

# Određivanje ostataka makrolidnih antibiotika u uzrocima mišićnog tkiva životinja primjenom LC-MS/MS metode

---

Spahija, Marta

Master's thesis / Diplomski rad

2020

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:001778>

*Rights / Prava:* [Attribution-NoDerivatives 4.0 International/Imenovanje-Bez prerada 4.0 međunarodna](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-08-13**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

# DIPLOMSKI RAD

Zagreb, prosinac 2020.

Marta Spahija  
1333/MB

**ODREĐIVANJE OSTATAKA  
MAKROLIDNIH ANTIBIOTIKA  
U UZORCIMA MIŠIĆNOG  
TKIVA ŽIVOTINJA  
PRIMJENOM LC-MS/MS  
METODE**

Rad je izrađen u Laboratoriju za određivanje rezidua na Hrvatskom veterinarskom institutu u Zagrebu pod neposrednim voditeljstvom dr. sc. Ivane Varenine, znanstvene suradnice, i dr. sc. Nine Bilandžić, znanstvene savjetnice u trajnom zvanju, te pod mentorstvom prof. dr. sc. Blaženke Kos iz Laboratorija za tehnologiju antibiotika, enzima, probiotika i starter kultura Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Sveučilišta u Zagrebu.

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Zavod za biokemijsko inženjerstvo

Laboratorij za tehnologiju antibiotika, enzima, probiotika i starter kultura

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Biotehnologija

### ODREĐIVANJE OSTATAKA MAKROLIDNIH ANTIBIOTIKA U UZROCIMA MIŠIĆNOG TKIVA ŽIVOTINJA PRIMJENOM LC-MS/MS METODE

*Marta Spahija, 1333/MB*

**Sažetak:** Makrolidni antibiotici imaju važnu primjenu u stočarstvu i veterinarskoj medicini. Zbog neprikladne upotrebe antibiotika, može doći do pojavljivanja rezistentnih patogenih bakterija u intestinalnom traktu životinja koje se onda mogu prenijeti na ljude putem hrane, kontaminirane vode ili direktnim kontaktom sa životinjama. U ovom radu, ispitana je koncentracija sedamnaest makrolidnih antibiotika u 31 uzoraka mišića različitih životinja, primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti i masene spektrometrije. Od ukupno 21 analiziranog uzorka, samo su dva uzorka bila pozitivna na ostatke ispitivanih makrolidnih antibiotika. Jedan uzorak je bio pozitivan na ostatke antibiotika tildipirozina, dok je drugi bio pozitivan na ostatke antibiotika tilozina A. Detektirane koncentracije rezidua antibiotika u navedenim uzorcima nisu bile veće od najveće dopuštene količine (NDK) propisane uredbom Europske komisije (EC) br. 37/2010.

**Ključne riječi:** makrolidni antibiotici, antibiotička rezistencija, ostaci antibiotika, LC-MS/MS

**Rad sadrži:** 54 stranica, 18 slika, 17 tablica, 43 literaturnih navoda

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Rad je u tiskanom i elektroničnom (pdf format) obliku pohranjen u:** Knjižnica

Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb

**Mentor:** prof. dr. sc. Blaženka Kos

**Pomoć pri izradi:** dr. sc. Ivana Varenina, znan. sur. i dr. sc. Nina Bilandžić, znan. savj. u trajnom zvanju

**Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:**

1. prof. dr. sc. *Jagoda Šušković*
2. prof. dr. sc. *Blaženka Kos*
3. dr. sc. *Ivana Varenina*
4. prof. dr. sc. *Ksenija Durgo* (zamjena)

**Datum obrane:** 18. prosinca 2020.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

**University of Zagreb**

**Faculty of Food Technology and Biotechnology**

**Department of Biochemical Engineering**

**Laboratory for antibiotic, enzyme, probiotic and starter culture technology**

**Scientific area:** Biotechnical Sciences

**Scientific field:** Biotechnology

### **DETERMINATION OF MACROLIDE ANTIBIOTIC RESIDUES IN ANIMAL MUSCLE TISSUE SAMPLES USING THE LC-MS/MS METHOD**

*Marta Spahija, 1333/MB*

**Abstract:** Macrolide antibiotics have important applications in animal husbandry and veterinary medicine. Due to the inappropriate use of antibiotics, resistant pathogenic bacteria can appear in the intestines of animals, which can then be transmitted to humans through food, contaminated water or direct contact with animals. In this experiment, the concentration of seventeen macrolide antibiotics in muscle samples of different animals was examined, using high performance liquid chromatography and mass spectrometry. Out of a total of 21 analyzed samples, only two samples were positive for residues of the tested macrolide antibiotics. One sample was positive for tildipirosine residues, while the other was positive for tylosin A residues. The detected concentrations of antibiotic residues in these samples did not exceed the maximum residue levels (MRL) prescribed by the European Commission Regulation (EC) no. 37/2010.

**Keywords:** macrolide antibiotics, antibiotic resistance, antibiotic residues, LC-MS/MS

**Thesis contains:** 54 pages, 18 figures, 17 tables, 43 references

**Original in:** Croatian

**Graduate Thesis in printed and electronic (pdf format) version is deposited in:** Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb

**Mentor:** PhD Blaženka Kos, Full Professor

**Technical support and assistance:** PhD Ivana Varenina, research associate, and PhD Nina Bilandžić, scientific adviser having a tenure

**Reviewers:**

1. PhD. *Jagoda Šušković*, Full professor
2. PhD. *Blaženka Kos*, Full professor
3. PhD. *Ivana Varenina*
4. PhD. *Kesnija Durgo*, Associate professor (substitute)

**Thesis defended:** 18<sup>th</sup> December 2020

<b>Sadržaj</b>	<b>Stranica</b>
<b>1. UVOD</b>	<b>1</b>
<b>2. TEORIJSKI DIO</b>	<b>2</b>
2.1. ANTIBIOTICI	2
2.1.1. Povijest antibiotika	2
2.1.2. Makrolidni antibiotici	3
2.1.3. Antibakterijsko djelovanje makrolida	7
2.1.4. Antibiotici u stočarstvu	7
2.2. ANTIBIOTIČKA REZISTENCIJA	11
2.2.1. Bakterije s višestrukom rezistencijom na antibiotike	16
2.2.2. Mehanizmi rezistencije na makrolidne antibiotike	17
2.2.3. Enzimi koji inhibiraju antimikrobno djelovanje ili razgrađuju antibiotike	18
<b>3. EKSPERIMENTALNI DIO</b>	<b>20</b>
3.1. MATERIJALI	20
3.1.1. Kemikalije i standardi	20
3.1.2. Aparatura i pribor	21
3.2. METODE	21
3.2.1. Postupanje s uzorcima	21
3.2.2. Priprema otopina	21
3.2.3. Priprema standardnih otopina veterinarskih lijekova	22
3.2.4. Priprema internih standarda	24
3.2.5. Priprema standardne krivulje na otapalu i standarda za kontrolu stabilnosti sustava	25
3.2.6. Priprema matriks kalibracijske krivulje	26
3.2.7. Potupci kontrole kvalitete	26
3.2.8. Pročišćavanje uzoraka mišića	27
3.2.9. Mjerenje na LC-MS/MS uređaju	27
<b>4. REZULTATI I RASPRAVA</b>	<b>31</b>
4.1. Kvalitativna i kvantitativna procjena rezultata	31
4.1.1. Kvalitativna i kvantitativna procjena uzoraka analize - Dan I	32
4.1.2. Kvalitativna i kvantitativna procjena uzoraka analize - Dan II	35
4.1.3. Kvalitativna i kvantitativna procjena uzoraka analize - Dan III	41
<b>5. ZAKLJUČCI</b>	<b>48</b>





# 1. UVOD

Antibiotici su specifični proizvodi mikrobnog metabolizma koji imaju visoku fiziološku aktivnost prema određenim grupama mikroorganizama (bakterije, plijesni, protozoe, virusi) ili zloćudnih tumora, sprečavajući im rast ili uništavajući ih. Osim prirodnih, dobivenih mikrobnom biosintezom, postoje i polusintetski i sintetski antibiotici. (Šušković i sur., 2020a). Koriste se u veterinarskoj i humanoj medicini za liječenje bakterijskih infekcija (Phillips i sur., 2004). Kada se antibiotici učestalo uzimaju može doći do razvijanja otpornosti bakterija i rezistencije. Ponekad se antibiotici pogrešno uzimaju za liječenje virusnih respiratornih infekcija jer su slični početni simptomi kao kod bakterijskih infekcija (HZJZ, 2017). Postoje određene vrste rezistentnih mikroorganizama koji su razvili otpornost na antibiotike, te mogu kroz generacije postati dominantne kod nekog domaćinima. Učestala primjena antibiotika povećava vjerojatnost nastanka rezistentne bakterijske populacije. Međutim, određene bakterijske vrste lakše razvijaju rezistenciju nego druge (Phillips i sur., 2004).

Ljudi i životinje imaju raznoliku crijevnu mikrobiotu. Tijekom konzumacije hrane životinjskog podrijetla, može doći do kontaminacije crijevnog mikrobioma s rezistentnim mikrobima. Također, bakterije rezistentne na antibiotike nalaze se i u životinjskom izmetu, koje onda kroz vodu i zemlju mogu kontaminirati čak i ratarske kulture. Zbog svega navedenog je važno određivati ostatke antibiotika u hrani životinjskog podrijetla (McGlinchey i sur., 2008).

Makrolidni antibiotici upotrebljavaju se u stočarstvu i veterinarskoj medicini. Koriste se u velikim količinama za prevenciju bolesti, u slučajevima bolesti ili da bi se spriječili gubici u transportu životinja (McGlinchey i sur., 2008). Stoga je cilj ovog diplomskog rada bio praćenje rezidua makrolidnih antibiotika u uzorcima tkiva životinja kao namirnicama životinjskog podrijetla, primjenom tekućinske kromatografije u kombinaciji sa spektrometrijom masa. Rezultati dobiveni u ispitivanim uzorcima su uspoređeni s rezultatima dobivenim u uzorcima obogaćenim određenim poznatim koncentracijama makrolidnih antibiotika.

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. ANTIBIOTICI

Antibiotici su specifični proizvodi mikrobnog metabolizma koji imaju visoku fiziološku aktivnost prema određenim grupama mikroorganizama (bakterije, plijesni, protozoe, virusi) ili zloćudnih tumora, sprečavajući im rast ili uništavajući ih. Osim prirodnih, dobivenih mikrobnom biosintezom, postoje i polusintetski i sintetski antibiotici. (Šušković i sur. 2020a). Antibiotici su antimikrobni lijekovi koji mogu imati antibakterijski, antivirusni, antifungalni i antiparazitski učinak (ECDC, 2008). Prvenstveno djeluju protiv bakterijskih infekcija i dijele se ovisno o tome induciraju li smrt osjetljivih bakterija (baktericidno djelovanje) ili inhibiraju njihov rast (bakteriostatsko djelovanje) (Kohanski i sur., 2010; Davies i Davies, 2010; ECDC, 2008). Antibiotici induciraju smrt bakterijske stanice stvaranjem dvolančanih lomova u DNA, zaustavljanjem sinteze RNA, spriječavanjem sinteze stanične stijenke ili inhibiranjem sinteze proteina. Letalne koncentracije antibiotika rezultiraju nastankom hidroksilnih radikala što uzrokuje promjene u metabolizmu bakterija (Kohanski i sur., 2010). Antibiotici mogu djelovati i antiviralno, antitumorski ili antikancerogeno, te se koriste čak u terapiji kardiovaskularnih bolesti ili kao imunosupresijska sredstva (Davies i Davies, 2010). Antibiotici su promijenili povijest medicine i omogućili liječenje infekcija koje su prije bile letalne. Također, profilaktička upotreba antimikrobnih lijekova omogućilo je provođenje operacija koje bi inače imale visoku stopu smrtnosti (Aarestrup, 2015).

#### 2.1.1. Povijest antibiotika

Upotreba antibiotika započelo je otkrićem penicilina 1928. godine. Antibiotici su se počeli koristiti za ozbiljne infekcije 1940-ih (Ventola, 2015). Prvi put su korišteni u životinje za vrijeme Drugog svjetskog rata kada se penicilin proizvodio u velikim količinama (Van i sur., 2020). Rezistencija na penicilin G je postala problem te je otkriće ostalih  $\beta$ -laktamskih antibiotika bilo rješenje. Međutim, u istom desetljeću, pojavio se meticilin-rezistentan *Staphylococcus aureus* (MRSA) (Ventola, 2015). Također, 1944. godine, za vrijeme Bijele kuge, razvio se mutirani soj *Mycobacterium tuberculosis* koji je bio rezistentan na streptomycin (Davies i Davies, 2010). Ostali otkriveni prirodni antibiotici su doživjeli sličnu

sudbinu i razvila se rezistencija na većinu od njih (Petković i sur. 2017, Ventola, 2015; Davies i Davies, 2010). 1950-ih godina je ustanovljeno da se geni odgovorni za rezistenciju mogu prenositi između bakterija konjugacijom i uslijed toga pridonijeti širenju rezistencije (Davies i Davies, 2010). Kasnih 1960.-tih i ranih 1980.-tih godina uvedeni su novi, tzv. polusintetski antibiotici kako bi se riješio problem antibiotske rezistencije. Međutim, sve je manje novih antibiotika i bakterijske infekcije izazvane rezistentnim patogenima su postale prijetnja u moderno doba (Ventola, 2015).

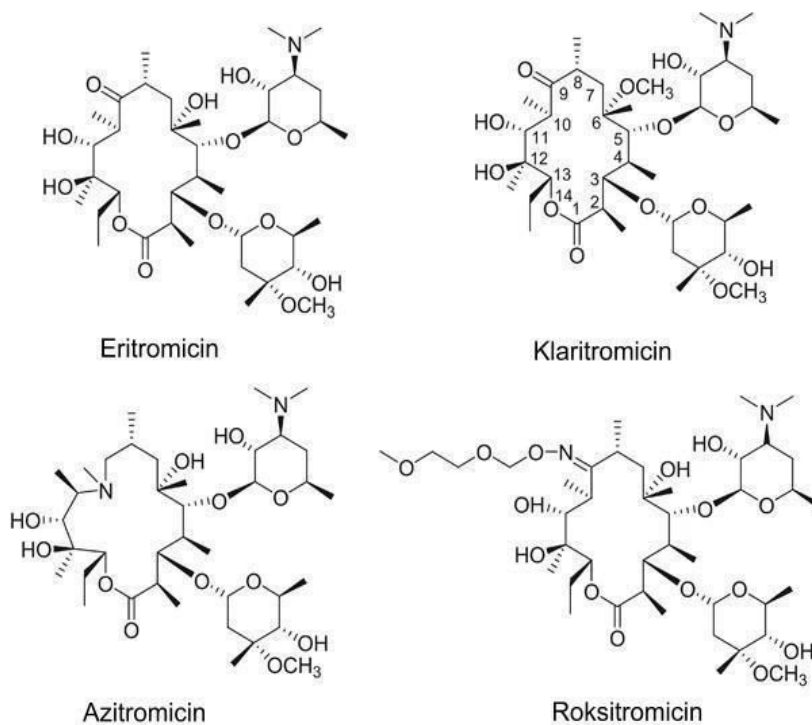
### 2.1.2. Makrolidni antibiotici

Makrolidni antibiotici su lipofilni spojevi koji su proizvedeni s pomoću aktinomiceta i mikromonospora (Lan i sur., 2019). Otkriće makrolida uslijedilo je nakon otkrića  $\beta$ -laktamskih i aminoglikozidnih antibiotika, kao treće najveće skupine antimikrobnih proizvoda sekundarnog mikrobnog metabolizma (Golkar i sur., 2018). Glavni su predstavnici eritromicin i njegovi analozi, kao što su roksitromicin, klaritromicin i azitromicin (Fernandes i sur., 2017). Azitromicin je makrolidni antibiotik kojeg je originalno razvila i patentirala grupa znanstvenika tvrtke PLIVA (autori patenta: Slobodan Đokić, Gabrijela Kobrehel, Gorjana Radobolja-Lazarevski i Zrinka Tamburašev) (Šušković i sur., 2020b).

Poliketid sintaze, prisutne u vrstama *Streptomyces*, sintetiziraju makrolidne antibiotike i odgovorni su za njihovu modularnu prirodu. Procjenjuje se da se u prirodi nalazi više od 2000 različitih makrolida (Golkar i sur., 2018). Makrolidi se dijele u skupine ovisno o tome jesu li sastavljeni od 12-, 14-, 16- ili 18-članih makrocikličnih laktonskih prstena. Na laktonskom prstenu povezani su jedan ili više deoksi šećera glikozidnim vezama (Park i Yoon, 2019). Azitromicin je građen od petnaesteročlanog makrocikličnog prstena, dok su roksitromicin i klaritromicin građeni od četrnaesteročlanog makrocikličnog prstena (Slika 1) (Fernandes i sur., 2017). Makrolidi su nestabilni u kiselinama što sprječava njihovu oralnu upotrebu. Zbog potrebe poboljšanja farmakokinetičkih svojstava, razvijaju se nove generacije polusintetskih makrolida (Golkar i sur., 2018). U veterinarskoj praksi, najčešće se upotrebljava grupa od šestnaesteročlanih makrolidnih antibiotika, među kojima je tilozin glavni. Eritromicin i njegovi analozi upotrebljavaju se za liječenje genitalnih, respiratornih i kožnih infekcija. Pozitivne strane makrolidnih antibiotika su njihova značajna intracelularna koncentracija, visoke koncentracije u tekućinama i tkivima (npr. tekućina sluznice pluća i plućnog epitela), djelovanje prema Gram-pozitivnim, ali ne i prema Gram-negativnim

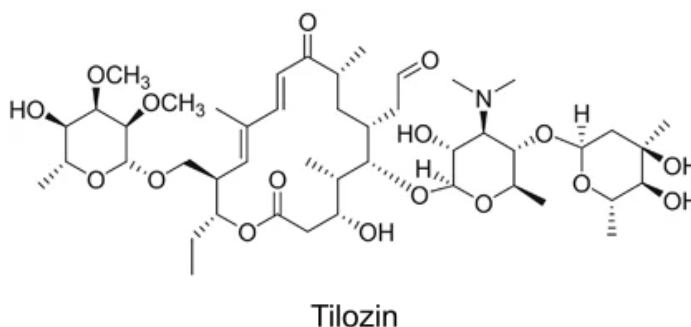
anaerobnim bakterijama (što je važno zbog zaštitne funkcije u crijevima), te općenito dobra tolerancija i sigurnost. Makrolidi djeluju i protuupalno te smanjuju bolove na mjestima infekcije što je uzrokovano oslobađanjem citokina (Fernandes i sur., 2017). Većina makrolidnih antibiotika inhibiraju sintezu proteina tako što interferiraju s elongacijom polipeptida (Park i Yoon, 2019). Makrolidi djeluju na intracelularne bakterije (vrste *Chlamydia* i *Rickettsia*), Gram-pozitivne koke (uglavnom stafilokoke i streptokoke) i Gram-negativne koke. Uz neke iznimke, Gram-negativni bacili uglavnom su rezistentni (Leclercq, 2002).

Mikroorganizam producent eritromicina je bakterija *Saccharopolyspora erythraea*, te je prvi put izoliran 1949. godine (Golkar i sur., 2018; Fernandes i sur., 2017). Njegova klinička upotreba je započela 1952. godine (Golkar i sur., 2018). Njegov makrociklični prsten nije stabilan u kiselini. Zbog toga, u želucu dolazi do konverzije eritromicina u anhidro-eritromicin i gubitka antibakterijske aktivnosti (Fernandes i sur., 2017). Eritromicin efikasno djeluje protiv patogenih Gram-pozitivnih bakterija, te se često daje za tretiranje infekcija izazvanih bakterijom *Staphylococcus aureus*. Također, može se koristiti kao zamjena za pacijente koji su alergični na penicilin i ostale  $\beta$ -laktamske antibiotike (Park i Yoon, 2019). Zbog nedostataka eritromicina, razvijeni su makrolidni antibiotici druge generacije, kao što su azitromicin, klaritromicin i roksitromicin, koji su stabilni u kiselinama (Park i Yoon, 2019; Fernandes i sur., 2017). U 2015. godini, razina rezistencije na ova četiri makrolidna antibiotika, dosegla je 48% u SAD-u i preko 70% u Aziji (Fernandes i sur., 2017).



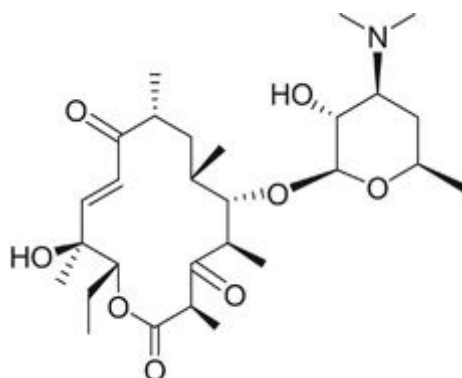
**Slika 1.** Kemijske strukture eritromicina, klaritromicina, azitromicina i roksitromicina (Prilagođeno prema Fernandes i sur., 2017)

Šestnaesteročlani makrolidni antibiotici kao što je tilozin imaju slabije djelovanje nego eritromicin, vjerojatno uslijed otežanog prolaska kroz bakterijske membrane (Slika 2). Međutim, efikasno djeluju protiv bakterija koje su rezistentne na četrnaesteročlane makrolidne antibiotike. Ovi makrolidi sadrže kompleksne bočne lance šećera. Tilozin, rokitamicin i mideamicin, upotrebljavaju se za terapiju ljudskih i veterinarskih infekcija. Metabolizmom bočnih lanaca šećera nastaju spojevi sa smanjenom aktivnosti, zbog čega šestnaesteročlani makrolidi djeluju manje efikasno *in vivo* nego četrnaesteročlani i petnaesteročlani makrolidi.

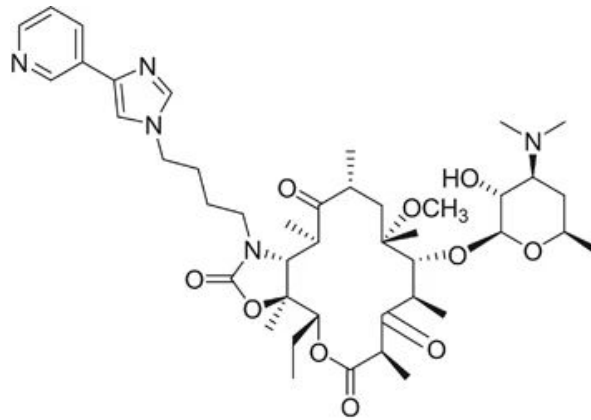


**Slika 2.** Kemijska struktura tilozina (Prilagođeno prema Fernandes i sur., 2017)

Pikromicin je četrnaesteročlani makrolidni antibiotik kojemu nedostaje kladinozni šećer (Slika 3). Prvi je identificirani makrolidni antibiotik, ali zbog niske aktivnosti, fokus razvoja novih makrolida usredotočeno je na eritromicin. Farmaceutska kompanija Aventis, dizajnirala je telitromicin (Fernandes i sur., 2017). Telitromicin pripada trećoj generaciji makrolidnih antibiotika koji se nazivaju ketolidima (Slika 4) (NCBI, 2020; Park i Yoon, 2019). Interferira sa sintezom proteina u bakterijama, tako što se veže istovremeno na dva mjesta na ribosomu, za razliku od starijih makrolida koji se vežu samo na jedno mjesto (NCBI, 2020; Fernandes i sur., 2017). Pretpostavlja se da je zbog toga telitromicin djelotvoran protiv sojeva koji su rezistentni na makrolide. Telitromicin se koristi u terapiji infekcija gornjih i donjih dišnih puteva. Plasiran je na tržište pod imenom Ketek, zbog prisutnosti keto skupine u molekuli. Međutim, pojavile su se nepoželjne nuspojave kao što je sinkopa, reverzibilni poremećaj vida i zatajenje jetre. Zbog toga, telitromicin više nije u širokoj upotrebi (Fernandes i sur., 2017).



**Slika 3.** Kemijska struktura četrnaesterčlanog pikromicina, prvog identificiranog makrolida (Prilagođeno prema Fernandes i sur., 2017)



**Slika 4.** Kemijska struktura telitromicina (Ketek), prvog ketolida (Prilagođeno prema Fernandes i sur., 2017)

Mijenjanje poliketid sintaze pomoću proteinskog inženjerstva, predstavlja novi pristup u razvijanju novih makrolida s poboljšanim antibiotskim svojstvima. Drugi takav pristup je potpuna sinteza makrolida *de novo* kao što je slaganje kockica. Na taj način, mogu se sintetizirati kemijski različiti makrolidi. *Macrolide Pharmaceuticals* trenutno upotrebljava ovakvu tehnologiju za razvoj novih antibiotika (Golkar i sur., 2018).

### 2.1.3. Antibakterijsko djelovanje makrolida

Istraživanja su pokazala da eritromicin djeluje na sintezu proteina uslijed vezanja na ribosom. Kroz ostala istraživanja, vidjelo se da makrolidi ulaze u interakciju s 50S podjedinicom ribosoma. Makrolidi blokiraju izlazak polipeptida kroz tunel velike ribosomalne podjedinice, tako što se vežu u izlazni tunel koji je pored centra peptidil transferaze. Blokada izlaska elongirajućeg peptida uzrokuje bakteriostatski ili baktericidni efekt ovisno o makrolidu. Neki streptogramini B klase i linkozamidi također se mogu vezati na istome mjestu u ribosomu. Neki makrolidi se ne vežu na bakterijski ribosom, kao što je osamnaesteročlani makrolid, fidaksomicin, koji inhibira RNA polimerazu (Golkar i sur., 2018).

### 2.1.4. Antibiotici u stočarstvu

Većina bolesti koje uzrokuju mikrobi u hrani uglavnom potječu od mlijeka i mesa. (Pérez-Rodríguez i Mercanoglu Taban, 2019). Više je antibiotika upotrebljeno u stočarstvu nego u ljudskoj medicini (Van i sur., 2020). Za stoku, svinje i peradi, upotrebljavaju se 12

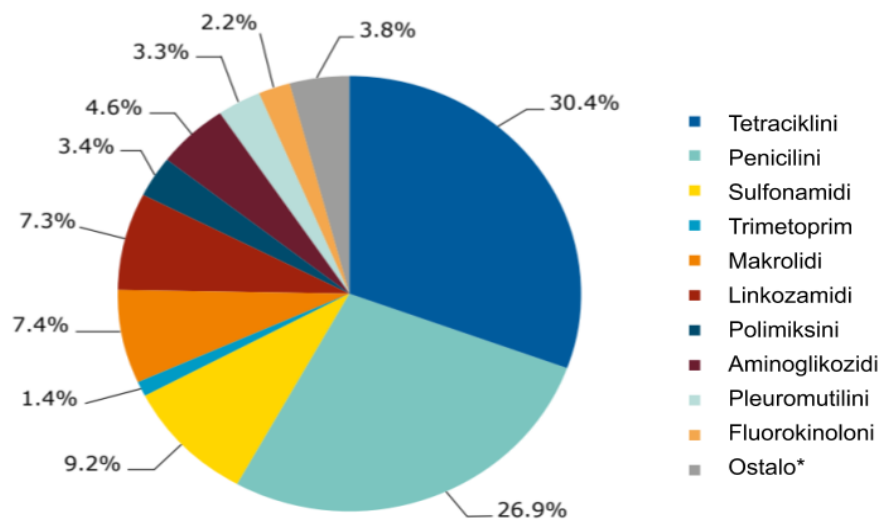
skupina antimikrobnih lijekova; to su: arsenici, glikolipidi, polipeptidi, streptogramini, kinoksalini, beta-laktami, tetraciklini, elfamicini, makrolidi, linkozamidi, polieteri i sulfonamidi. Neki antibiotici koji se koriste za liječenje životinja, koriste se i kod ljudi, kao što su tetraciklini, sulfonamidi i penicilini (Landers i sur., 2012). Antibiotici se koriste za tretiranje bolesti životinja, profilaktički i metafilaktički, u svrhu sprječavanja zoonoze koje se mogu prenijeti sa životinje na ljude ili za poticanje rasta životinja (Van i sur., 2020; Aarestrup, 2015; Landers i sur., 2012). Profilaktička upotreba podrazumijeva davanje antibiotika zdravim životinjama u svrhu sprječavanja bolesti. Antibiotici koji se daju u metafilaktičke svrhe, daju se zdravim životinjama koje pripadaju istom stadu ili dijele prostor sa oboljelim životinjama. Na taj način smanjuje se trajanje terapije (Aarestrup, 2015). Sve je češća upotreba antibiotika za neterapeutske svrhe kao što je poticanje rasta životinja, što uključuje kontinuirano dodavanje antibiotika u hranu za životinje (Van i sur., 2020; Aarestrup, 2015). Pozitivno djelovanje antibiotika na rast, potječe od 1940-ih godina kada su davali svinjama razne životinjske nusproizvode kako bi nadoknadili nedostatke u hrani koje su uzrokovale smanjen rast i reproduktivne probleme. Dodatni primjer je dodavanje otpadne proizvode iz proizvodnje tetraciklina u hranu za kokoši, što je imalo efekt poticanja rasta zbog prisutnost tetraciklina (Aarestrup, 2015). Europa i SAD zabranjuju upotrebu antibiotika za takve svrhe, iako su zapravo SAD i većina Europskih zemalja glavni korisnici antibiotika u stočarstvu. Međutim, antibiotici se daju u višim dozama za profilaktičke i metafilaktičke svrhe nego za poticanje rasta (Van i sur., 2020). Procjenjuje se da se u većini razvijenih zemalja, koristi 50-80 % proizvedenih antibiotika za stoku. Upotreba antibiotika bi trebala porasti za 67 % do 2030. godine (Van i sur., 2020). Makrolidni antibiotici koriste se za tretiranje bolesti životinja namijenjenih za hranu. Također, često je nejasno za što se točno upotrebljavaju antibiotici. Na primjer, u SAD-u, 16 % krava koje doje dobivaju antibiotike protiv mastitisa svake godine. Međutim, većina krava profilaktički dobiva intramamarnu infuziju antibiotika u preventivne svrhe. Za takve preventivne svrhe uglavnom se koriste penicilini, cefalosporini ili drugi beta-laktamski antibiotici. Isto tako, 15 % goveđe teladi dobivaju antibiotike za respiratorne bolesti, ali 10 % teladi profilaktički dobiva terapiju kako bi se spriječio nastanak bolesti. Također, 88 % svinja u SAD-u hranjeni su najčešće tetraciklinima ili tilozinom, u svrhu poticanje rasta i prevencije bolesti (Landers i sur., 2012). Penicilin, oksitetraciklin, bacitracin, aureomicin i streptomycin su među prvim antibioticima koji su pokazali djelovanje na povećanje rasta mladih ptica (Van i sur., 2020). Antibiotici daju se kao dodatak hrani, uglavnom stoci, svinjama i peradi. Međutim, ne dodaju se hrani u manje razvijenim zemljama jer se stoka i ovce hrane uglavnom na pašnjacima (Angulo i sur.,



2005). Pretjerano korištenje antimikrobnih lijekova u hrani za životinje može uzrokovati nastanak multi-rezistentnih patogena. Hrana koja se dobiva od tih životinja može onda služiti kao način prijenosa gena odgovornih za rezistenciju na antibiotike (Pérez-Rodríguez i Mercanoglu Taban, 2019).

Nisu poznate točne doze i učestalost korištenja antibiotika u stočarstvu. Također, nije poznato što je točno terapeuska svrha, a što neterapeuska svrha korištenja antibiotika (Landers i sur., 2012). Pozitivni efekti koji podupiru korištenje antimikrobnih lijekova u stočarstvu su: reduciranje bolesti, dobrobit životinja, pozitivno djelovanje na ekonomiju, povećana proizvodnja hrane i jeftinija hrana. Negativni efekti korištenja antimikrobnih lijekova su: povećana rezistencija u bakterijama, povećana kolonizacija bakterijama, povećana dugotrajna rezistencija na određenoj farmi i povećana rezistencija u patogenima (Aarestrup, 2015).

Prema Europskoj agenciji za lijekove (EMA), u svih 31 zemalja Europske unije 2017. godine, 66,5 % ukupne prodaje antimikrobnih lijekova uključivalo je tetracikline, peniciline i sulfonamide. Za razliku od 1,9 % za amfenikole, 0,1 % prodaje cefalosporina prve i druge generacije, 0,2 % za cefalosporine treće i četvrte generacije, i 0,4 % za ostale kinolone (Slika 5). Prema Europskoj bazi podataka za prodaju veterinarskih antimikrobnih tvari, mogu se vidjeti podaci ukupne prodaje antimikrobnih lijekova prikazano kao tone aktivnog sastojka (Tablica 1). Podaci su normalizirani pomoću jedinice za korekciju populacije (PCU - *Population Correction Unit*) i izraženi su u miligramima aktivnog sastojka po PCU (mg/PCU). Na ovaj način, uzima se u obzir veličina i struktura životinjske populacije u svakoj zemlji, što je važno s obzirom da se uspoređuju podaci iz različitih država i godina (European Medicines Agency, 2019).



**Slika 5.** Prodaja antimikrobnih tvari prikazani u obliku postotka antimikrobnih klasa od cjelokupne prodaje za životinjske vrste koje proizvode hranu, u mg/PCU, objedinjeno 31 Europskih zemalja, za 2017. godinu (Prilagođeno prema European Medicines Agency, 2019)

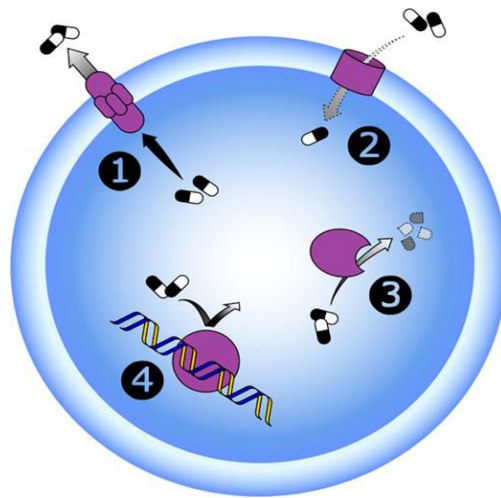
**Tablica 1.** Prodaja, u tonama aktivnog sastojka, veterinarskih antimikrobnih tvari namijenjenih uglavnom za životinje koje proizvode hranu (uključujući konje), jedinica korekcije populacije (PCU) i prodaja u mg/PCU, prikazano po zemljama, za 2016. i 2017.g. (prilagođeno prema European Medicines Agency, 2019)

Zemlja	Prodaja (u tonama) za životinje za hranu		PCU (1000 tona)		% promjene PCU	mg/PCU		% promjene mg/PCU
	2016	2017	2016	2017	2016-2017	2016	2017	2016-2017
Austrija	44.1	44.6	957	954	-0.3%	46.1	46.8	1.5%
Belgija	240.4	221.0	1,715	1,683	-1.9%	140.1	131.3	-6.3%
Bulgarija	61.1	49.6	393	382	-2.9%	155.3	129.8	-16.4%
Hrvatska	26.6	21.1	302	296	-2.2%	87.9	71.5	-18.7%
Kipar	46.3	45.4	102	107	5.1%	453.4	423.1	-6.7%
Češka	43.2	44.1	705	693	-1.7%	61.2	63.6	3.9%
Danska	98.7	94.4	2,420	2,398	-0.9%	40.8	39.4	-3.5%
Estonija	7.2	6.3	113	111	-1.7%	64	56.7	-11.5%
Finska	9.7	9.8	521	507	-2.5%	18.6	19.3	4.1%
Francuska	513.9	482.9	7,217	7,097	-1.7%	71.2	68	-4.4%
Njemačka	779.2	766.6	8,734	8,609	-1.4%	89.2	89	-0.2%
Grčka	79.9	116.7	1,261	1,245	-1.2%	63.4	93.7	47.9%
Mađarska	155.6	147.2	832	771	-7.3%	187.1	191	2.1%
Island	0.6	0.6	120	125	4.1%	4.7	4.6	-1.9%
Irska	102.3	98.5	1,963	2,114	7.7%	52.1	46.6	-10.6%
Italija	1,213.2	1,057.8	4,116	3,864	-6.1%	294.8	273.8	-7.1%
Letonija	5.4	5.9	180	176	-2.0%	29.9	33.3	11.4%
Litva	12.7	11.6	338	333	-1.5%	37.7	34.8	-7.7%
Luksemburg	1.9	1.9	55	55	0.1%	35.5	35	-1.5%
Malta		1.8		15			121	
Nizozemska	181.7	188.0	3,446	3,341	-3.0%	52.7	56.3	6.7%
Norveška	5.6	5.7	1,896	1,861	-1.9%	2.9	3.1	5.4%
Poljska	570.2	749.6	4,443	4,574	3.0%	128.3	163.9	27.7%
Portugal	210.9	135.1	1,014	1,007	-0.7%	208	134.1	-35.5%
Rumunjska	265.4	262.9	3,116	2,916	-6.4%	85.2	90.1	5.8%
Slovačka	12.2	13.9	243	225	-7.3%	50.2	61.8	23.1%
Slovenija	5.4	6.7	178	184	3.2%	30.3	36.5	20.5%
Španjolska	2,724.9	1,769.5	7,518	7,684	2.2%	362.5	230.3	-36.5%
Švedska	9.8	9.5	805	804	-0.1%	12.1	11.8	-2.9%
Švicarska	37.6	31.9	806	796	-1.2%	46.6	40.1	-14.0%

## 2.2. ANTIBIOTIČKA REZISTENCIJA

Antibiotička rezistencija je sposobnost bakterija da izbjegnu djelovanje antibiotika (ECDC, 2008). Prekomjerno korištenje antibiotika jedan je od uzroka razvoja rezistencije bakterija na antibiotike. Antibiotici se propisuju više nego što je potrebno pacijentima diljem svijeta (Ventola, 2015). Otpornost bakterija na antibiotike obuhvaća više različitih mehanizama koji se mogu svrstati u četiri glavne grupe: a) smanjenje intracelularne koncentracije antibiotika zbog promjene permeabilnosti vanjske membrane i/ili učinkovitih “*efflux*” mehanizama; b) modifikacija ciljnog mjesta djelovanja antibiotika zbog genetičke

mutacije ili post-translacijske modifikacije ciljnog mjesta djelovanja; c) inaktivacija antibiotika uzrokovana enzimskom modifikacijom antibiotika i d) mijenjanje inhibiranog metaboličkog puta (Džidić i sur., 2008). Glavni mehanizmi antibiotske rezistencije prikazani su na Slici 6. Različite kombinacije ovih mehanizama mogu biti prisutne u bakteriji, što onda dovodi do rezistencije na više antibiotika odjednom. Bakterije mogu razviti rezistenciju vertikalnom (endogeno) ili horizontalnom (egzogeno) evolucijom. Kod vertikalne evolucije, dolazi do spontane mutacije u bakterijskom genomu što se onda odražava pojavom rezistencije na određeni antibiotik. Takva mutacija prenosi se na potomstvo bakterije (Laws i sur., 2019). Terapija antibioticima izlaže bakterije selektivnom pritisku, nastaju spontane mutacije i takvi mutirani patogeni zbog nastale rezistencije preživljavaju i nadvladaju u populaciji što produljuje trajanje bolesti ili smrt. Za razliku od osjetljivih bakterija koje ugibaju (Laws, i sur. 2019; ECDC, 2008). Tijekom daljnje terapije dolazi do dodatnih mutacija koje postepeno povećavaju razinu rezistencije. Kod horizontalne evolucije, dolazi do prijenosa gena odgovornog za rezistenciju iz rezistentne bakterije u drugu bakteriju koja je osjetljiva na antibiotike. DNA između bakterija, prenosi se transformacijom, konjugacijom ili transdukcijom (Laws, i sur. 2019). Prenose se razni pokretni elementi DNA kao što su plazmidi, transpozoni, integroni ili genomski otoci (Aarestrup, 2015). Prijenos pokretnih elemenata DNA predstavlja veliki problem ako gene odgovorne za rezistenciju primi opasan bakterijski soj koji uzrokuje tešku infekciju (Laws, i sur. 2019; Aarestrup, 2015). Geni odgovorni za rezistenciju najčešće su vezani geni i nalaze se na transpozonima (Van i sur., 2020; Laws, i sur. 2019). Transpozoni su DNA sekvence koje se mogu prebacivati iz jednog dijela genoma u drugi što onda olakšava prijenos gena između bakterija (Laws, i sur. 2019; Pray, 2018). Neki transpozoni sadrže integrone koje mogu sadržavati više gena, stoga bakterija može postati rezistentna na razne antibiotike (Laws, i sur. 2019).



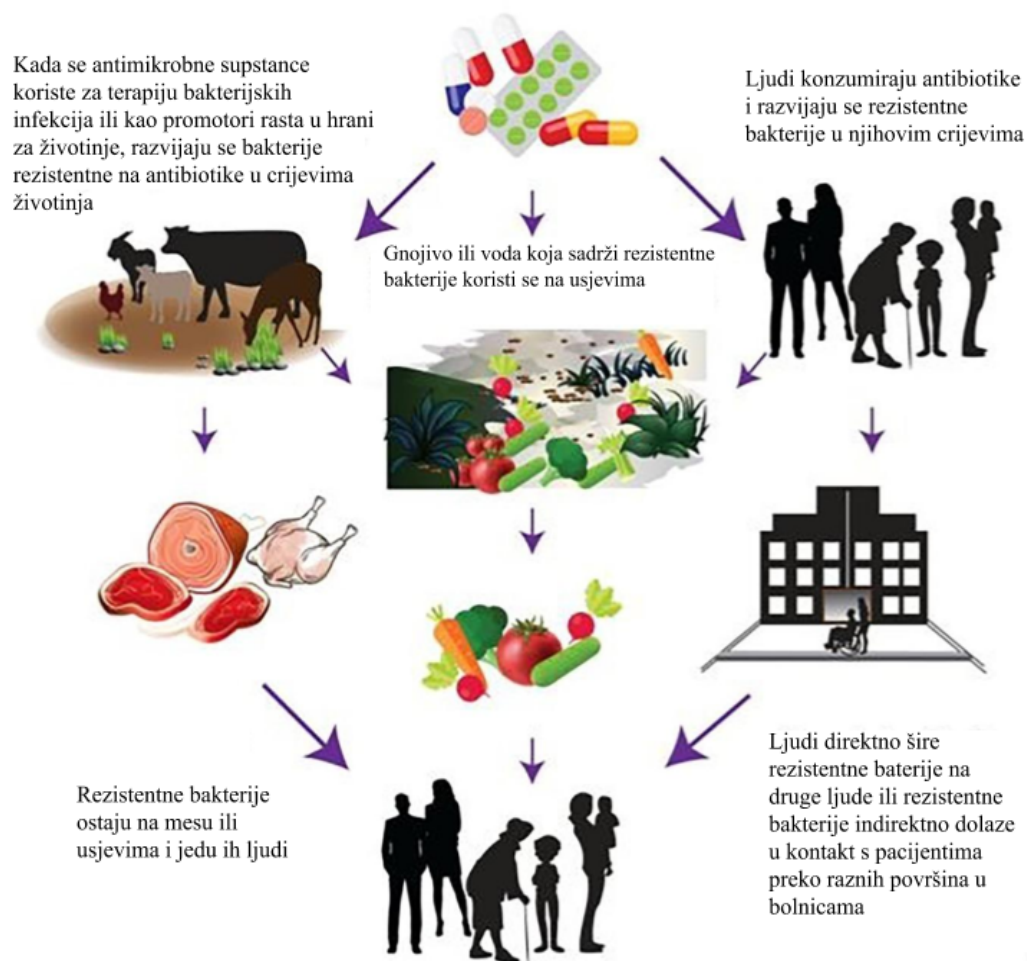
**Slika 6.** Mehanizmi rezistencije bakterija na antibiotike. 1) Izbacivanje antibiotika izvan stanice; 2) ograničavanje unosa antibiotika; 3) modifikacija ili degradacija lijeka; 4) modifikacija ciljnog mjesta djelovanja antibiotika. (Laws, i sur. 2019).

Zbog pretjeranog korištenja ili zloupotrebe antimikrobnih lijekova, dolazi do pojavljivanja rezistentnih patogenih bakterija u crijevu životinja (Makovec i sur. 2014). Kada se nepotrebnim antibiotikom daje životinji, može doći do pojavljivanja rezistentnih bakterija koje se mogu prenijeti na ljudske osobe putem hrane, kontaminirane vode ili direktnim kontaktom sa životinjama, što onda uzrokuje rezistentnu infekciju i smanjuje terapijske mogućnosti (Pérez-Rodríguez i Mercanoglu Taban, 2019; Tang i sur., 2017). Problem rezistencije veći je u siromašnim zemljama nego u zemljama prvog svijeta, u kojima se upotrebljavaju i druge terapije umjesto antibiotika (Laws i sur., 2019). Međunarodna putovanja i trgovina hranom životinjskog porijekla utječe na globalnu rezistenciju, zato što dolazi do širenja rezistentnih bakterijskih sojeva iz regija gdje vlada visoka rezistencija (Laws i sur., 2019; Aarestrup, 2015). Zbog toga, potrebna je regulacija i globalna kontrola rezistencije. Istraživanja su pokazala da geni koji su potencijalno odgovorni za rezistenciju potječu iz različitih okoliša (Aarestrup, 2015). Antibiotička profilaksa također može služiti kao vektor poticanja rezistencije. Davanje antibiotika prije operacije ili kemoterapije postati će ugroženo ako se nastavi širiti antimikrobna rezistencija (Laws, i sur. 2019). Životni vijek novih antimikrobnih lijekova doživljava samo 10 do 20 godina zbog problema razvoja rezistencije (Aarestrup, 2015).

Nepažljiva upotreba antibiotika uglavnom je posljedica konzumacije hrane (Lan i sur., 2019). Široka upotreba antibiotika u stočarstvu predstavlja problem jer smanjuje efikasnost djelovanja antibiotika, povećava medicinske troškove, morbiditet i smrtnost ljudi. Antibiotici

koji se daju u svrhu poticanja rasta, daju se u manjim količinama nego u terapeutske svrhe. Na ovaj način, bakterije se izlažu subletalnim dozama antibiotika što stvara selektivni pritisak i preživljavaju bakterije koje su razvile rezistenciju (Van i sur., 2020).

Hrana nije sterilna i može lako doći do kontaminacije antibioticima tijekom prijenosa niz hranidbenog lanca. Uz hranu životinjskog porijekla, može doći do kontaminacije usjeva s vodom koja je kontaminirana fekalijama (Slika 7) (Pérez-Rodríguez i Mercanoglu Taban, 2019). Inače se antibiotici daju životinjama oralnim putem, te je mikrobiom u crijevu direktno izložen njihovom djelovanju, za razliku od ljudske medicine gdje se često daju parenteralno (Aarestrup, 2015). Patogeni često nisu prisutni u hrani, te najveći problem predstavljaju nepatogeni mikroorganizmi koji mogu prenositi gene odgovorne za rezistenciju na druge mikroorganizme. Takvi geni mogu se prenositi između različitih bakterija u životinjama. Zatim, iz tih bakterija prenose se na bakterije u hrani i u ljude putem horizontalnog prijenosa gena. Prijenos gena odgovornih za rezistenciju može se događati i preko djelomično inaktiviranih stanica i stanica pod stresom. Sve veća upotreba biocida u proizvodnji hrane, te okolišni i procesni uvjeti, također mogu uzrokovati pojavu rezistencije na lijekove. Pokazalo se da subletalni uvjeti koje uzrokuju tehnologije za očuvanje hrane, mogu uzrokovati horizontalni prijenos plazmida koje sadrže gene odgovorne za rezistenciju. Čak i kod potpune eliminacije bakterija, svejedno može doći do transformacije mikroorganizama s DNA koji se oslobodio iz liziranih stanica. Također, fizički stres, koji se javlja zbog upotrebe tehnologije za konzerviranje, može potaknuti patogene da se prilagode na stresne uvjete, te tako dolazi do ekspresije gena odgovornih za rezistenciju. Ovisno o tipu subletalnog stresa (termalni, kiseli ili slani), postoji razlika u nastaloj rezistenciji. Na primjer, visoke temperature mogu smanjiti pojavu rezistencije, dok povećane koncentracije soli ili niski pH mogu povećati rezistenciju (Pérez-Rodríguez i Mercanoglu Taban, 2019).



**Slika 7.** Širenje antibiotske rezistencije putem hrane (Prilagođeno prema Pérez-Rodríguez i Mercanoglu Taban, 2019).

Savjetodavna grupa za integrirano praćenje antimikrobne rezistencije SZO (*WHO Advisory Group on Integrated Surveillance of Antimicrobial Resistance, WHO-AGISAR*) poručila je istraživanje o tome kakav utjecaj imaju metode reduciranja količine upotrijebljenih antibiotika u životinjama za hranu na pojavu rezistentnih bakterija u životinjama i ljudima. Rezultati su pokazali da je smanjen rizik rasprostranjenosti antibiotske rezistencije u životinjama između 10 i 15 %. Kod ljudskih osoba, u grupama koje su koristile metode intervencije, antibiotska rezistencija je bila 24 % manje u odnosu na kontrolne grupe. Metode intervencije uključivale su organske intervencije, vanjske zabrane i reduciranje upotrebe antibiotika, oznake “bez antibiotika”, “pašnjak” ili “slobodni uzgoj” i dobrovoljno reduciranje ili povlačenje upotrebe antibiotika. Rezultati istraživanja dosljedno podupiru pretpostavku da se rezistentne bakterije prenose sa stoke na poljoprivrednike. Međutim, postoji mogućnost ali nedostaje dovoljno dokaza je li dolazi do prijenosa tih bakterija i na

ostatak ljudske populacije. Mali je rizik prijenosa putem namirnica životinjskog porijekla ako su prikladno obrađene. Istraživanje je pokazalo da reduciranje upotrebe antibiotika u stočarstvu ima pozitivan utjecaj za ljude i životinje zbog povezanosti životinja, ljudi i ekosustava (Tang i sur., 2017).

Metode za nadziranje ostataka veterinarsko-medicinskih proizvoda dijele se na orijentacijske (eng. *screening methods*) i potvrdne metode (eng. *confirmatory methods*). Orijetacijske metode se koriste za otkrivanje prisutnosti analita ili klase analita na razini od interesa, dok potvrdne metode pružaju potpune ili komplementarne informacije kako bi se analit nedvosmisleno identificirao. Potvrdne metode moraju se temeljiti na primjeni spektrometrije masa, poput plinske kromatografije s masenom detekcijom (GC-MS), tekućinske kromatografije s masenom detekcijom (LC-MS) te najčešće tekućinskom kromatografijom kombiniranom s tandemskom spektrometrijom masa - LC-MS/MS (Kos, 2017).

#### 2.2.1. Bakterije s višestrukom rezistencijom na antibiotike

*ESKAPE* patogeni (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* i vrsta *Enterobacter*) odgovorni su za većinu infekcija dobivenih iz bolnice i kod njih se javlja visoka stopa rezistencije (Laws, i sur. 2019). Ovisno o važnosti određenih antimikrobnih lijekova za liječenje ljudi, Svjetska zdravstvena organizacija (WHO) rangira antimikrobne lijekove, što onda olakšava državnim regulacijama odrediti koji se antibiotici smiju dodavati hrani za životinje (Angulo i sur., 2009).

Neke od bakterija koje stvaraju veliki problem rezistencije u hrani životinjskog porijekla su vrste *Campylobacter*, *Salmonella*, *Staphylococcus aureus*, *E. coli* i vrsta *Enterococcus*. Kod ljudskih infekcija vrstama *Campylobacter* ili *Salmonella*, najčešće se koriste fluorokinoloni i cefalosporini treće generacije za terapiju, što predstavlja problem zato što se ti isti lijekovi daju i životinjama. Manja je rezistencija vrste *Campylobacter* na fluorokinolone u zemljama gdje je njihovo davanje životinjama ograničeno ili zabranjeno (npr. Norveška, Australija i Švedska), iako se u tim zemljama koriste u medicini. Za razliku od toga, veća je razina rezistencije u zemljama u kojima nije zabranjeno ili se često daju fluorokinoloni životinjama (npr. Kina, Španjolska i SAD). *Staphylococcus aureus* koji je rezistentan na meticilin proširio se na ljude u Kanadi, Europi i SAD-u preko životinja namijenjenih za hranu i domaćih životinja. *E. coli* nalazi se u gastrointestinalnom traktu u



ljudima, te razni sojevi dopijevaju tamo hranom koju unosimo. Na taj način mogu dospjeti i sojevi rezistentni na antimikrobne lijekove. Sve je veći porast rezistencije *E. coli* u razvijenim zemljama, kao što su Kina i Meksiko (Angulo i sur., 2009). Jedno istraživanje pokazuje kako je *E. coli*, koji je rezistentan na fluorokinolone, dospio do ljudi preko peradi, što je pokazalo da nije bilo odgovorno djelovanje fluorokinolona koje se daje u medicinske svrhe za nastanak rezistencije u *E. coli* koja se već nalazila u crijevima (Johnson i sur., 2006). Raširena je i rezistencija u vrstama *Enterococcus*, posebno *Enterococcus faecalis* i *E. faecium* koji su odgovorni za većinu enterokoknih infekcija (Hollenbeck i Rice, 2012; Angulo i sur., 2009).

### 2.2.2. Mehanizmi rezistencije na makrolidne antibiotike

Zbog nepravilnog korištenja, mogu zaostati rezidue makrolidnih antibiotika u hrani životinjskog porijekla, što može biti rizično za ljudsko zdravlje zbog akumulacije u tkivu životinja. Određena koncentracija makrolidnih antibiotika i njihovih metabolita može oštetiti vestibularne i pužne živce, jetru i bubrege (Lan i sur., 2019). Samo nekoliko godina nakon početka kliničke upotrebe, pojavila se rezistencija na eritromicin kod *Staphylococci*. U međuvremenu, rezistencija se pojavila u vrstama *Streptococcus*, *Bacteroides*, *Clostridium*, *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Campylobacter*, *M. pneumoniae*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Propionibacterium* i članovi *Enterobacteriaceae* (Golkar i sur., 2018).

Tri su mehanizma rezistencije pomoću kojih bakterije “izbjegavaju” djelovanje makrolidnih antibiotika; to su: izbacivanje antibiotika iz stanice pomoću efluks pumpe, enzimska modifikacija lijeka i sprječavanje vezanje antibiotika na ribosom (Park i Yoon, 2019; Leclercq, 2002). Bakterije mogu smanjiti intracelularnu koncentraciju antibiotika pomoću efluks pumpe. Za to su najčešće odgovorne potporodice Mef i Msr od efluks pumpe. Mef proteini ne koriste direktno energiju ATP-a za pumpanje antibiotika, dok Msr proteini upotrebljavaju ATP za aktivni transport makrolida. Drugi mehanizam rezistencije je modifikacija ribosoma najčešće putem metilacije 23S rRNA što interferira sa stvaranjem veza između nukleotida u 23S rRNA i šećerom u makrolidu. Također, mutacije u rRNA mogu spriječiti vezanje makrolida na ribosom zbog promjene u veznom mjestu. Linkozamidi i B streptogramini vežu se na isto mjesto kao i makrolidi. Stoga, bakterije koje su rezistentne na makrolide zbog modifikacije ribosoma, mogu biti rezistentni i na linkozamide i B streptogramine. Također, mogu se dogoditi mutacije u ribosomalnim proteinima, kao što su promjene u jednoj aminokiselini ili insercija/delecija više aminokiselina. Treći mehanizam rezistencije je enzimska modifikacija antibiotika. Enzimi modificiraju makrolide tako da se

ne mogu više vezati na 50S podjedinicu ribosoma. Makrolidne fosfotransferaze i makrolidne esterase su odgovorne za pojavu rezistencije na makrolide u bakterijama. (Golkar i sur., 2018).

U jednom studiju, izvedena je “procjena rizika” davanja makrolidnih antibiotika, tilozina i tilmikozina, životinjama namijenjenih za hranu. Tilozin se daje u svrhama prevencije, kontrole bolesti ili za poboljšanje rasta. Najčešće se daje peradi, svinjama i govedu. Tilmikozin je derivat tilozina s kojim se tretiraju respiratorne bolesti svinja i goveda. Pokazalo se da je puno manji rizik u odnosu na korist, upotreba makrolida u govedu, svinjama i peradi. Potencijalne koristi makrolida su zdravstvena zaštita, dobrobit životinja i sigurnost hrane (Hurd i sur., 2004).

### 2.2.3. Enzimi koji inhibiraju antimikrobno djelovanje ili razgrađuju antibiotike

Inhibitori  $\beta$ -laktamaza, enzima koji inaktiviraju djelovanje  $\beta$ -laktamskih antibiotika, su jedini inaktivatori antibiotičke rezistencije (eng. *antibiotic resistance breakers - ARBs*) koji imaju farmaceutsku primjenu (Laws i sur, 2019). Radi se o spojevima koji djeluju negativno na mehanizme rezistencije kako bi pojačali djelovanje antibiotika. Na ovaj način omogućuje se korištenje postojećih antibiotika na koje su bakterije razvile rezistenciju proizvodnjom enzima  $\beta$ -laktamaza. ARB-ovi se apliciraju zajedno s antibioticima ili kao konjuganti s antibioticima, te mogu imati izravno ili neizravno antibakterijsko djelovanje. Glavne skupine ARB-ova su, osim  $\beta$ -laktamaza koje su modificirajući enzimski inhibitori, membranski permeabilizatori i inhibitori efluks pumpe. ARB-ovi bi trebali omogućiti korištenje niže doze antibiotika zbog njihovog djelovanja protiv mehanizama antibiotičke rezistencije (Laws i sur., 2019).

Bakterije sadrže enzime koje mogu modificirati ili razgraditi antibiotike. Rezistencija se postiže putem hidrolize, prijenosa funkcionalne skupine, redoks reakcije ili djelovanjem enzima iz skupine liaza. Dvije glavne skupine su aminoglikozidni modificirajući enzimi i inhibitori  $\beta$ -laktamaza.  $\beta$ -laktamski antibiotici ometaju sintezu peptidoglikana stanične stijenke bakterija. U  $\beta$ -laktame ubrajaju se penicilini i cefalosporini, te su najčešće korišteni antibiotici.  $\beta$ -laktamaze hidroliziraju  $\beta$ -laktamski prsten antibiotika i tako spriječavaju njihovo djelovanje. Aminoglikozidi inhibiraju sintezu proteina u bakterijama, te se koriste za tretiranje infekcije s *Mycobacterium tuberculosis*. Glavni mehanizam rezistencije na aminoglikozidne antibiotike je enzimska inaktivacija. Postoji nekoliko inhibitora modificirajućih enzima aminoglikozidnih antibiotika, ali se još ne upotrebljavaju u medicini.

Gram-negativne bakterije intrinzično su rezistentne na neke antibiotike jer sadrže vanjsku membranu kroz koju ne mogu prodrijeti antibiotici. Gram-negativne bakterije imaju unutarnju membranu, vanjsku membranu i periplazmatski prostor koji sadrži sloj peptidoglikana. Vanjska membrana sadrži porine kroz koje mogu prolaziti hidrofilne molekule u bakterijsku stanicu. Mutacije mogu uzrokovati smanjenu ekspresiju porina, stoga bakterije mogu razviti rezistenciju na antibiotike zbog nemogućnosti prolaska lijekova u bakterijsku stanicu. Membranski permeabilizatori su spojevi koji povećavaju propusnost vanjski membrane, te na taj način olakšavaju unos antibiotika u Gram-negativne bakterijske stanice. Bakterijske efluks pumpe ispumpavaju neželjene spojeve izvan bakterijske stanice, kao što su teški metali, biocidi, metaboliti i antibiotici. Na taj način sprječavaju djelovanje antibiotika. Inhibitori efluks pumpe najčešće djeluju tako da fizički blokiraju izlazak molekula iz bakterijske stanice (Laws i sur., 2019).

### 3. EKSPERIMENTALNI DIO

#### 3.1. MATERIJALI

- Mišićno tkivo govedine, svinje, kokoši, ovce, junetine, teletine i ribe

##### 3.1.1. Kemikalije i standardi

- Acetonitril, LC-MS čistoće
- Metanol, LC-MS čistoće
- Mravlja kiselina, 98-100%, LC-MS čistoće
- Ultračista voda
- DMSO, HPLC grade
- Analitički standardi:
  1. Clindamycin hydrochloride C2250000 European Pharmacopeia
  2. Erythromycin A dihydrate 46256 Vetranal
  3. Gamithromycin 32161 Vetranal
  4. Josamycin Y000004 European Pharmacopeia
  5. Lincomycin hydrochloride 62143 Sigma
  6. Neo Spiramycin I N390040 Toronto Research Chemicals (TRC)
  7. Oleandomycin O517500 Toronto Research Chemicals (TRC)
  8. Pirlimycin Hydrochloride (*Mixture of Diastereomers*) P509300 Toronto Research Chemicals (TRC)
  9. Rifaximin 33999 Vetranal
  10. Roxithromycin R4393 Sigma
  11. Spiramycin from *Streptomyces sp.* 46745 Vetranal
  12. Tildipirosin T440150 Toronto Research Chemicals (TRC)
  13. Tilmicosin 33864 Vetranal
  14. Tulathromycine A 19202 Cayman
  15. Tylosin tartrate 33847 Vetranal
  16. Tylvalosin T898210 Toronto Research Chemicals (TRC)
  17. *Enrofloxacin-D5* E557802 Toronto Research Chemicals (TRC)

### 3.1.2. Aparatura i pribor

- Polipropilenske epruvete 15 mL
- Precizna analitička vaga
- Precizne analitičke pipete volumena od 10 µL do 5 mL
- Centrifuga s max 4600 o/min i max 15000 o/min
- Sustav za otparavanje s dušikom
- *Vortex* homogenizator
- Epruvete za ultracentrifugu volumena do 2 mL (*Eppendorf*)
- HPLC uređaj Agilent Technologies 1290 Infinity
- Agilent Triple Quad 6470A
- Kromatografska kolona: Acquity UPLC HSS T3 1,8µm, 2,1x150 mm, Part No.186003540, Waters
- Predkolona: Acquity HSS T3 1.8µM vanguard Pre-Col, Waters

### 3.2. METODE

Metoda je preuzeta iz literature Hrvatskog veterinarskog instituta (Varenina i sur., 2020).

#### 3.2.1. Postupanje s uzorcima

Uzorci doneseni u laboratorij na analizu, pohranjuju se u hladnjak na temperaturi 2 - 8 °C na 24 sata ili se homogeniziraju te se mogu čuvati do tri mjeseca na temperaturi -18 °C. Prije analize homogenizirani uzorak se ostavi na sobnoj temperaturi da se otopi. Za analizu, u epruveti od 15 mL odvaže se 2 g uzorka homogeniziranog mišića.

#### 3.2.2. Priprema otopina

Mobilna faza A je 0,1 % mravlja kiselina, koja se priprema dodatkom 1 ml mravlje kiseline u tikvicu od 1000 ml s ultračistom vodom, te se nadopunjuje do oznake s ultračistom vodom. Valjanost mobilne faze A je 4 dana čuvana na sobnoj temperaturi u zatamnjenu posudu. Mobilna faza B je MeOH (LC-MS čistoće). 0,5 % Mravlja kiselina u acetonitrilu priprema se pipetiranjem 2,5 ml mravlje kiseline u tikvicu od 500 ml.

### 3.2.3. Priprema standardnih otopina veterinarskih lijekova

Bazne otopine standarda pripremaju se zasebno nakon čega se pripremaju mješavine zasebnih grupa analita. Radne otopine služe za obogaćivanje kontrolnih uzoraka tj. pripremu matriks kalibracijske krivulje i za izradu standardne krivulje. Otopina B je bazna otopina koja se priprema za svaki analit zasebno. Nakon odvage oko 10 mg standarda, otapa se u odmjernoj tikvici od 10 ml s navedenim otapalima iz Tablice 2. Mješavina standarda S1 i S2 pripremaju se u metanolu. Postupak pripreme mješavine standarda S1 i S2, prikazano je u Tablici 3. Otopina S1 je radna otopina sa svim makrolidima pri određenim koncentracijama. Otopina S2 je razrjeđenje S1 otopine. Uzorci su obogaćeni sa S2 otopinom.

**Tablica 2.** Priprema standardnih radnih otopina veterinarskih lijekova

<b>Ime spoja</b>	<b>Odvaga čistog standarda, referentnog materijala (mg)</b>	<b>Otapalo</b>	<b>Temperatura čuvanja (°C)</b>	<b>Duljina čuvanja</b>
<b>Ertiromicin A</b>	11,2	MeOH	-20	3 mjeseca
<b>Klindamicin</b>	11,55	MeOH	-20	6 mjeseci
<b>Gamitromicin</b>	11,10	MeOH	-20	5 mjeseci
<b>Josamicin</b>	10,0	MeOH	-20	2 mjeseca
<b>Linkomicin</b>	11,37	MeOH	-20	6 mjeseci
<b>Neospiramicin</b>	10,4	MeOH	-20	6 mjeseci
<b>Oleandomicin</b>	10,23	MeOH	-20	1 godina
<b>Pirlimicin</b>	11,22	MeOH	-20	6 mjeseci
<b>Roksitromicin</b>	10,73	MeOH	-20	6 mjeseci
<b>Rifaksimim</b>	10,72	MeOH	-20	6 mjeseci
<b>Spiramicin</b>	10,96	MeOH	-20	1 godina
<b>Tildipirozin</b>	10,12	MeOH	-20	2 godine
<b>Tilmikozin</b>	12,45	MeOH	-20	1 godina
<b>Tulatromicin A</b>	10,00	EtOH, DMSO, DMF	-20	1 godina

<b>Tilozin A</b>	13,58	MeOH	-20	6 mjeseci
<b>Tilvalozin</b>	10,86	MeOH	-20	2 mjeseca

**Tablica 3.** Priprema mješavine standarda S1 i S2

<b>Ime spoja</b>	<b>MRL (ng/ml)</b>	<b>Bazna otopina (ng/mL)</b>	<b>Volumen Bazne otopine B (mL)</b>	<b>Volume n S1 tikvice (mL)</b>	<b>Koncentracija MIX S1-Makro-L inkozamid (ng ml<sup>-1</sup>)</b>	<b>Koncentracija MIX S2-Makro-L inkozamid (ng ml<sup>-1</sup>)</b>
<b>Ertiromicin A</b>	200	1000000	1	25	40000	4000
<b>Klindamicin</b>	50		0,25		10000	10000
<b>Gamitromicin</b>	50		0,25		10000	10000
<b>Josamicin</b>	50		0,25		10000	10000
<b>Linkomicin</b>	100		0,5		20000	2000
<b>Neospiramicin</b>	100		0,5		20000	2000
<b>Oleandomicin</b>	50		0,25		10000	1000
<b>Pirlimicin</b>	100		0,5		20000	2000
<b>Roksitromicin</b>	50		0,25		10000	1000
<b>Rifaksimin</b>	50		0,25		10000	1000
<b>Spiramicin</b>	100		0,5		20000	2000
<b>Tildipirozin</b>	400		2		80000	8000
<b>Tilmikozin</b>	50		0,25		10000	1000
<b>Tulatromicin A</b>	300		1,5		60000	6000
<b>Tilozin A</b>	100		0,5		20000	2000
<b>Tilvalozin</b>	25	0,125	5000	500		

### 3.2.4. Priprema internih standarda

Mješavina internih standarda priprema se prema Tablici 4. U uzorke za kalibraciju te ispitne uzorke dodaje se interni standard Enrofloxacin-d5 pri koncentraciji koja je približno jednaka MRL (eng. *maximum residue limit* - najveća dopuštena koncentracija) koncentraciji odgovarajućeg analita (Tablica 5). Valjanost internog standarda određuje analitičar prilikom analiza, te ukoliko je signal S/N < 10 potrebno je pripremiti svježu otopinu.

**Tablica 4.** Priprema otopine internih standarda

MIX-Q-TOF-IS						
Kinolon	Obogaćenje (ng ml <sup>-1</sup> )	Bazna otopina B (ng mL <sup>-1</sup> )	Volumen bazne otopine B (mL)	Volumen tikvice (mL)	IS1 (ng mL <sup>-1</sup> )	IS2 (MIX S2-Kin-Ple) (ng mL <sup>-1</sup> )
Enrofloksacin-d5	100	1000000	0,5	25	20000	2000

**Tablica 5.** Marker supstance za određivanje veterinarskih lijekova te propisane MRL vrijednosti za mišić (Uredba Komisije (EZ) br. 37/2010)

Makrolidi i Linkazomidi	Marker rezidua	Životinjska vrsta	MRL (µg kg <sup>-1</sup> )
Eritromicin A	Eritromicin A	sve	200
Gamitromicin	izvorni spoj	preživači osim goveda	50
		svinja	100
Josamicin	izvorni spoj	-	-
Oleandomicin	izvorni spoj	-	-
Rifaksimim	izvorni spoj	-	-
Roksitromicin	izvorni spoj	-	-



Spiramicin	Suma Spiramicin + Neospiramicin	govedo, piletina	200
Tildipirozin	izvorni spoj	ovce, koze	400
		svinja	1200
Tilmikozin	izvorni spoj	sve osim peradi	50
		perad	75
Tulatromicin	Tulatromicin A	ovce, koze	450
		goveda	300
		svinje	800
Tilozin	Tilozin A	sve	100
Tilvalozin	Suma Tilvalozin + 3-o-acetiltilozin	svinjetina	50
Klindamicin	izvorni spoj	-	-
Linkomicin	izvorni spoj	sve	100
Pirlimicin	izvorni spoj	govedo, svinja, piletina	100

### 3.2.5. Priprema standardne krivulje na otapalu i standarda za kontrolu stabilnosti sustava

Za kontrolu linearnosti odziva instrumenta te stabilnosti standardnih otopina priprema se kalibracijska krivulja na otapalu (Tablica 6). U svakodnevnim analizama provjerava se stabilnost standardne otopine S2 na način da se odziv standarda razine L3 bilježi u kontrolnu kartu.

**Tablica 6.** Standardna krivulja na otapalu za mišić

	L1 (µL)	L2 (µL)	L3 (µL)	Slijepa proba (µL)
H <sub>2</sub> O (mL)	500	500	<b>500</b>	500
MeOH (mL)	450	400	250	500
<b>RS-MAKRO-MI</b>				

<b>X-MIŠIĆ/ -S2</b>	50	100	<b>250</b>	-
Koncentracijska razina koja odgovara koncentraciji u uzorku <b>L3= ½ MRL</b>				

### 3.2.6. Priprema matriks kalibracijske krivulje

U svakoj analizi priprema se matriks kalibracijska krivulja na način da se određeni mišić obogati na 3 koncentracijske razine ovisno o postavljenom MRL-u ili najnižoj koncentraciji ispitanoj u validacijskom postupku. Ovisno o tome koja životinjska vrsta se pretražuje, priprema se i dodatni materijal te vrste kao kontrola iskorištenja. U uzorke mišića dodaje se mješavina standarda RS-MAKRO-MIX-MIŠIĆ -S2 (Tablica 7).

**Tablica 7.** Matriks kalibracija na mišiću

<b>Matriks</b>		<b>M1 (µL)</b>	<b>M2 (µL)</b>	<b>M3 (µL)</b>	<b>Slijepa proba (µL)</b>
Mišić 2 g	RS-MAKRO-MIX-MIŠIĆ-S2A	50	100	150	-
	RS-ISTD2	100	100	100	-

### 3.2.7. Potupci kontrole kvalitete

Kontrolni uzorak osjetljivosti instrumenta (**Response Check**) predstavlja mješavinu standarda RS-MAKRO-MIX-MIŠIĆ/S2 u koncentraciji koja odgovara koncentraciji analita u ekstraktu uzorka mišića obogaćenog na ½ MRL. Na početku i na kraju radne liste za injektiranje uzoraka, instrument mora detektirati pik sa omjerom signala i šuma S/N>10. Slijepi kontrolni uzorak (**Blank**) predstavlja mješavinu metanola i vode. Slijepi kontrolni

uzorak otapala (*Solvent blank*) predstavlja uzorak proveden kroz ekstrakciju bez prisustva matriksa. Negativni kontrolni uzorak matriksa (*Matrix blank*) predstavlja uzorak mišića koji ne sadrži analite koji se pretražuju ovom metodom. Negativni uzorci mišića, obogaćuju se standardnim otopinama mješavine analita prema Tablici 3 i 7. Također uzorcima se dodaje interni standard prema Tablici 4.

### 3.2.8. Pročišćavanje uzoraka mišića

Odvaži se  $2 \pm 0,02$  g uzorka mišića u plastičnu epruvetu od 50 mL. Zatim, dodaje se 100  $\mu$ L mješavine internog standarda MIX-MAKRO-ISTD2. U uzorke za matriks kalibracijsku krivulju, dodaje se otopina mješavine standarda kako je opisano u Tablici 7. Nakon toga, dodaje se 8 mL acetonitrila (hladnog, čuvanog na temp 2-8 °C) te se snažno vorteksira, kratko i pojedinačno, dok se matriks ne rasprši u otapalu. Slijedi vorteksiranje 10 minuta na vrtložnoj mješalici te centrifugiranje na 4600  $\text{min}^{-1}$  na 4 °C. Zatim, prebaci se supernatant u epruvetu od 15 mL. Dodaje se 50  $\mu$ L DMSO u svaku epruvetu sa supernatantom. Slijedi uparavanje do oko 50  $\mu$ L pri 40 °C pomoću dušika. Uzorak se otopi na način da se doda 150  $\mu$ L ultračiste vode, vorteksira i stavlja 5 minuta u ultrazvučnu kupelj. Zatim, uzorci se prebace u pasteuve epruvetice od 2 mL i centrifugiraju 5 minuta na 15000  $\text{min}^{-1}$  pri 4 °C. Na kraju, prebacuje se bistri supernatant u vialu. Faktor koncentriranja uzorka iznosi  $f=1/10$ , što znači da je koncentracija analita u finalnom ekstraktu 10 puta veća nego u uzorku.

### 3.2.9. Mjerenje na LC-MS/MS uređaju

Za provođenje analize koristi se HPLC uređaj *1290 Infinity* udružen s masenim spektrometrom s trostrukim kvadropolom (LC-MS/MS G6470) s *Dual AJS ESI* sustavom za elektrosprej ionizaciju. Analiti se ioniziraju u pozitivnom načinu rada. Instrumentalna analiza se obavlja na instrumentu oznake Agilent Technologies Triple Quadrupole LC/MS 6470A, koristeći *MassHunter Acquisition* računalni program.

#### Kromatografski uvjeti

- Kromatografska kolona: Acquity UPLC HSS T3 1,8 $\mu$ m, 2,1x150 mm
- Predkolona: Acquity UPLC HSS T3 1,8  $\mu$ m, 2,1x5mm VanGuard Pre-Column

- Protok: 0,4 mL min<sup>-1</sup>
- Temperatura odjeljka kolone: 40°C
- Sustav za uzorkovanje: Volumen injektiranja: 10 µL

Temperatura: 10 °C

Injektiranje s ispiranjem igle: 15 s (MeOH/ACN/PropOH 5: 2,5: 2,5)

- Mobilna faza: Otopina A: 0,1 % mravlja kiselina

Otopina B: MeOH LC-MS grade

Gradijent (Tablica 8)

**Tablica 8.** Gradijent mobilne faze

Redni broj	Vrijeme (min.)	A (%)	B (%)	Protok (mL min <sup>-1</sup> )	Tlak (bar)
1	3	100	0	0,400	1000
2	10	5	95	0,400	1000
3	13	5	95	0,400	1000
4	13,5	100	0	0,400	1000
5	17	100	0	0,400	1000

### Uvjeti masene spektrometrije

Ionizacija se odvija u ESI izvoru u pozitivnom načinu rada MRM vrstom skeniranja iona (engl. *MRM Multi reaction monitoring*). Postavke metode za skeniranje višestrukih ionskih tranzicija MRM načinom snimanja prikazane su u Tablici 9.

Parametri masene spektrometrije su:

- *Gas Temp* (°C): 150
- *Gas Flow* (l/min): 11
- *Nebulizer* (psi): 35
- *SheathGasHeater*: 300
- *SheathGasFlow*: 6
- *Capillary* (V): 4000
- *VCharging*: 500

- *Delta EMV: 250*

**Tablica 9.** Parametri detekcije supstancija pomoću LC-MS/MS spektrometra

Dinamični MRM							
Makrolidi	Prekursor Ion	Produkt Ion/ Kolizijska energija (eV)			Retencijsko vrijeme (min.)	Fragmentor	Polarnost
Klindamicin	425,2	377,2	126,1		8,76	135	Pozitivno
		20	20				Pozitivno
Eritromicin A	734,5	576,4	158,1		9,38	135	Pozitivno
		20	20				Pozitivno
Gamitromicin	407,2	359,2	126,1		6,97	135	Pozitivno
		10	20				Pozitivno
Josamicin	828,5	174,1	109,1		9,6 9	135	Pozitivno
		45	45				Pozitivno
Linkomicin	407,2	359,2	126,1		6,97	135	Pozitivno
		10	20				Pozitivno
Neospiramicin	699,4	540,3	174,1		7,76	180	Pozitivno
		20	40				Pozitivno
Oleandomicin	688,4	544,3	158,1	116,1	8,98	135	Pozitivno
		10	20	40			Pozitivno
Pirlimicin	411,2	363,2	112,1		8,67	135	Pozitivno
		10	20				Pozitivno
Rifaksimim	786,4	754,3	151,1		10,55	135	Pozitivno
		20	40				Pozitivno
Roksitromicin	837,5	679,4	158,1		9,8	135	Pozitivno
		20	40				Pozitivno
Spiramicin	843,5	540,3	174,1		8	135	Pozitivno
		35	40				Pozitivno
Tildipirozin	734,5	561,5	174		6,31	180	Pozitivno
		35	40				Pozitivno
Tilmikozin	869,6	696,4	174,1		8,51	135	Pozitivno

		44	48				Pozitivno
Tulatromicin A	577,4	420,3	158,1	116,1	7,13	135	Pozitivno
		45	45	45			Pozitivno
Tilozin A	916,5	772,4	174,1		9,32	135	Pozitivno
		20	40				Pozitivno
Tilvalozin	1042,6	814,5	229,1	109,1	9,94	135	Pozitivno
		40	40	40			Pozitivno

Prije početka instrumentalne analize, potrebno je optimizirati kolonu protokom mobilne faze kroz pola sata, dok krivulja tlaka pumpe na trenutnom prikazu stanja ne postane stabilna. Uzorci se injektiraju prema sljedećem rasporedu:

- *Blank*
- Kontrolni uzorak stanja instrumenta L2
- *Blank*
- Negativni kontrolni uzorak otapala
- Matriks *blank*
- Matriks kalibracijska krivulja
- *Blank*
- Uzorci (svakih 10 injektiranja testirati s kontrolnim uzorkom stanja instrumenta, nakon čega prije daljnjeg injektiranja uzoraka treba injektirati matriks blank)
- Uzorci
- Matriks *blank*
- Kontrolni uzorak stanja instrumenta
- *Blank*

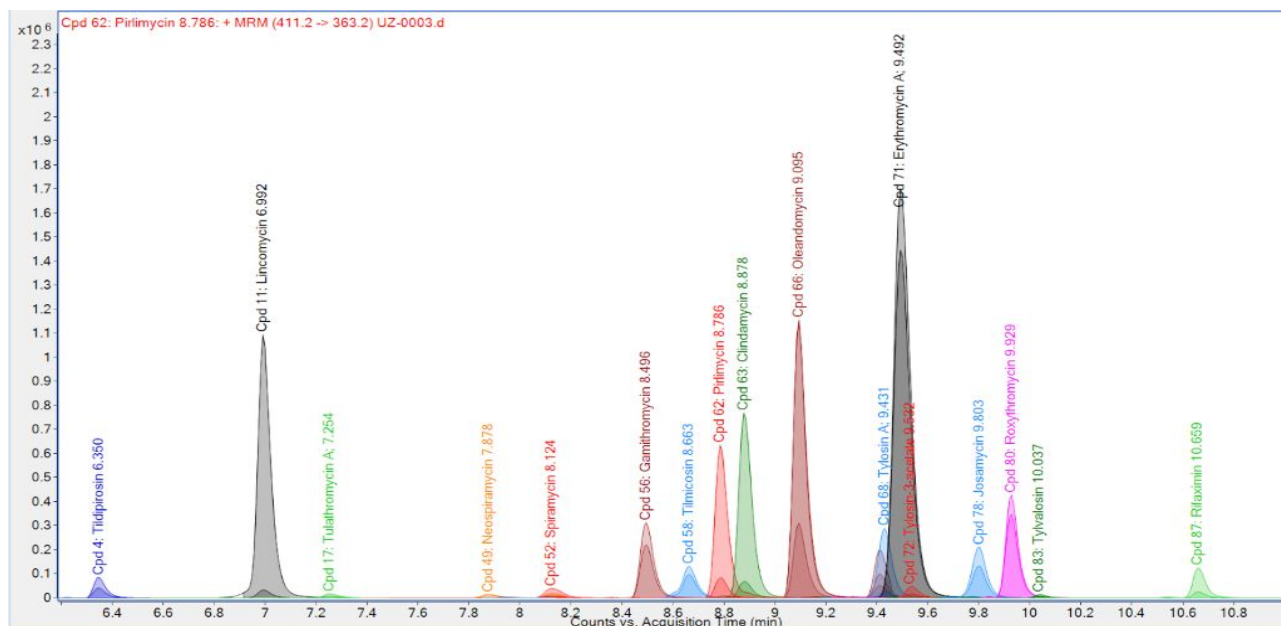
## 4. REZULTATI I RASPRAVA

### 4.1. Kvalitativna i kvantitativna procjena rezultata

Potvrдна analiza supstancija temelji se na snimanje cjelokupne struje iona u LC-MS/MS spektrometru. Za potvrdu analita potrebno je:

- Retencijsko vrijeme, odstupanje  $\pm 2,5\%$
- Prisutnost minimalno 2 produkt iona,  $S/N > 10$
- Odstupanje ionskog odnosa prekursora i produkta mora biti manje od 20-30 % u odnosu na kalibracijsku krivulju (Oguić, 2018)
- Visoki odziv

Obavljene su tri analize na različitim vrstama mišićnog tkiva. Prva analiza napravljena je na mišićno tkivo svinje, kokoši, junetine, govedo i ovce. Druga analiza uključivala je mišićno tkivo teletine, kokoši, svinje, junetine, ovce i ribe. Zadnja analiza napravljena je na mišićno tkivo kokoši, junetine i govedo. Analizirala se prisutnost 17 makrolidnih antibiotika navedeni u Tablici 9. Uzorci su analizirani tekućinskom kromatografijom reverzne faze, gdje najprije izlaze polarniji analiti. Kromatogram na Slici 8 prikazuje sve analite makrolida detektirane ovom metodom. Može se zaključiti da je tildipirozin najpolarniji makrolid jer se prvi eluira s kromatografske kolone, dok je rifaksimin najmanje polaran jer se najduže zadržava na koloni.



Slika 8. Kromatogram obogaćenog uzorka mišića goveda makrolidima na koncentraciju koja odgovara NDK vrijednosti

Kvantifikacija je provedena na osnovu matriks kalibracijske krivulje, tj. mišićnog tkiva obogaćenog na tri koncentracijske razine ½ MRL, MRL i 1,5 MRL.

U sljedećim prikazima analiza promatrani su sljedeći parametri: retencijsko vrijeme (odstupanje 2,5%), odziv analita (*Area/Površina pika dva produkt iona*), odstupanje *Ion ratio*/Omjera odziva produkt iona, te utjecaj matriksa na odziv analita (na kalibracijskim pravcima označeno kao Δ).

#### 4.1.1. Kvalitativna i kvantitativna procjena uzoraka analize - Dan I

Obrađeno je jedanaest uzoraka u prvoj analizi. U Tablici 10, prikazane su vrste mišićnog tkiva uzoraka i njihova priprema.

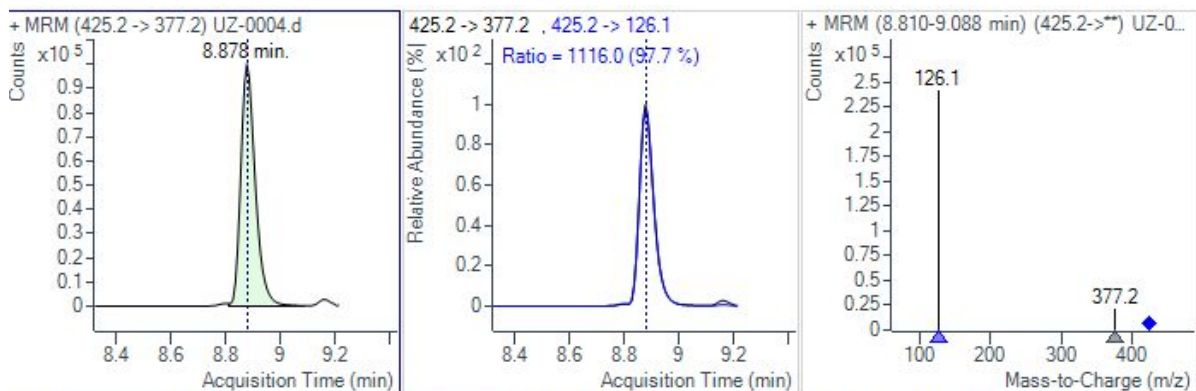
**Tablica 10.** Uzorci za kalibraciju i analizirani uzorci

Redni broj	Oznaka uzorka	Vrsta	Odvaga (g)	Dodatak RS-MAKRO -MIX-MIŠIĆ -S2 (µl)	Dodatak RS-ISTD2 (µl)
1	Kal-I-1	Mišić goveda obogaćeni	2,011	50	100
2	Kal-I-2	Mišić goveda obogaćeni	2,701	100	100
3	Kal-I-3	Mišić goveda obogaćeni	1,997	150	100
4	Kal-I-4	Mišić svinje obogaćeno	2,501	100	100
5	Kal-I-5	Mišić kokoši obogaćeno	2,203	100	100
6	Kal-I-6	Mišić ovce obogaćeno	2,504	100	100
7	Uz-I-1	Mišić svinje	1,997	-	100
8	Uz-I-2	Mišić kokoši	1,998	-	100
9	Uz-I-3	Mišić svinje	2,001	-	100
10	Uz-I-4	Mišić june	2,001	-	100
11	Uz-I-5	Mišić svinje	2,001	-	100

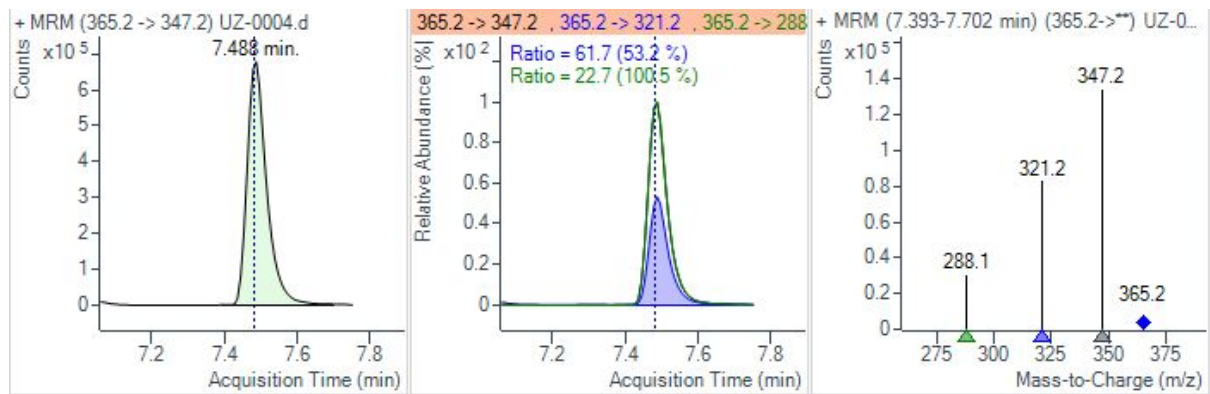


12	Uz-I-6	Mišić goveda	2,001	-	100
13	Uz-I-7	Mišić june	1,997	-	100
14	Uz-I-8	Mišić ovce	2,004	-	100
15	Uz-I-9	Mišić goveda	2,004	-	100
16	Uz-I-10	Mišić goveda	2,003	-	100
17	Uz-I-11	Mišić june	2,001	-	100

U prvoj analizi, svi su uzorci bili negativni na promatrane analite makrolida. Na Slici 9, prikazan je kromatogram klindamicina (m/z 425,2) u matriksu mišića goveda obogaćen na M3 razinu. Prikazane su tranzicije prekursora m/z 425,2 u produkt ione m/z 377,2 i 126,1. Na masenom spektru jasno se vide produkt ioni analita. Na Slici 10, prikazan je kromatogram internog standarda Enrofloxacin-D5, tj. njegovih produkt iona (m/z 365,2 → 347,2; 321,2).

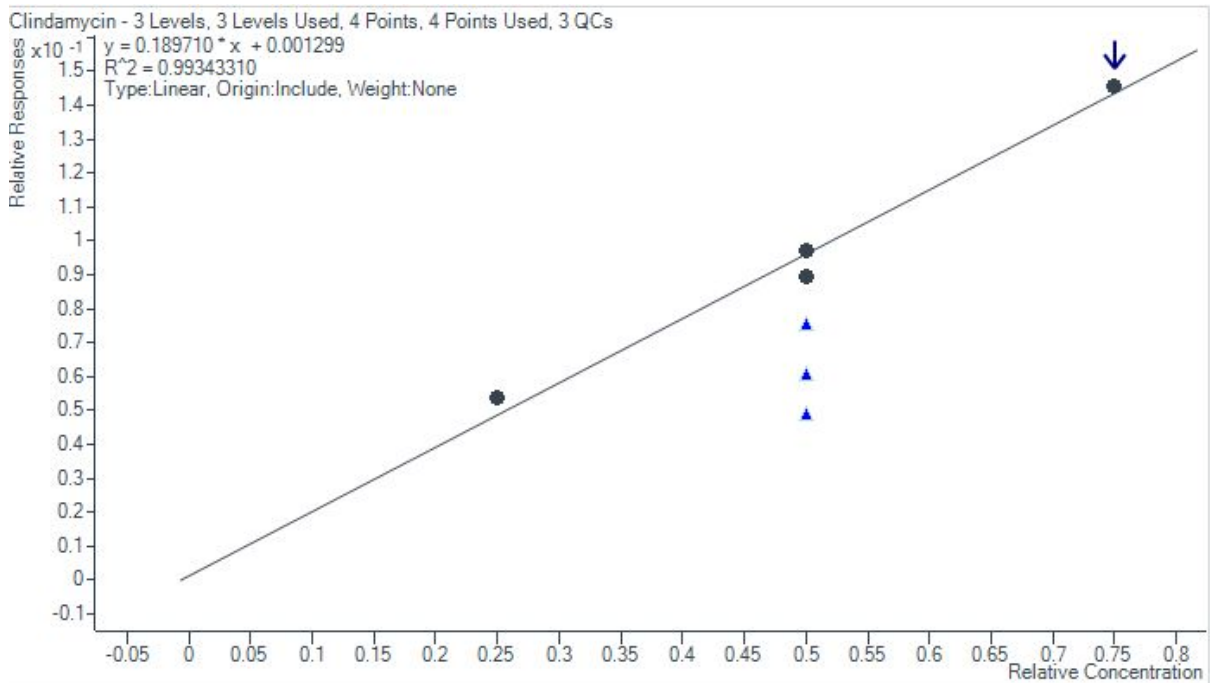


**Slika 9.** Kromatogram klindamicina u matriksu mišića goveda



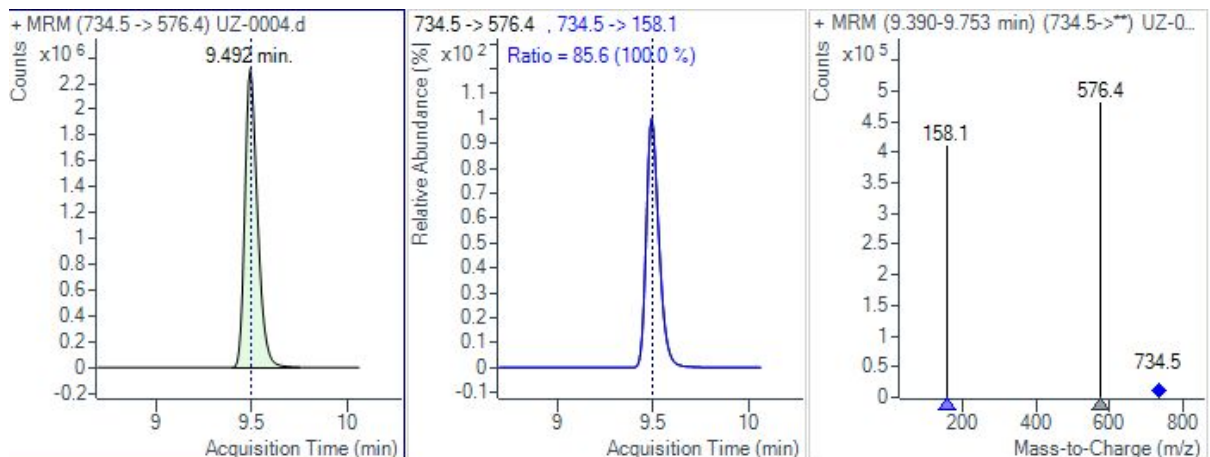
**Slika 10.** Kromatogram internog standarda Enrofoksacina-D5

Različite vrste mišića mogu utjecati na odstupanje odziva analita (makrolidnih antibiotika) od kalibracijske krivulje (Oguić, 2018). Matriks kalibracija na mišiću goveda prikazana je na Slici 11. Točke označene s “Δ”, predstavljaju odzive mišića svinje, peradi i ovce obogaćene na M2 razinu. Vidljivo je da matriksi mišića svinje, peradi i ovce utječu na ionizaciju analita klindamicina, odnosno uzrokuju supresiju iona i smanjen odziv.



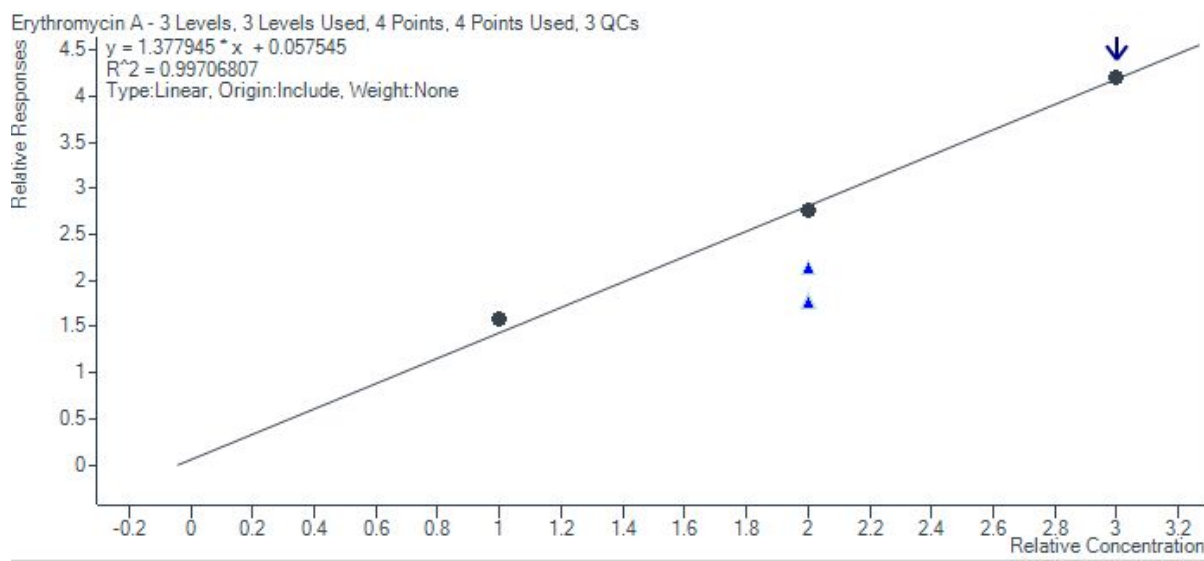
**Slika 11.** Matriks kalibracija na mišiću goveda (klindamicin)

Prikazan je kromatogram eritromicina A ( $m/z$  734,5), obogaćenog matriksa mišića goveda na M3 razinu. Retencijsko vrijeme iznosi 9,492 minuta, a omjer odziva produkta iona iznosi 85,6 (Slika 12).



**Slika 12.** Kromatogram eritromicina A u matriksu mišića goveda

Matriks kalibracija na mišiću goveda prikazana je na Slici 13. Može se vidjeti da krivulja ima dobru linearnost, s koeficijentom korelacije  $R^2$  0,997. Točke označene s “Δ”, predstavljaju odzive mišića svinje, peradi i ovce obogaćene na M2 razinu. Kao i kod klindamicina, također su matriksi mišića svinje, peradi i ovce utjecali na ionizaciju analita, zbog čega je došlo do smanjenog odziva.



**Slika 13.** Matriks kalibracija na mišiću goveda (eritromicin A)

#### 4.1.2. Kvalitativna i kvantitativna procjena uzoraka analize - Dan II

U ovoj analizi obrađeno je četrnaest uzoraka. U Tablici 11, prikazane su vrste mišićnog tkiva uzoraka i njihova priprema.

**Tablica 11.** Uzorci za kalibraciju i analizirani uzorci

Redni broj	Oznaka uzorka	Vrsta	Odvaga (g)	Dodatak RS-MAKRO -MIX-MIŠIĆ -S2 (μl)	Dodatak RS-ISTD2 (μl)
1	Kal-II-1	Mišić svinje obogaćeni	2,007	50	100
2	Kal-II-2	Mišić svinje	2,005	100	100

3	Kal-II-3	Mišić svinje	2,004	150	100
4	Kal-II-4	Mišić kokoši	2,003	100	100
5	Kal-II-5	Mišić june	2,005	100	100
6	Kal-II-6	Mišić ovce	2,002	100	100
7	Kal-II-7	Mišić morske ribe	2,003	100	100
8	Uz-II-1 (1. paralela)	Mišić tele	2,005	-	100
9	Uz-II-1 (2. paralela)	Mišić tele	2,002	-	100
10	Uz-II-2	Mišić svinje	2,006	-	100
11	Uz-II-3	Mišić kokoši	2,007	-	100
12	Uz-II-4	Mišić svinje	2,004	-	100
13	Uz-II-5	Mišić june	2,003	-	100
14	Uz-II-6	Mišić svinje	2,006	-	100
15	Uz-II-7	Mišić morske ribe	2,007	-	100
16	Uz-II-8	Mišić slatkovodne ribe	2,005	-	100
17	Uz-II-9	Mišić svinje	2,002	-	100
18	Uz-II-10	Mišić kokoši	2,004	-	100
19	Uz-II-11	Mišić ovce	2,003	-	100
20	Uz-II-12	Mišić morske ribe	2,006	-	100
21	Uz-II-13	Mišić svinje	2,007	-	100
22	Uz-II-14	Mišić june	2,006	-	100

U Tablici 12 prikazani su rezultati kalibracije za antibiotik tildipirozin iz druge analize.

**Tablica 12.** Rezultati kalibracije tildipirozina

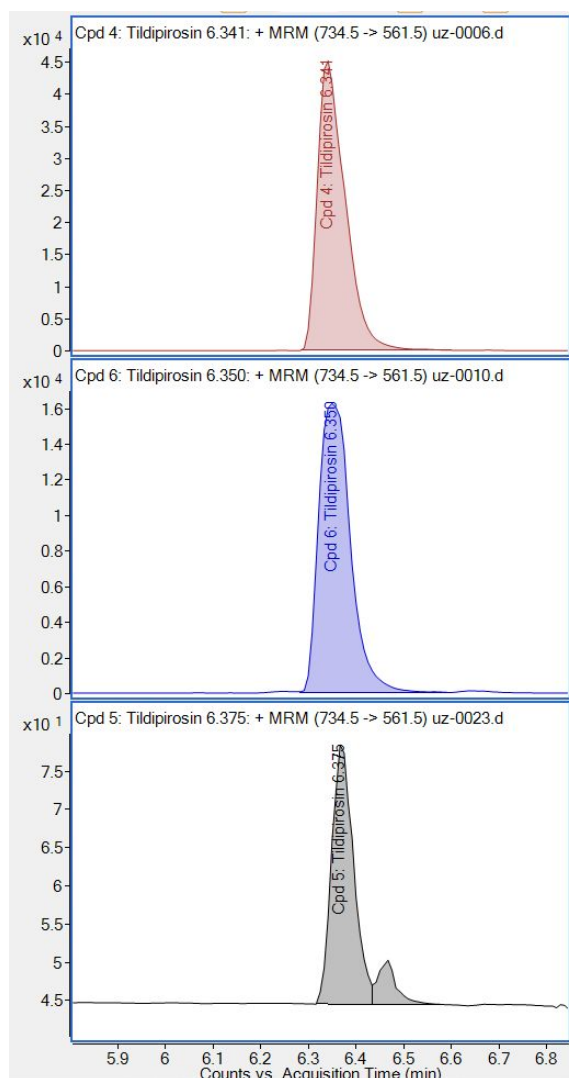
Uzorak	Očekivana konc.	Konačna konc.	Omjer odziva produkt iona	Odziv	Retencijsko vrijeme (min.)
Kal-II-1	200	244,51	181,6	99647	6,358
Kal-II-2	400	363,3	185,7	164226	6,358
Kal-II-3	600	644,51	183,1	300057	6,366
Kal-II-4	400	424,93	185,1	176966	6,332
Kal-II-5	400	417,51	180,9	183421	6,341
Kal-II-6	400	246,79	177,8	84976	6,332
Kal-II-7	400	262,89	182,5	70517	6,341
Srednja vrijednost	-	-	182,4	-	6,347
Standardna devijacija	-	-	2,47	-	-
Koeficijent varijacije (%)	-	-	1,35	-	-

U Tablici 12 prikazani su stalan omjer odziva produkta iona (eng. *Ratio*), retencijsko vrijeme te linearan odziv kalibracijskih uzorka na tildipirozin. Kako bi potvrdili analit u uzorku i proglasili ga pozitivnim, retencijsko vrijeme mora odgovarati onom u standardu ( $\pm 2,5\%$ ), te površina pika treba biti veća od prve kalibracijske točke. Zbog visoke preciznosti UHPLC, lako je zaključiti da je uzorak negativan ako su neodgovarajuća retencijska vremena (Oguić, 2018). Također, za minimalno dva produkta iona, mora biti stalan omjer odziva produkt iona. Uzorak oznake Uz-II-1 ima visok odziv u obje paralele (Površina pika; 93770/76167) i detektirani spoj ima retencijsko vrijeme od 6,349 min., što odgovara srednjoj vrijednosti *RT* standarda. Omjer odziva produkta iona je 178,7, što ne odstupa više od 20 % od ionskog odnosa utvrđenog u standardima i obogaćenim uzorcima (*Ratio*=182,4). Zbog toga, može se zaključiti da je uzorak mišića teleta (Uz-II-1) pozitivan na tildipirozin. Ostali uzorci koji su proglašeni negativni, imali su vrlo niske odzive. Također, retencijska vremena nekih uzoraka odstupali su za više od  $\pm 2,5\%$  srednje vrijednosti retencijskog vremena standarda. Uz to, MRM tranzicije tog analita nisu pronađene te stoga i omjer odziva produkta iona uzoraka odstupali su značajnije od vrijednosti ionskih odnosa standarda. Na Slici 14,

prikazana je usporedba kromatograma tildipirozina u obogaćenom uzorku, pozitivnom uzorku, i negativnom uzorku. Može se primjetiti kako je i kod negativnog uzorka vidljiv signal analita, ali niskog odziva.

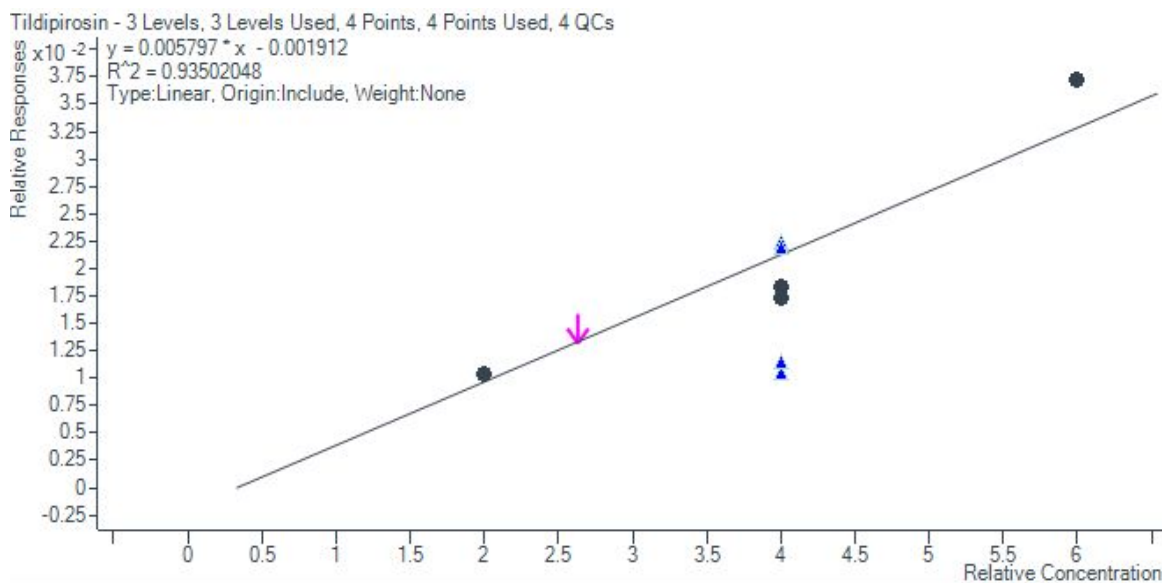
**Tablica 13.** Rezultati analize uzoraka za tildipirozin

<b>Uzorak</b>	<b>Omjer odziva produkt iona</b>	<b>Retencijsko vrijeme (min.)</b>	<b>Odziv (površina pika)</b>
Uz-II-1 (1. paralela)	180,4	6,349	93770
Uz-II-1 (2. paralela)	177	6,349	76167
Srednja vrijednost	178,7	6,349	-
Uz-II-2	273,6	6,366	60
Uz-II-3	413,2	6,349	36
Uz-II-4	-	6,299	42
Uz-II-5	249,6	6,332	50
Uz-II-6	148,6	6,374	369
Uz-II-7	305,2	6,383	74
Uz-II-8	265,5	6,467	1
Uz-II-9	703	6,383	33
Uz-II-10	185,4	6,349	26
Uz-II-11	213,4	6,366	132
Uz-II-12	100,1	6,266	8
Uz-II-13	155,2	6,358	243
Uz-II-14	199,2	6,366	108



**Slika 14.** Kromatogram obogaćenog uzorka mišića na M2 razinu (crveno), pozitivnog uzorka oznake Uz-II-1 (plavo) i negativnog uzorka mišića (sivo)

Koncentracija analita u uzorku može se proračunati s kalibracijske krivulje. Kalibracijska krivulja prikazuje odnos relativnog odgovora (Relative response) izmjerene površine analita i odgovarajućeg internog standarda i teoretske koncentracije kalibracijske točke (Varenina i sur., 2020). Na Slici 15, prikazana je matriks kalibracija za analit tildipirozina na mišiću svinje. Ovisno o vrsti mišića, odziv analita može varirati jer matriks u znatnoj mjeri utječe na površinu pika. Točke označene s “Δ”, predstavljaju odzive mišića kokoši, junetine, ovce i ribe obogaćene na M2 razinu. Matriks mišića kokoši i junetine imali su visok odziv i dobru linearnost, za razliku od mišića ovce i ribe koje su uzrokovali smanjeni odziv.



**Slika 15.** Matriks kalibracija na mišiću svinje (tildipirozin)

Pomoću programa, mogu se dobiti koncentracije analita u uzorcima prema kalibracijskoj krivulji (Varenina i sur., 2020). Uzimajući u obzir kalibracijsku krivulju utvrđena koncentracija tildipirosina u uzorku oznake Uz-II-1 iznosi za dvije paralelne probe 300,06 i 263,06  $\mu\text{g kg}^{-1}$ , odnosno srednja vrijednost iznosi 281,56  $\mu\text{g kg}^{-1}$ . Iako je ispitivani uzorak pozitivan na tildipirozin, utvrđena koncentracija ne premašuje najveću dopuštenu količinu (NDK) od 400  $\mu\text{g kg}^{-1}$  propisanu uredbom Europske komisije (EC) br. 37/2010, te se stoga ne mora evidentirati u EFSA (engl. *European Food Safety Agency*) bazu podataka. Naime, u okviru „Nacionalnog plana monitoringa rezidua Republike Hrvatske“, svi uzorci koji su nesukladni tj. u kojima je ustanovljena NDK vrijednost iznad one koja je propisana, evidentiraju se i objavljuju u godišnjim EFSA izvješćima o rezultatima praćenja ostataka veterinarsko-medicinskih proizvoda i drugih tvari u živim životinjama i proizvodima životinjskog podrijetla (EFSA, 2020). Podaci se prikupljaju iz svih zemalja članica EU, a u objedinjavanju podataka sudjeluju EFSA, *European Medicines Agency* (EMA) i *European Centre for Disease Prevention and Control* (ECDC) (Fejzuli i sur. 2018).



#### 4.1.3. Kvalitativna i kvantitativna procjena uzoraka analize - Dan III

Obrađeno je šest uzoraka u analizi. U Tablici 14, prikazane su vrste mišićnog tkiva uzoraka i njihova priprema.

**Tablica 14.** Uzorci za kalibraciju i analizirani uzorci

Redni broj	Oznaka uzorka	Vrsta	Odvaga (g)	Dodatak RS-MAKRO-MIX-MIŠIĆ-S2 (µl)	Dodatak RS-ISTD2 (µl)
1	Slijepi-matriks	Mišić goveda	2,005	-	100
2	Kal-III-1	Mišić goveda obogaćeni	2,002	50	100
3	Kal-III-2	Mišić goveda	2,006	100	100
4	Kal-III-3	Mišić goveda	2,007	150	100
5	Kal-III-4	Mišić kokoši	2,006	100	100
6	Uz-III-1	Mišić kokoši	2,006	-	100
7	Uz-III-2	Mišić kokoši	2,007	-	100
8	Uz-III-3	Mišić june	2,005	-	100
9	Uz-III-4	Mišić june	2,002	-	100
10	Uz-III-5	Mišić goveda	2,004	-	100
11	Uz-III-6	Mišić goveda	2,003	-	100

U Tablici 15 prikazani su rezultati kalibracije za antibiotik tilozin A iz treće analize.

**Tablica 15.** Rezultati kalibracije tilozina A

Uzorak	Očekivana konc.	Konačna konc.	Omjer odziva produktiona	Odziv	Retencijsko vrijeme (min.)
Kal-III-1 (1.)	50	58,87	1004,5	90347	9,465

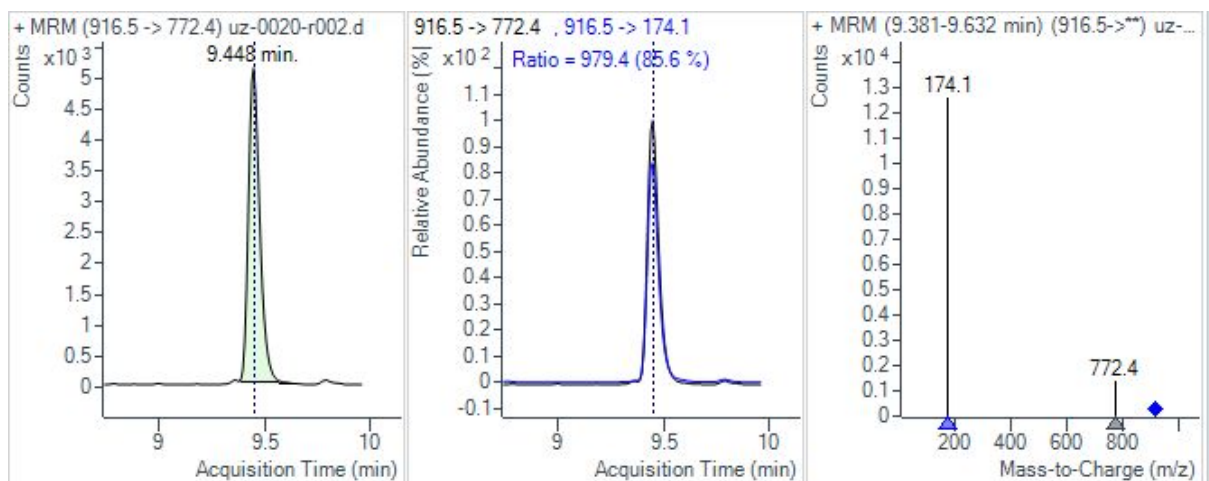
Kal-III-1 (2.)	50	59,33	1008,1	88611	9,465
Kal-III-2 (1.)	100	112,06	969,5	141539	9,457
Kal-III-2 (2.)	100	117,1	943	145056	9,457
Kal-III-3 (1.)	150	150,35	954,7	173799	9,457
Kal-III-3 (2.)	150	141,03	968,8	167063	9,448
Kal-III-4 (1.)	100	67,35	999,9	121363	9,457
Kal-III-4 (2.)	100	67,5	1007,3	117277	9,457
srednja vrijednost	-	-	982	-	9,458
Standardna devijacija	-	-	24,35	-	-
Koeficijent varijacije (%)	-	-	2,48	-	-

U Tablici 15 prikazani su stalan omjer odziva produkta iona (eng. *Ratio*), retencijsko vrijeme te odziv svakog uzorka na tilozin A. Srednje vrijednosti retencijskih vremena uzorka oznake Uz-III-2 i Uz-III-4 razlikovala su se za više  $\pm 2,5$  % srednje vrijednosti retencijskog vremena standarda. Retencijska vremena za uzorke oznake Uz-III-1, Uz-III-3, Uz-III-5 i Uz-III-6, odgovaraju analitu u obogaćenim uzorcima, tj. kalibracijskoj krivulji. Paralele uzorka oznake Uz-III-5 imali su visoke odzive, dok su ostali uzorci imali vrlo niske odzive. Također, srednja vrijednost omjera odziva produkta iona Uz-III-5, odgovaralo je onom u kalibracijskoj krivulji. Na osnovu toga, može se zaključiti da je uzorak Uz-III-5 (mišićno tkivo govedine) pozitivan na tilozin A, dok su ostali uzorci negativni. Uzorak mišićnog tkiva govedine (Uz-III-5) pozitivan na tilozin A ( $m/z$  916,5), prikazan je na kromatogramu (Slika 16).

**Tablica 16.** Rezultati analize uzoraka za tilozin A

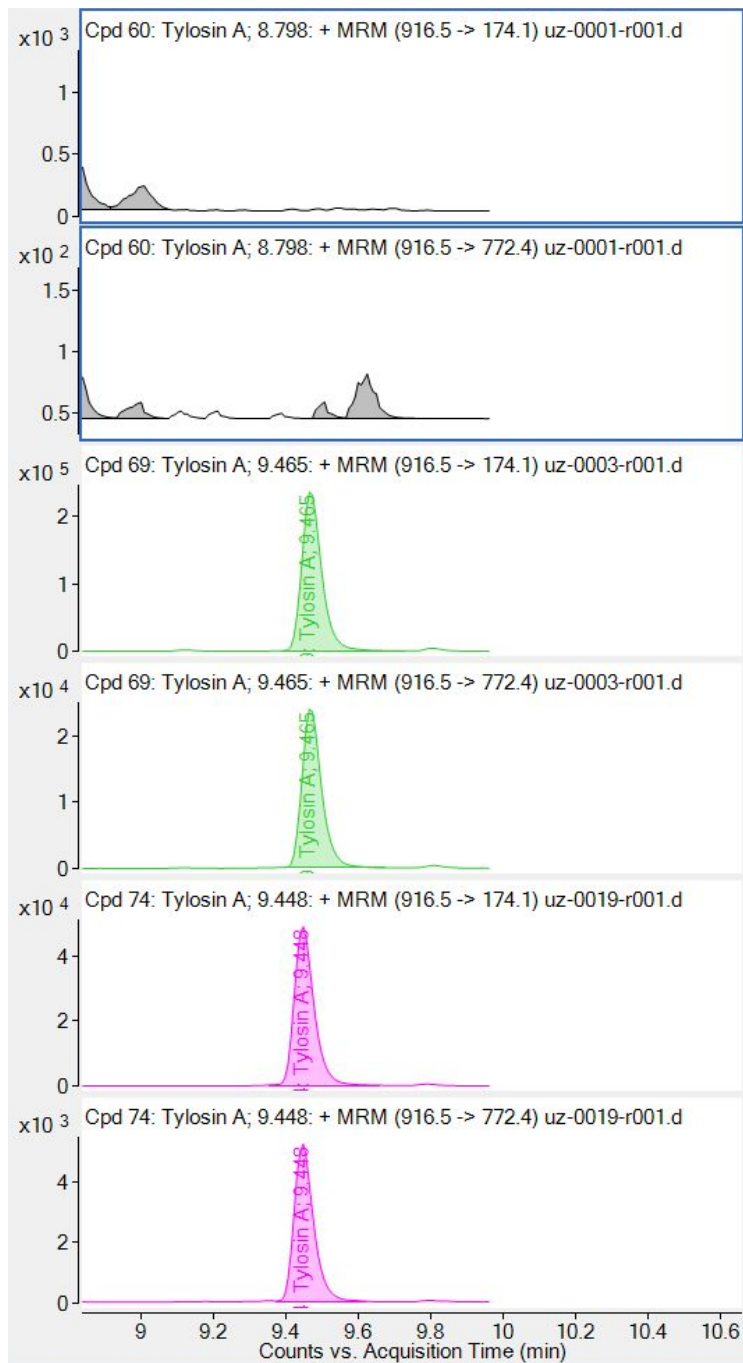
Uzorak	Omjer odziva produkt iona	Retencijsko vrijeme (min.)	Odziv
Uz-III-1 (1.)	390,2	9,457	18
Uz-III-1 (2.)	-	9,431	27
Srednja vrijednost	195,1	9,444	-

Uz-III-2 (1.)	-	9,405	16
Uz-III-2 (2.)	-	9,457	12
Srednja vrijednost	-	9,431	-
Uz-III-3 (1.)	826,8	9,448	15
Uz-III-3 (2.)	328,3	9,465	22
Srednja vrijednost	577,55	9,457	-
Uz-III-4 (1.)	887,5	9,405	40
Uz-III-4 (2.)	1523,9	9,448	11
Srednja vrijednost	1205,7	9,427	-
Uz-III-5 (1.)	963,7	9,448	19389
Uz-III-5 (2.)	979,4	9,448	19063
Srednja vrijednost	971,55	9,448	-
Uz-III-6 (1.)	922,8	9,448	16363
Uz-III-6 (2.)	984,9	9,448	15559
Srednja vrijednost	953,85	9,448	-



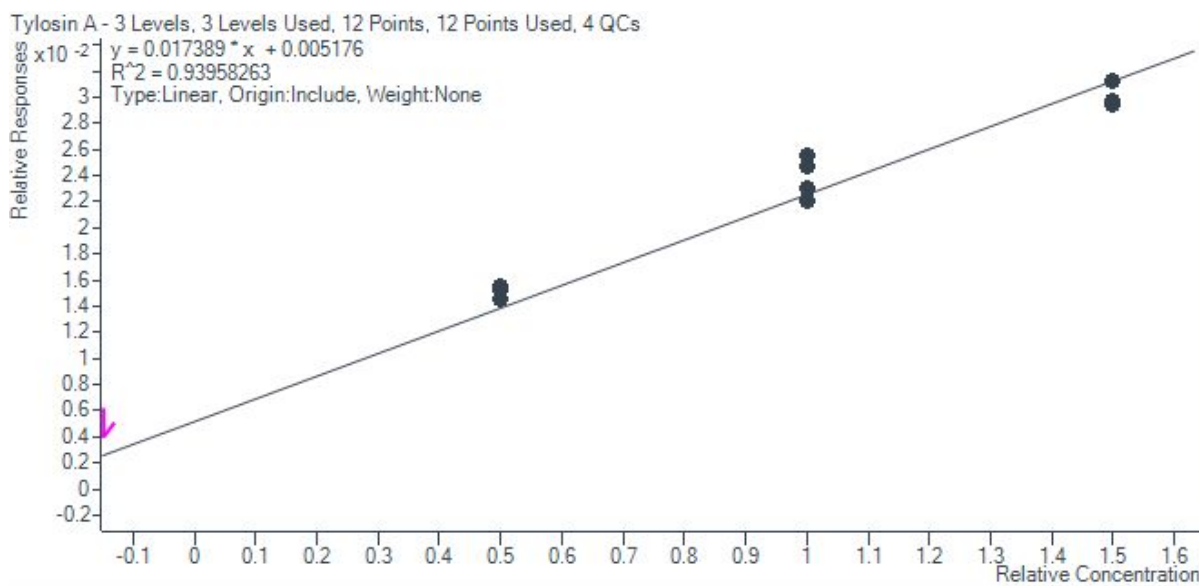
Slika 16. Kromatogram uzorka Uz-III-5 (2. paralela)

Na Slici 17, prikazana je usporedba kromatograma tilozina za negativni uzorak mišića, obogaćeni uzorak na razinu M2 i pozitivan uzorak oznake Uz-III-5. Na kromatogramu obogaćenog uzorka mišića, vidljiv je odziv tilozina A pri retencijskom vremenu 9,465. Kromatogram uzorka oznake Uz-III-5 također prikazuje visok odziv tilozina pri retencijskom vremena od 9,448. Kromatogram negativnog kontrolnog uzorka matriksa (*matrix blank*), prikazuje mnoštvo niskih pikova pri retencijskom vremenu od 8,798, te su oni rezultat odziva otapala.



**Slika 17.** Kromatogram negativnog uzorka mišića (sivo), obogaćenog uzorka mišića na M2 razinu (zeleno) i pozitivnog uzorka Uz-III-5 (1. paralela) (rozo)

Na Slici 18, prikazana je matriks kalibracija na mišiću goveda. Može se vidjeti dobra linearnost krivulje uz manja odstupanja.



**Slika 18.** Matriks kalibracija na mišiću goveda (tilozin A)

Koncentracije analita mogu se izračunati kvantitativno na osnovi pristupa razrijeđenja izotopa. Najprije je potrebno izračunati faktor odgovora ( $RF$ ) za tilozin A u odnosu na interni standard za sve standardne otopine prema formuli:  $RF_n = A_n^1 * c_{istd} / A_{istd}^1 * c_n$  ( $A_n^1$  - površina pika najzastupljenije tranzicije standarda,  $c_n$  - koncentracija standarda,  $A_{istd}^1$  - površina pika najzastupljenije tranzicije internog standarda,  $c_{istd}$  - koncentracija internog standarda). Zatim, izračuna se srednja vrijednost faktora odgovora za standardne otopine koja se uvrsti u formulu za izračun koncentracije analita prema formuli:  $C_n = c_{istd} * A_n^1 / A_{istd}^1 * \overline{RF}_n$  ( $A_n^1$  - površina pika najzastupljenije tranzicije standarda,  $C_n$  - koncentracija analita u uzorku,  $A_{istd}^1$  - površina pika najzastupljenije tranzicije internog standarda,  $c_{istd}$  - koncentracija internog standarda,  $\overline{RF}_n$  - srednja vrijednost RF standarda). Rezultat se izražava u  $\mu\text{g kg}^{-1}$  (ppb) na dvije značajne znamenke (Varenina i sur., 2020). Za izračun, upotrijebljeni su podaci iz Tablice 17. Utvrđena koncentracija tilozina A u uzorku oznake Uz-III-5 iznosi za dvije paralelne probe 11,72 i 11,29  $\mu\text{g kg}^{-1}$ , odnosno srednja vrijednost iznosi 11,51  $\mu\text{g kg}^{-1}$ .

**Tablica 17.** Vrijednosti površine pika, koncentracije standarda i internog standarda

Uzorak	$A_n^1$	$A_{istd}$	$c_n$ (ng ml <sup>-1</sup> )	$c_{istd}$ (ng ml <sup>-1</sup> )
Kal-III-1 (1.)	90347	5862270	50	100
Kal-III-1 (2.)	88611	5720024	50	
Kal-III-2 (1.)	141539	5739309	100	
Kal-III-2 (2.)	145056	5680121	100	
Kal-III-3 (1.)	173799	5549351	150	
Kal-III-3 (2.)	167063	5625183	150	
Kal-III-4 (1.)	121363	7187205	100	
Kal-III-4 (2.)	117277	6934107	100	
Uz-III-5 (1.)	19389	7194959	-	
Uz-III-5 (2.)	19063	7343698	-	

Utvrđena koncentracija tilozina A u pozitivnom uzorku ne premašuje NDK tilozina A u mišiću goveda od 100 µg kg<sup>-1</sup>, koja je propisana uredbom Europske komisije (EC) br. 37/2010. U slučaju da pozitivan nalaz antibiotika u analiziranom uzorku mišićnog tkiva premašuje NDK utvrđenu uredbom Europske komisije br. 37/2010, mora se evidentirati u bazi podataka koju objavljuje EFSA (engl. *European Food Safety Agency*) jer je pokazatelj nepravilne upotrebe veterinarskih lijekova u uzgoju životinja za ljudsku prehranu.

## 5. ZAKLJUČCI

1. Primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti i masene spektrometrije, analizirani su uzorci mišića i utvrđeno je jesu li uzorci pozitivni ili negativni na određeni makrolidni antibiotik.
2. Svih jedanaest obrađenih uzoraka u prvoj analizi bili su negativni na sve makrolidne antibiotike.
3. U drugoj analizi, od četrnaest analiziranih uzoraka, uzorak telećeg mišića u dvije paralele bio je pozitivan na tildipirozin. Uzorak je pozitivan na tildipirozin ali ne premašuje najveću dopuštenu koncentraciju (NDK) od  $400 \mu\text{g kg}^{-1}$ .
4. U trećoj analizi, od šest analiziranih uzoraka mišića, uzorak goveđeg mišića u dvije paralele bio je pozitivan na tilozin A. Srednja vrijednost koncentracije paralela iznosila je  $11,51 \mu\text{g kg}^{-1}$ , što ne premašuje najveću dopuštenu koncentraciju tilozina A u mišiću goveda od  $100 \mu\text{g kg}^{-1}$ .
5. U slučaju da pozitivan nalaz antibiotika u analiziranom uzorku mišićnog tkiva premašuje NDK utvrđenu uredbom Europske komisije br. 37/2010, mora se evidentirati u bazi podataka koju objavljuje EFSA (engl. *European Food Safety Agency*) jer je pokazatelj nepravilne upotrebe veterinarskih lijekova u uzgoju životinja za ljudsku prehranu.



## 6. LITERATURA

Aarestrup, F. M. (2015) The livestock reservoir for antimicrobial resistance: a personal view on changing patterns of risks, effects of interventions and the way forward. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* **370(1670)**, 20140085. doi: 10.1098/rstb.2014.0085

Angulo, F.J., Collignon, P., Powers, J.H., Chiller, T.M., Aidara-Kane, A., Aarestrup, F.M. (2009) World Health Organization Ranking of Antimicrobials According to Their Importance in Human Medicine: A Critical Step for Developing Risk Management Strategies for the Use of Antimicrobials in Food Production Animals. *Clin Infect Dis.* **49(1)**, 132–141, <<https://doi.org/10.1086/599374>>. Pristupljeno 23. srpnja, 2020.

Angulo, F.J., Collignon, P., Wegener, H.C., Braam, P., Butler, C.D. (2005) The Routine Use of Antibiotics to Promote Animal Growth Does Little to Benefit Protein Undernutrition in the Developing World. *Clin Infect Dis.* **41(7)**, 1007–1013, <<https://doi.org/10.1086/433191>>. Pristupljeno 23. srpnja, 2020.

Davies, J., Davies, D. (2010) Origins and Evolution of Antibiotic Resistance. *Microbiol Mol Biol Rev.* **74(3)**, 417-433. doi: 10.1128/MMBR.00016-10

Džidić, S., Šušković, J., Kos, B. (2008) Antibiotic resistance mechanisms in bacteria: biochemical and genetic aspects. *Food Technol Biotechnol.* **46**, 11-21.

ECDC (2008) Factsheet for experts - Antimicrobial resistance. ECDC - European Centre for Disease Prevention and Control. <<https://www.ecdc.europa.eu/en/antimicrobial-resistance/facts/factsheets/experts>>.

Pristupljeno 7. kolovoza 2020.

ECDC (2020) The European Union Summary Report on Antimicrobial Resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2017/2018, ECDC - European Centre for Disease Prevention and Control.

EC (2010) Council Regulation 37/2010/EU of 22 December 2009 on pharmacologically active substances and their classification regarding maximum residue limits in foodstuffs of animal origin, EC - European Commission. *OJEU*. L15 1-72.

EFSA (2020) Report for 2018 on the results from the monitoring of veterinary medicinal product residues and other substances in live animals and animal product. EFSA Supporting publication 2020:EN-1775, EFSA - European Food Safety Authority. <<https://www.efsa.europa.eu/en/supporting/pub/en-1775>>. Pristupljeno 14. prosinca 2020.

EMA (2010) Reflection paper on the use of macrolides, lincosamides and streptogramins (MLS) in food-producing animals in the European Union: development of resistance and impact on human and animal health, EMA - European Medicines Agency. (EMA/CVMP/SAGAM/741087/2009)

EMA (2020). European database of sales of veterinary antimicrobial agents, EMA - European Medicines Agency, <[https://bi.ema.europa.eu/analyticsSOAP/saw.dll?Dashboard&PortalPath=%2Fshared%2FESVAC%20Public%2F\\_portal%2FAnnual%20Report&Page=Population%20corrected%20sales%20by%20class](https://bi.ema.europa.eu/analyticsSOAP/saw.dll?Dashboard&PortalPath=%2Fshared%2FESVAC%20Public%2F_portal%2FAnnual%20Report&Page=Population%20corrected%20sales%20by%20class)>. Pristupljeno 23. srpnja 2020.

EMA (2019) European Surveillance of Veterinary Antimicrobial Consumption, 'Sales of veterinary antimicrobial agents in 31 European countries in 2017', EMA - European Medicines Agency (EMA/294674/2019).

Fejzuli, L., Solomun Kolanović, B., Šušković, J., Kos, B., Bilandžić, N. (2018) Aminoglikozidni antibiotici - primjena u veterinarstvu i kontrola u hrani životinjskog podrijetla, *Hrvat. čas. prehranbeni tehnol. biotehnol. nutr.* **13(3-4)**, 95-106.

Fernandes, P., Martens, E., Pereira, D. (2017) Nature nurtures the design of new semi-synthetic macrolide antibiotics. *J. Antibiot.* **70**, 527-533.

Golkar, T., Zieliński, M., Berghuis, A.M. (2018) Look and Outlook on Enzyme-Mediated Macrolide Resistance. *Front. Microbiol.* **9**, 1942, <<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2018.01942/full>>.

Pristupljeno 5. listopada, 2020.

Hollenbeck, B. L., Rice, L. B. (2012) Intrinsic and acquired resistance mechanisms in enterococcus. *Virulence*. **3(5)**, 421–433.

HZJZ (2017) Antibiotiska rezistencija, HZJZ - Hrvatski zavod za javno zdravstvo <<https://www.hzjz.hr/aktualnosti/antibiotiska-rezistencija/>>. Pristupljeno 23. srpnja 2020.

Hurd, H.S., Doores, S., Hayes, D., Mathew, A., Maurer, J., Silley, P., Singer, R.S., Jones, R.N. (2004) Public Health Consequences of Macrolide Use in Food Animals: A Deterministic Risk Assessment, *J Food Prot.* **67 (5)**, 980-992.

Johnson, J.R., Kuskowski, M.A., Menard, M., Gajewski, A., Xercavins, M., Garau, J. (2006) Similarity between Human and Chicken *Escherichia coli* Isolates in Relation to Ciprofloxacin Resistance Status. *J Infect Dis.* **194(1)**, 71–78, <<https://doi.org/10.1086/504921>>. Pristupljeno 23. srpnja, 2020.

Kohanski, M. A., Dwyer, D. J., & Collins, J. J. (2010) How antibiotics kill bacteria: from targets to networks. *Nat RevMicrobiol.* **8(6)**, 423–435. doi: 10.1038/nrmicro2333

Kos, B. (2017): predavanja iz modula “Ostatci antibiotika u hrani”, Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu,

[http://www.pbf.unizg.hr/hr/zavodi/zavod\\_za\\_biokemijsko\\_inzenjerstvo/laboratorij\\_za\\_tehnologiju\\_antibiotika\\_enzima\\_probiotika\\_i\\_starter\\_kultura/ostatci\\_antibiotika\\_u\\_hrani](http://www.pbf.unizg.hr/hr/zavodi/zavod_za_biokemijsko_inzenjerstvo/laboratorij_za_tehnologiju_antibiotika_enzima_probiotika_i_starter_kultura/ostatci_antibiotika_u_hrani)

Pristupljeno: 23. studenog 2020.

Lan, C., Yin, D., Yang, Z., Zhao, W., Chen, Y., Zhang, W., Zhang, S. (2019) Determination of Six Macrolide Antibiotics in Chicken Sample by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry Based on Solid Phase Extraction, *J Anal Methods Chem.* **2019**, <<https://www.hindawi.com/journals/jamc/2019/6849457/>>. Pristupljeno 1. listopada, 2020.

Landers, T. F., Cohen, B., Wittum, T. E., Larson, E. L. (2012) A review of antibiotic use in food animals: perspective, policy, and potential. *Public Health Rep.* **127(1)**, 4–22. doi: 10.1177/003335491212700103

Laws, M., Shaaban, A., Rahman, K.M. (2019) Antibiotic resistance breakers: current approaches and future directions. *FEMS Microbiol Rev.* **43(5)**, 490–516, <<https://doi.org/10.1093/femsre/fuz014>>. Pristupljeno 23. srpnja 2020.

Leclercq, R. (2002) Mechanisms of Resistance to Macrolides and Lincosamides: Nature of the Resistance Elements and Their Clinical Implications, *Clin Infect Dis.* **34 (4)**, 482–492, <<https://academic.oup.com/cid/article/34/4/482/412492>>. Pristupljeno 24. rujna 2020.

Makovec, S., Kos, B., Šušković, J., Bilandžić, N. (2014) Tetraciklinski antibiotici i određivanje njihovih rezidua u hrani. *Hrvat čas prehrambenu tehnol biotehnol nutr.* **9**, 7-16.

McGlinchey, T.A., Rafter P.A., Regan, F., McMahon, G.P. (2008) A review of analytical methods for the determination of aminoglycoside and macrolide residues in food matrices, *Anal Chim Acta.* **624**, 1-15.

NCBI (2020) PubChem Compound Summary for CID 3002190, Telithromycin, NCBI - National Center for Biotechnology Information <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Telithromycin>>. Pristupljeno 17. rujna 2020.

Oguić, A. (2018) Određivanje rezidua cefalosporina u mišiću goveda, svinje, peradi i ribe primjenom tekućinske kromatografije ultravisoke djelotvornosti sa spektrometrijom masa i analizatorom vremena preeta (UHPLC/Q-TOF-MS). *Faculty of Food Technology and Biotechnology.* <<https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:928719>> Pristupljeno 30. listopada, 2020.

Park, J.W., Yoon, Y.J. (2019) Recent advances in the discovery and combinatorial biosynthesis of microbial 14-membered macrolides and macrolactones. *J Ind Microbiol Biotechnol.* **46**, 445-458.

Pérez-Rodríguez, F., Mercanoglu Taban, B. (2019) A State-of-Art Review on Multi-Drug Resistant Pathogens in Foods of Animal Origin: Risk Factors and Mitigation Strategies. *Front Microbiol.* **10**, 2091. doi:10.3389/fmicb.2019.02091

Petković, H., Lukežič, T., Šušković, J. (2017) Biosynthesis of Oxytetracycline by *Streptomyces rimosus*: Past, Present and Future Directions in the Development of Tetracycline Antibiotics. *Food Technol Biotechnol.* **55**, 3-13. doi: 10.17113/ftb.55.01.17.4617

Phillips, I., Casewell, M., Cox, T., De Groot, B., Friis, C., Jones, R., Nightingale, C., Preston, R., Waddell, J. (2004) Does the use of antibiotics in food animals pose a risk to human health? A critical review of published data. *J Antimicrob Chemother.* **53**(1), 28–52, <<https://doi.org/10.1093/jac/dkg483>>. Pristupljeno 23. srpnja 2020.

Pray, L. (2008) Transposons: The jumping genes. *Nature Education.* **1**(1), 204.

Šušković, J., Kos, B., Novak, J. (2020a) Tehnologija antibiotika (interna skripta, predavanja). Dostupno na: <<https://moodle.srce.hr/2019-2020/course/view.php?id=57229>>. Pristupljeno: 20.10.2020.

Šušković, J., Kos, B., Šantek, B., Kniewald, Z., Mrša, V., Hruškar, M., Frece, J., Gaurina Srček, V., Slavica, A., Novak, J., Leboš Pavunc, A. (2020b) Biotehnologija u Hrvatskoj – povijesna baština i suvremeni trendovi, *Annual of the Croatian Academy of Engineering.* **2019**(1), str. 438-484.

Tang, K.L., Caffrey, N.P., Nobrega, D.B., Cork, S.C., Ronksley, P.E., Barkema, H.W., Polachek, A.J., Ganshorn, H., Sharma, N, Kellner, J.D., Ghali, W.A. (2017) Restricting the use of antibiotics in food-producing animals and its associations with antibiotic resistance in food-producing animals and human beings: a systematic review and meta-analysis. *Lancet*

*Planet Health*. **1(8)**, 316-327, <[https://doi.org/10.1016/S2542-5196\(17\)30141-9](https://doi.org/10.1016/S2542-5196(17)30141-9)>. Pristupljeno 23. srpnja, 2020.

Van, T.T.H., Yidana, Z., Snooker, P.M., Coloe, P.J. (2020) Antibiotic use in food animals worldwide, with a focus on Africa: Pluses and minuses. *J Glob Antimicrob Resist*. **20**, 170-177, <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2213716519301985?via%3Dihub>>. Pristupljeno 23. srpnja 2020.

van Duin, D., Paterson, D. L. (2016) Multidrug-Resistant Bacteria in the Community: Trends and Lessons Learned. *InfectDis Clin North Am*. **30(2)**, 377–390. doi: 10.1016/j.idc.2016.02.004

Varenina, I., Božić Luburić, Đ., Bilandžić, N. (2020) Analitička metoda: Određivanje veterinarskih lijekova primjenom UPLC-MS-MS. *Hrvatski veterinarski institut*.

Ventola C. L. (2015) The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats. *P T*. **40(4)**, 277–283, <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4378521/>>. Pristupljeno 23. srpnja 2020.

## IZJAVA O IZVORNOSTI

Izjavljujem da je ovaj diplomski rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristila drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

Marta Spahija

Ime i prezime studenta