

Чувствительность к антибиотикам штаммов бактерий, входящих в состав пробиотика «Линекс»

М.В. Сухорукова, А.В. Тимохова, М.В. Эйдельштейн, Р.С. Козлов

НИИ антимикробной химиотерапии, Смоленск, Россия

Уровень потребления пробиотиков в составе продуктов питания, биологически активных добавок к пище и в качестве лекарственных препаратов неуклонно возрастает. Одновременно увеличивается количество исследований, посвященных эффективности данных средств при различных патологических состояниях. В то же время вопрос о безопасности применения продуктов, содержащих живые микроорганизмы, для человека остается открытым. Официальная процедура оценки безопасности пробиотиков, входящих в состав пищевых добавок, в Европе не установлена.

В публикуемой статье приводятся результаты микробиологического исследования препарата «Линекс» (Сандоз): определение видовой идентификации и чувствительности к антибиотикам микроорганизмов, входящих в его состав, в свете предлагаемых на сегодняшний день международными экспертными организациями подходов к оценке безопасности продуктов, содержащих живые микроорганизмы.

Ключевые слова: пробиотики, Линекс, чувствительность к антибиотикам.

Antimicrobial Susceptibility of Bacterial Strains Contained in the Probiotic Preparation «Linex» (Sandoz)

M.V. Sukhorukova, A.V. Timokhova, M.V. Edelstein, R.S. Kozlov

Institute of Antimicrobial Chemotherapy, Smolensk, Russia

Currently, there is an ever-increasing consumption of probiotics contained in foods, food supplements, and medicinal products. A number of studies to determine efficacy of those products in different medical conditions is also increasing. Meanwhile, safety of probiotic-containing products administration in humans is not fully known. In Europe, no formal safety assessment procedure for probiotics contained in food supplements is established. This paper presents the results of a microbiological study of probiotic preparation «Linex» (Sandoz). Species

identification and antimicrobial susceptibility testing for bacterial strains contained in the product were performed in this study. All testing were conducted according to the proposed by the international expert organizations approaches to the safety assessment of live microorganisms-containing products.

Key words: susceptibility, antimicrobials, probiotics, Linex.

Контактный адрес:

Марина Витальевна Сухорукова

Эл. почта: Marina.Sukhorukova@antibiotic.ru

Введение

Использование пробиотиков в виде продуктов питания, в качестве биологически активных добавок к пище и лекарственных препаратов издавна привлекало внимание человечества. Вопрос о целесообразности их применения в профилактических и терапевтических целях при различных патологических состояниях наиболее активно обсуждается в литературе в последние годы.

Отрадно, что наряду с ростом потребления пробиотиков все чаще становятся объектом серьезного научного изучения в рамках микробиологических, рандомизированных клинических исследований и метаанализов. Сегодня в России продаются пробиотики более ста различных наименований, однако лишь некоторые из них имеют регистрацию в качестве лекарственных средств. Препарат «Линекс» (Sandoz) – один из наиболее известных среди последних.

Пробиотики в качестве лекарственных препаратов должны, в первую очередь, соответствовать двум обязательным требованиям: клинически доказанная польза для здоровья и безопасность при применении у человека [1].

Влияние пробиотиков на здоровье человека изучено при следующих патологических состояниях:

- антибиотик-ассоциированная диарея [2-3];
- острая диарея [4-5];
- профилактика диарея путешественников [6];
- эрадикация *Helicobacter pylori* и уменьшение частоты нежелательных лекарственных реакций на фоне антихеликобактериальной терапии [7–10], а также снижение частоты колонизации *H. pylori* [11, 12].

Несмотря на длительную историю изучения влияния пробиотиков на здоровье человека, вопрос оценки безопасности современных средств не теряет своей актуальности. Такие характеристики пробиотиков, как: видовой состав микроорганизмов; дозы, предусматривающие попадание в организм человека микроорганизмов в количестве, существенно превышающем их естественный уровень содержания в продуктах питания; современные способы производственного культивирования – значительно изменились на протяжении последних десятилетий. Опубликованные в последние годы обзоры, касающиеся клинического применения пробиотиков, зачастую не содержат ответа на этот вопрос [13]. Официальная процедура оценки безопасности пробиотиков, входящих в состав пищевых добавок, в Европе не установлена.

Контроль безопасности кормовых добавок для животных, содержащих живые микроорганизмы,

напротив, строго регламентируется *Европейским Управлением по безопасности пищевых продуктов* (European Food Safety Authority, EFSA). Изучение чувствительности к антибиотикам штаммов бактерий, предназначенных для использования в составе кормовых добавок, является одним из обязательных этапов оценки безопасности таких продуктов [14, 15]. По мнению экспертов, такой подход к оценке безопасности, в принципе, может быть применен ко всем микроорганизмам, участвующим в пищевой цепи [16].

В последнее десятилетие проведен целый ряд исследований, направленных на выбор научно обоснованных критериев оценки безопасности пробиотиков для человека [17]. Среди них: проекты Евросоюза PROSAFE («Biosafety Evaluation of Probiotic Lactic Acid Bacteria for Human Consumption»); ACE-ART («Assessment and Critical Evaluation of Antibiotic Resistance Transferability in the Food Chain»); разработка рекомендаций по оценке пробиотиков в продуктах питания рабочей группы Всемирной Организации Здравоохранения ООН, Продовольственной и сельскохозяйственной Организации (Food and Agriculture Organization ООН (FAO/WHO) и другие исследования, организованные национальными и международными научными обществами [15].

Анализ результатов проведенных исследований позволил экспертам выделить основные факторы, влияние которых необходимо учитывать при оценке безопасности ингредиентов пробиотических средств. Среди них: (1) количество жизнеспособных микроорганизмов; (2) свойства микроорганизмов, зависящие от используемых ферментативных сред и условий культивирования; (3) наличие любых филогенетически родственных микроорганизмов, способных продуцировать токсины для млекопитающих; (4) способность микроорганизмов персистировать в желудочно-кишечном тракте и (5) резистентность микроорганизмов к клинически значимым антибиотикам, особенно с учетом наличия любых трансмиссибельных генетических элементов, несущих детерминанты антибиотикорезистентности [15, 18].

Цель исследования – определить чувствительность к антибиотикам штаммов бактерий, входящих в состав пробиотика «Линекс», и наличие необычных фенотипов – превышение МПК антибиотика по сравнению с *эпидемиологическими видоспецифическими пограничными концентрациями* (ЕСOFFs), которые могут являться предикторами приобретенных детерминант резистентности.

Материал и методы

Образцы препаратов. Данные об исследованных образцах препарата «Линекс» приведены в табл. 1.

Выделение и идентификация бактериальных штаммов. Содержимое капсулы асептически ресуспендировали в 10 мл стерильного 0,85% раствора NaCl до получения однородной суспензии, из которой готовили ряд последовательных 10-кратных разведений. Исходную суспензию и ее разведения наносили на питательные среды для выделе-

методом разведений с определением минимальных подавляющих концентраций (МПК) антибиотиков в отношении исследуемых микроорганизмов. Двойные серийные разведения химически чистых субстанций антибактериальных препаратов готовились в соответствии с рекомендациями *Европейского комитета по определению чувствительности микроорганизмов к антибиотикам (EUCAST)* [1]. Перечень антибактериальных препаратов и диапазон разведений для каждого из них представлены в табл. 3.

Выбор антибиотиков для определения чувствительности осуществлялся с учетом природной устойчивости бактерий, входящих в состав изучаемых лекарственных средств, и исходя из перекрестной резистентности к представителям одной группы *антибактериальных препаратов (АБП)* на основе постулата о том, что чувствительность (или устойчивость) к исследуемому препарату является предиктором чувствительности (или устойчивости) к другим представителям соответствующей группы.

Для контроля качества определения чувствительности параллельно с тестируемыми штаммами определяли МПК в отношении международных контрольных штаммов *Staphylococcus aureus* ATCC29213 и *Enterococcus faecalis* ATCC 29212; оценка результатов определения МПК проводилась в соответствии с действующими критериями [20–22].

Чувствительность к антибиотикам *Lactobacillus* spp. определялась стандартным методом микро-разведений в бульоне LSM (90% бульона Iso-Sensitest, OXOID, 10% бульона M.R.S., OXOID, pH 6,7) с использованием микротитровальных планшетов в условиях аэробной атмосферы при 35 °C в течение 24 ч [22].

Определение чувствительности *Bifidobacterium* spp. проводили методом микро-разведений в бульоне с использованием среды LSM (как описано выше для *Lactobacillus* spp.) с добавлением

Таблица 1. Исследованные образцы препарата «Линекс»

№ флакона	Номер партии	Дата производства	Срок годности
1	BD2076	01.2011	01.2013
2	BK2497	01.2011	01.2013
3	BM7627	03.2011	03.2013
4	BM9220	03.2011	03.2013

ния соответствующих микроорганизмов (табл. 2). Колонии микроорганизмов с морфологией, типичной для *Lactobacillus* spp., *Enterococcus faecium* и *Bifidobacterium* spp., выделяли после окончания необходимого периода инкубации с агара M.R.S., агара Enterococcosel, агара M.R.S. с добавлением 0,03% L-цистеина соответственно (по 10 изолированных колоний каждого типа, всего 40 колоний для каждого штамма, входящих в состав препарата). Используемые питательные среды и условия инкубации представлены в табл. 2.

Идентификация была выполнена с использованием метода время-пролетной MALDI-масс-спектрометрии белков на анализаторе MALDI BioTyper System (Bruker Daltonics, Германия) в соответствии с рекомендациями производителя.

Определение чувствительности к антибиотикам. Определение чувствительности проводилось

Таблица 2. Питательные среды и условия инкубации

Питательная среда	Назначение	Условия инкубации	Длительность инкубации
M.R.S. агар*	<i>Lactobacillus</i> spp.	5% CO ₂ , 35 °C	24 ч
Агар Enterococcosel**	<i>Enterococcus faecium</i>	Обычная атмосфера, 35 °C	24 ч
M.R.S. агар* + 0,03% L-цистеина	<i>Bifidobacterium</i> spp.	Анаэробные условия – 80,9% N ₂ , 10% CO ₂ , 9,1% H ₂ , 35 °C Инкубатор BugBox Station (Jouan)	48 ч

Примечание: * – M.R.S. агар – de man, Rogosa, Sharpe; OXOID, (Великобритания);

** – агар Enterococcosel – Becton Dickinson (США)

Таблица 3. Антибактериальные препараты, использованные для определения чувствительности штаммов бактерий, входящих в состав пробиотика «Линекс»

Антибиотик	Диапазон тестируемых концентраций, мг/л		
	<i>Enterococcus</i> spp.	<i>Lactobacillus</i> spp.	<i>Bifidobacterium</i> spp.
Ампициллин	0,125–256	0,032–16	0,032–16
Ампициллин/сульбактам (4 мг/л)	–	0,032–16	0,032–16
Гентамицин	4–4096	1–2048	–
Эритромицин	0,016–32	0,016–32	0,016–32
Клиндамицин	–	0,032–32	0,032–32
Хлорамфеникол	1–128	0,25–128	0,25–128
Тетрациклин	0,25–128	0,125–128	0,125–128
Ципрофлоксацин	0,25–128	–	–
Ванкомицин	0,125–32	0,125–128	0,125–128
Триметоприм/сульфаметоксазол (1:19)	0,125–32	0,5–256	0,5–256

0,03% L-цистеина. Инкубация микротитровальных планшетов проводилась в анаэробных условиях в течение 40–48 ч [22, 23].

Чувствительность *E. faecium* определяли стандартным методом разведений в агаре Мюллера–Хинтон (Becton Dickinson) согласно рекомендациям EUCAST [19].

Минимальная концентрация, при которой не было выявлено признаков роста микроорганизма, расценивалась как МПК антибиотика в отношении данного изолята. Медиана значений МПК рассчитывалась для каждой пары микроорганизм+антибиотик, исследованной в 10 повторностях (индивидуальные значения МПК для 10 изолятов каждого штамма). Полученное значение сравнивалось с известными эпидемиологическими пограничными концентрациями (ECOFFs) для соответствующих комбинаций микроорганизм+антибиотик [24–27].

Для распределения штаммов на чувствительные, умеренно резистентные или резистентные использовались современные критерии Института по клиническому и лабораторному стандартам (CLSI) США, EUCAST и EFSA [20, 21, 28].

Результаты исследования

Результаты видовой идентификации бактерий, выделенных из препарата «Линекс», представлены в табл. 4. Все выделенные изоляты с высокой степенью достоверности были идентифицированы до вида – *Enterococcus faecium*, *Lactobacillus gasseri*, *Bifidobacterium longum*.

При определении чувствительности исследованных штаммов бактерий, выделенных из препарата «Линекс», индивидуальные значения МПК антибиотиков отличались от значения медианы не

больше, чем на 1 последовательное разведение в 1–2 (из 10) повторов. Различий между партиями препарата «Линекс» выявлено не было.

Обсуждение результатов

Проблему чувствительности бактерий, входящих в состав пробиотиков, следует рассматривать с двух позиций. С одной стороны, если штаммы, входящие в состав пробиотиков, чувствительны к антибактериальным препаратам, возникает вопрос: является ли их одновременное использование целесообразным? Опубликованные результаты целого ряда клинических исследований и метаанализов демонстрируют эффективность применения пробиотиков совместно с антибиотиками для профилактики возникновения нежелательных лекарственных реакций последних (в первую очередь, со стороны ЖКТ), несмотря на данные *in vitro* о чувствительности пробиотических микроорганизмов ко многим антимикробным препаратам [12]. С другой стороны, живые микроорганизмы, используемые в составе пробиотических добавок и лекарственных препаратов, резистентные к антибиотикам, не должны становиться источником приобретенных детерминант устойчивости к антибиотикам для бактерий, обитающих в ЖКТ человека, тем самым внося свой вклад в распространение антибиотикорезистентности.

Выявление приобретенной антибиотикорезистентности у пробиотических микроорганизмов является необходимым этапом оценки безопасности кормовых добавок [14, 24, 27] и предлагается научной общественностью как один из критериев безопасности применения пробиотиков у человека [15]. Применяемые для этой цели методы должны соответствовать международным стандартам.

Таблица 4. Результаты идентификации штаммов, входящих в состав пробиотика «Линекс»

Идентифицированные изоляты	Шкала достоверности результатов идентификации* с использованием MALDI BioTyper (пределы колебаний)
<i>Enterococcus faecium</i>	2,114–2,374
<i>Lactobacillus gasseri</i>	2,299–2,369
<i>Bifidobacterium longum</i>	2,255–2,462

Примечание: * – уровень достоверности идентификации выше 2,3 свидетельствует о точной видовой идентификации, уровень достоверности от 2,0 до 2,3 – о точной идентификации до рода.

Согласно опубликованным совсем недавно «Рекомендациям EFSA по оценке чувствительности бактерий к антибиотикам, имеющим медицинское и ветеринарное значение», первым и необходимым этапом этой работы является определение МПК следующих антибиотиков: ампициллина, ванкомицина, гентамицина, канамицина, стрептомицина, эритромицина, клиндамицина, тетрациклина, хлорамфеникола, в отдельных случаях – и некоторых других препаратов, включая триметоприм/сульфаметоксазол, и использование полученных результатов в качестве предикторов резистентности к другим представителям АБП соответствующих групп [27].

Необходимо отметить, что оценка возможности передачи *in vivo* детерминант антибиотикорезистентности от штаммов, входящих в состав пробиотиков, микроорганизмам, обладающих более мощным патогенным потенциалом, является крайне сложной задачей. В связи с этим ключевым моментом на практике является разделение популяции микроорганизмов с природной резистентностью к антибиотику (антибиотикам) от популяции с приобретенной резистентностью. Превышение значений МПК антибиотика в отношении исследуемых штаммов значения ECOFF того же препарата позволяет предположить наличие приобретенных детерминант резистентности. В последней категории является важным дальнейшее разделение резистентности, связанной со случайными генетическими событиями в хромосомных генах (например инактивация топоизомеразы, приводящая к устойчивости к хинолонам), и трансмиссибельной резистентности, когда детерминанты устойчивости связаны с мобильными генетическими элементами (плазмидами, транспозонами и др.) [27].

Еще одним требованием к штаммам, предназначенным для применения у человека в составе пробиотиков, приведенным в указанном документе, является чувствительность, по крайней мере, к двум антибиотикам, имеющим клиническое применение [15].

Полученные в ходе представленного исследования результаты определения чувствительности

к антибиотикам штаммов, входящих в состав препарата «Линекс», показали следующее:

- *E. faecium* в соответствии с действующими критериями EUCAST и CLSI был резистентен к ампициллину (уровень МПК выше опубликованных значений ECOFF), и ципрофлоксацину в соответствии с критериями CLSI для МПК, равной значению ECOFF (4 мг/л);

- штаммы *B. longum* в соответствии с критериями EUCAST и EFSA были чувствительны ко всем исследованным антибиотикам;

- штаммы *L. gasseri* в соответствии с критериями EFSA были резистентны к гентамицину, эритромицину и тетрациклину а к хлорамфениколу – в соответствии с критериями EUCAST и EFSA с МПК, превышающими значения ECOFF.

Эти данные, во-первых, свидетельствуют о соответствии изученных штаммов пробиотиков предлагаемому EFSA критерию – наличие чувствительности, как минимум, к двум антибактериальным препаратам, используемым в клинической практике. Во-вторых, выявленная нечувствительность *E. faecium* и *L. gasseri*, входящих в состав пробиотика «Линекс», к некоторым антибактериальным препаратам может способствовать выживанию этих бактерий в условиях проведения антибактериальной терапии [1].

В отличие от большого числа работ, посвященных изучению механизмов формирования и распространения резистентности у патогенных микроорганизмов, опубликованных данных о механизмах резистентности некоторых родов бактерий, не имеющих патогенных видов, крайне мало [27]. Так, при выполнении исследования PROSAFE было обнаружено шесть штаммов лактобактерий, входящих в состав различных пробиотиков, которые были фенотипически устойчивы к тетрациклину и/или эритромицину и обладали генами *erm(B)* и/или *tet(W)*, *tet(M)*, а также неидентифицированными генами группы *tet(M)*. В ходе экспериментов *in vitro* осуществить передачу этих детерминант резистентности как между представителями одного вида, так и между представителями разных видов, не удалось. У трех штаммов лактобактерий феноти-

пическими методами была выявлена устойчивость высокого уровня к стрептомицину, однако попытки обнаружить гены, обуславливающие данный вид резистентности, методом ПЦР также не увенчались успехом [25].

При выполнении проекта ACE-ART в большинстве случаев *erm*- и *tet*- гены были обнаружены у штаммов с высокими значениями МПК соответствующих антибиотиков. Однако соответствие фенотипа и генотипа также встречалось не во всех случаях. Так, у 22 чувствительных к тетрациклину и эритромицину изолятов были выявлены *tet*- и *erm*-гены. В то же время у 15 фенотипически резистентных штаммов не было найдено детерминант резистентности, связанных с трансмиссивными генетическими элементами [29].

Таким образом, опубликованные на сегодняшний день данные свидетельствуют о крайне низкой вероятности передачи детерминант устойчивости от штаммов-пробиотиков другим видам бактерий, обитающих в кишечнике человека ввиду хромосомного их расположения [15].

Проведенные исследования по изучению чувствительности пробиотиков, предназначенных для использования у животных и человека, внесли существенный вклад в разработку критериев оценки безопасности продуктов, содержащих живые микроорганизмы. Однако ряд вопросов до настоящего времени все еще остается нерешенным, среди них: спектр изучаемых антибиотиков, необходимое для тестирования количество штаммов, методы оценки *in vivo* риска передачи детерминант резистентности от пробиотических штаммов микроорганизмам, находящимся в ЖКТ.

Принимая во внимание тот факт, что клиническая эффективность не всегда может быть предсказана только на основании данных определения чувствительности *in vitro*, исследования по изучению закономерностей между результатами экспериментов *in vitro* и чувствительностью *in vivo* должны быть продолжены [15].

Литература

1. Hoesl C.E., Altwein J.E. The Probiotic approach: an alternative treatment option in urology. *European Urology* 2005; 47:288-96.
2. Cremonini F., Di Caro S., Nista E.C., et al. Meta-analysis: the effect of probiotic administration on antibiotic-associated diarrhoea. *Aliment Pharmacol Ther* 2002; 16 (8): 1461-7.
3. Szajewska H., Ruszczyński M., Radzikowski A. Probiotics in the prevention of antibiotic-associated diarrhea in children: a meta-analysis of randomized controlled trials. *J Pediatr* 2006 149(3):367-72.
4. Huang J.S., Bousvaros A., Lee J.W., Diaz A., Davidson E.J. Efficacy of probiotic use in acute diarrhea in children: a meta-analysis. *Dig Dis Sci* 2002; 47(11):2625-34.
5. Allen S.J., Martinez E.G., Gregorio G.V., Dans L.F. 2010 Probiotics for treating acute infectious diarrhoea. *Update of Cochrane Database Syst Rev* 2004;(2):CD003048.
6. McFarland L.V. Meta-analysis of probiotics for the prevention of traveler's diarrhea. *Travel Med Infect Dis* 2007; 5(2):97-105.
7. Жихарева Н.С., Хавкин А.И. Терапия антибиотико-ассоциированного дисбактериоза. *РМЖ* 2006; 14 (19): 1386-9.
8. Sheu B.S., Cheng H.C., Kao AW, et al. Pretreatment with *Lactobacillus*- and *Bifidobacterium*-containing yogurt can improve the efficacy of quadruple therapy in eradicating residual *Helicobacter pylori* infection after failed triple therapy. *Am J Clin Nutr* 2006; 83(4):864-9.
9. De Bortoli N., Leonardi G., Ciancia E., et al. *Helicobacter pylori* eradication: a randomized prospective study of triple therapy versus triple therapy plus Lactaferrin and probiotics. *Am J Gastroenterol* 2007;102(5):951-6.
10. Myllyluoma E., Veijola L., Ahlroos T., et al. Probiotic supplementation improves tolerance to *Helicobacter pylori* eradication therapy – a placebo-controlled, double-blind randomized pilot study. *Aliment Pharmacol Ther* 2005; 21:1263-72.
11. Gotteland M., Brunzer O., Ctechet S. Systematic review: are probiotic useful in controlling gastric colonization by *Helicobacter pylori*? *Aliment Pharmacol Ther* 2006; 23(8):1077-86.
12. Андреева И.В. Когда следует назначать пробиотики? *Клин микробиол антимикроб химиотер* 2011; 13(3): 279-82.
13. Abdel-Rahman A., Anyangwe N., Carlacci L., et al. The safety of natural products used as food s and food ingredients. *Toxicological Sciences* 2011; 123(2):333-48.
14. Introduction of Qualified Presumption of Safety (QPS) approach for Assessment of selected microorganisms referred to EFSA – Opinion of the Scientific Committee 2007. Available from: http://www.efsa.europa.eu/EFSA/efsa_locale-1178620753812_1178667590178.htm.
15. Sanders M.E., Akkermans L.M.A., Haller D., et al. Safety assessment of probiotics for human use. *Gut Microbes* 2010; 1(3):164-85.
16. Mayrhofer S., van Hoek A., Mair C., et al. Antibiotic susceptibility of members of the *Lactobacillus acidophilus* group using broth microdilution and molecular identification of their resistance determinants. *Int J Food Microbiol* 2010; 144:81-7.
17. Von Wright A. Regulating the safety of probiotics – the

- European approach. *Curr Pharm Des* 2005; 11:17-23.
18. Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization 2002. Guidelines for the evaluation of probiotics in food. http://www.who.int/foodsafety/fs_management/en/probiotic_guidelines.pdf.
 19. EUCAST Definitive Document E.DEF 3.1, June 2000: Determination of minimum inhibitory concentrations (MICs) of antibacterial agents by agar dilution. *Clin Microbiol Infect* 2000; 6:509-15.
 20. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-First Informational Supplement. CLSI document M100-S21. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI 2011).
 21. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing. (EUCAST 2011); 1(3).
 22. Klare, I., C. Konstabel, S. Muller-Bertling, R., et al. Evaluation of new broth media for microdilution antibiotic susceptibility testing of Lactobacilli, Pediococci, Lactococci, and Bifidobacteria. *Appl Environ Microbiol* 2005; 71:8982-6.
 23. Huys G., Haene K.D. Cnockaert M., et al. Intra- and interlaboratory performances of two commercial antimicrobial susceptibility testing methods for bifidobacteria and nonenterococcal lactic acid bacteria. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; 54:2567-74.
 24. Klare I., Konstabel C., Werner G., et al. Antimicrobial susceptibilities of *Lactobacillus*, *Pediococcus* and *Lactococcus* human isolates and cultures intended for probiotic or nutritional use. *J Antimicrob Chemother.* 2007; 59:900-12.
 25. Mayrhofer S., van Hoek A.H., Mair C., et al. Antibiotic susceptibility of members of the *Lactobacillus acidophilus* group using broth microdilution and molecular identification of their resistance determinants. *Int J Food Microbiol* 2010;144:81-7.
 26. Guidance on the assessment of bacterial susceptibility to antimicrobials of human and veterinary importance. Prepared by the panel on additives and products or substances used in animal feed. *EFSA Journal* 2012; 10(6): 1-10.
 27. MIC- and inhibition zone diameter distributions of microorganisms without and with resistance mechanisms. Available from: http://www.eucast.org/mic_distributions/
 28. Update of the criteria used in the assessment of bacterial resistance to antibiotics of human or veterinary importance. Prepared by the Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed. *EFSA Journal* 2008; 7; 32:1-15.