie wartości MIC cefoksytyny lub oksacyliny, testy aglutynacji lateksowej lub immunochromatograficzne wykrywające białka PBP2a i PBP2c, oraz metodami genetycznymi wykrywającymi geny *mecA*, *mecB* i *mecC*, najczęściej przy użyciu techniki PCR.

Zgodnie z zaleceniami EUCAST¹, oznaczanie wrażliwości na metycylinę u wszystkich gatunków gronkowców, z wyjątkiem *S. pseudintermedius* i *S. schleiferi*, należy wykonywać metodą dyfuzyjno-krążkową z użyciem krążka z cefoksytyną (30 μ g). W przypadku *S. pseudintermedius* i *S. schleiferi* zalecane jest stosowanie krążka z oksacyliną (1 μ g). Inkubacja powinna być prowadzona w atmosferze tlenowej, w temp. $35\pm 1^\circ\text{C}$ przez 18 ± 2 h.

Zalecenia CLSI⁵³ dopuszczają stosowanie u gronkowców różnych, w zależności od gatunku, fenotypowych metod wykrywania oporności na metycylinę (oksacylinę) (Tab. 2). We wszystkich tych metodach rekomendowana jest inkubacja w temp. 33 - 35°C , ponieważ, według zaleceń, testy prowadzone w temp. powyżej 35°C mogą nie wykrywać tej oporności.

Oznaczanie wrażliwości na metycylinę izolatów *S. aureus*, które słabo rosną na podłożach MHA i CAMHB, przykładowo tzw. small-colony variants, nie powinno być przeprowadzane na innych podłożach ze względu na możliwość uzyskania niewiarygodnych wyników oporności wynikającej z obecności genu *mecA*. W przypadku tego typu izolatów należy przeprowadzić test w kierunku obecności PBP2a, po wcześniejszej indukcji wytwarzania białka za pomocą cefoksytyny (patrz pkt 2.4). Można przeprowadzić również wykrywanie genu *mecA* metodą PCR⁵³.

Tabela 2. Zestawienie fenotypowych metod wykrywania oporności na metycylinę (oksacylinę) u *Staphylococcus* spp. według CLSI⁵³.

Gatunek	Cefoksytyna		Oksacylina		
	MIC	Krążek (30 μ g)	MIC	Krążek (1 μ g)	Agar z NaCl ¹
<i>S. aureus</i>	Tak (16-20h) ²	Tak ³ (16-18h)	Tak (24h)	Nie	Tak (24h)
<i>S. lugdunensis</i>	Tak (16-20h)	Tak (16-18h)	Tak (24h)	Nie	Nie
<i>S. epidermidis</i>	Nie	Tak (24h)	Tak (24h)	Tak (16-18h)	Nie
<i>S. pseudintermedius</i>	Nie	Nie	Tak (24h)	Tak (16-18h)	Nie
<i>S. schleiferi</i>	Nie	Nie	Tak (24h)	Tak (16-18h)	Nie
<i>Staphylococcus</i> spp. (niewymienione powyżej lub niezidentyfikowane do gatunku)	Nie	Tak (24h) ⁴	Tak (24h) ⁴	Nie	Nie

¹ Patrz Metoda przeglądowa, pkt 2.6 ² W nawiasach podano zalecany czas inkubacji ³ Podkreślono metodę zalecaną przez EUCAST¹

⁴ W przypadku izolatów należących do kategorii „*Staphylococcus* spp. (niewymienione powyżej lub niezidentyfikowane do gatunku)” wyhodowanych z ciężkich zakażeń, dla których wartości MIC oksacyliny mieszczą się w zakresie 1-2 μ g/mL, zalecenia CLSI sugerują przeprowadzenie analizy w kierunku obecności *mecA* lub PBP2a, ponieważ są to najbardziej wiarygodne metody wykrywania u nich oporności na metycylinę (oksacylinę). Zalecenia CLSI podają, że metoda dyfuzyjno-krążkowa z użyciem krążka z cefoksytyną może nie dawać wiarygodnych wyników dla niektórych gatunków należących do tej kategorii (np. *S. haemolyticus*).

Zalecana przez CLSI metoda przeglądowa, z oksacyliną w podłożu, do oznaczania oporności na metycylinę (oksacylinę) może być stosowana jako metoda wykrywania oporności na metycylinę jedynie u *S. aureus*. W przypadku niejednoznacznych wyników uzyskanych tą metodą, wynik należy potwierdzić stosując inne metody fenotypowe lub genetyczne.

Metody genetyczne, wykrywające obecność genów *mecA*, *mecB* i *mecC* techniką PCR, nadal uznawane są za „złoty standard” i powinny być wykonywane w przypadku uzyskania niejednoznacznych wyników metodami fenotypowymi, zarówno w przypadku *S. aureus* jak i innych gatunków z rodzaju *Staphylococcus*.

Niezwykłe rzadko występujące izolaty *S. aureus*, u których potwierdzono metodami molekularnymi obecność genu *mecA*, a które są wrażliwe na cefoksytynę i oksacylinę, ze względu na brak aktywności tego genu (*ang.* oxacillin-susceptible MRSA, OS-MRSA) ⁶³, powinny być raportowane jako MRSA ⁶². Wydaje się, że taka sama zasada powinna dotyczyć izolatów wrażliwych na cefoksytynę i oksacylinę niosących geny *mecB* i *mecC*, chociaż obecnie nie ma takich zaleceń.

Dostępne testy aglutynacji lateksowej lub immunochromatograficzne, wykrywające białko PBP2a, dają miarodajne wyniki jedynie w przypadku opornych na metycylinę izolatów *S. aureus* niosących gen *mecA*. Dla zwiększenia wykrywalności izolatów opornych na metycylinę zalecana jest, przed wykonaniem testu, indukcja ekspresji genów *mec* przy użyciu krążka z cefoksytyną (patrz pkt 2.4).

Izolaty z zakażeń inwazyjnych, podejrzane o fenotyp MRS i sprawiające trudności diagnostyczne należy, w celu potwierdzenia, przesyłać do KORLD.

2. Metody oznaczania lekowrażliwości i wykrywania mechanizmów oporności *Staphylococcus* spp. na antybiotyki β -laktamowe

Zgodnie z zaleceniami EUCAST ¹ podstawową metodą wykrywania oporności na antybiotyki β -laktamowe u *Staphylococcus* spp. w badaniu przesiewowym jest oznaczenie oporności na metycylinę metodą dyfuzyjno-krążkową z użyciem krążka z cefoksytyną (30 μ g). W przypadku *S. pseudintermedius* i *S. schleiferi* w badaniu przesiewowym stosowana jest metoda dyfuzyjno-krążkowa z użyciem krążka z oksacyliną (1 μ g).

Dla nielicznych antybiotyków β -laktamowych (penicylina benzylowa dla *S. aureus* i *S. lugdunensis*, ceftarolina i ceftobiprol dla *S. aureus*) wykonywane jest również oznaczanie lekowrażliwości metodą dyfuzyjno-krążkową i/lub za pomocą określania wartości MIC. Natomiast w przypadku *S. saprophyticus* wykonywane jest oznaczanie lekowrażliwości metodą dyfuzyjno-krążkową z użyciem krążka z ampicyliną.

Przygotowanie inokulum oraz rozcieńczeń leku w celu określenia wartości MIC metodą mikrorozcieńczeń w podłożu płynnym MHB (Mueller-Hinton broth) powinno być przeprowadzane zgodnie z Polską Normą PN-EN ISO 20776-1:2007, będącą polską wersją Normy Europejskiej EN ISO 20776-1:2006, zalecanej przez EUCAST¹. Końcowa gęstość inokulum powinna wynosić 5×10^5 CFU/mL (zakres od 2×10^5 do 8×10^5 CFU/mL).

Oznaczanie metodą dyfuzyjno-krążkową i przy użyciu paska gradientowego wykonywane jest na podłożu stałym MHA (Mueller-Hinton agar), z zawiesiną bakteryjną o gęstości optycznej 0,5 McFarlanda; inkubacja 18 ± 2 h w temp. 35 ± 1 °C, w atmosferze tlenowej.

2.1. Oznaczanie wrażliwości *S. aureus* i *S. lugdunensis* na penicylinę¹

Oznaczanie wrażliwości na penicylinę wykonywane jest wyłącznie dla izolatów *S. aureus* i *S. lugdunensis*; nie opracowano wiarygodnej metody dla pozostałych gatunków gronkowców. Można stosować metodę dyfuzyjno-krążkową z użyciem krążka z penicyliną benzylową (1 jednostka) lub metodę określania wartości MIC penicyliny benzylowej.

Metoda dyfuzyjno-krążkowa

- Podłoże stałe: MHA
- Krążek z penicyliną benzylową (1 jednostka)
- Zawiesina bakteryjna o gęstości optycznej 0,5 McFarlanda
- Sposób wykonania:
 - Nanieść równomiernie zawiesinę bakteryjną na podłoże jałową wymazówką
 - Nanieść krążek
- Inkubacja: 18 ± 2 h w temp. 35 ± 1 °C, w atmosferze tlenowej
- Odczyt: wykonać pomiar średnicy strefy zahamowania wzrostu; odczyt prowadzić w świetle przechodzącym
- Interpretacja wyniku: Tab. 3

Metoda mikrorozcieńczeń w podłożu płynnym

- Podłoże płynne: MHB
- Inokulum: 5×10^5 CFU/mL
- Sposób wykonania:
 - Przygotować serię dwukrotnych rozcieńczeń penicyliny benzylowej w bulionie MHB
- Inkubacja: 18 ± 2 h w temp. 35 ± 1 °C, w atmosferze tlenowej
- Interpretacja wyniku: Tab. 3

2.2. Oznaczanie wrażliwości *S. saprophyticus* na ampicylinę¹

Oznaczanie wrażliwości na ampicylinę wykonywane jest wyłącznie dla izolatów *S. saprophyticus*, metodą dyfuzyjno-krążkową z użyciem krążka z ampicyliną (2 μ g).

Metoda dyfuzyjno-krążkowa

- Podłoże stałe: MHA
- Krążek z ampicyliną (2 μ g)
- Zawiesina bakteryjna o gęstości optycznej 0,5 McFarlanda
- Sposób wykonania:
 - Nanieść równomiernie zawiesinę bakteryjną na podłoże jałową wymazówką
 - Nanieść krążek
- Inkubacja: 18 \pm 2h w temp. 35 \pm 1°C, w atmosferze tlenowej
- Odczyt: wykonać pomiar średnicy strefy zahamowania wzrostu; odczyt prowadzić w świetle odbitym
- Interpretacja wyniku: Tab. 3

Tabela 3. Interpretacja wyników oznaczania wrażliwości na penicylinę *S. aureus* i *S. lugdunensis* w metodach dyfuzyjno-krążkowej oraz mikrorozcieńczeniowej lub dyfuzji z paska gradientowego oraz wrażliwości na ampicylinę *S. saprophyticus* w metodzie dyfuzyjno-krążkowej ¹.

Antybiotyk	MIC (mg/L)		Krążek	Średnica strefy zahamowania wzrostu (mm)	
	S ^a <	R ^b >		S \geq	R<
Penicylina benzylowa, <i>S. aureus</i> * i <i>S. lugdunensis</i>	0,125	0,125	1 jedn.	26	26
Penicylina benzylowa, gronkowce koagulazo-ujemne inne niż <i>S. lugdunensis</i>	Brak wiarygodnych metod oznaczania wrażliwości				
Ampicylina, <i>S. saprophyticus</i>	Brak zaleceń		2 μ g	18	18

^aS – wrażliwy; ^bR – oporny; *W wykrywaniu izolatów *S. aureus* wytwarzających penicylinazę gronkowcową, metoda dyfuzyjno-krążkowa jest wiarygodniejsza od metody określania wartości MIC, pod warunkiem, że jest mierzona średnica strefy zahamowania wzrostu i dokładnie sprawdzana granica strefy. Granica strefy zahamowania wzrostu powinna być sprawdzana w świetle przechodzącym (płytką trzymana pod światło). Jeśli średnica strefy zahamowania wzrostu wynosi <26 mm izolat należy raportować jako oporny na penicylinę. Jeśli średnica strefy zahamowania wzrostu wynosi \geq 26 mm i granica tej strefy jest ostra lub wątpliwa izolat również należy raportować jako oporny na penicylinę. Jeśli jest rozmyta, raportować jako wrażliwy.

2.3. Oznaczanie wrażliwości *Staphylococcus* spp. na metycylinę ¹

Do wykrywania oporności *Staphylococcus* spp. na metycylinę rekomendowana jest metoda dyfuzyjno-krążkowa.

Metoda dyfuzyjno-krążkowa

- Podłoże stałe: MHA
- Krążek z cefoksytyną (30 μ g) z wyjątkiem izolatów *S. pseudintermedius* i *S. schleiferi*, dla których stosowany jest krążek z oksacyliną (1 μ g)
- Zawiesina bakteryjna o gęstości optycznej 0,5 McFarlanda
- Sposób wykonania:

- Nanieść równomiernie zawiesinę bakteryjną na podłoże jałową wymazówką
- Nanieść krążek odpowiedni dla badanego gatunku
- Inkubacja: 18 ± 2 h w temp. $35\pm 1^\circ\text{C}$, w atmosferze tlenowej
- Odczyt: wykonać pomiar średnicy strefy zahamowania wzrostu (uwzględnić obecność pojedynczych kolonii w strefie); odczyt prowadzić w świetle odbitym
- Interpretacja wyniku: Tab. 4

Tabela 4. Interpretacja wyników oznaczania wrażliwości na metycylinę izolatów *Staphylococcus* spp. w metodzie dyfuzyjno-krążkowej¹.

Antybiotyk	Krążek (μg)	Średnica strefy zahamowania wzrostu (mm)		ATU*
		S ^a <	R ^b >	
Cefoksytyna (badanie przesiewowe oporności na metycylinę), <i>S. aureus</i> i gronkowce koagulazo-ujemne inne niż <i>S. epidermidis</i>	30	22	22	
Cefoksytyna (badanie przesiewowe oporności na metycylinę), <i>S. epidermidis</i>	30	25	25	25-27
Cefoksytyna (badanie przesiewowe oporności na metycylinę), gronkowce koagulazo-ujemne niezidentyfikowane do gatunku	30	25	25	
Oksacylina (badanie przesiewowe oporności na metycylinę), <i>S. pseudintermedius</i> i <i>S. schleiferi</i>	1	20	20	

^aS – wrażliwy; ^bR – oporny; *Obszar niepewności technicznej (*ang.* Area of Technical Uncertainty)

Porównanie wartości granicznych do interpretacji wielkości stref średnic zahamowania wzrostu *Staphylococcus* spp., zalecanych przez EUCAST¹ i CLSI⁵³, w metodzie dyfuzyjno-krążkowej z użyciem krążka z cefoksytyną i oksacyliną, przedstawiono w pkt 2.8, Tab. 6.

2.4. Indukcja ekspresji genów *mec* przy użyciu krążka z cefoksytyną

Wytwarzanie nabytych białek PBP w komórce bakterii zachodzi w obecności cefoksytyny, będącej bardzo dobrym induktorem ekspresji genów *mecA* i *mecC*^{64,65}. Dlatego też zalecane jest, aby testy immunologiczne służące do wykrywania tych białek wykonywać z wykorzystaniem populacji komórek, w których ich wytwarzanie jest zaindukowane. W celu uzyskania takiego materiału należy nanieść równomiernie zawiesinę bakteryjną jałową wymazówką na płytkę z podłożem stałym MHA uzupełnionym krwią lub płytkę agarową z krwią i położyć krążek z cefoksytyną (30 μg). Materiał wyhodowany po 24h inkubacji w temp. $35\pm 2^\circ\text{C}$, w atmosferze 5% CO_2 , pobierać z krawędzi strefy zahamowania wzrostu bakterii wokół krążka⁵³.

2.5. Oznaczanie wrażliwości *S. aureus* na cefalosporyny V generacji¹

Oznaczanie wrażliwości na cefalosporyny V gen., ceftarolinę i ceftobiprol, wykonywane jest wyłącznie dla izolatów *S. aureus*. Można stosować metodę dyfuzyjno-krążkową z użyciem krążka z ceftaroliną (5 μg) lub ceftobipolem (5 μg), lub metodę określania wartości MIC.

Metoda dyfuzyjno-krążkowa

- Podłoże stałe: MHA
- Krążek z ceftaroliną (5 μ g) lub ceftobiprolem (5 μ g)
- Zawiesina bakteryjna o gęstości optycznej 0,5 McFarlanda
- Sposób wykonania:
 - Nanieść równomiernie zawiesinę bakteryjną na podłoże jałową wymazówką
 - Nanieść odpowiedni krążek
- Inkubacja: 18 \pm 2h w temp. 35 \pm 1°C, w atmosferze tlenowej
- Odczyt: wykonać pomiar średnicy strefy zahamowania wzrostu; odczyt prowadzić w świetle odbitym
- Interpretacja wyniku: Tab. 5

Metoda mikrorozcieńczeń w podłożu płynnym

- Podłoże płynne: MHB
- Inokulum: 5x10⁵ CFU/mL
- Sposób wykonania:
 - Przygotować serię dwukrotnych rozcieńczeń ceftaroliny lub ceftobiprołu w bulionie MHB
- Inkubacja: 18 \pm 2h w temp. 35 \pm 1°C, w atmosferze tlenowej
- Interpretacja wyniku: Tab. 5

Tabela 5. Interpretacja wyników oznaczania wrażliwości na ceftarolinę i ceftobiprol *S. aureus* w metodach dyfuzyjno-krążkowej oraz mikrorozcieńczeniowej lub dyfuzji z paska gradientowego ¹.

Antybiotyk	MIC (mg/L)		ATU*	Krążek (μ g)	Średnica strefy zahamowania wzrostu (mm)		ATU
	S ^a <	R ^b >			S \geq	R<	
Ceftarolina, <i>S. aureus</i> (wskazania inne niż zapalenie płuc)	1	2	1	5	20	17	19-20
Ceftarolina, <i>S. aureus</i> (zapalenie płuc)	1	1	1	5	20	20	19-20
Ceftobiprol, <i>S. aureus</i>	2	2	2	5	17	17	16-17

^aS – wrażliwy; ^bR – oporny; *Obszar niepewności technicznej (*ang.* Area of Technical Uncertainty, ATU)

2.6. Oznaczanie wrażliwości *S. aureus* na metycylinę (oksacylinę) ⁵³**Metoda przeglądowa z oksacyliną w podłożu stałym**

- Podłoże stałe: MHA z 4% NaCl i oksacyliną w stężeniu 6 μ g/mL
- Zawiesina bakteryjna o gęstości optycznej 0,5 McFarlanda
- Sposób wykonania:
 1. zanurzyć wykalibrowaną eżę (1 μ L) w zawieszynie bakteryjnej, a następnie nanieść ją na podłoże i rozprowadzić w postaci plamki o średnicy 10-15 mm; lub

2. zanurzyć wymazówkę w zawiesinie bakteryjnej i rozprowadzić w postaci plamki o średnicy 10-15 mm lub równomiernie na całej płytce

- Inkubacja: 24h w temp. 33 - 35°C, w atmosferze tlenowej
- Odczyt: wzrost bakterii odczytywać w świetle przechodzącym
- Interpretacja wyniku: wzrost więcej niż jednej kolonii lub niewielki ślad wzrostu w postaci mgiełki oznacza oporność na metycylinę (oksacylinę)

2.7. Oznaczanie wrażliwości na metycylinę (oksacylinę). Metoda określania wartości minimalnego stężenia hamującego

Wykrywanie oporności na metycylinę poprzez oznaczenie wartości MIC jest wykonywane najczęściej z użyciem gotowych testów diagnostycznych do odczytu wizualnego lub w systemach automatycznych. Do oznaczania wartości MIC stosowana jest metoda mikrorozcieńczeń cefoksytyny lub oksacyliny w podłożu bulionowym, lub metoda dyfuzji z paska gradientowego.

2.7.1. Oznaczanie wrażliwości na metycylinę *S. aureus* i *S. lugdunensis* ⁵³

Metoda mikrorozcieńczeń cefoksytyny w podłożu płynnym

Metoda obejmuje także pozostałe gatunki z kompleksu *S. aureus* - *S. argenteus* i *S. schweitzeri*.

- Podłoże płynne: CAMHB
- Inokulum: 5×10^5 CFU/mL
- Sposób wykonania:
 - Przygotować serię dwukrotnych rozcieńczeń cefoksytyny w bulionie CAMHB
- Inkubacja: 16-20h w temp. 33 - 35°C, w atmosferze tlenowej
- Interpretacja wyniku:
MIC cefoksytyny:
 - $\geq 8 \mu\text{g/mL}$ izolat oporny na metycylinę (oksacylinę) - *mecA* dodatni*
 - $\leq 4 \mu\text{g/mL}$ izolat wrażliwy na metycylinę (oksacylinę) - *mecA* ujemny

*Wytyczne EUCAST dotyczące wykrywania mechanizmów oporności i swoistej oporności o znaczeniu klinicznym i/lub epidemiologicznym zalecają raportowanie izolatów *S. aureus*, dla których MIC cefoksytyny wynosi $>4 \mu\text{g/L}$ jako odporne na metycylinę ⁶².

Metoda mikrorozcieńczeń oksacyliny w podłożu płynnym

Metoda obejmuje także pozostałe gatunki z kompleksu *S. aureus* - *S. argenteus* i *S. schweitzeri*.

- Podłoże płynne: CAMHB z 2% NaCl
- Inokulum: 5×10^5 CFU/mL
- Sposób wykonania:
 - Przygotować serię dwukrotnych rozcieńczeń oksacyliny w bulionie CAMHB z 2% NaCl
- Inkubacja: 24h w temp. 33 - 35°C, w atmosferze tlenowej
- Interpretacja wyniku:

MIC oksacyliny:

$\geq 4 \mu\text{g/mL}$ izolat oporny na metycylinę (oksacylinę) - *mecA* dodatni*

$\leq 2 \mu\text{g/mL}$ izolat wrażliwy na metycylinę (oksacylinę) - *mecA* ujemny

* Ze względu na rzadkie przypadki występowania mechanizmów oporności na metycylinę (oksacylinę) innych niż obecność *mecA* izolaty, które nie niosą genu *mecA*, ale są odporne na oksacylinę (MIC oksacyliny $\geq 4 \mu\text{g/mL}$), powinny być raportowane jako odporne na metycylinę (oksacylinę) ⁶⁶.

2.7.2. Oznaczanie wrażliwości *Staphylococcus* spp. na metycylinę z wyjątkiem *S. aureus* i *S. lugdunensis* ⁵³

Metoda mikrorozcieńczeń oksacyliny w podłożu płynnym

Metoda nie obejmuje gatunków z kompleksu *S. aureus*.

- Podłoże płynne: CAMHB z 2% NaCl
- Inokulum: 5×10^5 CFU/mL
- Sposób wykonania:
 - Przygotować serię dwukrotnych rozcieńczeń oksacyliny w bulionie CAMHB z 2% NaCl
- Inkubacja: 24h w temp. 33 - 35°C, w atmosferze tlenowej
- Interpretacja wyniku:

MIC oksacyliny:

$\geq 1 \mu\text{g/mL}$ izolat oporny na metycylinę (oksacylinę) - *mecA* dodatni

$\leq 0,5 \mu\text{g/mL}$ izolat wrażliwy na metycylinę (oksacylinę) - *mecA* ujemny

2.7.3. Oznaczanie wrażliwości na metycylinę. Metoda dyfuzji z paska gradientowego z cefoksytiną lub oksacyliną

Komercyjne paski z gradientem stężeń cefoksytiny lub oksacyliny wytwarzane są przez różnych producentów. Oznaczanie wrażliwości i interpretację wyników należy prowadzić zgodnie z instrukcją wytwórcy.

Porównanie wartości granicznych MIC cefoksytiny i oksacyliny dla *Staphylococcus* spp., w metodzie mikrorozcieńczeniowej lub dyfuzji z paska gradientowego, zalecanych przez EUCAST ¹ i CLSI ⁵³ przedstawiono w pkt 2.8, Tab. 7.

2.8. Oznaczanie wrażliwości *Staphylococcus* spp. na metycylinę - porównanie wartości granicznych zalecanych przez EUCAST¹ i CLSI⁵³**Tabela 6.** Porównanie wartości granicznych do interpretacji wielkości stref średnic zahamowania wzrostu bakterii z rodzaju *Staphylococcus*, zalecanych przez EUCAST¹ i CLSI⁵³, w metodzie dyfuzyjno-krążkowej z użyciem krążka z cefoksytyną i oksacyliną

Ref.	Gatunek	Cefoksytyna		Oksacylina		Uwagi/interpretacja wg Ref.		
		Krążek (µg)	Średnica strefy zahamowania wzrostu (mm)		Krążek (µg)		Średnica strefy zahamowania wzrostu (mm)	
			S ^a	R ^b			S ^a	R ^b
EUCAST 2021	<i>S. aureus</i> i gronkowce koagulazo-ujemne inne niż <i>S. epidermidis</i>	30	≥ 22	< 22				
	<i>S. epidermidis</i> * i gronkowce koagulazo-ujemne niezidentyfikowane do gatunku	30	≥ 25	< 25		* <i>S. epidermidis</i> ATU 25-27 mm		
	<i>S. pseudintermedius</i> i <i>S. schleiferi</i>				1	≥ 20 < 20	Cefoksytyna w metodzie dyfuzyjno-krążkowej jest słabszym wskaźnikiem obecności <i>mecA</i> niż u innych gronkowców	
CLSI 2021	<i>S. aureus</i> ^c i <i>S. lugdunensis</i>	30	≥ 22	≤ 21		<ul style="list-style-type: none"> • ≤ 21 mm = oporność ze względu na obecność <i>mecA</i>; izolat raportować jako oporny na metycylinę (oksacylinę) • ≥ 22 mm = izolat <i>mecA</i> ujemny Wynik metody dyfuzyjno-krążkowej z użyciem krążka z oksacyliną nie jest wiarygodny przy wykrywaniu oporności warunkowanej obecnością genu <i>mecA</i> .		
	<i>S. epidermidis</i> , <i>S. pseudintermedius</i> i <i>S. schleiferi</i>				1	≥ 18 ≤ 17	<ul style="list-style-type: none"> • ≤ 17 mm = oporność ze względu na obecność <i>mecA</i>; izolat raportować jako oporny na metycylinę (oksacylinę) • ≥ 18 mm = izolat <i>mecA</i> ujemny Wynik metody dyfuzyjno-krążkowej z użyciem krążka z cefoksytyną nie jest wiarygodny przy wykrywaniu oporności warunkowanej obecnością genu <i>mecA</i> .	
	<i>Staphylococcus</i> spp. z wyjątkiem <i>S. aureus</i> , <i>S. lugdunensis</i> , <i>S. pseudintermedius</i> i <i>S. schleiferi</i>	30	≥ 25	≤ 24			<ul style="list-style-type: none"> • ≤ 24 mm = oporność ze względu na obecność <i>mecA</i>; izolat raportować jako oporny na metycylinę (oksacylinę) • ≥ 25 mm = izolat <i>mecA</i> ujemny 	

^aS – wrażliwy; ^bR – oporny; ^cdotyczy kompleksu *S. aureus*, obejmującego trzy gatunki gronkowców koagulazo-dodatnich: *S. aureus*, *S. argenteus* i *S. schweitzeri*

*Obszar niepewności technicznej (ang. Area of Technical Uncertainty, ATU)

Tabela 7. Porównanie wartości granicznych najmniejszych stężeń hamujących (*ang.* minimal inhibition concentration, MIC) cefoksytyny i oksacyliny dla bakterii z rodzaju *Staphylococcus*, w metodzie mikrorozcieńczeniowej lub dyfuzji z paska gradientowego, zalecanych przez EUCAST¹ i CLSI⁵³.

Ref.	Gatunek	MIC cefoksytyny		MIC oksacyliny		Uwagi/interpretacja wg Ref.	Zalecenia
		S ^a	R ^b	S	R		
EUCAST 2021	<i>S. aureus</i> <i>S. lugdunensis</i>	> 4 mg/L ^c				Izolat oporny na metycylinę (najczęściej ze względu na obecność genu <i>mecA</i> , rzadziej - <i>mecC</i>). Oporność na metycylinę wiarygodnie przewiduje metoda dyfuzyjno-krążkowa z użyciem krążka z cefoksytyną.	Przy wartościach granicznych MIC powtórzyć badanie; sprawdzić fenotyp metodą dyfuzyjno-krążkową z cefoksytyną lub oksacyliną, zgodnie z zaleceniami. Przeprowadzić wykrywanie obecności genów <i>mecA</i> , <i>mecB</i> i <i>mecC</i> za pomocą techniki PCR lub ich produktów metodami immunologicznymi.
	<i>S. saprophyticus</i>	> 8 mg/L					
	<i>S. aureus</i> <i>S. lugdunensis</i> <i>S. saprophyticus</i>			> 2 mg/L		W większości przypadków izolaty są oporne na metycylinę, ze względu na obecność genu <i>mecA</i> lub <i>mecC</i> . Czasami wysokie wartości MIC oksacyliny u <i>S. aureus</i> obserwowane są przy braku genów <i>mec</i> – fenotyp BORSA.	
	CoNS inne niż <i>S. lugdunensis</i> i <i>S. saprophyticus</i>			> 0,25 mg/L		Izolat oporny na metycylinę	
CLSI 2021	<i>S. aureus</i> ^d <i>S. lugdunensis</i>	≤ 4 µg/mL	≥ 8 µg/mL			<ul style="list-style-type: none"> MIC cefoksytyny ≥ 8 µg/mL = oporność ze względu na obecność <i>mecA</i>; izolat raportować jako oporny na metycylinę (oksacylinę) MIC cefoksytyny ≤ 4 µg/mL = izolat <i>mecA</i> ujemny MIC oksacyliny ≥ 4 µg/mL = oporność ze względu na obecność <i>mecA</i>; izolat raportować jako oporny na metycylinę (oksacylinę) MIC oksacyliny ≤ 2 µg/mL = izolat <i>mecA</i> ujemny 	Izolaty, u których uzyskano wynik ujemny powinny być raportowane jako wrażliwe na metycylinę (oksacylinę).
				≤ 2 µg/mL	≥ 4 µg/mL		
	<i>Staphylococcus</i> spp. inne niż <i>S. aureus</i> i <i>S. lugdunensis</i>			≤ 0,5 µg/mL	≥ 1 µg/mL	<ul style="list-style-type: none"> MIC oksacyliny ≥ 1 µg/mL = oporność ze względu na obecność <i>mecA</i>; izolat raportować jako oporny na metycylinę (oksacylinę) MIC oksacyliny ≤ 0,5 µg/mL = izolat <i>mecA</i> ujemny Dla gatunków <i>Staphylococcus</i> spp. innych niż <i>S. aureus</i> , <i>S. lugdunensis</i> , <i>S. epidermidis</i> , <i>S. pseudintermedius</i> i <i>S. schleiferi</i> wartości graniczne MIC oksacyliny mogą przeszacowywać oporność i niektóre izolaty o wartościach MIC 1-2 µg/mL mogą być <i>mecA</i> ujemne. Izolaty o takich wartościach MIC, pochodzące z poważnych zakażeń, można badać w kierunku obecności genu <i>mecA</i> lub PBP2a. Izolaty, u których nie wykryto obecności tych markerów powinny być raportowane jako wrażliwe na metycylinę (oksacylinę).	

^aS – wrażliwy; ^bR – oporny; ^c jednostki wg zaleceń; ^d dotyczy kompleksu *S. aureus*, obejmującego trzy gatunki gronkowców koagulazo-dodatnich: *S. aureus*, *S. argenteus* i *S. schweitzeri*

2.9. Testy immunologiczne do wykrywania MRSA

Dostępne, komercyjne testy immunologiczne zostały opracowane do wykrywania białka PBP2a (PBP2'), produktu genu *mecA*. Obejmują one testy aglutynacji lateksowej, przykładowo Slidex® MRSA Detection Kit (bioMérieux), Oxoid™ PBP2' Latex Agglutination Test Kit (Thermo Scientific™), PBP2a assay (Innogenetics) lub Mastalex™-MRSA (Mast Group Ltd.) oraz testy immunochromatograficzne, jak PBP2a Culture Colony Test (Alere™) lub Clearview Exact PBP2a (Inverness Medical Innovations). W zależności od rodzaju, testy te umożliwiają wykonanie oznaczenia wyłącznie u izolatów *S. aureus* lub zarówno *S. aureus* jak i gronkowców koagulazo-ujemnych, przy czym, należy zawsze prowadzić je zgodnie z zaleceniami producenta. Należy pamiętać, że charakteryzują się one różną swoistością i czułością^{67,68}. Nie opracowano dotychczas testów immunologicznych swoiście wykrywających białka PBP2b i PBP2c (produkty genów *mecB* i *mecC*), a tym samym jednoznacznie rozróżniających nabyte białka PBP warunkujące oporność na metycylinę. Co więcej, pomimo 63% homologii pomiędzy sekwencjami aminokwasowymi białek PBP2a i PBP2c⁸, niektóre z testów do wykrywania białka PBP2a wykrywają również białko PBP2c. Przykładowo, pierwsze izolaty *S. aureus* niosące gen *mecC* były zidentyfikowane jako MRSA przy użyciu testów Mastalex™-MRSA i Clearview Exact PBP2a, ale nie przy stosowaniu PBP2a assay⁶. Pokazano również, że test PBP2a Culture Colony Test wykrywa białko PBP2c w izolatach *mecC*-MRSA wówczas, gdy jego wytwarzanie jest indukowane cefoksytyną przez co najmniej 18h⁶⁵. Indukcję cefoksytyną (patrz pkt 2.4) można również stosować przy wykrywaniu białka PBP2a metodą immunochromatograficzną w izolatach *S. aureus* o niskim poziomie ekspresji genu *mecA*^{67,69}.

2.10. Szczepy wzorcowe

Kontrolę jakości należy prowadzić zgodnie z zaleceniami EUCAST^{1,70}. Jako szczep kontrolny do oznaczania wrażliwości na antybiotyki β -laktamowe oraz wykrywania obecności penicylinazy zalecany jest *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 (*mecA* ujemny, wytwarzający na niskim poziomie β -laktamazę). Jako szczep odporny na metycylinę (MRSA) w metodzie dyfuzyjno-krażkowej z cefoksytyną zalecany jest *Staphylococcus aureus* NCTC 12493 (*mecA* dodatni). Jako szczep wrażliwy na wszystkie antybiotyki β -laktamowe zalecany jest *Staphylococcus aureus* ATCC 25923⁵³.

Do kontroli jakości oznaczania wrażliwości *S. aureus* na metycylinę w metodzie przeglądowej z oksacyliną w podłożu zalecane są:

- *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 - wrażliwy na metycylinę (*mecA* ujemny)
- *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 - odporny na metycylinę (*mecA* dodatni) lub
- *Staphylococcus aureus* MIKROBANK 14.001 (dawniej *S. aureus* MIKROBANK MR3) - szczep o heterogennej ekspresji oporności na metycylinę (kontrola dodatnia)
- *Staphylococcus aureus* MIKROBANK 14.002 (dawniej *S. aureus* MIKROBANK MR16) - szczep o homogennej ekspresji oporności na metycylinę (kontrola dodatnia).

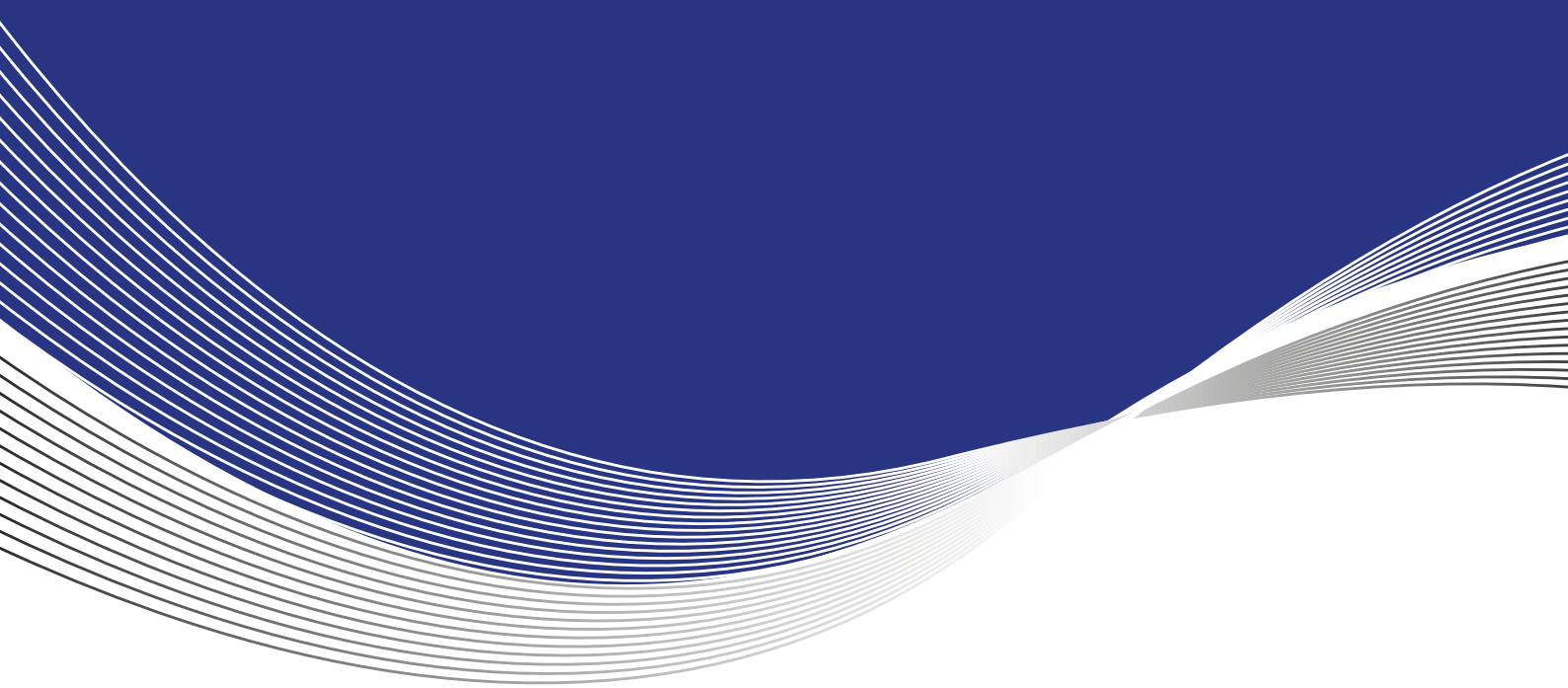
Piśmiennictwo

1. EUCAST. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 11.0. <http://www.eucast.org>. 2021.
2. EUCAST. EUCAST Intrinsic Resistance and Unusual Phenotypes. Version 3.2, February. 2020.
3. Lowy FD. Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*. J Clin Invest 2003;111:1265-1273.
4. Hartman BJ, Tomasz A. Low-affinity penicillin-binding protein associated with β -lactam resistance in *Staphylococcus aureus*. J Bacteriol 1984;158:513-516.
5. Becker K, van Alen S, Idelevich EA, et al. Plasmid-encoded transferable *mecB*-mediated methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. Emerg Infect Dis 2018;24:242-248.
6. Shore AC, Deasy EC, Slickers P, et al. Detection of staphylococcal cassette chromosome *mec* type XI carrying highly divergent *mecA*, *mecI*, *mecR1*, *blaZ*, and *ccr* genes in human clinical isolates of clonal complex 130 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother 2011;55:3765-3773.
7. Baig S, Johannesen TB, Overballe-Petersen S, et al. Novel SCC*mec* type XIII (9A) identified in an ST152 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Infect Genet Evol 2018;61:74-76.
8. García-Álvarez L, Holden MTG, Lindsay H, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with a novel *mecA* homologue in human and bovine populations in the UK and Denmark: a descriptive study. Lancet Infect Dis 2011;11:595-603.
9. Petersen A, Stegger M, Heltberg O, et al. Epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying the novel *mecC* gene in Denmark corroborates a zoonotic reservoir with transmission to humans. Clin Microbiol Infect 2013;19:E16-E22.
10. Hartman BJ, Tomasz A. Expression of methicillin resistance in heterogeneous strains of *Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother 1986;29:85-92.
11. Kim C, Mwangi M, Chung M, et al. The mechanism of heterogeneous beta-lactam resistance in MRSA: key role of the stringent stress response. PLoS One 2013;8:e82814.
12. Tomasz A, Nachman S, Leaf H. Stable classes of phenotypic expression in methicillin-resistant clinical isolates of staphylococci. Antimicrob Agents Chemother 1991;35:124-129.
13. de Lencastre H, Sa Figueiredo AM, Urban C, et al. Multiple mechanisms of methicillin resistance and improved methods for detection in clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother 1991;35:632-639.
14. Hryniewicz W, Trzciński K. The current situation and perspectives of standardization in susceptibility testing in Poland. Antiinfective Drugs and Chemotherapy 1995;13:35-40.
15. Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. Clin Microbiol Infect 2012;18:268-281.
16. Klevens RM, Morrison MA, Nadle J, et al. Invasive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in the United States. JAMA 2007;298:1763-1771.
17. Luczak-Kadlubowska A, Sulikowska A, Empel J, et al. Countrywide molecular survey of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains in Poland. J Clin Microbiol 2008;46:2930-2937.
18. Gostev V, Kruglov A, Kalinogorskaya O, et al. Molecular epidemiology and antibiotic resistance of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* circulating in the Russian Federation. Infect Genet Evol 2017;53:189-194.

19. Garcia C, Rijnders MI, Bruggeman C, et al. Antimicrobial resistance and molecular typing of *Staphylococcus aureus* bloodstream isolates from hospitals in Peru. *J Infect* 2012;65:406-411.
20. Sakoulas G, Moellering RC, Jr. Increasing antibiotic resistance among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. *Clin Infect Dis* 2008;46 Suppl 5:S360-367.
21. Gomez Casanova N, Siller Ruiz M, Munoz Bellido JL. Mechanisms of resistance to daptomycin in *Staphylococcus aureus*. *Rev Esp Quimioter* 2017;30:391-396.
22. Antonelli A, D'Andrea MM, Brenciani A, et al. Characterization of *poxTA*, a novel phenicol-oxazolidinone-tetracycline resistance gene from an MRSA of clinical origin. *J Antimicrob Chemother* 2018;73:1763-1769.
23. Malbruny B, Canu A, Bozdogan B, et al. Resistance to quinupristin-dalfopristin due to mutation of L22 ribosomal protein in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 2002;46:2200-2207.
24. Werner G, Cuny C, Schmitz FJ, et al. Methicillin-resistant, quinupristin-dalfopristin-resistant *Staphylococcus aureus* with reduced sensitivity to glycopeptides. *J Clin Microbiol* 2001;39:3586-3590.
25. Otto M. Community-associated MRSA: what makes them special? *Int J Med Microbiol* 2013;303:324-330.
26. Boucher HW, Corey GR. Epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clin Infect Dis* 2008;46 Suppl 5:S344-349.
27. Carpaij N, Willems RJ, Rice TW, et al. Genetic variation in spatio-temporal confined USA300 community-associated MRSA isolates: a shift from clonal dispersion to genetic evolution? *PLoS One* 2011;6:e16419.
28. Wong JW, Ip M, Tang A, et al. Prevalence and risk factors of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carriage in Asia-Pacific region from 2000 to 2016: a systematic review and meta-analysis. *Clin Epidemiol* 2018;10:1489-1501.
29. Diep BA, Gill SR, Chang RF, et al. Complete genome sequence of USA300, an epidemic clone of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet* 2006;367:731-739.
30. Stryjewski ME, Chambers HF. Skin and soft-tissue infections caused by community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clin Infect Dis* 2008;46 Suppl 5:S368-377.
31. Voyich JM, Otto M, Mathema B, et al. Is Pantone-Valentine leukocidin the major virulence determinant in community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* disease? *J Infect Dis* 2006;194:1761-1770.
32. Zhang K, McClure JA, Elsayed S, et al. Coexistence of Pantone-Valentine leukocidin-positive and -negative community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* USA400 sibling strains in a large Canadian health-care region. *J Infect Dis* 2008;197:195-204.
33. Otter JA, French GL. Molecular epidemiology of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Europe. *Lancet Infect Dis* 2010;10:227-239.
34. Kobayashi SD, DeLeo FR. An update on community-associated MRSA virulence. *Curr Opin Pharmacol* 2009;9:545-551.
35. Mroczkowska A, Zmudzki J, Marszalek N, et al. Livestock-associated *Staphylococcus aureus* on Polish pig farms. *PLoS One* 2017;12:e0170745.
36. McCarthy AJ, Lindsay JA, Loeffler A. Are all methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) equal in all hosts? Epidemiological and genetic comparison between animal and human MRSA. *Vet Dermatol* 2012;23:267-275.
37. Chuang YY, Huang YC. Livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Asia: an emerging issue? *Int J Antimicrob Agents* 2015;45:334-340.
38. EFSA. Analysis of the base-line survey on the prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in holdings with breeding pigs, in the EU, 2008. Part A: MRSA prevalence estimates. *EFSA J*, 7 (11): 1376 2009.

39. Lozano C, Aspiroz C, Saenz Y, et al. Genetic environment and location of the *Inu(A)* and *Inu(B)* genes in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and other staphylococci of animal and human origin. *J Antimicrob Chemother* 2012;67:2804-2808.
40. Li J, Jiang N, Ke Y, et al. Characterization of pig-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Vet Microbiol* 2017;201:183-187.
41. Yan X, Li Z, Chlebowicz MA, et al. Genetic features of livestock-associated *Staphylococcus aureus* ST9 isolates from Chinese pigs that carry the *lsa(E)* gene for quinupristin/dalfopristin resistance. *Int J Med Microbiol* 2016;306:722-729.
42. Becker K, Ballhausen B, Kock R, et al. Methicillin resistance in *Staphylococcus* isolates: the “*mec* alphabet” with specific consideration of *mecC*, a *mec* homolog associated with zoonotic *S. aureus* lineages. *Int J Med Microbiol* 2014;304:794-804.
43. Paterson GK, Harrison EM, Holmes MA. The emergence of *mecC* methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Trends Microbiol* 2014;22:42-47.
44. Lozano C, Fernandez-Fernandez R, Ruiz-Ripa L, et al. Human *mecC*-carrying MRSA: clinical implications and risk factors. *Microorganisms* 2020;8:1615.
45. Goudarzi M, Navidinia M, Dadashi M, et al. First report of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying the *mecC* gene in human samples from Iran: prevalence and molecular characteristics. *New Microbes New Infect* 2021;39:100832.
46. Alves M, Penna B, Pereira RFA, et al. First report of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* harboring *mecC* gene in milk samples from cows with mastitis in southeastern Brazil. *Braz J Microbiol* 2020;51:2175-2179.
47. Khan AA, Ali A, Tharmalingam N, et al. First report of *mecC* gene in clinical methicillin resistant *S. aureus* (MRSA) from tertiary care hospital Islamabad, Pakistan. *J Infect Public Health* 2020;13:1501-1507.
48. Aklilu E, Hui Ying C. First *mecC* and *mecA* positive livestock-associated methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (*mecC* MRSA/LA-MRSA) from dairy cattle in Malaysia. *Microorganisms* 2020;8:147.
49. Stegger M, Andersen PS, Kearns A, et al. Rapid detection, differentiation and typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* harbouring either *mecA* or the new *mecA* homologue *mecA*_{LGA251}. *Clin Microbiol Infect* 2012;18:395-400.
50. Becker K, Larsen AR, Skov RL, et al. Evaluation of a modular multiplex-PCR methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* detection assay adapted for *mecC* detection. *J Clin Microbiol* 2013;51:1917-1919.
51. Cartwright EJ, Paterson GK, Raven KE, et al. Use of Vitek 2 antimicrobial susceptibility profile to identify *mecC* in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* 2013;51:2732-2734.
52. Kriegeskorte A, Idelevich EA, Schlattmann A, et al. Comparison of different phenotypic approaches to screen and detect *mecC*-harboring methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* 2018;56:e00826-00817.
53. CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 31st ed. CLSI supplement M100. 2021.
54. Kim C, Milheiriço C, Gardete S, et al. Properties of a novel PBP2A protein homolog from *Staphylococcus aureus* strain LGA251 and its contribution to the β -lactam-resistant phenotype. *J Biol Chem* 2012;287:36854-36863.
55. Paterson GK, Morgan FJ, Harrison EM, et al. Prevalence and characterization of human *mecC* methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates in England. *J Antimicrob Chemother* 2014;69:907-910.
56. Hryniewicz MM, Garbacz K. Borderline oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus* (BORSA) - a more common problem than expected? *J Med Microbiol* 2017;66:1367-1373.
57. Argudin MA, Roisin S, Nienhaus L, et al. Genetic diversity among *Staphylococcus aureus* isolates showing oxacillin and/or cefoxitin resistance not linked to the presence of *mec* genes. *Antimicrob Agents Chemother* 2018;62:e00091-00018.

-
58. Skinner S, Murray M, Walus T, et al. Failure of cloxacillin in treatment of a patient with borderline oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus* endocarditis. *J Clin Microbiol* 2009;47:859-861.
 59. Krupa P, Bystroń J, Bania J, et al. Genotypes and oxacillin resistance of *Staphylococcus aureus* from chicken and chicken meat in Poland. *Poult Sci* 2014;93:3179-3186.
 60. Krupa P, Bystroń J, Podkowiak M, et al. Population structure and oxacillin resistance of *Staphylococcus aureus* from pigs and pork meat in South-West of Poland. *Biomed Res Int* 2015;2015:141475.
 61. EUCAST. EUCAST Expert rules for *Staphylococcus* spp. 2018, http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Expert_Rules/2018/Exprules_Staphylococcus_2018.pdf.
 62. EUCAST. EUCAST guidelines for detection of resistance mechanisms and specific resistance of clinical and/or epidemiological importance, Version. 2.0, July. 2017.
 63. Hososaka Y, Hanaki H, Endo H, et al. Characterization of oxacillin-susceptible *mecA*-positive *Staphylococcus aureus*: a new type of MRSA. *J Infect Chemother* 2007;13:79-86.
 64. Okonogi K, Noji Y, Kondo M, et al. Emergence of methicillin-resistant clones from cephamycin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Antimicrob Chemother* 1989;24:637-645.
 65. Dupieux C, Bouchiat C, Larsen AR, et al. Detection of *mecC*-positive *Staphylococcus aureus*: what to expect from immunological tests targeting PBP2a? *J Clin Microbiol* 2017;55:1961-1963.
 66. CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 30th ed. CLSI supplement M100. 2020.
 67. Dupieux C, Trouillet-Assant S, Tasse J, et al. Evaluation of a commercial immunochromatographic assay for rapid routine identification of PBP2a-positive *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2016;86:262-264.
 68. Tasse J, Dupieux C, Caillon J, et al. Rapid bench identification of methicillin-sensitive and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a multicenter comparative evaluation of Alere™ PBP2a Culture Colony Test (Alere) versus Slidex® MRSA Detection (bioMérieux). *PLoS One* 2016;13 e0200064.
 69. Nonhoff C, Roisin S, Hallin M, et al. Evaluation of Clearview Exact PBP2a, a new immunochromatographic assay, for detection of low-level methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (LL-MRSA). *J Clin Microbiol* 2012;50:3359-3360.
 70. EUCAST. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Routine and extended internal quality control for MIC determination and disk diffusion as recommended by EUCAST. Version 11.0. <http://www.eucast.org>. 2021.
-



ISBN 978-83-949636-6-8