



CERTIFIKOVANÁ METODIKA

Metodika testování antibiotické rezistence u bakterií mléčného kvašení využívaných v potravinářském průmyslu

Mgr. Monika Morávková, Ph.D.

Ing. Hana Vlková

Mgr. Marta Dušková, Ph.D.

Doc. MVDr. Renáta Karpíšková, Ph.D.

Certifikovaná metodika č. 85

QJ1510338 č. BMK 01/2017

**Metodika testování antibiotické rezistence u bakterií mléčného kvašení využívaných
v potravinářském průmyslu**

Autoři:

Mgr. Monika Morávková, Ph.D., Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v.v.i. (35 %)

Ing. Hana Vlková, Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v.v.i. (35 %)

Mgr. Marta Dušková, Ph.D., Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v.v.i. (20 %)

Doc. MVDr. Renáta Karpíšková, Ph.D., Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v.v.i. (10 %)

Metodika je výsledkem řešení výzkumného projektu Ministerstva zemědělství

ČR NAZV KUS, číslo grantu QJ1510338

Osvědčení č. 12872/2017/RED o uplatněné certifikované metodice ze dne 4. 12. 2017

Vydal: Ústav pro státní kontrolu veterinárních biopreparátů a léčiv, Hudcova 56a, 621 00
Brno

ISBN 978-80-88233-05-3

PŘEDMLUVA

Na základě doporučení EFSA, bakterie mléčného kvašení (BMK), které jsou vnášeny do potravin či krmiva, by měly být testovány na citlivost/rezistenci k antimikrobiálním látkám (EFSA, 2012). Nicméně v současnosti nejsou v České republice pro laboratoře zabývající se využíváním BMK k dispozici vhodné a cenově dostupné sety ke stanovení minimální inhibiční koncentrace (MIC). Sety, které jsou k dispozici, zcela neodpovídají spektrem a použitou koncentrací antibakteriálních látek. Vzhledem k výše uvedeným skutečnostem bylo naším záměrem navrhnout produkt (mikrotitrační destičku), který bude splňovat podmínky předpisu EFSA 2012, bude kompletní, tedy připraven i s růstovým médiem. Cílem této metodiky byl podrobný komplexní postup využívající nově navrženou a připravenou mikrotitrační destičku s vyhovujícím spektrem a rozsahem antibiotik a vhodným kultivačním médiem. Metodický postup již začíná prekultivací daného kmene a končí interpretací dat. Výběr metodiky byl zvolen dle požadavků uvedených v ISO 10932:2010, která definuje podmínky pro stanovení antimikrobiální rezistence bifidobakterií a bakterií mléčného kvašení jiných než enterokoků, které se používají v mléčném průmyslu. Metodické postupy pro tyto bakterie, které jsou uvedené ve standardech CLSI nebo jiné postupy testování antibiotické rezistence, nelze použít. Důvodem je provázanost standardů ISO 10932:2010 a hodnocení dle doporučení EFSA (2012). Na základě dostupných publikací bylo zjištěno, že použití různých metodických postupů (např. použité médium) má vliv na výsledek hodnoty MIC (Klare a kol., 2005; Mayrhofer a kol., 2014).

I) CÍL METODIKY

Cílem metodiky je podrobný a komplexní pracovní postup a hodnocení citlivosti bakterií mléčného kvašení k antimikrobiálním látkám pomocí stanovení minimálních inhibičních koncentrací. Pro splnění cíle metodiky byly navrženy a následně otestovány sety pro stanovení MIC u BMK.

II) VLASTNÍ POPIS METODIKY

Předkládaná metodika představuje komplexní postup pro stanovení citlivosti/rezistencí BMK a dalších bakteriálních rodů používaných při výrobě fermentovaných výrobků, včetně interpretace výsledků. Metodika zahrnuje přípravu kultur pro testování, přípravu inokula, optimalizaci růstových podmínek BMK v mikrotitrační destičce, včetně výběru vhodných médií, výběr panelu antimikrobiálních látek s rozmezím testovaných koncentrací dané antimikrobiální látky, zavedení metody hodnocení a interpretaci dat.

Postup přípravy destiček včetně výběru antibiotik metodicky vycházel z mezinárodních metodik Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI, 2013), ISO 10932:2010 a z doporučení EFSA (2012).

Metodika je vhodná pro testování zejména následujících BMK a případně dalších bakterií rodu *Bifidobacterium*, *Propionibacterium*, *Bacillus*:

- 1) *Lactobacillus* spp. (obligátně homofermentativní zahrnující *L. helveticus*, *L. delbrueckii*; obligátně heterofermentativní zahrnující *L. fermentum*; *L. rhamnosus*; *L. acidophilus* group; *L. plantarum/pentosus*; *L. casei/paracasei*, *L. reuteri*)

- 2) *Bifidobacterium* spp.
- 3) *Lactococcus lactis*
- 4) *Streptococcus thermophilus*
- 5) *Propionibacterium* spp.
- 6) *Bacillus* spp.
- 7) *Pediococcus* spp. a *Leuconostoc* spp.
- 8) *Enterococcus faecium*

1. Navržené mikrotitrační destičky ke stanovení MIC antimikrobiálních látek

Ke stanovení MIC antimikrobiálních látek u BMK v mikrotitračních destičkách byly navrženy dva sety, které se liší zvoleným kultivačním médiem. Výběr ATB a rozmezí jejich koncentrací je v obou destičkách shodné.

Sety musí být skladovány zamrazené při teplotě (-) 80°C. Po rozmrazení a temperování setu na kultivační teplotu je nutné provést inokulaci destičky do 1 h. Rozmrazené sety se nesmí opětovně zamrazit (riziko degradace antimikrobiálních látek). Při skladování setů v (-) 80 °C je expirace 6 měsíců ode dne výroby.

Při testování MIC antimikrobiálních látek musí být vždy použity vhodné referenční kmeny s definovaným rozmezím hodnot MIC.

1.1. Kultivační média

1.1.1. **IST+L:** IST médium s přídavkem laktosy (ISO –Sensitest broth s 10,0 g laktosy na litr média) - koky

1.1.2. **LSM+C**: LSM médium s přidavkem cysteinu (90% ISO –Sensitest broth + 10% MRS broth s přidavkem cysteinu; cystein 0,3 g na litr média) – ostatní BMK

1.2. Schéma mikrotitrační destičky

Zvolená antibiotika a jejich rozmezí (µg/ml) je uvedeno v **Příloze č. 1**.

2. Podmínky kultivace a limity růstu referenčních kmenů

Při každém testování antibiotické rezistence je nutné zároveň testovat referenční kmeny. Podmínky kultivace jsou uvedeny v Tabulce 1. Limity růstu pro referenční kmeny jsou uvedeny v **Příloze č. 2**.

Tabulka 1: Podmínky kultivace referenčních kmenů

Referenční kmen	Teplota	Atmosféra A/AN	Doba inkubace	Médium agar/broth
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> LMG 6890/ATCC 194358	30 °C	aerobní	20-24 h	M17+L/ IST+L
<i>Lbc. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> LMG 12586/ATCC 334	30 °C	aerobní	20-24 h	MRS+C/ LSM+C
<i>Lbc. plantarum</i> subsp. <i>plantarum</i> LMG 6907/ATCC 14917	30 °C	aerobní	20-24 h	MRS+C/ LSM+C
<i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>longum</i> LMG 13197/ATCC 15707	37 °C	anaerobní*	24-28 h max. 32 h	MRS+C/ LSM+C

M17+L: M17 agar + laktosa (pH 6,9 ±0,2)

IST+L: ISO –Sensitest broth s 10,0 g laktosy na litr média

MRS+C: MRS (ISO) agar + L-cystein (pH 5,7±0,1)

LSM+C: 90% ISO –Sensitest broth + 10% MRS broth s přidavkem cysteinu; cystein 0,3 g na litr média

* 80 % N₂, 10 % H₂, 10 % CO₂, < 0,2 % O₂

3. Kultivace, příprava, nanášení inokula na mikrotitrační destičku a kontrola počtu buněk v jamce mikrotitrační destičky

3.1. Pre-kultivace testovaných kmenů

Kmeny kultivujeme na následujících pevných médiích:

a) MRS (ISO) agaru (OXOID CM 1153) + L-cystein (pH 5,7±0,1)

MRS připravíme dle návodu, po autoklávování 121 °C/15 min, ochladit na 44 °C, přidat 1,0 ml ZR L-cysteinu do 100 ml a rozlít na Petriho misky. Zásobní roztok L-cysteinu (ZR: 0,3 g L-cystein /10 ml H₂O, sterilizace filtrací přes 0,2 µm filtr). Toto médium (MRS+C) je vhodné především pro kultivaci *Lactobacillus* spp., *Bacillus* spp., lze i *Bifidobacterium* spp. (pozn*).

b) M17 agaru (OXOID CM0785) + laktosa (pH 6,9 ±0,2)

M17 agar připravíme dle návodu (48,25 g agar M17 + 950 ml deionizovaná voda), po sterilizaci 121 °C/15 min a ochlazení na 50 °C přidat 50 ml sterilního roztoku 10% laktosy a rozlít na Petriho misky. Zásobní roztok 10% laktosy (10 g laktosy p.a. do 100 ml deionizované vody, sterilizace filtrací přes 0,2 µm filtr, nebo autokláv 105 °C/10 min.) Toto médium (M17+L) je vhodné především pro *Lactococcus* spp., *Streptococcus* spp. a *Propionbacterium* spp. a další koky BMK.

*pozn: Bifidobakteria lze také kultivovat na M1396-HIMEDIA, nebo lépe na BK 090HA-BIOKAR clostridial agar

Tabulka 2: Růstové podmínky pre-kultivace testovaných kmenů

Druh	Medium (agar)	Teplota	Atmosféra	Doba inkubace
<i>Bifidobacterium</i> spp.	MRS+C	37 °C	anaerobní*	24-48 h
<i>Lactobacillus brevis</i>	MRS+C	30 °C	anaerobní / nebo aerobní	20-24 h /max 36 h
<i>Lactobacillus plantarum/pentosus</i>	MRS+C	30 °C	anaerobní / nebo aerobní	20-24 h
<i>Lactobacillus sakei</i>	MRS+C	30 °C	anaerobní / nebo aerobní	20-24 h
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> skupina	MRS+C	37 °C	anaerobní	24-48 h
<i>Lactobacillus</i> spp. ostatní	MRS+C	37 °C / případně 30 °C	anaerobní / nebo aerobní	20-24 h/ max 36 h
<i>Lactococcus lactis</i>	M17+L	30 °C / případně 32 °C	anaerobní / nebo aerobní	20-24 h
<i>Streptococcus thermophilus</i>	M17+L	37 °C / případně až 42 °C	anaerobní / nebo výjimečně aerobní	24-36 h /max 48 h
<i>Propionibacterium</i> spp.	MRS+C	30 °C	anaerobní	36-48 h

M17+L: M17 agar + laktosa (pH 6,9 ±0,2)

MRS+C: MRS (ISO) agar + L-cystein (pH 5,7±0,1)

* 80 % N₂, 10 % H₂, 10 % CO₂, < 0,2 % O₂

Podmínky kultivace (čas, teplota, atmosféra), které vyhovují pro jednotlivé kmeny při této pre-kultivaci, se musí dodržet i při testaci ATB rezistence v mikrotitračních destičkách. Tzn. kmeny vykultivované na MRS+L se testují v mikrotitrační destičce s LSM+C médiem. Kmeny vykultivované na M17 agaru s laktosou se testují v mikrotitrační destičce s IST+L. V Tabulce 2 jsou uvedeny optimální podmínky (teplota a atmosféra) pro jednotlivé druhy. Pokud testované kmeny nevyrostou za těchto uvedených podmínek do 24 h maximálně do 48 h, bude potřeba tyto podmínky zoptimalizovat. Pokud by některý kmen nerostl za anaerobních nebo aerobních podmínek, je vhodné otestovat i růst v prostředí mikroaerofilním (79,3 % N₂, 6,4 % H₂, 6,4 % CO₂, 7,5 % O₂).

Pozor: Je nutné, aby kultivační podmínky byly nastaveny tak, aby kultivace proběhla během 24 h maximálně 48 h.

3.2 Vlastní příprava inokula

Bakteriologickou kličkou odebraná kultura z Petriho misky do sterilního roztoku 0,85% NaCl se promíchá převalováním, suspenze se nesmí provzdušnit. Takto připravená bakteriální suspenze by měla odpovídat hodnotám:

Suspenze buněk OD λ 625 nm: 0,16-0,20 – této optické denzitě odpovídají následující hodnoty McFarland:

- a) *Lactococcus* spp., *Streptococcus* spp. a další koky - doporučujeme zákal 1,5 °McFarland
- b) *Lactobacillus* spp., a ostatní BMK - doporučujeme zákal 1,2-1,3 °McFarland
- c) *Enterococcus* spp. doporučujeme zákal 0,7 °McFarland

Připraví se suspenze buněk o výše uvedené denzitě tzn. kolem 3 až 5×10^8 CFU/ml (počet kolonie tvořících buněk v jednom mililitru) ve 2 ml 0,85% NaCl (výše uvedené hodnoty umožňují dosáhnout konečnou koncentraci inokula v jamce s ATB cca 3 až 5×10^5 CFU/ml). Následuje přenos 1 ml suspenze buněk (připravené dle 2.2) do 9 ml 0,85% NaCl.

3.3. Inokulace mikrotitračních destiček

Výběr typu mikrotitrační destičky viz bod 3.1. Mikrotitrační destičky před inokulací rozmrazit při pokojové teplotě buď v exikátoru (musí být pootevřené a nesmí ležet na sobě), lépe otevřené v laminárním boxu. Nesmí dojít ke kondenzaci. Destičky se inokulují pokud možno do 1 h po rozmražení a do 20 min od přípravy inokula. Nanáší se 5 μ l suspenze (připravené v Petriho misce dle 3.2) multikanálovou pipetou do všech jamek s ATB a do 2 jamek určených jako pozitivní kontrola (PK; pozice G/9; F/9; viz Příloha 1.) Do jamky pozice H/9 se nenanáší nic, tato jamka slouží jako negativní kontrola (NK). Před nanesením do destičky se promíchá suspenze v Petriho misce velice šetrně špičkami, roztok se nesmí provzdušnit.

Pozor: Nesmí se nanést více než 5 μ l, změnila by se koncentrace daného antibiotika a při práci s inokulem nesmí dojít k provzdušnění.

3.4. Kontrola denzity inokula

Po nanesení inokula do jamek mikrotitrační destičky se provede zpětná kontrola CFU/ml: z jamky PK – 9/G se odebere 50 μ l.

I. ředění:

A) 100 x ředěná PK (tzn. 10^3 CFU/ml) = 50 μ l PK + 4,95 ml 0,85% NaCl, z ředění A se opět odebere 50 μ l

II. ředění

B) 100 x ředěné A (tzn. 10^1 CFU/ml) = 50 μ l (ředění A) + 4,95 ml 0,85% NaCl.

Z ředění B se odebere 3 x 330 μ l, nanese a rozetře hokejkou na Petriho misku s agarovou půdou stejného složení, jaká byla použita k namnožení kmene pro test. Kultivuje se za stejných podmínek jako mikrotitrační destička. Test se považuje za vyhovující, pokud odečet ukáže hodnoty v rozsahu ± 1 log od hodnoty očekávané (viz 3.2)

4. Inkubace mikrotitračních destiček, odečet hodnot MIC, kontrola PK a NK

4.1 Inkubace

Po inokulaci se destičky zakryjí víčkem a poté jsou inkubovány za anaerobních nebo aerobních (případně za mikroaerofilních) podmínek v termostatu při 30 °C, případně 37 °C po dobu 24 h, max. 48 h viz 3.1.

V případě anaerobní kultivace se destičky před inkubací vloží do anaerobního sáčku, zataví se v definované atmosféře (80 % N₂, 10 % H₂, 10 % CO₂) za použití přístroje LAS-D1 (TRIOS s.r.o.). V případě mikroaerofilních podmínek se zataví v atmosféře (79, 3% N₂, 6,4 % H₂, 6,4 % CO₂, 7,5 % O₂). Lze též použít anaerostaty s vyvíječem vhodného plynu.

4.2 Odečet MIC

Odečet MIC se provádí vždy poprvé po 24 h. V první řadě se zkontroluje růst v jamkách s PK – nutný vizuální rozdíl oproti jamce s NK. Pokud je rozdíl viditelný a jamka s NK nevykazuje známky kontaminace (např. zákal), lze přistoupit k hodnocení. Pokud rozdíl není viditelný, pokračuje se v inkubaci dalších 12 h, případně 24 h. **Minimální inhibiční koncentrace (MIC; µg/ml) je nejnižší odečtená koncentrace antimikrobiální látky, která inhibuje růst.** Odečet lze provést několika způsoby, nicméně vizuální hodnocení na základě použití indikátoru se jeví jako nejsnadnější způsob odečtu výsledku.

Možné způsoby odečítání:

1) Vizuálně - růst bakterií se projevuje zákalem obsahu jamky nebo sedimentem na dně jamky. MIC je hodnota nejnižší koncentrace, ve které není pozorován žádný růst nebo je růst snížen o 80 %.

2) Vizuálně - změna pH pomocí indikátoru* - růst se projevuje změnou pH.

MIC je nejnižší hodnota koncentrace, ve které není zaznamenán žádný růst, tedy nedojde ke změně barvy indikátoru a jamka zůstává zbarvena červeně – stejně jako jamka NK. Růst je indikován žlutým zbarvením, stejně jako u jamky PK. Jako indikátor je použit roztok chlorfenolové červeně (Chlorphenolrot p.a., kat.č. 0347.1 Roth**).

* Aplikace indikátoru: Pro snadnější odečítání se do každé jamky napipetuje 5-10 µl roztoku indikátoru. Odečítáme ihned, max do 1 min po zbarvení.

**Příprava chlorfenol červeně: 1 g chlorfenol červeně + 1 l 20% ethylalkoholu.

3) Reader – měří se růst při vlnové délce 620 nm, nejméně dobrý odečet, ruší bubliny a vpadlé krystalky cysteinu, nutné překontrolovat vizuálně.

5. Interpretace výsledků

Hodnoty MIC ($\mu\text{g/ml}$) pro jednotlivá antibiotika u testovaných kmenů se zaznamenají do Tabulky v Příloze 1. Zároveň se zjištěná MIC pro referenční kmeny porovná s kritérii pro použitý referenční kmen dle ISO10932-IDF223 viz Příloha č. 2, kde jsou uvedeny limity růstu referenčních kmenů. Poté se výsledná MIC antimikrobiální látky u testovaných kmenů porovná s kritérii pro daný druh viz Příloha č. 3, kde jsou uvedeny cut-off ($\mu\text{g/ml}$) pro jednotlivá antibiotika (převzato z EFSA JOURNAL 2012;10(6):2740).

- a) Kmen je definovaný jako citlivý (S), pokud je inhibovaný koncentrací antibiotika nižší nebo rovno cut-off ($S = \text{MIC} \leq \text{cut-off}$).
- b) Kmen je definovaný jako rezistentní (R), pokud je inhibovaný koncentrací antibiotika vyšší než je stanovené cut-off ($R = \text{MIC} > \text{cut-off}$).
- c) V případě zjištěné fenotypové rezistence, je nutné u daného kmene došetřit genetický základ této rezistence.

6. Kontrola kvality

Postup navržený v této certifikované metodice, zároveň s navrženými mikrotitračními destičkami, byl testován jak na referenčních kmenech, tak na kmenech pocházejících ze sbírky mlékárenských mikroorganismů Laktoflora®. Dlouhodobým testováním kmenů byla potvrzena údržnost destiček na 6 měsíců v (-) 80 °C. Metodika byla otestována na kmenech uvedených v Příloze č. 4.

6.1. Kontrola sterility mikrotitračních destiček

Kontrola sterility mikrotitračních destiček je zaručena výrobcem. Kontrolu lze provést inkubací nenačkovaných destiček v termostatu při 37 °C (případně 30°C) při aerobních a anaerobních podmínkách po dobu 48 h. Kontaminace destiček se projeví zakalením média případně sedimentem v jamce. V tomto případě nelze danou sérii k testování použít a je nutné upozornit výrobce.

6.2. Kontrola růstu vyšetřovaného kmene (pozitivní kontrola)

Při odečítání se hodnotí růst v jamce, která byla zaočkována testovaným kmenem, ale která neobsahuje žádné antimikrobiální látky (pozice PK F/9,G/9).

6.3. Kontrola kontaminace během inokulace destiček (negativní kontrola)

Při odečítání se hodnotí negativní růst v jamce, jenž obsahuje pouze kultivační médium bez antibiotik, a do které nebylo inokulum zaočkováno (pozice NK H/9).

6.4. Kontrola kvality výsledků

Kontrola kvality výsledků se provádí paralelně vyšetřením hodnot MIC referenčních kmenů. Výsledné hodnoty MIC musí odpovídat rozmezí hodnot MIC uvedených pro dané referenční kmeny (Tabulka v Příloze č. 2).

III) SROVNÁNÍ NOVOSTI POSTUPŮ

V současné době je k testování rezistencí u BMK možné využít pouze omezenou nabídku komerčních setů české a zahraniční výroby. Avšak tyto komerčně dodávané destičky určené pro stanovení MIC u BMK jsou neúměrně drahé a zcela neodpovídají spektrem a použitou koncentrací antibakteriálních látek. Předložená metodika stanovení citlivosti/rezistence k

antimikrobiálním látkám u bakterií mléčného kvašení a dalších startovacích kultur využívaných nejen v mlékařském průmyslu vychází z ISO 10932. Výběr a hodnocení antibiotické rezistence vychází z doporučení EFSA (2012). V navržené metodice je uveden komplexní postup pro stanovení citlivostí/rezistencí BMK a dalších bakteriálních rodů pomocí navržených mikrotitračních destiček včetně interpretace výsledků. Kromě panelu antibiotik uváděných v EFSA, byl panel antibiotik navíc doplněn o ciprofloxacin. Ciprofloxacin, antibiotikum ze třídy chinolonů, které inhibuje replikaci DNA, bylo přidáno z důvodu výskytu rezistentních kmenů *Lactobacillus* spp. v řadě publikací (Guo a kol., 2017; Shao a kol., 2015). Pro zjednodušení metodiky (ekonomické a časové důvody) byly též na základě optimalizace vybrána pouze dvě vhodná kultivační média, která zaručí růst většiny sledovaných bakterií do 24 h nebo maximálně do 48 h, což je klíčové pro správný odečet výsledku. Dále vzhledem k obtížnějšímu odečtu výsledku byla navržena metoda, která je založena na využití chlorfenolové červeně, která usnadní odečítání výsledku.

IV) POPIS UPLATNĚNÍ CERTIFIKOVANÉ METODIKY

BMK, které se využívají pro výrobu fermentovaných výrobků musí být sledovány na přítomnost antimikrobiální rezistence. Proto při jakémkoliv zavádění výrobku s novou mlékařskou kulturou je nutné tuto kulturu otestovat též na přítomnost rezistence k vybraným antimikrobiálním agens. Metodika je tudíž určena jednak pro samotné producenty mlékařských kultur, jednak pro dozorové či kontrolní orgány zabývající se sledováním výskytu mikrobiální rezistence u mlékařských kultur. Metodika může být dále využita v ostatních laboratořích nakládajících s BMK a může přispět k prohloubení studia BMK. Metodika přispívá ke komplexnímu a jednotnému postupu stanovení citlivostí/rezistencí BMK k antimikrobiálním látkám, včetně snadnějšího odečítání a interpretaci výsledků.

V) EKONOMICKÉ ASPEKTY

Za ekonomický přínos lze považovat zejména možnost našich výrobců mlékařských a jiných kultur otestovat si kultury ve vlastní laboratoři pomocí navržených setů. Tím se podpoří konkurenceschopnost českých výrobců kultur i výrobců mlékárenských produktů.

Náklady na zavedení postupů uvedených v metodice jsou minimální (0 – 5 tis. Kč), protože jejich provedení nevyžaduje žádné speciální přístrojové vybavení. Provedení je možné s využitím přístrojů, pomůcek (termostat, pipety) a spotřebního materiálu běžně používaného v bakteriologické laboratoři. Nejvyšší položkou je nákup nově navržených destiček, jejichž předpokládaná cena je 250 Kč/ks. V současné době žádný výrobce v ČR ani zahraničí nedodává takto komplexní testovací set obsahující všechna předepsaná antibiotika v kultivačních médiích umožňujících optimální růst mlékařských kultur. K testování jednoho bakteriálního kmene by tak bylo nutné použít minimálně dva různé sety a případně doplnit jednotlivými E-testy. Cena za testování jednoho kmene by pak byla minimálně 750 Kč.

Ekonomický přínos pro laboratoře bude představovat úsporu nákladů u provedených vyšetření. Např. za předpokladu vyšetření v jedné laboratoři cca 100 kmenů mlékařských kultur ročně by náklady byly 75 000 Kč. Použitím nově navržené metodiky se náklady sníží na 25 000 Kč, což představuje úsporu 50 000 Kč ročně. Za pět let to činí úsporu 250 000 Kč.

VI) SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

Clinical Laboratory Standards Institute: CLSI, 2013, VET01-A4., Vol.33; No 7; replaces M31-A3).

European Food safety Authority: Guidance on the assessment of bacterial susceptibility to antimicrobials of human and veterinary importance. EFSA Journal 2012;10(6):2740.

European Commission, Health & Consumer Protection Directorate: Opinion of the Scientific Committee on Animal Nutrition on Criteria for Assessing The Safety of Micro-Organisms Resistant to Antibiotics of Human Clinical and Veterinary Importance (adopted on 3 July 2001, revised on 24 January 2003).

GUO, H.; PAN, L.; LI, L.; LU, J.; KWOK, L.; MENGHE, B.; ZHANG, H.; ZHANG, W. Characterization of Antibiotic Resistance Genes from *Lactobacillus* Isolated from Traditional Dairy Products. *J Food Sci.* 2017, 82(3):724-730.

ISO 10932:2010: Milk and milk products - Determination of the minimal inhibitory concentration (MIC) of antibiotics applicable to bifidobacteria and non - enterococcal lactic acid bacteria (LAB).

KLARE, I.; KONSTABEL, C.; MULLER-BERTLING, S.; REISSBRODTL, R.; HUYS, G.; VANCANNEYT, M.; SWINGS, J.; GOOSSENS, H.; WITTE, W. Evaluation of new broth media for microdilution antibiotic susceptibility testing of *Lactobacilli*, *Pediococci*, *Lactococci*, and *Bifidobacteria*. *Appl Environ Microb.* 2005, 71(12):8982-8986.

MAYRHOFER, S.; ZITZ, U.; BIRRU, F. H.; GOLLAN, D.; GOLOS, A. K.; KNEIFEL, W.; DOMIG, K. J. Comparison of the CLSI guideline and ISO/IDF standard for antimicrobial susceptibility testing of *Lactobacilli*. *Microb Drug Resist.* 2014, 20(6):591-603.

SHAO, Y. Y.; ZHANG, W. Y.; GUO, H. L.; PAN, L.; ZHANG, H. P.; SUN, T. S. Comparative studies on antibiotic resistance in *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus plantarum*. *Food Control*. 2015, vol. 50, s. 250-258.

VII) SEZNAM PUBLIKACÍ, KTERÉ PŘEDCHÁZEJÍ METODICE

DUŠKOVÁ, M.; KARPÍŠKOVÁ, R.; TRKOVSKÁ, A.; MĚCHÁČKOVÁ, P.; NECIDOVÁ, L. Antimikrobiální rezistence u laktobacilů izolovaných z potravin. [Antimicrobial resistance of lactobacilli isolated from food] In *XI. Konference mladých vědeckých pracovníků s mezinárodní účastí: Sborník*. Brno: Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, 2009, s. 4-6. ISBN 978-80-7305-068-9. (MSM 6215712402)

DUŠKOVÁ, M.; VÍŠKOVÁ, L.; KARPÍŠKOVÁ, R. Monitoring of antimicrobial resistance of lactobacilli isolated from food. In *25. Kongres ČSSM 2010 s mezinárodní účastí: "Mikroorganizmy a kvalita života", program a abstrakty, Stará Lesná, Vysoké Tatry*. Slovenská Republika: Československá spoločnosť mikrobiologická, 2010, s. 152. ISBN 970-80-970477-8-8. (MSM 6215712402)

DUŠKOVÁ, M.; VÍŠKOVÁ, L.; KARPÍŠKOVÁ, R. Testování citlivosti k antimikrobiálním látkám u laktobacilů mikrodiluční metodou. [Antimicrobial susceptibility testing of lactobacilli by broth microdilution method] In *Food Hygiene and Technology 40th Lenfeld's and Hökl's Days: Sborník přednášek a posterů*. Brno: Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, 2010, s. 94-97. ISBN 978-80-7305-121-1. (MSM 6215712402)

DUŠKOVÁ, M.; KARPÍŠKOVÁ, R. Antimicrobial resistance of lactobacilli isolated from food. *Czech Journal of Food Sciences*. 2013, vol. 31, no. 1, s. 27-32. ISSN 1212-1800. (MSM 6215712402)

LAČANIN, I.; DUŠKOVÁ, M.; KAMENIK, J.; KARPÍŠKOVÁ, R. Antibiotická resistance startovacích kultur. [Antimicrobial resistance of starter cultures] In *Hygiena Alimentorum XXXV „Bezpečnosť mäsa a mäsových výrobkov v duchu tradičnej kvality“: Zborník prednášok a posterov*). Slovenská republika: Univerita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach, Štátna veterinárna a potravinová správa Slovenskej republiky, Národný kontaktný bod pre vedeckú a technickú spoluprácu s EFSA, 2014, s. 126-129. ISBN 978-80-8077-401-1. (NAZV KUS QJ1230044, MZ IGA NT/14392-3)

DUŠKOVÁ, M.; KARPÍŠKOVÁ R. Rezistence laktobacilů izolovaných z mléčných výrobků k antimikrobiálním látkám. *Veterinářství*. 2015, vol. 65, no. 10, s. 790-794. (NAZV KUS QJ1510338, MEYS NPU program LO1218)

LAČANIN, I.; DUŠKOVÁ, M.; KAMENÍK, J.; KARPÍŠKOVÁ, R. Antimicrobial susceptibility of *Weissella* spp. isolated from cooked ham and manufacturing area. In *XVII. Konference mladých vědeckých pracovníků s mezinárodní účastí: Sborník příspěvků*. Brno: Veterinární a farmaceutická Univerzita Brno, 2015, s. 26-28. ISBN 978-80-7305-758-9. (NAZV KUS QJ1510338)

DUŠKOVÁ, M.; KARPÍŠKOVÁ, R. Antimicrobial resistance of lactobacilli isolated from dairy products. In *CESAR 2015: Programme and abstracts*. Croatia: Croatian Microbiological Society, 2015, s. 71. ISBN 978-953-7778-12-5. (NAZV KUS QJ 1510338)

VIII) Přílohy, dokumenty a doklady

Smlouva s uživatelem – MILCOM a.s.

Posudek odborníka v daném oboru – Doc. Ing. Milada Plocková, CSc., VŠCHT Praha

Posudek ze státní správy – Mgr. Lucie Pokludová, Ph.D., ÚSKVBL

Osvědčení odborného orgánu státní správy – ÚSKVBL

V Brně dne.....*1. 12. 2014*



Za zhotovitele: Doc. MVDr. Renáta Karpíšková, Ph.D.

Příloha č. 1: Skladba a koncentrace (µg/ml) antibiotik v mikrotitrační destičce pro testování citlivosti k antimikrobiálním látkám

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	AMP	STR	TET	ERY	CLI	VAN	CMP	KAN	KAN	GEN	GEN/CIP	CIP
A	16	256	64	8	8	32	32	2050	8	512	2	16
B	8	128	32	4	4	16	16	1024	4	256	1	8
C	4	64	16	2	2	8	8	512	2	128	0.5	4
D	2	32	8	1	1	4	4	256	1	64	0.25	2
E	1	16	4	0.5	0.5	2	2	128	0.5	32	0.125	1
F	0.5	8	2	0.25	0.25	1	1	64	PK	16	128	0.5
G	0.25	4	1	0.125	0.125	0.5	0.5	32	PK	8	64	0.25
H	0.125	2	0.5	0.063	0.063	0.25	0.25	16	NK	4	32	0.125

antibiotika: AMP (ampicilin); STR (streptomycin); TET (tetracyklin); ERY (erytromycin); CLI (klindamycin); VAN (vankomycin); CMP (chloramfenikol); KAN (kanamycin); GEN (gentamicin); CIP (ciprofloxacin)

pozn: pro EFM sadu (testace *Enterococcus faecium*) je vhodné sadu rozšířit o tylosin v rozsahu 2-4-8 ug/ml, a těmito koncentracemi nahradit AMP ve sloupci 1, řádku A, B, C.

Příloha č. 2: Rozmezí MIC referenčních kmenů dle ISO10932-IDF223

Hodnoty upraveny na základě výsledků testování kmenů zakoupených v LMG.

Šedé pole v tabulkách znázorňují rozmezí MIC pro jednotlivé referenční kmeny.

Tabulka rozmezí MIC (µg/ml) *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* LMG 6890

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	AMP	STR	TET	ERY	CLI	VAN	CMP	KAN	KAN	GEN	GEN/CIP	CIP
A	16	256	64	8	8	32	32	2050	8	512	2	16
B	8	128	32	4	4	16	16	1024	4	256	1	8
C	4	64	16	2	2	8	8	512	2	128	0.5	4
D	2	32	8	1	1	4	4	256	1	64	0.25	2
E	1	16	4	0.5	0.5	2	2	128	0.5	32	0.125	1
F	0.5	8	2	0.25	0.25	1	1	64	PK	16	128	0.5
G	0.25	4	1	0.125	0.125	0.5	0.5	32	PK	8	64	0.25
H	0.125	2	0.5	0.063	0.063	0.25	0.25	16	NK	4	32	0.125

Tabulka rozmezí MIC ($\mu\text{g/ml}$) *Lactobacillus paracasei* LMG 12586

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	AMP	STR	TET	ERY	CLI	VAN	CMP	KAN	KAN	GEN	GEN/CIP	CIP
A	16	256	64	8	8	>32*	32	2050	8	512	2	16
B	8	128	32	4	4	16	16	1024	4	256	1	8
C	4	64	16	2	2	8	8	512	2	128	0.5	4
D	2	32	8	1	1	4	4	256	1	64	0.25	2
E	1	16	4	0.5	0.5	2	2	128	0.5	32	0.125	1
F	0.5	8	2	0.25	0.25	1	1	64	PK	16	128	0.5
G	0.25	4	1	0.125	0.125	0.5	0.5	32	PK	8	64	0.25
H	0.125	2	0.5	0.063	0.063	0.25	0.25	16	NK	4	32	0.125

pozn:* VAN v ISO 10932-IDF223 neuvedeno

Tabulka rozmezí MIC ($\mu\text{g/ml}$) *Lactobacillus plantarum* LMG 6907

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	AMP	STR*	TET	ERY	CLI	VAN*	CMP	KAN*	KAN*	GEN*	GEN*/CIP	CIP
A	16	256	64	8	8	>32	32	2050	8	512	2	16
B	8	128	32	4	4	16	16	1024	4	256	1	8
C	4	64	16	2	2	8	8	512	2	128	0.5	4
D	2	32	8	1	1	4	4	256	1	64	0.25	2
E	1	16	4	0.5	0.5	2	2	128	0.5	32	0.125	1
F	0.5	8	2	0.25	0.25	1	1	64	PK	16	128	0.5
G	0.25	4	1	0.125	0.125	0.5	0.5	32	PK	8	64	0.25
H	0.125	2	0.5	0.063	0.063	0.25	0.25	16	NK	4	32	0.125

pozn:* STR, KAN, GEN, VAN v ISO 10932-IDF223 neuvedeno

Tabulka rozmezí MIC ($\mu\text{g/ml}$) *Bifidobacterium longum* LMG 13197

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	AMP	STR	TET	ERY	CLI	VAN	CMP	KAN	KAN	GEN	GEN/CIP	CIP
A	16	256	64	8	8	32	32	2050	8	512	2	16
B	8	128	32	4	4	16	16	1024	4	256	1	8
C	4	64	16	2	2	8	8	512	2	128	0.5	4
D	2	32	8	1	1	4	4	256	1	64	0.25	2
E	1	16	4	0.5	0.5	2	2	128	0.5	32	0.125	1
F	0.5	8	2	0.25	0.25	1	1	64	PK	16	128	0.5
G	0.25	4	1	0.125	0.125	0.5	0.5	32	PK	8	64	0.25
H	0.125	2	0.5	0.063	0.063	0.25	0.25	16	NK	4	32	0.125

Příloha č. 3: Mikrobiologické cut-off hodnoty (µg/ml)

Hodnoty cut-off s výjimkou hodnot pro ciprofloxacin byly převzaty z doporučení EFSA 2012 (Guidance on assessment of bacterial susceptibility to antimicrobials of human and veterinary importance).

	Ampicilin	Vankomycin	Gentamicin	Kanamycin	Streptomycin	Erytromycin	Klindamycin	Tetracyklin	Chloramfenkol	Ciprofloxacin**
<i>Lactobacillus</i> obligátně homofermentativní druhy (např. <i>L. delbrueckii</i>, <i>L. helveticus</i>)	1	2	16	16	16	1	1	4	4	4**
<i>Lactobacillus acidophilus</i> group	1	2	16	64	16	1	1	4	4	4**
<i>Lactobacillus</i> obligátně heterofermentativní druhy (např. <i>L. fermentum</i>)	2	n.r.	16	32	64	1	1	8	4	4**
<i>Lactobacillus reuteri</i>	2	n.r.	8	64	64	1	1	16	4	4**
<i>Lactobacillus</i> fakultativně heterofermentativní druhy *	4	n.r.	16	64	64	1	1	8	4	4**
<i>Lactobacillus plantarum/pentosus</i>	2	n.r.	16	64	n.r.	1	2	32	8	4**
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	4	n.r.	16	64	32	1	1	8	4	4**
<i>Lactobacillus casei/paracasei</i>	4	n.r.	32	64	64	1	1	4	4	4**
<i>Bifidobacterium</i> spp.	2	2	64	n.r.	128	1	1	8	4	
<i>Pediococcus</i> spp.	4	n.r.	16	64	64	1	1	8	4	16
<i>Leuconostoc</i> spp.	2	n.r.	16	16	64	1	1	8	4	
<i>Lactococcus lactis</i>	2	4	32	64	32	1	1	4	8	
<i>Streptococcus thermophilus</i>	2	4	32	64	64	2	2	4	4	
<i>Bacillus</i> spp.	n.r.	4	4	8	8	4	4	8	8	1
<i>Propionibacterium</i> spp.	2	4	64	64	64	0.5	0.25	2	2	
Ostatní Grampozitivní druhy	1	2	4	16	8	0.5	0.25	2	2	
<i>Enterococcus faecium</i>	2	4	32	1024	128	4	4	4	16	4

n.r. – not required (není vyžadováno)

*zahrnuje i homofermentativní druh *L. salivarius*

** hodnoty cut - off pro *Lactobacillus* spp. pro ciprofloxacin převzaty EUC (2003), u některých druhů *Lactobacillus* spp. je primární (přirozená) rezistence

Příloha č. 4: Testovaná kolekce kmenů ze sbírek LMG, CCM a CCD

Kmen	Počet
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> CCM 1877	1
<i>Lactobacillus casei</i> subsp. <i>casei</i> CCM 7089	1
<i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>longum</i> CCM 7826	1
<i>Lactobacillus plantarum</i> CCM 7039	1
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> LMG 06890	1
<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> LMG 12586	1
<i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>longum</i> LMG 13197	1
<i>Lactobacillus plantarum</i> subsp. <i>plantarum</i> LMG 06907	1
<i>Lactobacillus helveticus</i>	9
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	3
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> - Laktoflora®	2
<i>Lactobacillus fermentum</i> - Laktoflora®	1
<i>Lactobacillus plantarum</i> - Laktoflora®	2
<i>Lactobacillus acidophilus</i> - Laktoflora®	1
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> - Laktoflora®	3
<i>Lactobacillus animalis</i> - Laktoflora®	1
<i>Lactobacillus paracasei</i> - Laktoflora®	3
<i>Lactobacillus brevis</i> - Laktoflora®	1
<i>Lactobacillus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> - Laktoflora®	1
<i>Bacillus coagulans</i> - Laktoflora®	1
<i>Bifidobacterium animalis</i> - Laktoflora®	2
<i>Streptococcus thermophilus</i> - Laktoflora®	2
<i>Lactococcus lactis</i> - Laktoflora®	3
<i>Propionibacterium freudenreichii</i> subsp. <i>freudenreichii</i> - Laktoflora®	2
<i>Enterococcus faecium</i> - Laktoflora®	1

Celkem testováno: 42 izolátů BMK

Sbírková kolekce CCM 4, sbírková kolekce LMG 4 a sbírková kolekce Laktoflora® 38 izolátů.

CCM: Česká sbírka mikroorganismů; Brno, ČR – Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta, Ústav experimentální biologie

LMG: LMG/BCCM Belgian Coordinated Collections of Microorganisms; Ghent University, BE.

Laktoflora®: Milcom a.s., Ke Dvoru 12, Praha ČR



Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v.v.i.
Hudcova 296/70
621 00 Brno
Czech Republic
Tel.: +420 5 3333 1111; www.vri.cz; e-mail: vri@vri.cz