

Problemy weterynaryjnej diagnostyki mikrobiologicznej dotyczącej zakażeń gronkowcowych

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

z Zakładu Mikrobiologii Katedry Nauk Przedklinicznych Wydziału Medycyny Weterynaryjnej w Warszawie

Gronkowce należą do bakterii powszechnie występujących w środowisku oraz mikrobiomie ludzi i zwierząt. Zakażenia u ludzi najczęściej wywołwane są przez *Staphylococcus aureus* (1). W weterynarii spośród gatunków koagulazo-dodatnich (coagulase-positive staphylococci – CPS) obok *S. aureus* istotne są również *Staphylococcus pseudintermedius* oraz *Staphylococcus schleiferi* subsp. *coagulans*, izolowane głównie od psów, jak również pozostałe gatunki CPS (2, 3). W ostatnim czasie wyodrębniono kilkanaście nowych gatunków z rodzaju *Staphylococcus*, co wskazuje na ogromną różnorodność tych bakterii i przysparza trudności w ich identyfikacji. Obecnie, z materiałów klinicznych pochodzących od zwierząt oraz ludzi, coraz częściej izolowane są także gronkowce koagulazo-ujemne (coagulase-negative staphylococci – CNS) jako czynniki etiologiczne zakażeń (3, 4). Wskazuje to na konieczność prawidłowej identyfikacji również tej grupy gronkowców.

Podstawowym celem weterynaryjnej diagnostyki mikrobiologicznej jest identyfikacja czynnika zakaźnego. Prawidłowe i szybkie rozpoznanie drobnoustrojów wyizolowanych z materiału klinicznego umożliwia przeprowadzenie wiarygodnego badania ich lekowrażliwości, co z kolei decyduje o wyborze skutecznej antybiotykoterapii (5). Tradycyjne procedury diagnostyczne oparte są w głównej mierze na metodach hodowlanych, w których oceniane są cechy fenotypowe bakterii. Obecnie do identyfikacji gronkowców, jak również innych mikroorganizmów, coraz częściej wykorzystywane są techniki molekularne bazujące na analizie kwasów nukleinowych, a także serologiczne umożliwiające wykrycie swoistych antygenów (6, 7, 8). Diagnostyka mikrobiologiczna wymaga przestrzegania określonych procedur, które obejmują wszystkie etapy badania, począwszy od sposobu pobierania materiału od pacjenta poprzez transport pobranego materiału, stosowanie metod izolacji i identyfikacji patogenów, kończąc na interpretacji uzyskanych wyników. Ujednolicenie tych procedur wpływa na wiarygodność oraz powtarzalność uzyskiwanych wyników badań. Weterynaryjna diagnostyka mikrobiologiczna często bazuje na rekomendacjach opracowanych dla szczepów bakterii pochodzących od ludzi. Ogólny schemat metodyki laboratoryjnej jest najczęściej odpowiedni również dla rozpoznania patogenów izolowanych od zwierząt. Jednak wyzwaniem dla diagnostyki weterynaryjnej jest brak procedur identyfikacji gatunków gronkowców występujących u zwierząt, a także brak lub niepełny zakres rekomendacji dotyczących interpretacji wyników badania lekowrażliwości tych bakterii (7).

Problems of veterinary microbiological diagnostics in staphylococcal infections

Kizerwetter-Świda M., Chrobak-Chmiel D., Rzewuska M., Division of Microbiology, Department of Preclinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Warsaw University of Life Sciences – SGGW

The aim of this review was to present the problems of microbiological diagnostics related to staphylococcal infections in animals. In contrast to human medicine, different species of coagulase-positive staphylococci are isolated from clinical specimens and except for *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus pseudintermedius* and *Staphylococcus schleiferi*, are also often recognized. Recently, new species have been described within the genus *Staphylococcus*. Moreover, coagulase-negative staphylococci are increasingly isolated from clinical specimens. This indicates the need of correct staphylococci identification protocol for veterinary diagnostic laboratories. Many of the modern molecular biology methods are not yet used for routine veterinary diagnostics. Therefore, harmonization of methodology and the development of guidelines for the interpretation of susceptibility testing results for animal pathogens, including various species of staphylococci and their host species, are urgently needed.

Keywords: *Staphylococcus* spp., taxonomy, animals, infections, microbiological diagnostics.

Klasyczne metody identyfikacji gronkowców

Podstawą diagnostyki mikrobiologicznej bakterii z rodzaju *Staphylococcus* są klasyczne metody hodowlane służące izolacji bakterii oraz badanie aktywności biochemicznej w celu ich identyfikacji (5, 9). Testy biochemiczne można wykonywać metodami manualnymi, ale dostępnych jest także wiele systemów automatycznych przeznaczonych do rozpoznawania gronkowców, umożliwiających ich identyfikację oraz oznaczanie lekowrażliwości. Systemy te są stale udoskonalane, cechują się coraz szerszym spektrum możliwości diagnostycznych, a czas identyfikacji oraz oceny lekowrażliwości może być skrócony nawet do kilku godzin. Czułość automatycznych systemów jest wysoka, ponieważ pozwalają na wykrycie niedostrzegalnych nieuzbrojonym okiem oznak wzrostu mikroorganizmów. Niestety, na ogół są one opracowywane na podstawie właściwości typowych dla szczepów wyizolowanych od ludzi, i z tego względu ich przydatność do rozpoznawania gronkowców pochodzących od zwierząt, jak np.: *Staphylococcus pseudintermedius*, może być ograniczona (10), o czym należy pamiętać podczas diagnostyki zakażeń gronkowcowych u zwierząt. Szczególnie identyfikacja szczepów

CNS oparta na właściwościach fenotypowych może być nieprecyzyjna (4, 11).

Nowoczesne metody wykrywania i identyfikacji gronkowców

W diagnostyce mikrobiologicznej coraz powszechniej stosowane są nowe technologie, pozbawione wad procedur opartych na klasycznych metodach hodowli i identyfikacji mikroorganizmów na podstawie ich aktywności biochemicznej. Systemy nowej generacji bazują na metodach biologii molekularnej, w tym także na analizie profilu białek komórek bakteryjnych przy użyciu spektrometrii masowej MALDI-TOF MS (matrix assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry; 7, 12). Zastosowanie nowoczesnych metod pozwala na znaczne skrócenie czasu oczekiwania na wyniki badań, cechując się one wysoką swoistością oraz czułością.

Upowszechnienie stosowania metod diagnostycznych opartych na biologii molekularnej jest konsekwencją poszerzenia bazy danych genomów wielu gatunków drobnoustrojów, w tym również gronkowców, jak również coraz większych możliwości zautomatyzowania izolacji materiału genetycznego mikroorganizmów oraz dostępności gotowych zestawów do amplifikacji materiału genetycznego patogenów. W diagnostyce mikrobiologicznej wykorzystywane są takie techniki, jak łańcuchowa reakcja polimerazy (polymerase chain reaction – PCR), hybrydyzacja oraz sekwencjonowanie kwasów nukleinowych (6, 10, 13). Metody diagnostyczne oparte na technikach biologii molekularnej są stale udoskonalane, stają się coraz tańsze i bardziej dostępne. Coraz częściej bakterii poszukuje się bezpośrednio w pobranym materiale klinicznym lub w materiale poddanym wstępnemu namnażaniu, chociaż dotychczas takie rozwiązania znajdują zastosowanie głównie w diagnostyce zakażeń u ludzi. Dla przykładu, zautomatyzowany, zamknięty system GeneXpert (Cepheid) oparty na real-time PCR (PCR w czasie rzeczywistym) pozwala na wykrycie szczepów *Staphylococcus aureus* opornych na metycylinę (methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* – MRSA), a także innych drobnoustrojów. Zaletą tego systemu jest krótki czas oczekiwania na wynik, wynoszący około godziny (6).

Spektrometria masowa MALDI-TOF MS znajduje coraz szersze zastosowanie w identyfikacji gronkowców pochodzących z różnych próbek. Referencyjne bazy widm spektrofotometrycznych białek są stale rozszerzane i uaktualniane, obejmują dane o coraz większej liczbie mikroorganizmów, w tym również o gatunkach istotnych w weterynarii (14). Wykazano, że MALDI-TOF MS umożliwia identyfikację gronkowców zaliczanych do tzw. grupy SIG (*Staphylococcus intermedius* group; 12). Należą do niej trzy gatunki chorobotwórczych gronkowców: *Staphylococcus pseudintermedius*, *Staphylococcus intermedius* oraz *Staphylococcus delphini*, których zbliżone cechy fenotypowe i genotypowe znacznie utrudniają ich różnicowanie i identyfikację (15).

Zastosowanie metod opartych na biologii molekularnej oraz MALDI-TOF MS w weterynaryjnej diagnostyce mikrobiologicznej staje się coraz powszechniejsze. Literatura podaje liczne przykłady wykorzystania

alternatywnych metod umożliwiających szybką identyfikację drobnoustrojów bezpośrednio w materiałach klinicznych pobranych od zwierząt, choć zwykle nie są one jeszcze stosowane rutynowo. Na przykład, analiza próbek mleka przy pomocy gotowego zestawu do real-time PCR przeznaczonego do diagnostyki mastitis u krów, potwierdziła dobrą czułość oraz swoistość tego testu dla *S. aureus*. Natomiast w przypadku gronkowców koagulazo-ujemnych nie otrzymano wystarczająco dobrej identyfikacji i lepsze wyniki uzyskano po zastosowaniu tradycyjnych metod hodowlanych. Wykorzystany w tych badaniach gotowy zestaw do real-time PCR uwzględniał jedynie niewielką liczbę gatunków najczęściej izolowanych z przypadków zapaleń gruczołu mlekowego bydła, co tłumaczy jego ograniczoną przydatność w rozpoznawaniu gronkowców koagulazo-ujemnych (16). Inni badacze (17) zastosowali technikę MALDI-TOF MS do identyfikacji szczepów bakterii wyizolowanych z mleka pobranego od krów z objawami zapalenia gruczołu mlekowego. Wykazali wysoką zgodność identyfikacji izolatów w oparciu o analizę spektrometryczną oraz tradycyjne metody biochemiczne. Opisano również próbę zastosowania MALDI-TOF MS bezpośrednio do badania próbek mleka, z pominięciem etapu hodowli. Do uzyskania prawidłowego widma białek rybosomalnych konieczna była odpowiednia liczba drobnoustrojów w badanym materiale. Wiarygodną identyfikację uzyskiwano przy liczbie komórek bakteryjnych $\geq 10^6$ cfu/ml dla *S. aureus* (17). Ograniczeniem metodyki opartej na bezpośrednim wykrywaniu gronkowców jest możliwość występowania różnych bakterii w badanym materiale. Wykazano, że wiarygodną identyfikację uzyskuje się jedynie, gdy w badanej próbce obecne są drobnoustroje należące do jednego gatunku.

Problem prawidłowej identyfikacji bakterii z rodzaju *Staphylococcus* istotnych w weterynarii

Gatunkiem gronkowców dominującym u psów jest *S. pseudintermedius*, przy czym szczepy mogą być izolowane od zwierząt klinicznie zdrowych lub chorych. W przypadku wyhodowania tych bakterii z materiału pobranego od psa, przy interpretacji wyniku należy zawsze uwzględniać obserwowane objawy kliniczne. Natomiast prawidłowe rozpoznanie tego gatunku w przypadku izolacji z materiałów pobranych od innych gatunków zwierząt lub od ludzi nie jest łatwe (2, 18). Rzadziej *S. pseudintermedius* stwierdzany jest u kotów oraz innych gatunków zwierząt, w wyjątkowych przypadkach także u ludzi (19). *S. pseudintermedius* wykazuje duże podobieństwo cech fenotypowych do blisko spokrewnionych z nim gatunków z grupy SIG. Obecnie przyjęte jest, że szczepy izolowane od psów, które uznawane są za naturalnego gospodarza *S. pseudintermedius*, o typowych cechach fenotypowych można rozpoznawać jako należące do tego gatunku. Dostępne na rynku testy do identyfikacji gronkowców oparte na oznaczaniu ich właściwości biochemicznych nie pozwalają na rozpoznanie *S. pseudintermedius* bez zastosowania dodatkowych testów (2). Co istotne, stosując identyfikację opartą na właściwościach biochemicznych, *S. pseudintermedius* może być mylnie rozpoznany

jako *S. aureus* lub *S. intermedius* (15). Podobnie w przypadku szczepów *S. delphini* czy *S. intermedius*, identyfikacja oparta na cechach fenotypowych może być nieprecyzyjna (7). Dlatego wiarygodna identyfikacja tych bakterii pochodzących od zwierząt lub od człowieka wymaga zastosowania techniki PCR lub MALDI-TOF MS (18, 20). Do rozpoznawania gatunków gronkowców koagulazo-dodatnich izolowanych od zwierząt często stosowana jest technika multiplex PCR, umożliwiająca rozpoznanie 7 gatunków istotnych w weterynarii: *S. aureus*, *S. pseudintermedius*, *S. intermedius*, *S. delphini* typu A, *S. delphini* typu B, *Staphylococcus hyicus* oraz *Staphylococcus schleiferi* subsp. *coagulans* (13, 19).

W latach 2010–2015 w rodzaju *Staphylococcus* wyodrębniono 11 nowych gatunków wyizolowanych głównie od ludzi, a także od zwierząt. Grupa gronkowców koagulazo-dodatnich, które mogą występować u zwierząt, powiększyła się o gatunki *Staphylococcus argutus*, *Staphylococcus schweitzeri* (21) oraz koagulazo-zmiennej *Staphylococcus agnetis* (22). Nowe gatunki koagulazo-ujemne to *Staphylococcus rostri* (23) stwierdzony u świń, *Staphylococcus devriesei* wyizolowany z mleka krów (24) oraz *Staphylococcus microti* (25) i *Staphylococcus stepanovicii* (26) wyizolowane od gryzoni.

Potencjał chorobotwórczy nowych gatunków, oprócz *S. agnetis*, jak dotąd nie jest poznany. Gatunek *S. agnetis* opisano w 2012 r., początkowo izolowany był z przypadków *mastitis* u bydła, obecnie wiadomo, że może być także czynnikiem etiologicznym *osteomyelitis* u brojlerów kurzych (27). Identyfikacja *S. agnetis* oraz innych nowo opisanych gatunków gronkowców nie jest rutynowo wykonywana w laboratoriach mikrobiologicznych, są one rozpoznawane jedynie jako szczepy gronkowców koagulazo-dodatnich lub CNS (28). Ewentualnie w laboratoriach działających przy ośrodkach naukowych lub akademickich możliwa jest identyfikacja nowych gatunków w ramach prowadzonych badań naukowych.

Dlaczego prawidłowa identyfikacja gronkowców jest tak istotna?

Prawidłowe rozpoznanie gatunków w obrębie rodzaju *Staphylococcus* jest niezwykle istotne, ponieważ zgodnie z rekomendacjami Europejskiego Komitetu ds. Oznaczania Lekowrażliwości (European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing – EUCAST) (29) oraz Amerykańskiej Komisji ds. Klinicznych Standardów Laboratoryjnych (Clinical and Laboratory Standards Institute – CLSI), interpretacja wyników oznaczania lekowrażliwości dla *S. aureus* oraz innych gronkowców koagulazo-dodatnich i CNS jest różna (30). Natomiast prawidłowe rozpoznanie gatunku *S. pseudintermedius* ma także zasadnicze znaczenie w doborze antybiotyku użytego w metodzie krążkowo-dyfuzyjnej do wykrywania oporności na metycylinę (31). Dla szczepów *S. pseudintermedius* zalecane jest stosowanie krążka z oksacyliną, ponieważ wykazano jego większą skuteczność w wykrywaniu tego mechanizmu oporności, w porównaniu z krążkiem z cefoksytyną, który jest zalecany dla *S. aureus*. Ponadto u niektórych szczepów *S. pseudintermedius* opornych na metycylinę (meticylin-resistent *Staphylococcus pseudintermedius* – MRSP),

należących do typu sekwencyjnego 258, stwierdzono niskie wartości MIC oksacyliny (0,5–4 µg/ml), co może skutkować fenotypową wrażliwością na oksacylinę i cefoksytynę w teście krążkowo-dyfuzyjnym. W tych wątpliwych przypadkach o wykryciu oporności na metycylinę decyduje obecność genu *mecA*, warunkującego ten typ oporności (32, 33). U niektórych izolatów MRSP stwierdzono również heterogenną ekspresję genu *mecA*, wtedy wokół krążka z oksacyliną występuje strefa zahamowania wzrostu, a wokół krążka z cefoksytyną pojawia się strefa zahamowania wzrostu o średnicy pozwalającej na zakwalifikowanie tego szczepu jako wrażliwego na metycylinę (34).

Trudności w interpretacji wyników oznaczania lekowrażliwości gronkowców izolowanych od zwierząt

Problemem w weterynaryjnej diagnostyce mikrobiologicznej jest brak ujednoczonych wytycznych określających interpretację wyników badania lekowrażliwości dla wielu drobnoustrojów izolowanych od zwierząt. Rekomendacje takie powinny być opracowane dla różnych patogenów, w tym również gronkowców oraz dla bakterii izolowanych od różnych gatunków zwierząt (7). Aktualne wytyczne CLSI z 2015 r. zawierają takie zalecenia, choć w ograniczonym zakresie (30). Nie uwzględniają one interpretacji wyników oznaczania wrażliwości na chloramfenikol, rifampicynę czy sulfametoksazol z trimetoprimem dla gronkowców pochodzących od zwierząt. Z kolei rekomendacje EUCAST dotyczą drobnoustrojów izolowanych tylko od ludzi, bazują one na parametrach PK/PD oraz dawkowaniu stosowanym u ludzi (29). Obecnie brakuje wytycznych odnośnie do nowych gatunków gronkowców, które mogą być izolowane od zwierząt, np. *S. agnetis*.

Podsumowanie

W ostatnich latach nastąpił znaczny rozwój metod badania pokrewieństwa drobnoustrojów, opartych na analizie ich materiału genetycznego. Umożliwiło to m.in. uaktualnienie taksonomii bakterii z rodzaju *Staphylococcus*. Jednak wiele metod identyfikacji gronkowców opartych na biologii molekularnej nie znajduje jeszcze zastosowania w rutynowej diagnostyce weterynaryjnej, która bazuje na tradycyjnych metodach mikrobiologicznych. Do identyfikacji coraz częściej wykorzystywana jest również spektrometria mas. Konieczna jest harmonizacja metod badawczych stosowanych w weterynaryjnych laboratoriach mikrobiologicznych oraz opracowanie wytycznych odnośnie do interpretacji wyników badania lekowrażliwości dla różnych drobnoustrojów, w tym różnych gatunków gronkowców, z uwzględnieniem poszczególnych gatunków zwierząt, od których są one izolowane.

Piśmiennictwo

1. Coates R., Moran J., Horsburgh M.J.: Staphylococci: colonizers and pathogens of human skin. *Future Microbiol.* 2014, 9, 75–91.
2. Savini V., Passeri C., Mancini G., Iuliani O., Marrollo R., Argentieri A.V., Fazio P., D'Antonio D., Carretto E.: Coagulase-positive staphylococci: my pet's two faces. *Res. Microbiol.* 2013, 164, 371–374.

3. Schwarz S., Enne V.I., van Duijkeren E.: 40 years of veterinary papers in JAC – what have we learnt? *J. Antimicrob. Chemother.* 2016, **71**, 2681–2690.
4. Becker K., Heilmann C., Peters G.: Coagulase-negative staphylococci. *Clin. Microbiol. Rev.* 2014, **27**, 870–926.
5. Matuschek E., Brown D.F., Kahlmeter G.: Development of the EUCAST disk diffusion antimicrobial susceptibility testing method and its implementation in routine microbiology laboratories. *Clin. Microbiol. Infect.* 2014, **20**, O255–6.
6. Yossepowitch O., Dan M., Kutchinsky A., Gottesman T., Schwartz-Harari O.: A cost-saving algorithm for rapid diagnosis of *Staphylococcus aureus* and susceptibility to oxacillin directly from positive blood culture bottles by combined testing with BinaxNOW® *S. aureus* and Xpert MRSA/SA Assay. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 2014, **78**, 352–355.
7. Guardabassi L., Damborg P., Stamm I., Kopp P.A., Broens E.M., Toutain P.L.: ESCMID Study Group for Veterinary Microbiology. Diagnostic microbiology in veterinary dermatology: present and future. *Vet. Dermatol.* 2017, **28**, 146–e30. DOI: 10.1111/vde.12414.
8. Vanderhaeghen W., Piepers S., Leroy F., Van Coillie E., Haesebrouck F., De Vliegher S.: Identification, typing, ecology and epidemiology of coagulase negative staphylococci associated with ruminants. *Vet. J.* 2015, **203**, 44–51.
9. Dargatz D.A., Erdman M.M., Harris B.: A survey of methods used for antimicrobial susceptibility testing in veterinary diagnostic laboratories in the United States. *J. Vet. Diagn. Invest.* 2017, **29**, 669–675.
10. van Duijkeren E., Catry B., Greko C., Moreno M.A., Pomba M.C., Pyörälä S., Ruzauskas M., Sanders P., Threlfall E.J., Torren-Edo J., Törneke K.: Scientific Advisory Group on Antimicrobials (SAGAM). Review on methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius*. *J. Antimicrob. Chemother.* 2011, **66**, 2705–2714.
11. Park J.Y., Fox L.K., Seo K.S., McGuire M.A., Park Y.H., Rurangirwa F.R., Sischo W.M., Bohach G.A.: Comparison of phenotypic and genotypic methods for the species identification of coagulase-negative staphylococcal isolates from bovine intramammary infections. *Vet. Microbiol.* 2011, **147**, 142–148.
12. Angeletti S.: Matrix assisted laser desorption time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) in clinical microbiology. *J. Microbiol. Methods* 2017, **138**, 20–29.
13. Sasaki T., Tsubakishita S., Tanaka Y., Sakusabe A., Ohtsuka M., Hirotaiki S., Kawakami T., Fukata T., Hiramatsu K.: Multiplex-PCR method for species identification of coagulase-positive staphylococci. *J. Clin. Microbiol.* 2010, **48**, 765–769.
14. El-Bouri K., Johnston S., Rees E., Thomas I., Bome-Mannathoko N., Jones C., Reid M., Ben-Ismael B., Davies A.R., Harris L.G., Mack D.: Comparison of bacterial identification by MALDI-TOF mass spectrometry and conventional diagnostic microbiology methods: agreement, speed and cost implications. *Br. J. Biomed. Sci.* 2012, **69**, 47–55.
15. Silva M.B., Ferreira F.A., Garcia L.N., Silva-Carvalho M.C., Botelho L.A., Figueiredo A.M., Vieira-da-Motta O.: An evaluation of matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry for the identification of *Staphylococcus pseudintermedius* isolates from canine infections. *J. Vet. Diagn. Invest.* 2015, **27**, 231–235.
16. Hiitiö H., Riva R., Autio T., Pohjanvirta T., Holopainen J., Pyörälä S., Pelkonen S.: Performance of a real-time PCR assay in routine bovine mastitis diagnostics compared with in-depth conventional culture. *J. Dairy Res.* 2015, **82**, 200–208.
17. Elbehiry A., Al-Dubaib M., Marzouk E., Osman S., Edrees H.: Performance of MALDI biotyper compared with Vitek™ 2 compact system for fast identification and discrimination of *Staphylococcus* species isolated from bovine mastitis. *Microbiologyopen*. 2016, **5**, 1061–1070.
18. Bond R., Loeffler A.: What's happened to *Staphylococcus intermedius*? Taxonomic revision and emergence of multi-drug resistance. *J. Small Anim. Pract.* 2012, **53**, 147–154.
19. Kizerwetter-Świda M., Chrobak-Chmiel D., Rzewuska M., Binek M.: *Staphylococcus pseudintermedius* – trudno rozpoznawalny patogen. *Post. Mikrobiol.* 2015, **54**, 103–114.
20. Chrobak D., Kizerwetter-Świda M., Rzewuska M., Binek M.: *Staphylococcus pseudintermedius* – nowy, ale dobrze znany patogen. *Życie Wet.* 2013, **88**, 625–628.
21. Tong S.Y., Schaumburg F., Ellington M.J., Corander J., Pichon B., Leendertz F., Bentley S.D., Parkhill J., Holt D.C., Peters G., Giffard P.M., Tong S.Y., Schaumburg F., Ellington M.J., Corander J., Pichon B., Leendertz F., Bentley S.D., Parkhill J., Holt D.C., Peters G., Giffard P.M.: Novel staphylococcal species that form part of a *Staphylococcus aureus*-related complex: the non-pigmented *Staphylococcus argenteus* sp. nov. and the non-human primate-associated *Staphylococcus schweitzeri* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2015, **65**, 15–22.
22. Taponen S., Supré K., Piessens V., Van Coillie E., De Vliegher S., Kort J.M.: *Staphylococcus agnetis* sp. nov., a coagulase-variable species from bovine subclinical and mild clinical mastitis. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2012, **62**, 61–65.
23. Riesen A., Perreten V.: *Staphylococcus rostri* sp. nov., a haemolytic bacterium isolated from the noses of healthy pigs. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2010, **60**, 2042–2047.
24. Supré K., De Vliegher S., Cleenwerck I., Engelbeen K., Van Trappen S., Piepers S., Sampimon O.C., Zadoks R.N., De Vos P., Haesebrouck F.: *Staphylococcus devriesei* sp. nov., isolated from teat apices and milk of dairy cows. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2010, **60**, 2739–2744.
25. Nováková D., Pantůček R., Hubálek Z., Falsen E., Busse H.J., Schumann P., Sedláček I.: *Staphylococcus microti* sp. nov., isolated from the common vole (*Microtus arvalis*). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2010, **60**, 566–573.
26. Hauschild T., Stepanović S., Zakrzewska-Czerwińska J.: *Staphylococcus stepanovicii* sp. nov., a novel novobiocin-resistant oxidase-positive staphylococcal species isolated from wild small mammals. *Syst. Appl. Microbiol.* 2010, **33**, 183–187.
27. Adkins P.R.F., Middleton J.R., Calcutt M.J., Stewart G.C., Fox L.K.: Species Identification and strain typing of *Staphylococcus agnetis* and *Staphylococcus hyicus* isolates from bovine milk by use of a novel multiplex PCR assay and pulsed-field gel electrophoresis. *J. Clin. Microbiol.* 2017, **55**, 1778–1788.
28. Al-Rubaye A.A., Couger M.B., Ojha S., Pummill J.F., Koon J.A., Wideman R.F. Jr, Rhoads D.D.: Genome analysis of *Staphylococcus agnetis*, an agent of lameness in broiler chickens. *PLoS One*. 2015, **10**, e0143336. DOI: 10.1371/journal.pone.0143336. eCollection 2015.
29. Europejski Komitet ds. Oznaczania Lekowrażliwości, European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). <http://www.eucast.org>.
30. Amerykańska Komisja ds. Klinicznych Standardów Laboratoryjnych, Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI): Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals. 3rd ed. Wayne, PA: 2015. CLSI Supplement; VET01S.
31. Kizerwetter-Świda M., Chrobak D., Rzewuska M., Binek M.: Kliniczne znaczenie metycylinoopornych szczepów *Staphylococcus pseudintermedius* w praktyce weterynaryjnej. *Życie Wet.* 2013, **88**, 841–847.
32. Damborg P., Moodley A., Aalbæk B., Ventrella G., Dos Santos T.P., Guardabassi L.: High genotypic diversity among methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* isolated from canine infections in Denmark. *BMC Vet. Res.* 2016, **12**, 131. DOI: 10.1186/s12917-016-0756-y.
33. Feng Y., Tian W., Lin D., Luo Q., Zhou Y., Yang T., Deng Y., Liu Y.H., Liu J.H.: Prevalence and characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* in pets from South China. *Vet. Microbiol.* 2012, **160**, 517–524.
34. Savini V., Di Giuseppe N., Fazii P., D'Amario C., D'Antonio D., Carretto E.: *Staphylococcus pseudintermedius* heterogeneously expresses the *meaC* gene. *Vet. Microbiol.* 2013, **165**, 489–490.

Dr Magdalena Kizerwetter-Świda,
e-mail: magdalena_kizerwetter_swida@sggw.pl