

Metoda krążkowo-dyfuzyjna w weterynaryjnej diagnostyce bakteriologicznej – praktyczne dane

Dominika Borowska, Artur Jabłoński, Zygmunt Pejsak

z Zakładu Chorób Świń Państwowego Instytutu Weterynaryjnego – Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach

Oznaczenie wrażliwości patogenów na substancje antybakteryjne jest jednym z kluczowych etapów diagnostyki bakteriologicznej mającym wpływ na

powodzenie terapii. Rozpowszechnione korzystanie z antybiotyków oraz częste nieodpowiednie ich stosowanie może powodować wzrost oporności wielu klinicznie

ważnych drobnoustrojów. Odwrócenie tej niekorzystnej sytuacji zależy przede wszystkim od zmiany podejścia do tego tematu wśród lekarzy praktyków. Wymaga to także od laboratoriów wdrożenia standaryzowanych procedur określania oporności patogenów na stosowane antybiotyki. Aby wyniki uzyskane w badaniach mikrobiologicznych *in vitro* mogły znaleźć zastosowanie w leczeniu klinicznym, muszą być porównywalne względem siebie niezależnie od laboratorium, w którym zostały wykonane.

Testy wrażliwości na antybiotyki i chemioterapeutyki określają zdolność czynnika przeciwbakteryjnego do zahamowania

wzrostu drobnoustroju *in vitro*. We współczesnych laboratoriach mikrobiologicznych stosuje się wiele różnych metod oznaczania lekowrażliwości bakterii, jednak podstawową i nadal powszechnie stosowaną na świecie i w Polsce jest metoda krążkowo-dyfuzyjna (metoda Kirby-Bauera). Po raz pierwszy opisano ją w 1966 r. i jest nadal najczęściej stosowaną metodą oceny lekooporności. Jest metodą jakościową, opartą na dyfuzji antybiotyku zawartego w krążku bibuły do podłoża stałego. Substancja antybakteryjna dyfunduje promieniście, tworząc strefy z gradientem stężeń. Największa jej koncentracja występuje przy brzegach krążka i spada wraz z odległością od niego. Wielkość strefy zahamowania wzrostu bakterii jest wprost proporcjonalna do stopnia jej wrażliwości na daną substancję – im większa jest strefa zahamowania, tym drobnoustroj jest bardziej wrażliwy. W zależności od wielkości strefy oraz przyjętych kryteriów oceny, drobnoustroje określa się jako: wrażliwe i odporne lub wrażliwe, średniowrażliwe i odporne. Pomimo swej prostoty, metoda ta wymaga precyzyjnego wykonania i kontroli jakości na każdym etapie postępowania.

Podstawowym elementem takiej kontroli jest równoczesne z badaniem wykonanie oznaczenia wrażliwości na ten sam antybiotyk lub zestaw antybiotyków szczepu wzorcowego o znanej wrażliwości. Laboratorium powinno dysponować zestawem szczepów wzorcowych odpowiednich do zakresu prowadzonej diagnostyki. Istotnym czynnikiem podczas oznaczania wrażliwości bakterii na leki jest również kontrola jakości parametrów ogólnych podłoży.

Podstawowym podłożem używanym do wykonywania antybiogramów w metodzie dyfuzyjno-krążkowej patogenów trzody chlewnej jest agar Mueller-Hintona, które stosuje się do oznaczania lekowrażliwości drobnoustrojów niewymagających specjalnych czynników wzrostowych, m.in. enterokoków, gronkowców, Gram-ujemnych pałeczek z rodziny *Enteriobacteriaceae* i pałeczek niefermentujących. Natomiast do oznaczania lekowrażliwości paciorkowców, w tym *Streptococcus suis*, i *Pasteurella multocida*, wykorzystywany jest agar Mueller-Hintona z 5% krwią barania.

O zastosowaniu podłoży mikrobiologicznych do diagnostyki decydują wyniki kontroli jakości podłoży pod względem parametrów ogólnych, takich jak: jałowość, zabarwienie i stopień jednorodności, grubość warstwy lub objętość rozlanego podłoża, konsystencja żelu, zawartość wody, wartość pH oraz parametrów szczegółowych, takich jak: żywność podłoża czy zawartość tyminy i tymidyny.

Wszystkie podłoża stosowane do oznaczania lekowrażliwości powinny mieć pH w zakresie 7,2–7,4, ponieważ nieprawidłowa jego wartość ma istotny wpływ na wyniki: zbyt niskie pH powoduje utratę aktywności antybiotyków aminoglikozydowych, chinolonów i makrolidów (zmniejszenie strefy – fałszywa oporność) lub wzmożenie aktywności tetracyklin (zwiększenie strefy – fałszywa wrażliwość). Zbyt wysokie pH powoduje efekt odwrotny. Czynnikiem, który również ma wpływ na uzyskiwane wyniki jest zawartość jonów, takich jak: Mg^{2+} , Zn^{2+} i Ca^{2+} . Nieprawidłowy ich poziom wpływa fałszywie na wyniki oceny wrażliwości na aminoglikozydy i tetracykliny. Z reguły nadmiar jonów w podłożu powoduje zmniejszenie strefy zahamowania.

Istotny wpływ na wielkość strefy zahamowania wzrostu w metodzie krążkowo-dyfuzyjnej mają również:

- gęstość inokulum: w przypadku zbyt małej gęstości inokulum strefa zahamowania będzie mniejsza, a odporne szczepy mogą zostać opisane jako wrażliwe, natomiast przy zbyt dużej gęstości inokulum szczepy wrażliwe mogą zostać opisane jako odporne,
- czas nałożenia krążków: na posianych płytkach pozostawionych w temperaturze pokojowej dłużej niż 15 minut przed nałożeniem krążków dochodzi do namnażania szczepów – w efekcie strefy zahamowania wzrostu mogą być mniejsze i bakterie mogą zostać opisane jako odporne,
- temperatura i czas inkubacji: optymalny wzrost uzyskujemy w temperaturze 35°C po 16–18-godzinnym okresie inkubacji, jeśli temperatura jest niższa, wydłuża się czas inkubacji, a uzyskane strefy zahamowania są większe.

Antybiogramy wykonane metodą dyfuzyjno-krążkową spełniają kryteria, gdy otrzymuje się zlewny lub półzlewny wzrost kolonii badanego szczepu. Odczyt stref zahamowania wzrostu dla antybiotyków można wykonać automatycznie (np. zestaw Osiris (Bio-Rad)) lub za pomocą suwmiarki (także elektronicznej) czy zwyczajnej linijki.

Przy interpretacji wyniku wzrost wtórny jest brany pod uwagę w przypadku wzrostu pojedynczych drobnych kolonii w obrębie strefy zahamowania wzrostu przy oznaczaniu oporności gronkowców na metycylinę oraz ziarniaków Gram-dodatnich na glikopeptydy. Natomiast nie jest istotny w przypadku oznaczania wrażliwości na sulfonamidy czy też wzrost drobnych kolonii w strefie zahamowania, widocznych tylko pod powiększeniem lub „pod światło” oraz przerastania i rozlewania się szczepów *Proteus* spp. Nie ma wpływu na odczyt wyników w przypadku obecności dużych

Disk diffusion method in veterinary diagnostics – practical data

Borowska D., Jabłoński A., Pejsak Z.,
Department of Swine Diseases, National Veterinary Research Institute in Pulawy

The disk diffusion method alongside the MIC-based method is still a widely used technique. The aim of this study was to establish and provide critical points of the disk diffusion method and guidelines for interpretation of the results of the susceptibility testing of various pathogens. Breakpoints are an integral part of modern microbiology laboratory practice and are used to define susceptibility and resistance to antimicrobial agents. In general, all susceptibility testing methods require breakpoints, also known as interpretive criteria, so that the results of the tests can be interpreted as susceptible, intermediate, or resistant and reported to a broad range of clinicians. Assumed that there are two types of interpretive criteria: epidemiological to monitor changes in the resistance of microorganisms of the population of species and clinical used to determine the possibility of therapeutic success.

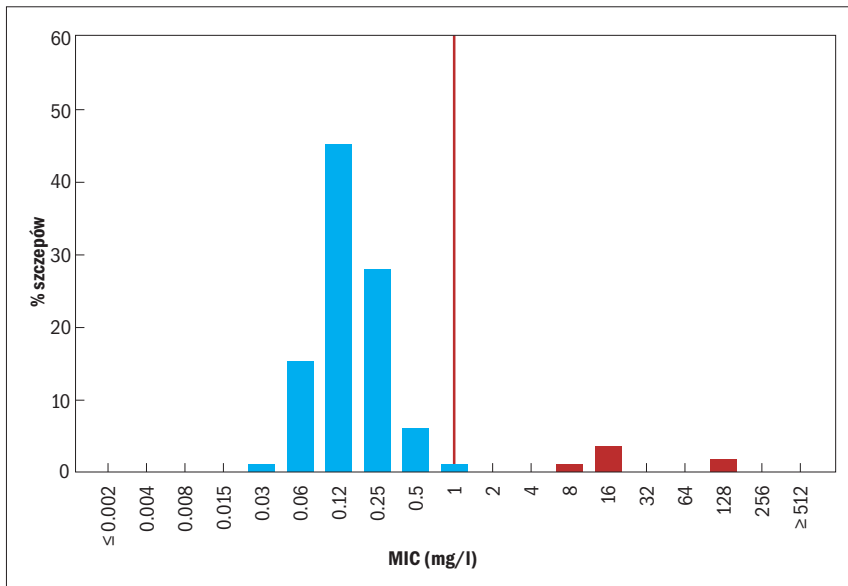
Keywords: disk diffusion method, antibiotic susceptibility testing, interpretive breakpoints

kolonii. W strefie zahamowania wzrostu należy sprawdzić, czy rosnące kolonie nie są opornym wariantem badanego szczepu, w związku z tym należy kolonie przesiać, zidentyfikować gatunek, a następnie oznaczyć wrażliwość. Jeżeli pojawią się ponownie lub badany szczep wykaże pełną oporność, należy określić izolat jako oporny.

Po zakończeniu testu na wrażliwość w formularzu badania należy wpisywać wielkość stref zahamowania w milimetrach oraz interpretację wyniku jako: odporny, wrażliwy, średnio wrażliwy, zgodnie z przyjętymi przez laboratorium kryteriami.

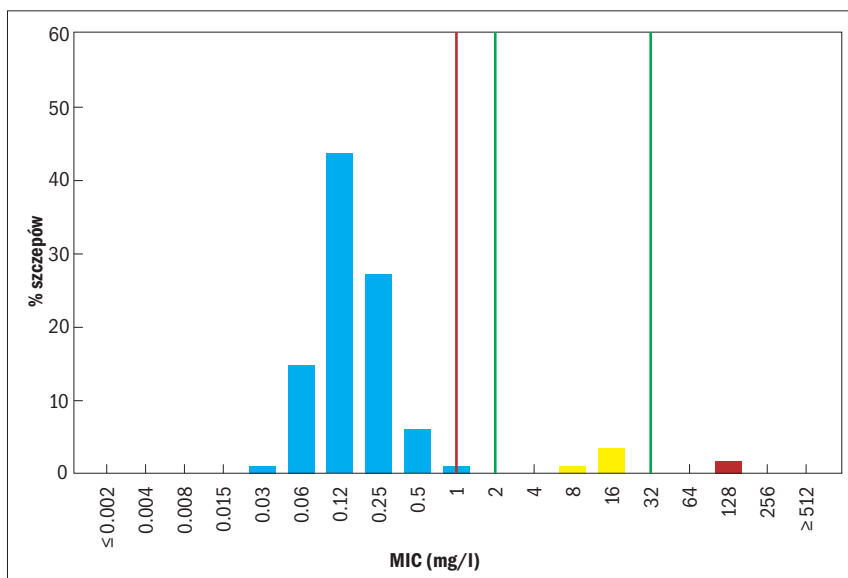
Kryteria interpretacji wyników

Proces sporządzenia jednolitych wartości granicznych oraz wytycznych dotyczących oznaczania i interpretacji wyników określania lekowrażliwości bakterii dla poszczególnych substancji antybakteryjnych rozpoczyna się od zdefiniowania podstawowych pojęć w tym obszarze. Istotna jest konieczność opracowania metodyk ustalania epidemiologicznych i klinicznych wartości granicznych. Przyjęto, że występują dwa rodzaje wrażliwości/oporności: epidemiologiczna (dla mikrobiologów), służąca do monitorowania zmian w oporności populacji danego gatunku drobnoustrojów oraz kliniczna, stosowana jako określenie możliwości odniesienia sukcesu terapeutycznego (dla lekarzy).



Ryc. 1. Schematyczne przedstawienie wyników MIC w formie histogramu uwidaczniającego empiryczny rozkład wyników MIC kilkuset szczepów bakterii X w odniesieniu do antybiotyku Y. Na osi rzędnych znajdują się wartości MIC bakterii dla danego antybiotyku, a na osi odciętych odsetek szczepów, które charakteryzowały się określonymi wartościami MIC. Punkt odcięcia wyznaczono na wartość MIC – 1 mg/l.

Schemat pokazuje dwie populacje bakterii. Zaznaczone na niebiesko, charakteryzują się rozkładem zbliżonym do rozkładu normalnego i określone są jako szczepy „dzikie” (WT), czyli szczepy charakteryzujące się wartością MIC ≤ 1 mg/L. Zaznaczone na czerwono to szczepy „nie-dzikie” (NWT) charakteryzujące się wyższymi wartościami MIC > 1 mg/l, czyli możliwością występowania oporności na antybiotyki



Ryc. 2. Poglądowy histogram z ryc. 1. z naniesionymi klinicznymi wartościami granicznymi na zielono.

W porównaniu do ryc. 1. na podstawie dodatkowych danych farmakokinetycznych i farmakodynamicznych określono, że antybiotyk Y osiąga przez długi czas stężenie do 2 mg/l. W przedziale od 2 mg/l do 32 mg/l antybiotyk Y może być skuteczny, pod warunkiem że właściwości farmakokinetyczne i farmakodynamiczne, przy odpowiednim dawkowaniu, pozwolą na osiągnięcie koncentracji bakterioobójczej/bakteriostatycznej. Antybiotyk Y nigdy nie osiąga lub osiąga na krótki czas, stężenie w surowicy lub w miejscu zakażenia wartości powyżej 32 mg/l. Wartości graniczne oznaczają: wrażliwy $S \leq 2$ mg/l; oporny $R > 32$ mg/l; średnio wrażliwy w przedziale $I > 2, \leq 32$ mg/l

Epidemiologiczne wartości graniczne (wrażliwość/oporność epidemiologiczna) zostały ustalone na podstawie wyników oznaczania lekowrażliwości z różnych ośrodków zajmujących się monitorowaniem lekowrażliwości drobnoustrojów i analizie rozkładu wartości najmniejszego stężenia hamującego MIC dla

poszczególnych antybiotyków i poszczególnych gatunków bakterii.

Wprowadzono pojęcia: szczep „dziki” i „nie-dziki”, które zdefiniowano następująco:

– szczep „dziki” (wild type – WT) – należący do najbardziej wrażliwej populacji, nie posiada nabytej drogi mutacji

lub transferu mechanizmu oporności na dany lek;

– szczep „nie-dziki” (non-wild type – NWT) określający oporność mikrobiologiczną, a należące do tej populacji szczepy posiadają nabytą drogą mutacji lub transferu mechanizm oporności na dany lek.

Obie populacje są rozdzielone przez wartość graniczną, tzw. epidemiologicznym punktem odcięcia (epidemiological cut off – ECOFF). Wartości graniczne dla obu rodzajów szczepów są przedstawiane w następujący sposób: WT $\leq x$ mg/L, NWT $> x$ mg/L. Epidemiologiczne wartości graniczne uznawane są za najbardziej wrażliwe wskaźniki pojawiania się mechanizmów oporności na dany chemioterapeutyk. Posiadają zastosowanie do monitorowania oporności drobnoustrojów zwierząt i ludzi, a także do tworzenia sposobu przeciwdziałania rozprzestrzenianiu się mechanizmów oporności. Szczepy z wartościami MIC równymi epidemiologicznym wartościom granicznym powinny budzić niepokój epidemiologów (9; ryc. 1).

Wrażliwość/oporność kliniczna oznacza wrażliwość drobnoustroju na standardowe dawki leku, a zatem oporność kliniczną określa sytuacja, w której nie można osiągnąć efektu terapeutycznego mimo stosowania wysokich dawek leku. Zazwyczaj trudno przewidzieć efekt kliniczny, gdyż istnieje wiele czynników, które wpływają na odpowiedź drobnoustroju na leczenie. Definicja wrażliwości klinicznej oparta jest na ocenie wrażliwości *in vitro* na dany antybiotyk, jego właściwościach farmakokinetycznych i farmakodynamicznych, a szczególnie możliwego do osiągnięcia stężenia w miejscu infekcji. W praktyce brane jest pod uwagę stężenie, jakie osiąga antybiotyk w surowicy. Kategorie wrażliwości, według której interpretowany jest wynik, są oparte na skuteczności klinicznej. Wartości graniczne określają przedziały gdzie dany szczep bakterii jest wrażliwy $S \leq x$ mg/l; oporny $R > y$ mg/l i średnio wrażliwy (w przedziale $I > x, \leq y$ mg/l). Kliniczna średnia wrażliwość występuje wtedy, gdy szczep bakterii w zakresie wartości MIC występuje w przedziale pomiędzy wrażliwym a opornym, efekt leczenia jest niepewny, ale może zostać osiągnięty warunkowo. Może to nastąpić wskutek podania wyższych dawek leku lub np. jeśli zakażenie przebiega w takiej lokalizacji, gdzie lek ulega zagęszczeniu (ryc. 2).

Ośrodki referencyjne

Wyniki uzyskane w badaniach mikrobiologicznych *in vitro* muszą znaleźć zastosowanie w leczeniu klinicznym, dlatego powinny być one porównywalne względem siebie. W procesie skutecznego leczenia zakażeń niezbędna jest uaktualniona

wiedza medyczna, której źródłem są publikacje w czasopiśmie naukowych, a także światowe ośrodki referencyjne, publikujące i aktualizujące właściwe rekomendacje. Globalnie istnieją dwie organizacje, które wyznaczają standardy określania lekowrażliwości bakterii i na bieżąco publikują normy i dyrektywy. Informacje zawarte w tych opracowaniach dotyczą zarówno sposobu, szczegółowych warunków wykonywania badań, użytych podłoży oraz przede wszystkim kryteriów oceny wrażliwości drobnoustrojów na antybiotyki.

Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI) jest amerykańską organizacją, która określa zalecenia kliniczne oparte o parametry farmakodynamiczne i farmakokinetyczne poszczególnych leków. Dokumenty opracowane przez CLSI są dostępne na stronie internetowej CLSI (www.clsi.org). Podstawę dla medycyny weterynaryjnej stanowią publikacje wydane w 2011 r.: „Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated From Animals; Approved Standard” (3) oraz „Development of *In Vitro* Susceptibility Testing Criteria and Quality Control Parameters for Veterinary Antimicrobial Agents; Approved Guideline” (4). Publikacje te obejmują rekomendacje dotyczące interpretacji wyników oznaczania lekowrażliwości wybranych gatunków bakterii, zarówno z zastosowaniem metody dyfuzyjno-krążkowej, jak i oznaczania minimalnego stężenia hamującego – MIC.

European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) w oparciu o analizę tysięcy wyników MIC i metody dyfuzyjno-krążkowej uzyskanych przez różnorodne laboratoria europejskie dla różnych gatunków bakteryjnych i właściwych dla nich antybiotyków proponuje kliniczne punkty graniczne, stosowane jako wyznaczniki klinicznej skuteczności leku oraz epidemiologiczne wartości graniczne, stosowane jako wskaźniki pojawiania się mechanizmów oporności. W procesie wyznaczania klinicznych wartości granicznych EUCAST uwzględnia wiele czynników m.in.: właściwości farmakokinetyczne (PK) i farmakodynamiczne (PD) antybiotyków, wyniki badań przedklinicznych i klinicznych z różnych ośrodków, różne sposoby dawkowania oraz rozkłady wartości MIC oraz metody krążkowo-dyfuzyjnej szczepów „dzikich”, tzw. epidemiologiczne punkty odcięcia (ECOFF). Wszystkie dokumenty opracowane przez EUCAST oraz tabele z wartościami granicznymi dla poszczególnych grup antybiotyków są dostępne na stronie internetowej EUCAST (www.eucast.org). Zgodnie z opublikowanymi wytycznymi Krajowego Ośrodka Referencyjnego ds. Lekowrażliwości Drobnoustrojów (www.korl.edu.pl)

oraz konsultanta krajowego w dziedzinie mikrobiologii lekarskiej, od 1 maja 2012 r. wartościami granicznymi obowiązującymi w Polsce do interpretacji wyników oznaczania lekowrażliwości w leczeniu ludzi są wartości graniczne dostępne na stronie internetowej EUCAST (10). Wprowadzenie nowych europejskich rekomendacji lekowrażliwości szczepów bakteryjnych zastępuje obowiązujące rekomendacje amerykańskie (CLSI).

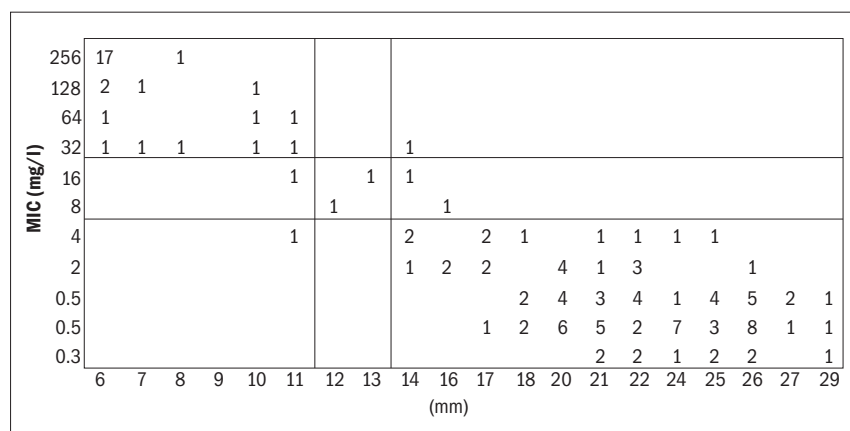
W medycynie weterynaryjnej dane odnośnie do wartości granicznych oceny lekowrażliwości patogennych bakterii są skromne, pełniejsze jeśli chodzi o drobnoustroje wskaźnikowe i zoonotyczne, lecz minimalne odnośnie do bakterii patogennych dla zwierząt. Prawie wszystkie wartości graniczne wobec patogennych dla trzody chlewnej bakterii nie są określone. Brak wytycznych oznaczania lekowrażliwości dla patogenów bakteryjnych zwierząt w EUCAST, CLSI oraz w dostępnych publikacjach naukowych przyczyniło się niestety do stosowania przez laboratoria weterynaryjne kryteriów klinicznych wynikających

z farmakokinetyki i farmakodynamiki danego antybiotyku (rekomendowanych na podstawie badań na modelu ludzkim) bez uwzględnienia danych oporności epidemiologicznej tych bakterii.

Wyznaczanie wartości granicznych w metodzie krążkowo-dyfuzyjnej

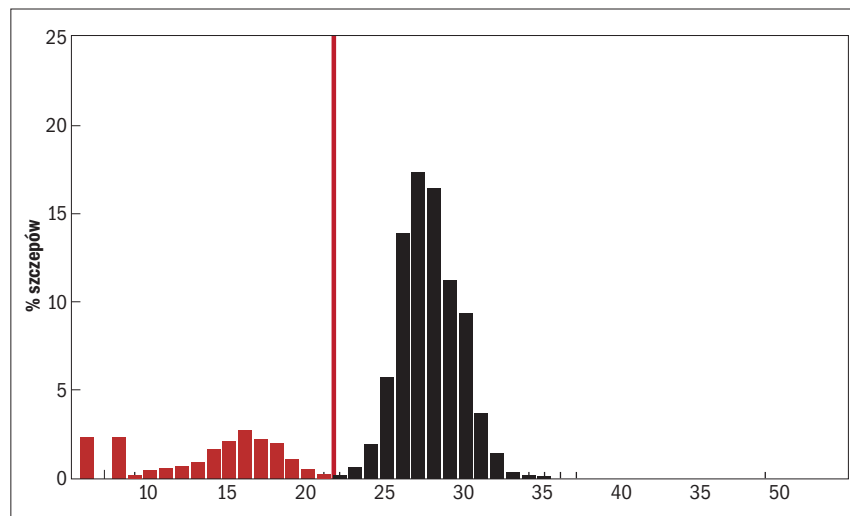
Powszechnie, funkcjonuje kilka metod, dzięki którym wyznaczane są wartości graniczne oznaczania lekowrażliwości w metodzie krążkowo-dyfuzyjnej. Żadna z nich nie dominuje i nie jest metodą referencyjną (9).

Prostą metodą, lecz wymagającą jednoczesnego badania antybiotykowrażliwości jednego szczepu dwoma technikami, jest porównanie wyników MIC oraz metody krążkowo-dyfuzyjnej. Wizualne wyznaczenie wartości granicznych jest oparte na wykonaniu tzw. scattergramu, czyli wykresu rozrzutu (ryc. 3), który obrazuje zależność między dwiema zmiennymi w postaci chmury punktów (lub liczb). Dalsze analizy oparte na tej metodzie polegają na określeniu metody statystycznej, która by



Ryc. 3. Scattergram ukazujący zależność wyników MIC (oś odciętych) i metody krążkowo-dyfuzyjnej (oś rzędnych). Cyfry reprezentują liczby szczepów ocenianych jednocześnie tymi dwiema metodami.

Dla przykładu 17 izolatów bakteryjnych charakteryzował wynik ≥ 256 mg/l w metodzie MIC i jednocześnie strefa zahamowania wzrostu wyniosła 6 mm w metodzie krążkowo-dyfuzyjnej



Ryc. 4. Metoda Kronvall i wsp. (6, 7) określająca na histogramie początek rozkładu normalnego szczepów „dzikich”

w sposób najbardziej obiektywny pozwałała na określenie wartości granicznych.

Początkowo uznano, że należy zestawić szczepy należące do jednego gatunku bakteryjnego na jednym wykresie rozrzutu i dopasować linie regresji do danych (9). Jednakże, dane strefy MIC i średnica zahamowania wzrostu, nie muszą być równomiernie rozmieszczone dla danego gatunku, dlatego regresja jako metoda statystyczna niekoniecznie zapewnia różnicowanie pomiędzy szczepami wrażliwymi i opornymi. Pierwsza efektywna metoda statystyczna określająca kryteria interpretacji na podstawie danych z wykresu rozrzutu została opracowana przez Metzlera i DeHaana (8). Stworzyli oni tzw. metodę z powiązaniem wskaźnikiem błędów (error-rate-bounded method). Dalsze rozwinięcie tej metody przedstawił Brunden i wsp. (1), a alternatywną jej wersję przedstawiono w CLSI (2).

Kronvall i wsp. (6, 7) zaproponowała całkowicie inne podejście w określeniu wartości granicznych metody krążkowo-dyfuzyjnej, bazując na histogramie (ryc. 4). Wspomniani autorzy zauważyli podobieństwo rozkładów średnicy w metodzie krążkowo-dyfuzyjnej dla szczepów „dzikich” do rozkładu normalnego i stworzyli autororską metodę definiowania rozkładu i określenia jednej wartości granicznej. Metoda ta wykorzystuje fakt, że „początkowa” część rozkładu normalnego jest łatwo

zauważalna, w formie graficznej. Dane mogą być wykorzystane do określenia statystycznie „części” końcowej rozkładu normalnego szczepów „dzikich”, który w pewnym sensie jest lustrzanym odbiciem „części” początkowej.

Zupełnie inna alternatywna metoda dla ustanowienia kryteriów interpretacyjnych średnicy stref zahamowania w metodzie krążkowo-dyfuzyjnej została zaproponowana przez Craiga (5). Opiera się ona na szczegółowym statystycznym modelowaniu rozprzestrzeniania i błędów z MIC i średnic stref zahamowania. Jest to najbardziej zaawansowana z metod opracowanych do tej pory i powinna zostać przyjęta przez organizacje ustanawiające standardy.

Reasumując, przedstawione dane uwiadcniają, że problemy związane z wykonywaniem i interpretacją wyników badania lekowności nie zostały jeszcze do końca rozwiązane. Brak jednoznacznych standardów oraz globalnie ujednoczonego podejścia do oceny lekowności jest jedną z przyczyn istotnie zróżnicowanego podejścia do tego zagadnienia, co uwiadcza się szczególnie na styku medycyny i weterynarii.

Piśmiennictwo

1. Brunden, M. N., Zurenko G.E., Kapik B.: Modification of the error-rate bounded classification scheme for use with two MIC break points. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 1992, 15, 135–140.

2. Clinical and Laboratory Standards Institute: *Development of in vitro susceptibility testing criteria and quality control parameters; approved guideline*, 2nd ed., CLSI document M23-A2. CLSI, Wayne, PA. 2001.
3. Clinical and Laboratory Standards Institute: *Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated From Animals; Approved Standard*, 3rd ed., CLSI document M31A3. CLSI, Wayne, PA 2011.
4. Clinical and Laboratory Standards Institute: *Development of In Vitro Susceptibility Testing Criteria and Quality Control Parameters for Veterinary Antimicrobial Agents; Approved Guideline*, 3rd ed., CLSI document M37A3. CLSI, Wayne, PA 2011.
5. Craig B. A.: Modeling approach to diameter breakpoint determination. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 2000, 36, 193–202.
6. Kronvall, G., Kahlmeter G., Myrne E., Galas M.F.: A new method for normalized interpretation of antimicrobial resistance from disk test results for comparative purposes. *Clin. Microbiol. Infect.* 2003, 9, 120–132.
7. Kronvall, G.: Determination of the real standard distribution of susceptible strains in zone histograms. *Int. J. Antimicrob. Agents* 2003, 22, 7–13.
8. Metzler, C. M., DeHaan R.M.: Susceptibility tests of anaerobic bacteria: statistical and clinical considerations. *J. Infect. Dis.* 1974, 30, 588–594.
9. Turnidge J., Paterson D.L.: Setting and revising antibacterial susceptibility breakpoints. *Clin Microbiol Rev* 2007, 20, 391–408.
10. http://www.korلد.edu.pl/pdf/eucast/komunikat-konsultanta-krajowego_04_2012.pdf