

Tradycyjne i nowoczesne metody ilościowego oznaczania drobnoustrojów

JANINA MALARSKA

Biowet Puławy Sp. z o.o., ul. Arciucha 2, 24-100 Puławy

Malarska J.

Traditional and modern methods of quantitative determination of micro-organisms

Summary

This article presents methods of quantitative determination of micro-organisms used in a microbiological analysis. The traditional methods are: direct, indirect, optical, biomass amount measurement, while the modern methods: impedancemetry, cytometry, bioluminescence.

Keywords: quantitative determination of micro-organisms number

Określenie liczby drobnoustrojów jest niezbędne dla oceny prawidłowości przebiegu procesów biotechnologicznych, kontroli czystości mikrobiologicznej surowców, półproduktów i produktów żywnościowych, kosmetycznych i farmaceutycznych. Kontrola ilości drobnoustrojów jest również konieczna do monitorowania stanu higieny i czystości mikrobiologicznej środowiska wytwarzania produktów (powietrze, powierzchnie, aparatura, urządzenia, personel). Metody pomiaru liczby mikroorganizmów możemy podzielić na tradycyjne i nowoczesne. Do metod tradycyjnych zaliczamy metody bezpośrednie i pośrednie.

Metody bezpośrednie (mikroskopowe)

Metody bezpośrednie polegają na liczeniu komórek mikroorganizmów pod mikroskopem, w preparacie przyżyciowym i barwionym. Do tych metod zaliczamy: zliczanie w komorze Thoma, Bürkera, metodą Breeda oraz techniki Direct Epifluorescent Microscopy (DEM) i Direct Epifluorescent Filter Technique (DEFT) (2, 5, 8-10, 14).

Metody pośrednie

Do metod pośrednich zaliczamy: pomiar ilości biomasy, metody optyczne, metody hodowlane (5).

Pomiar ilości biomasy drobnoustrojów:

- pomiar ciężaru mokrej masy drobnoustrojów po odwirowaniu i przemyciu komórek,
- pomiar ciężaru suchej masy bakterii i drożdży po odwirowaniu i przemyciu komórek jałową wodą destylowaną, a następnie wysuszeniu do stałej masy w 105°C,
- pomiar objętości osadu drobnoustrojów, po odwirowaniu w wyskalowanych probówkach.

Metody optyczne oparte są na zależności między ilością mikroorganizmów w płynnej hodowli a przepuszczalnością światła. Wyróżniamy metodę turbidymetryczną i nefelometryczną.

– Metoda turbidymetryczna: w tej metodzie mierzona jest ilość światła zaabsorbowanego przez zawiesinę mikroorganizmów w spektrofotometrze przy określonej długości fali. Długość fali zależy od zabarwienia podłoża. W badanej próbce odczytuje się wartość ekstynkcji (OD – Optical Density) lub transmisję (%). Próbą kontrolną jest jałowe podłoże. Im wartość ekstynkcji jest większa a transmisja mniejsza, tym więcej w podłożu znajduje się mikroorganizmów (5).

– Metoda nefelometryczna: w tej metodzie mierzona jest natężenie światła rozproszonego w zawiesinie mikroorganizmów przy pomocy urządzenia zwanego nefelometrem (5). Uzyskany wynik odnosi się do zawiesin standardowych o znanej liczbie komórek. Powszechnie stosowaną jest tzw. skala McFarlanda, która zawiera 10 probówek z chlorkiem baru o różnym stężeniu. Ich zmętnienie odpowiada zmętnieniu zawiesiny bakterii od 3×10^8 do 3×10^9 komórek w 1 ml.

Metody hodowlane. W metodach hodowlanych określa się liczbę żywych komórek drobnoustrojów zdolnych do wzrostu w podłożach płynnych lub stałych.

– Metoda filtracji membranowej: próbki przesącza się przez filtr membranowy o średnicy porów nie większej niż 0,45 μm za pomocą aparatu do filtracji. Po przesączeniu próbki w objętości nie mniejszej niż 100 ml, sączek z zatrzymanymi na nim mikroorganizmami przenosi się aseptycznie na płytkę Petriego z podłożem stałym. Po inkubacji liczy się wyrosłe kolonie bakterii i/lub grzybów na sączku (5, 7).

– Metoda rozcieńczeń – najbardziej prawdopodobna liczba drobnoustrojów NPL: metoda polega na serijnych 10-krotnych rozcieńczeniach badanej próby, w podłożach płynnych. Badanie wykonuje się w 3 powtórzeniach. Badaną próbę należy rozcieńczyć tak, aby przynajmniej w ostatnim rozcieńczeniu nie było drobnoustrojów. Po zakończeniu inkubacji dokonuje się odczytu wyników pozytywnych. Po uwzględnieniu rozcieńczenia i ilości powtórzeń korzystając z tablic McCarady'ego, wylicza się NPL – najbardziej prawdopodobną liczbę drobnoustrojów w 1 ml badanej próby (5, 7).

– Metoda płytkowa: w metodzie tej nie liczy się komórek drobnoustrojów, lecz kolonie wyrosłe na podłożach stałych. Badany materiał rozcieńcza się, stosując kolejne dziesięciokrotne rozcieńczenia i wysiewa na płytki Petriego z podłożem stałym, metodą wgłębną lub powierzchniową. Posiewy powinny być wykonane z różnych rozcieńczeń, w co najmniej dwóch powtórzeniach. Badaną próbę rozcieńczyć tak, aby liczba kolonii wyrosłych na płytkach wynosiła 30-300. Po inkubacji płytek liczy się ilość wyrosłych kolonii, a następnie uwzględniając rozcieńczenie wylicza się liczbę jednostek tworzących kolonie w 1 ml (jtk/ml) (5, 7).

– Metoda posiewów spiralnych: w 1973 roku dr J Ed Campbell wprowadził metodę posiewu spiralnego na płytkach Petriego. W metodzie tej wykorzystuje się spiralę Archimedesesa jako wzór posiewu. Badaną próbkę posiewa się za pomocą specjalnego urządzenia – Eddy Jet, produkowanego przez firmę IUL Instruments. Posiewa się znaną objętość próbki, zaczynając od środka i kończąc na obrzeżu płytki. W ten sposób zmniejsza się objętość próbki nałożonej na jednostkę płytki, znacznie ograniczając stopień rozcieńczenia próbek (nawet tysiąckrotny). Próbka nakładana jest przy pomocy jałowych, jednorazowych końcówek, co zapewnia dokładne dozowanie i wyklucza zakażenia próbek. Liczenie wyrosłych, po inkubacji, kolonii na płytkach odbywa się przy użyciu siatki lub przy użyciu automatycznego licznika kolonii.

Wyniki posiewu spiralnego są porównywalne z wynikami uzyskiwanymi ręcznie z korelacją powyżej 95% (5).

Metoda płytkowa opisana w 1885 r. przez Kocha do dziś jest powszechnie stosowana. Jest to metoda standardowa stosowana do oznaczania poziomu zanieczyszczeń mikrobiologicznych. Jednak pomimo istnienia wielu nowoczesnych urządzeń (posiew spiralny, automatyczne i ręczne liczniki kolonii, aparaty do przygotowania rozcieńczeń, gotowe podłoża z certyfikatem producenta, takie jak zestawy łopatkowe czy Petrifilmy) jest metodą pracochłonną, materiałochłonną i niedokładną, gdyż nie zawsze 1 kolonia odpowiada 1 komórce, lecz zespołowi komórek, których nie udało się rozdzielić przez rozcieńczenie, wstrząsanie i pipetowanie (wiele bakterii występuje w skupiskach), oznaczane są tylko organizmy zdolne do tworzenia kolonii (cfu), nie uwzględnia obecności żyjących, ale

niehodowlanych bakterii (viable but nonculturable, VBNC). Stadium VBNC (1) występuje u mikroorganizmów, które narażone są na stropy środowiska. W tym stadium bakterie są jeszcze żywe, wykazują aktywność metaboliczną, lecz nie mogą być wykrywane jako jednostki tworzące kolonie, przy użyciu konwencjonalnych metod płytkowych. Mikroorganizmy znajdujące się w stadium VBNC mogą stanowić ryzyko dla zdrowia. Poza tym w metodach tradycyjnych wynik uzyskiwany jest po długim czasie. Dlatego też coraz częściej stosowane są tzw. szybkie techniki oznaczania ilości drobnoustrojów.

Nowoczesne metody mikrobiologiczne

Do innych metod detekcji mikroorganizmów niż wzrost na podłożach stałych – agarowych, które pozwalają znacznie skrócić czas badania zalicza się: impedymetrię, cytometrię, bioluminescencję.

Impedymetria. Metoda impedymetryczna pomiaru ilości mikroorganizmów oparta jest na zjawisku zmian przewodności podłoża wraz ze wzrostem drobnoustrojów. Zmiany te powstają na skutek ich aktywności metabolicznej. W czasie wzrostu mikroorganizmy wytwarzają substancje zmniejszające impedancję podłoża (opór w środowisku przewodzącym prąd elektryczny), a zwiększając jego konduktancję (siłę jonową) i pojemność (pojemność elektryczną środowiska). Impedymetria ilościowa oparta jest na pomiarze czasu detekcji DT (detection time). Jest on mierzony od rozpoczęcia inkubacji próbki do chwili uzyskania wykrywalnej przez urządzenie zmiany impedancji. Jest on odwrotnie proporcjonalny do logarytmicznej liczby drobnoustrojów wprowadzonych do podłoża. Czas detekcji zależy więc od początkowej liczby drobnoustrojów w badanej próbce. Im więcej jest mikroorganizmów w próbce, tym czas detekcji jest krótszy. Zależy on również od rodzaju drobnoustrojów i szybkości ich wzrostu. Czas wykrycia 1 komórki bakterii z grupy coli wynosi ok. 9 godzin, a 1 komórki drożdży wynosi ok. 19 godzin.

W impedymetrycznej metodzie określania ilości drobnoustrojów konieczne jest wykonanie krzywej wzrostowej w stosunku do metody referencyjnej. Korelacja pomiędzy wynikami uzyskanymi tradycyjną metodą płytkową i metodą impedancji jest bardzo wysoka.

Aparatura do pomiaru impedancji jest dobrze przystosowana do kontroli mikrobiologicznej. Istnieje możliwość badania dużej liczby prób, w różnych temperaturach. Charakteryzuje się łatwością wykonania badania i jest w pełni zautomatyzowana. Wykonanie badania w aparacie Bacometr M 64 (produkowany w Stanach Zjednoczonych, dystrybuowany przez firmę bioMérieux) ogranicza się do wprowadzenia podłoża i badanej próby do cel modułu. Następnie uruchamia się aparat, a moduł wstawia się do komory inkubacyjnej aparatu. Wybiera się odpowiedni typ testu, wprowadza się oznaczenia i uruchamia moduły (5).

Wyniki odczytywane są w jednostkach tworzących kolonie (jtk).

Inne aparaty to: BacTrac (produkowany w Austrii przez Sy-Lab), Malthus System V (produkowany w Anglii) oraz Rabbit (produkowany w Anglii przez Don Whitley Scientific).

Metoda impedymetryczna stosowana jest do badania czystości mikrobiologicznej wody, produktów żywnościowych oraz w badaniu skuteczności środków dezynfekcyjnych i mianowaniu mikrobiologicznym antybiotyków (8, 9).

Cytometria. Cytometria to grupa metod wykorzystująca spektrofлуorymetrię. Do określenia liczebności komórek stosuje się cytometrię przepływową i stacjonarną (13).

W cytometrii przepływowej (9) mikroorganizmy barwione są w płynnym podłożu markerem fluorescencyjnym w badanej próbce. Później następuje przemieszczanie próbki przed promieniem lasera, powodując emisję sygnału, który pozwala zliczyć mikroorganizmy znajdujące się w analizowanym materiale.

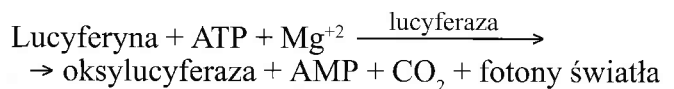
W cytometrii stacjonarnej (9) badana próba jest filtrowana przez membranę. Następnie zatrzymane mikroorganizmy na sączku są barwione barwnikiem fluorescencyjnym. Powierzchnia filtra jest omiatana wiązką promieni laserowych i zliczana jest ilość drobnoustrojów. Wynik jest wyrażony jako liczba mikroorganizmów na jednostkę objętości i wyświetlany na ekranie, może być także wydrukowany lub przekazany do innych oprogramowań. Membrany mogą być archiwizowane i poddane ponownej analizie wiele miesięcy po zabarwieniu. Granica wykrywalności zależy od typu aparatu, objętości badanej próby. Do badania jakościowego (obecność/brak) konieczny jest etap wzbogacenia przez 24 godziny.

Cytometria jest dziś najszybciej rozwijającą się techniką. Ogromną zaletą tej metody jest szybkość pomiaru, w ciągu jednej sekundy bada się tysiące mikroorganizmów oraz kilka parametrów jednej komórki jako całości. Pozwala jednocześnie na wykrycie rzadkich populacji. Niektóre markery fluorescencyjne pozwoliły na ujawnienie mikroorganizmów, których hodowla metodą klasyczną nie jest możliwa. Cytometria stacjonarna wykorzystywana jest do analizy wody na różnych etapach produkcji, jako test sterylności produktów gotowych. Pomiarów dokonuje się za pomocą aparatu Chemscan lub systemu Cobra (produkowany we Francji przez Biocom dystrybuowany przez bioMérieux). Cytometria przepływowa stosowana jest do oceny skuteczności konserwantów i środków dezynfekcyjnych poprzez wykonanie zliczania drobnoustrojów w różnym czasie ekspozycji (badanie można wykonać już po paru sekundach kontaktu środka dezynfekcyjnego z drobnoustrojem), bez wykonywania licznych rozcieńczeń, oczywiście z użyciem markerów żywotności. Metoda ta wykorzystywana jest do kontroli i nadzoru procesów fermentacyjnych. Można określić ilość całej populacji, ilość żywych i martwych

komórek. W niektórych przypadkach można określić zanieczyszczenia inokulów i procesu fermentacji. Cytometria wykorzystywana jest także w medycynie, szczególnie w onkologii, immunologii (do określenia stopnia ekspresji określonych antygenów/receptorów) i hematologii, a także do badania jakości i ilości nasienia człowieka i zwierząt (13).

Bioluminescencja. Bioluminescencję obserwujemy w przyrodzie u robaczka świętojańskiego *Lampyrus noctiluca* żyjącego w Europie i świetlika *Photinus pyralis* zamieszkującego Amerykę Północną.

Bioluminescencja (5, 12, 15) polega na pomiarze ATP (adenozynotrójfosforanu). Jest on zawarty we wszystkich żywych komórkach (prokariotycznych i eukariotycznych). Adenozynotrójfosforan służy do magazynowania i uwalniania energii, która jest niezbędna w przebiegu różnych procesów metabolizmu komórkowego. Tylko żywe komórki posiadają ATP, gdyż po ich obumarciu jest on szybko rozkładany. Ilość jego jest proporcjonalna do ilości drobnoustrojów w badanej próbce. Stężenie ATP jest mierzone w reakcji substratu i enzymu, tj. lucyferyny i luceferazy. W wyniku reakcji katalizowanej przez lucyferazę, lucyferyna ulega utlenieniu, powstaje oksylucyferyna i następuje rozkład ATP do AMP (adenozynomonofosforan) oraz emitowane jest światło w ilości proporcjonalnej do ilości ATP.



Ilość wydzielonego w reakcji światła jest skorelowana z ilością ATP w próbce i odczytywana jest jako względne jednostki światła – Relativ Light Units (RLU). Pomiaru dokonuje się w aparatach zwanych luminometrami (7). Na rynku dostępna jest duża ilość tych urządzeń, np. UNI-LITTLE® (BIOTRACE – kuweta w aplikatorze do wymazów), HY-LITTLE® (Merk – kuweta w „piórze próbówkowym”), CHECKMATE (Lumac – kuweta), Biocounter® (Lumac – kuweta), System SURE (Celsis – kuweta), PROFILE (Transja – kuweta), BioOrbit (Bio-Orbit Oy – kuweta), BioSystems TD-20/20 (dystrybucja Promega – kuweta), Lumistar Galaxy (dystrybucja BIOGENET – mikro-płytki).

Istnieją aparaty przenośne przeznaczone tylko do monitorowania stanu higieny powierzchni i urządzeń. Mierzą one ATP mikrobiologiczne i ATP somatyczne zawarte w tkankach roślinnych i zwierzęcych. Wykonanie badania jest bardzo proste, a wynik uzyskuje się po paru minutach. Aby przeprowadzić badanie przeciera się badaną powierzchnię sterylnym wacikiem, który zanurza się w buforze reakcyjnym, następnie dodaje się ekstraktant i odczynnik (lucyferaza/lucyferyna). Wytworzone światło jest mierzone natychmiast. Wyniki badania próbki porównuje się z wartością progową, ustaloną przez użytkownika systemu. Inne typy aparatów służą do pracy w laboratorium i mogą, mię-

dzy innymi, być wykorzystane do kontroli zanieczyszczeń mikrobiologicznych produktów i wód oraz w biotechnologii do oceny jakościowej inokulów i procesów fermentacyjnych (4, 6, 8, 9, 11). W celu pomiaru ilości drobnoustrojów (12) należy selektywnie oddzielić niemikrobiologiczne (somatyczne) ATP poprzez zastosowanie specyficznego odczynnika, który czyni błonę komórek somatycznych przepuszczalną dla cząsteczek ATP poprzez jej rozluźnienie. Na komórki mikroorganizmów ten odczynnik nie działa, następnie usunięty z ekstraktem somatyczny APT jest hydrolyzowany przez odpowiedni odczynnik. Mikrobiologiczny ATP jest oznaczany na lumenometrze po dodaniu odczynnika ekstrakcyjnego ATP mikrobiologiczny i odczynnika zawierającego lucyferazę i lucyferynę.

W celu stwierdzenia, czy badana próba nie zawiera drobnoustrojów lub zawiera ich mało, należy przeprowadzić etap wzbogacania, który polega na inkubacji badanej próby w podłożu wzrostowym, w temp. 30°C przez 24-48 godz.

Dużą zaletą testu ATP jest to, że otrzymujemy wynik w bardzo krótkim czasie, a badanie jest łatwiejsze do wykonania niż klasyczna metoda (5).

Podsumowanie

Skrócenie czasu badania, ograniczenie pracochłonności, łatwość wykonania prób, uzyskanie bardziej precyzyjnych wyników oraz zastępowanie ich subiektywnej oceny i zliczania ilości mikroorganizmów przez człowieka, możliwość archiwizacji i analizy danych sprawia, że szybkie metody określania ilości drobnoustrojów powinny być wykorzystywane do badań rutynowo wykonywanych w przemyśle farmaceutycznym, żywnościowym i kosmetycznym.

Piśmiennictwo

1. Dam H., Strzelczyk E.: Żyjące lecz nie dające się hodować bakterie. Post. Mikrobiol. 2004, 43 (3), 251-265.

2. Graham L., Pettipher, Ubaldina M., Rodrigues.: Rapid enumeration of microorganisms in foods by the direct epifluorescent filter technique. Appl. Environ. Microbiol. 1982, 4, 809-813.
3. Kozdrój J.: Aspekty ekologiczne i biotechniczne luminescencji bakterii. Post. Mikrobiol. 1998, 37 (3), 349-369.
4. Loimaranta Vuokko, Tenovuo Jorma, Koivisto Leeni, Karp Matti.: Generation of bioluminescent Streptococcus mutants and its usage in rapid analysis of the efficacy of antimicrobial compounds. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 1998, 42, 8, 1906-1910.
5. Libudzisz Z., Kowal K., Kregiel D., Kunicka A.: Nowoczesne metody pomiaru liczby drobnoustrojów. Materiały z seminarium. Instytut Technologii Fermentacji i Mikrobiologii Politechniki Łódzkiej 2004.
6. Meyers P. R., Bourn W. R., Steyn L. M., von Helden P. D., Beyers A. D., Brown G. D.: Novel method for rapid measurement of growth of Mycobacteria in detergent-free media.: Journal of Clinical Microbiology 1998, 36 (9), 2752-2754.
7. Parnowska W.: Mikrobiologia farmaceutyczna. Problemy produkcji i kontroli leków. PZWL 1998.
8. Petat E., Antoni C., Decrulle M., Durant F., Fourniat J., Guyomard S., Jamet X., Le Juez V., Manuel M., Philippe L., Sofia T.: Alternatywne metody kontroli mikrobiologicznej. Prezentacja wykonanych prac. Raport komisji SFSTP. Pharmaceutica 2000, 12, 3-32.
9. Petat E., Bauer C., Butin M., Decrulle M., Foulon V., Gaubert S., Guyomard S., Lejuez V., Mandray C., Philippe L., Sofia T.: Alternatywne metody kontroli mikrobiologicznej. Prezentacja szybkich technik. Raport komisji SFSTP. Pharmaceutica 2000, 10, 2-19.
10. Raymond L., Kepner J. R., James R., Pratt.: Use of fluorochromes for direct enumeration of total bacteria in environmental samples: Past and present. Microbiol. Rev. 1994, 58, 4, 603-615.
11. Roché Y., Alexander B., Buges E., Easter M., Ferguson D., Grant P., Guibot F., Mercier A. L., Penicaud A., Thomas B., Darbord J. C., Verjat D.: Walidacja metody zliczania mikrobiologicznego drogą bioluminescencji w wodach o niskim stopniu zanieczyszczenia. Raport SFSTP. Pharmaceutica 2001, 15, 2-23.
12. Ramji N., Donovan-Brand R., Buchanan W., Hutner-Rinderie.: ATP Bioluminescence: A Tool to Measure Clinical Efficacy of Topical Oral Anti-microbials. Procter&Gamble, Mason, OH, USA.
13. Siemieniuch M. J., Bielas W., Dubiel A.: Cytometria przepływowa jako metoda oceny jakości nasienia. Medycyna Wet. 2004, 60, 1270-1273.
14. Sierra M.-L., Sheridan J. J., McGuire L.: Microbial quality of lamb carcasses during processing and the acridine orange direct count technique (a modified DEFT) for rapid enumeration of total viable counts. Int. J. Food. Microbiol. 1997, 36, 61-67.
15. Ziętkiewicz-Capala A., Malm A., Bartoszcze M.: Bioluminescencja i jej praktyczne zastosowanie w mikrobiologicznej ocenie jakości leków. Farmacja Polska 2004, 60 (22), 1058-1062.

Adres autora: Janina Malarska, ul. Arciucha 2, 24-100 Puławy

CHIANINI F., ADAMS C., BUXTON D.: Zmiany neuropatologiczne u płodów owiec wywołane gorączką kleszczową. (Neuropathological changes in ovine fetuses caused by tickborn fever). Vet. Rec. 155, 805-806, 2004 (25)

Gorączka kleszczowa jest chorobą zakaźną wywołaną u owiec przez *Anaplasma phagocytophilum* i przenoszona przez kleszcze. W stadzie liczącym 250 maciorek około 150 poroniło w ostatnim okresie ciąży. Badania w kierunku toksoplazmozy, choroby granicznej, zakażenia *Chlamydochloa abortus*, *Leishmania* i gorączki kleszczowej wykonano u 16 owiec. Badaniem anatomopatologicznym poddano 9 płodów. Tylko w jednym przypadku stwierdzono u owiec przeciwciała w niskim mianie dla *Toxoplasma*, w jednym przypadku dla choroby granicznej i u 11 owiec dla gorączki kleszczowej. W neutrofilach w rozmazach krwi występowały śródkomórkowo pasożyty podobne do *A. phagocytophilum*. W mózgu 9 płodów występowało wieloogniskowe, homogennie kwasochłonne rozmiękanie istoty białej mózgu, u dwóch dodatkowo rozmiękanie istoty białej mózdzku.

G.

FRIEDMAN S., SHOSHANI E., EZRA E.: Straty ekonomiczne z powodu klinicznej postaci zapalenia wymienia w 4 stadach krów mlecznych w Izraelu. (Economical losses from clinical mastitis in 4 dairy herds in Israel). Is. J. Vet. Med. 59, 16-19, 2004 (1-2)

Monitoringiem objęto 970 krów badanych w kierunku zapalenia gruczołu mlekowego przez okres 1998-1999. Średnia wydajność mleka w kooperatywach wynosiła 36,5 kg/krowe, a w gospodarstwach indywidualnych 31,9 kg/krowe. Liczba komórek somatycznych w mleku wynosiła 350 000-525 000/ml. Zakażenia wywołane przez *Nocardia*, *Escherichia coli*, *Corynebacterium bovis* i koagulazo-ujemne gronkowce powodowały największy spadek mleczności. Nawroty choroby wystąpiły u 22% krów i były wywołane przez ten sam lub inny gatunek bakterii. Odsetek nawrotów klinicznej postaci zapalenia gruczołu mlekowego wynosił 36,56% w zakażeniach wywołanych przez *E. coli*, 3,23% w zakażeniach wywołanych przez *Serratia*, 1,08% w infekcjach spowodowanych przez *Staphylococcus aureus*, 2,15% w zakażeniach *Streptococcus dysgalactiae* i 2,19% w zakażeniach koagulazo-ujemnymi gronkowcami.

G.