

Detekcija ostataka enrofloksacina u kozumnom pilećem mesu mikrobiološkom (test inhibicije rasta) i ELISA metodom nakon eksperimentalne profilaktičke i terapijske aplikacije

Članjak,¹ E., M. Smajlović¹, F. Čaklovića¹, D. Alagić¹, K. Čaklovića¹, A. Smajlović²

Znanstveni rad

Sažetak

U radu su predstavljeni rezultati detekcije ostataka enrofloksacina u mišićnom tkivu i tkivu jetre brojlera nakon eksperimentalne aplikacije profilaktičkih i terapijskih doza ispitujućeg lijeka. Za detekciju ostataka enrofloksacina u mišićnom tkivu i tkivu jetre korištene su dvije metode: mikrobiološka metoda (test inhibicije rasta) i ELISA test. Cilj istraživanja je ispitati pouzdanost metode mikrobiološkog testa inhibicije rasta (difuzijska metoda) uz primjenu referentnog soja *E. coli* ATCC 10 536 kao test-mikroorganizma za detekciju rezidua enrofloksacina u konzumnom mesu brojlera, te usporediti primijenjene metode. Phi koeficijentom korelacije ustanovljeno je da postoji statistički visoko signifikantna pozitivna korelacija ($p < 0,001$) između podataka mikrobiološke i ELISA metode i u uzorcima mišićnog tkiva i u tkivu jetre, te da u eksperimentalnim uvjetima, mikrobiološka i ELISA metoda daju jednako pouzdane rezultate detekcije dozvoljenih količina rezidua enrofloksacina, iako je riječ o različitim mjerama (mm ili ppb) istog fenomena.

Ključne riječi: enrofloksacin, test inhibicije rasta, ELISA

Uvod

U posljednjih deset godina primjena enrofloksacina, kao jednog od predstavnika fluorokinolona, vidno je porasla širom svijeta, podjednako u humanoj i veterinarskoj medicini. Istovremeno je uočen i porast rezistentnosti patogena naročito onih koji uzrokuju oboljenja kod ljudi a koji se prenose hranom, kao što su bakterije *Salmonella* spp. i *Campylobacter* spp. (Giguère i sar., 2007).

Analiza ostataka veterinarskih lijekova u proizvodima animalnog podrijetla posljednjih godina je u intenzivnom razvoju i predstavlja novi trend s aspekta sigurnosti hra-

ne. Ovaj razvoj se odvija u pravcu pronalaženja bržih i osjetljivijih „screening“ metoda za detekciju ostataka u proizvodima animalnog podrijetla, te sofisticiranih metoda za potvrdu rezultata dobivenih „screening“ pretragama (De Brabander i sar., 2009.). Maksimalni limiti ostataka za enrofloksacin u EU regulirani su u Tablici 1. Aneksa Regulative 37/2010 (EC, 2010.), i iznose 100 µg/kg za mišićno tkivo i 200 µg/kg za tkivo jetre.

Enrofloksacin je sintetski kemoterapeutik iz grupe fluorokinolona. Fluorokinoloni spadaju u preostale tri generacije (II,III i IV) kinolona. Kada su se, zbog jačine i širine antimikrob-

nog spektra djelovanja, kao i male toksičnosti, pojavili u kliničkoj praksi osamdesetih godina prošlog stoljeća, smatrali su se skoro „idealnim“ antimikrobnim preparatom (Giguère i sar., 2007.). Enrofloksacin, zajedno s ciprofloksacinom, orbifloksacinom, difloksacinom, danofloksacinom, marbofloksacinom, sarafloksacinom, te norfloksacinom spada u drugu generaciju antimikrobnih lijekova. Enrofloksacin inhibira funkciju dva enzima, topoizomeraze II i topoizomeraze IV. Topoizomeraza II (DNK – giraza) je odgovorna za replikaciju DNK (sekundarnu spiralizaciju linearne dvostruke uvojnice DNK) u jezgri bakterijske stanice (Bonagura, 2000;

¹ mr. Enida Članjak, suradnik; dr. sdc. Muhamed Smajlović, docent; dr. Faruk Čaklovića, redoviti profesor; mr. Davor Alagić, viši asistent; mr. Kenan Čaklovića, asistent; Katedra za higijenu i tehnologiju namirnica Veterinarskog fakulteta Univerziteta u Sarajevu, Zmaja od Bosne 90, 71 000 Sarajevo, Bosna i Hercegovina

² mr. Ahmed Smajlović, viši asistent, Katedra za farmakologiju i toksikologiju Veterinarskog fakulteta Univerziteta u Sarajevu, Zmaja od Bosne 90, 71 000 Sarajevo, Bosna i Hercegovina

Tablica 1. Raspored aplikacije enrofloksacina tijekom eksperimenta

Eksperimentalna skupina	Vrijeme aplikacije lijeka	Koncentracija lijeka u ppm	Broj životinja po skupini
Profilaktička skupina (P)	1) Terapiranje životinja profilaktičkom dozom u periodu od 1. do 7. dana tova	60 ppm	42
Skupina 1 (G1)	1) Terapiranje životinja profilaktičkom dozom u periodu od 1. do 7. dana tova 2) Terapiranje životinja terapijskom dozom u periodu od 25. do 31. dana tova	100 ppm	42
Skupina 2 (G2)	1) Terapiranje životinja profilaktičkom dozom u periodu od 1. do 7. dana tova 2) Terapiranje životinja dozom 2x većom u odnosu na terapijsku u periodu od 25. do 31. dana tova	200 ppm	42
Skupina 3 (G3)	1) Terapiranje životinja profilaktičkom dozom u periodu od 1. do 7. dana tova 2) Terapiranje životinja terapijskom dozom u periodu od 34. do 41. dana tova	130 ppm	42
Skupina 4 (G4)	1) Terapiranje životinja profilaktičkom dozom u periodu od 1. do 7. dana tova 2) Terapiranje životinja dozom 2x većom u odnosu na terapijsku u periodu od 34. do 41. dana tova	260 ppm	42

Boothe, 2001.). To je proces koji je neophodan za grupiranje bakterijskih kromosoma unutar stanice (Dollery, 1999.). Kod gram-negativnih uzročnika enrofloksacin inhibira enzim DNK-girazu vežući se za njenu subjedinicu A, čime se onemogućava i sinteza mRNK. (Bonagura, 2000.; Boothe, 2001.). Enrofloksacin, kao i drugi fluorokinoloni, ima širok spektar djelovanja koje pokazuje u daleko manjim koncentracijama u odnosu na tradicionalne antibiotike, kao što su penicilini, cefalosporini, tetraciklini, makrolidi, kao i na sulfonamide (Rivier i Papich, 2009.).

Enrofloksacin se primjenjuje peroralno (s hranom, zamjenom za mlijeko ili u vodi za piće) i parenteralno (s/c ili i/m), te se nakon resorpcije, kao i drugi fluorokinoloni, dobro i brzo distribuira po svim tkivima organizma zahvaljujući svojoj izrazitoj lipofilnosti i slaboj ionizaciji (Prescott, J. F., 2000.). Enrofloksacin se metabolizira do aktivnog metabolita

ciprofloksacina koji se i sam koristi u terapiji (Anadon, 1995.).

Materijal i metode

Istraživanje je provedeno na ukupno 210 brojlera podijeljenih u pet skupina: profilaktička skupina (P) i četiri pokusne skupine (G1, G2, G3 i G4). Svaka se sastojala od 42 brojlera ujednačene tjelesne mase. Pilići su smješteni u 5 boksova pripremljenih unutar proizvodnog objekta farme. Tijekom cijelog perioda tova, pilići su hranjeni po principu *ad libitum* (podne hranilice), dok je napajanje bilo putem sistema za napajanje (nipl-pojilice). Tov pilića je trajao 42 dana. Tijekom pokusnog perioda pilići su hranjeni s tri vrste krmnih smjesa. Starter smjesa (PT-1) korištena je od 0. do 14. dana, „grover“ od 15. do 35. dana i „finašer“ (PT-3) od 36. do 42. dana tova. Kod svih eksperimentalnih skupina sproveden je imunoprofilaktički postupak, odnosno vakcinacija brojlera prema utvrđenom programu imunoprofilakse. Za eksperimentalnu apli-

kaciju lijeka je korišten Vetoflok 10% prašak® („Veterina“ d.o.o, Kalinovica, Hrvatska), a režim doziranja i način pripreme apliciranog lijeka izvršen je na osnovu preporuke proizvođača. U Tablici 1. su prikazani podaci o apliciranim koncentracijama enrofloksacina u hrani tijekom eksperimenta.

Posljednjih 8 dana tova, odnosno od 34-og dana iz svake skupine su izdvajana po 4 brojlera te u odvojenim i jasno obilježenim kutijama transportirani do klaonice. Nakon klanja, trupovi i jetra su odvojeno pakovani u plastične vrećice obilježene oznakom skupine, danom klanja i brojem uzorka. Odmah nakon klanja uzorci su dostavljeni u laboratorij Katedre za higijenu namirnica Veterinarskog fakulteta u Sarajevu. Za analize su korišteni trupovi i jetra od tri eksperimentalne životinje, a trup i jetra četvrte eksperimentalne životinje su pohranjivani kao rezervni uzorak. Trupovi brojlera namijenjenih za analizu dijelili su se na 3 dijela i čuvali na temperaturi od minimalno -20 °C do početka analiza, odnosno do završetka klanja svih životinja.

Mikrobiološka metoda (test inhibicije rasta – postupak „jedne ploče“)

Metoda je rađena prema Kirbišu (2007.). Kao test mikroorganizam za detekciju ostataka enrofloksacina korišten je referentni soj *E. coli* ATCC 10536 koji je prethodno obogaćen u ml tripton-soja bujonu (Oxoid, UK), inkubiran na 37°C tijekom 1 sata, te inokuliran na krvni agar i inkubiran narednih 16 sati na temp. 37°C. Za test su korištene isključivo svježe i čiste kulture *E. coli* ATCC 10 536 pripremljene na navedeni način. Kao medij za pripremu testnih ploča korišten je agar za detekciju antibiotika No. 2 (Merck, Njemačka). Agar pripremljen prema uputi proizvođača (pH=8.0) je autoklaviran na temperaturi od 121°C tokom 15 minuta i ohlađen na 40°C. Suspenzija *E. coli* ATCC 10 536 je pripremljena u fiziološkoj otopini gustoće 1 McFarland stepen, što odgo-

Tablica 2. Rezultati detekcije rezidua enrofloksacina metodom mikrobiološkog testa inhibicije rasta (dijametar zone inhibicije rasta u mm) u mišićnom tkivu brojlera po danima klanja. LOD mikrobiološkog testa = 50 ppb. Veličina zone inhibicije rasta testnog mikroorganizma (pozitivna kontrola) iznosila je 13 mm, što odgovara vrijednosti MRL za mišićno tkivo peradi od 100 ppb.

Oznaka eksperimentalne grupe	Oznaka uzorka	Dan klanja							
		1	2	3	4	5	6	7	8
P	1	< 13	< 13	< 13	< 13	< 13	< 13	< 13	< 13
	2	< 13	< 13	< 13	< 13	< 13	< 13	< 13	< 13
	3	< 13	< 13	< 13	< 13	< 13	< 13	< 13	< 13
G1	1	< 13	< 13	< 13	< 13	< 13	< 13	< 13	< 13
	2	< 13	< 13	< 13	< 13	< 13	< 13	< 13	< 13
	3	< 13	< 13	< 13	< 13	< 13	< 13	< 13	< 13
G2	1	< 13	< 13	< 13	< 13	< 13	< 13	< 13	< 13
	2	< 13	< 13	< 13	< 13	< 13	< 13	< 13	< 13
	3	< 13	< 13	< 13	< 13	< 13	< 13	< 13	< 13
G3	1	28	35	32	30	28	30	29	28
	2	26	34	33	32	39	32	28	33
	3	30	33	34	32	30	30	30	30
G4	1	34	40	38	39	40	38	40	36
	2	34	39	37	35	38	35	34	40
	3	32	38	35	38	38	37	35	38

Tablica 3. Rezultati analiza detekcije rezidua enrofloksacina metodom mikrobiološkog testa (dijametar zone inhibicije rasta u mm) u jetri* eksperimentalnih životinja po danima klanja; LOD mikrobiološkog testa = 50 ppb. Veličina zone inhibicije rasta testnog mikroorganizma (pozitivna kontrola) iznosila je 22 mm, što odgovara vrijednosti MRL za mišićno tkivo peradi od 200 ppb.

Oznaka eksperimentalne grupe	Oznaka uzorka	Dani klanja							
		I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
P*	1								
	2	<22	<22	<22	<22	<22	<22	<22	<22
	3								
G1*	1								
	2	<22	<22	<22	<22	<22	<22	<22	<22
	3								
G2*	1								
	2	<22	<22	<22	<22	<22	<22	<22	<22
	3								
G3*	1								
	2	30	32	31	32	32	30	31	38
	3								
G4*	1								
	2	42	43	45	45	38	42	45	43
	3								

* vrijednost za zbirni uzorak od 3 jetre brojlera iz iste eksperimentalne skupine

vara $1,6 \times 10^7$ cfu/ml agara, gdje je od toga dodano 0,2 ml u 50 ml prethodno pripremljenog i ohlađenog agara za detekciju antibiotika No. 2. Nakon toga, 10 ml pripremljenog ispitujućeg medija stavljeno je u Petrijeve

ploče promjera 90 mm. Srednja vrijednost zone inhibicije rasta za koncentraciju od 100 ppb je iznosila 13 mm, a za koncentraciju od 200 ppb 22 mm. U testne ploče s prethodno napravljenim udubljenjima aplicira-

no je 100 μ l ispitujućeg uzorka, odnosno ekstrahiranog mesnog fluida. Ploče su inkubirane na 37 °C 18-24 sata. U svakoj testnoj ploči je napravljena pozitivna kontrola sa standardima enrofloksacina (Sigma Aldrich,

Njemačka), u koncentraciji od 100 ppb za mišićno tkivo i 200 ppb za jetru. Nakon inkubacije mjerene su zone inhibicije rasta (u mm) kod pozitivne kontrole i ispitujućih uzoraka.

ELISA test za detekciju enrofloksacina

Za detekciju rezidua enrofloksacina u pilećem mišiću i jetri ELISA metodom korišteni su komercijalni ELISA kitovi (Max-Signal®-Enrofloxacin ELISA Test Kit, Bioo Scientific, SAD), prema uputi proizvođača. Očitavanje je vršeno pomoću ELISA čitača (IDEXX, SAD), na valnoj duljini od 450 nm. Interpretacija rezultata je izvršena korištenjem identifikacijskog softvera BIOO MaxSignal® ELISA Analysis Program (Bioo Scientific, SAD).

Statistička obrada podataka rezultata analiza uzoraka rađena je primjenom programa SPSS 17 (eng. Statistical Package for Social Sciences). Za utvrđivanje stepena asociranosti podataka dobivenih jednom odnosno drugom metodom, primijenjen je izračun phi koeficijenta korelacije (j ili r).

Rezultati i rasprava

Rezultati detekcije rezidua enrofloksacina u mišićnom tkivu analiziranih metodom mikrobiološkog testa predstavljeni su u Tablici 2. Analizirani uzorci mišićnog tkiva iz profilaktičke skupine (P), te skupina G1 i G2 su bili negativni tokom svih osam dana klanja dok su zone inhibicije rasta kod svih analizirani uzoraka iz skupina G3 i G4 bile veće od 13 mm, te su smatrani pozitivnim uzorcima. Zone inhibicije rasta kod uzoraka iz skupine G3, gdje je životinjama aplicirana terapijska doza enrofloksacina, kretale su se u rasponu od 26 do 39 mm, dok su za grupu G4, gdje je životinjama aplicirana doza dva puta veća u odnosu na terapijsku, zone inhibicije rasta bile još izraženije i kretale su se u rasponu od 32 do 40 mm.

U Tablici 3. prikazana su očitavanja

Tablica 4. Rezultati detekcije rezidua enrofloksacina ELISA metodom (ppb* ± SD) u mišićnom tkivu eksperimentalnih životinja po danima klanja. LOD ELISA metode = 3,5 ppb; boldirane vrijednosti su iznad MRL za mišićno tkivo peradi (>100 ppb).

Oznaka eksperimentalne grupe	Oznaka uzorka	Dani klanja							
		1	2	3	4	5	6	7	8
P*	1								
	2	<3,5	<3,5	<3,5	<3,5	<3,5	<3,5	<3,5	<3,5
	3								
G1*	1								
	2	24,26 ±1,0	20,15 ±3,13	8,22 ±1,08	6,5 ±0,95	3,39 ±0,37	<3,5	<3,5	<3,5
	3								
G2*	1								
	2	28,40 ±1,32	24,15 ±0,53	12,43 ±0,41	7,36 ±3,47	4,69 ±0,17	<3,5	<3,5	<3,5
	3								
G3*	1								
	2	258,27 ±23,93	259,47 ±26,74	309,13 ±40,85	290,72 ±20,05	249,79 ±11,93	282,28 ±22,42	328,76 ±21,5	390,43 ±7,25
	3								
G4*	1								
	2	486,95 ±75,51	592,30 ±71,13	493,99 ±39,80	551,85 ±27,34	663,62 ±31,84	457,91 ±77,72	578,33 ±29,95	709,75 ±50,46
	3								

* - srednja vrijednost iz tri uzorka mišićnog tkiva

Tablica 5. Rezultati detekcije rezidua enrofloksacina ELISA metodom (ppb) u jetri eksperimentalnih životinja po danima klanja; LOD ELISA metode = 3,5 ppb; boldirane vrijednosti su iznad MRL za jetru peradi (> 200 ppb).

Oznaka eksperimentalne grupe	Oznaka uzorka	Dani klanja							
		1	2	3	4	5	6	7	8
P*	1								
	2	<3,5	<3,5	<3,5	<3,5	<3,5	<3,5	<3,5	<3,5
	3								
G1*	1								
	2	72,53	52,43	45,09	31,84	28,78	25,76	17,68	13,79
	3								
G2*	1								
	2	240,40	109,47	81,77	64,50	29,18	21,09	19,52	15,88
	3								
G3*	1								
	2	700,78	888,41	881,18	845,87	648,67	567,98	683,83	773,09
	3								
G4*	1								
	2	988,07	1023,72	1060,65	1009,86	745,85	820,34	940,76	993,50
	3								

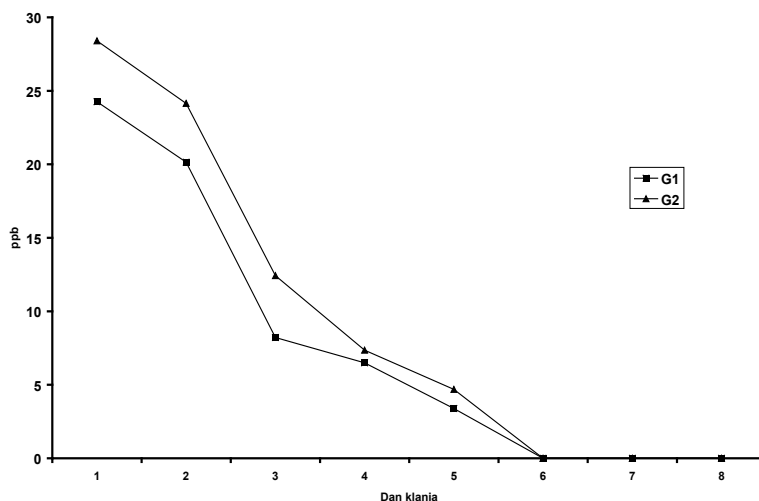
* vrijednost za zbirni uzorak od 3 jetre brojlera iz iste eksperimentalne skupine

zona inhibicije rasta u analiziranim uzorcima jetre eksperimentalnih životinja. Ovi rezultati pokazuju sličan trend kao i kod uzoraka mišićnog

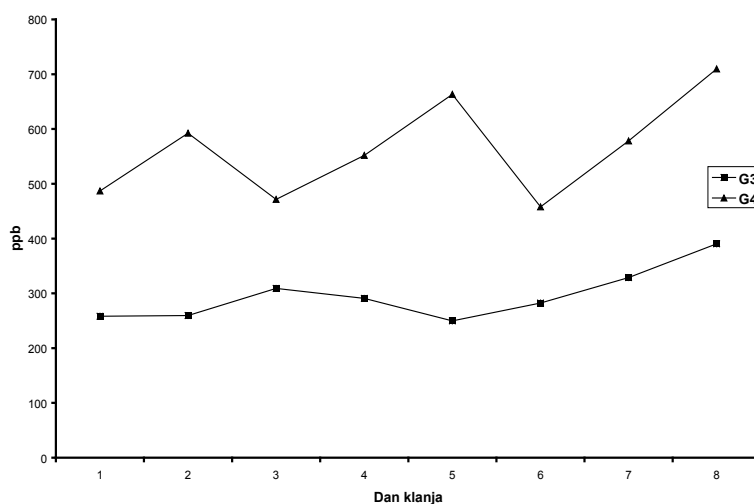
tkiva, gdje su svi analizirani uzorci iz profilaktičke skupine (P), te skupina G1 i G2 bili negativni, odnosno koncentracije rezidua enrofloksacina su

bile ispod MRL-a. Zone inhibicije rasta za sve analizirane uzorke jetre iz skupine G3 i G4 tijekom svih dana klanja su bile iznad 22 mm i kretale se u rasponu od 30 do 38 mm za skupinu G3 i 38 do 45 mm za skupinu G4.

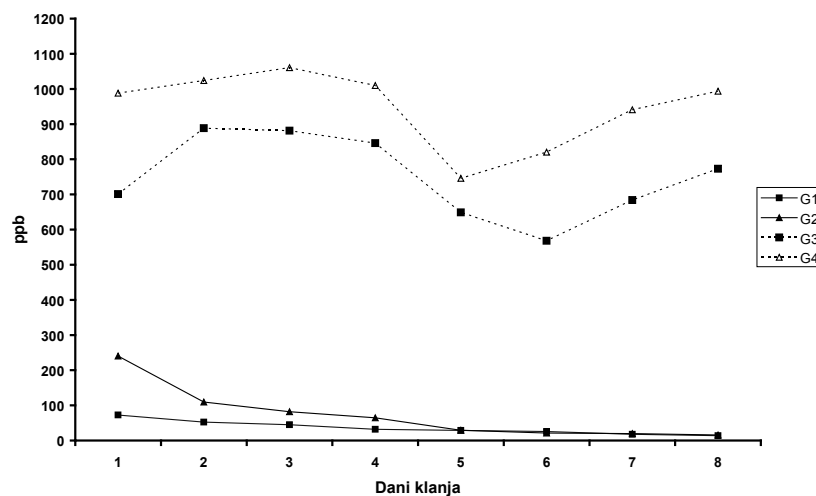
Rezultati detekcije rezidua enrofloksacina ELISA metodom u mišićnom tkivu (Tablica 4) pokazuju da su svi uzorci iz profilaktičke skupine (P) tijekom svih dana klanja bili negativni, te da su koncentracije rezidua enrofloksacina bile ispod nivoa detekcije (< 3,5 ppb). Koncentracija rezidua enrofloksacina u uzorcima mišićnog tkiva uzetih prvog dana klanja iz eksperimentalne skupine G1 je bila ispod MRL-a i kretala se u rasponu od $24,26 \pm 1,0$ ppb, a u uzorcima uzetim od prvog do osmog dana klanja može se uočiti trend konstantnog smanjenja koncentracija enrofloksacina. U istoj eksperimentalnoj skupini uočen je nagli pad koncentracija enrofloksacina u uzorcima jetre uzetim trećeg dana klanja, dok su ove koncentracije u uzorcima uzetim od šestog do osmog dana klanja bile ispod limita detekcije (Grafikon 3). Nivoi detekcije rezidua uzoraka iz skupine G2 1. dana klanja su bili nešto viši u odnosu na iste uzorke iz skupine G1, ali su i dalje bili niži u odnosu na MRL i kretali su se u rasponu od $28,40 \pm 1,32$ ppb. I u ovoj eksperimentalnoj grupi uočen je trend konstantnog pada koncentracija rezidua enrofloksacina tijekom narednih dana klanja, te je, slično kao i kod eksperimentalne grupe G1, uočen nagli pad koncentracija trećeg dana klanja. Od šestog do osmog dana klanja zabilježene su koncentracije enrofloksacina ispod limita detekcije (Grafikon 1). Rezultati detekcije enrofloksacina za eksperimentalne skupine G3 i G4 pokazuju da su analizirani uzorci iz obje grupe već prvog dana klanja bili pozitivni, odnosno da su koncentracije enrofloksacina bile daleko iznad maksimalno dozvoljenog limita. Koncentracije rezidua ispitujućeg antibiotika u uzorcima eksperimentalne skupine



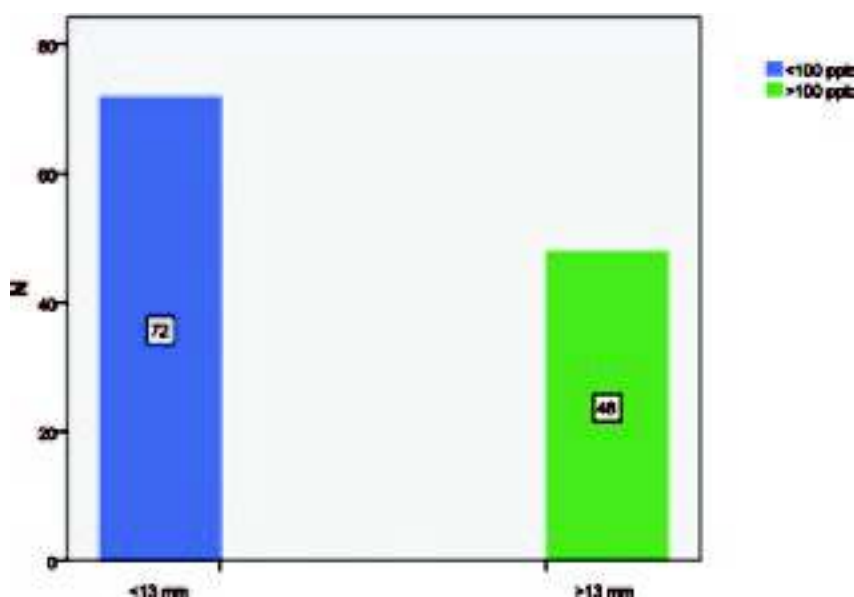
Grafikon 1. Dinamika srednjih vrijednosti koncentracije enrofloksacina (ppb) u uzorcima mišićnog tkiva brojlera (n = 3) za eksperimentalne skupine G1 i G2 po danima klanja primjenom ELISA metode



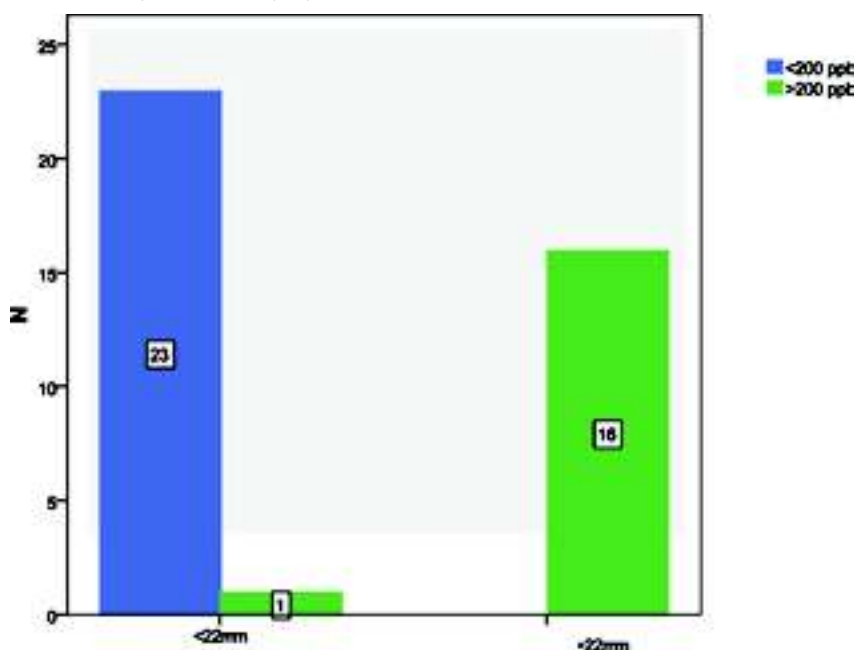
Grafikon 2. Dinamika srednjih vrijednosti koncentracije enrofloksacina (ppb) u uzorcima mišićnog tkiva brojlera (n = 3) za eksperimentalne skupine G3 i G4 po danima klanja primjenom ELISA metode



Grafikon 3. Dinamika koncentracija rezidua enrofloksacina (ppb) u zbirnim uzorcima jetre 3 brojlera za eksperimentalne skupine G1, G2, G3 i G4 primjenom ELISA metode.



Grafikon 4. Korelacija rezultata ispitivanja rezidua enrofloksacina u uzorcima mišićnog tkiva (n = 120) dobivenih metodom mikrobiološkog testa i ELISA metodom. Koeficijent korelacije (j) = 1,00; p << 0,001.



Grafikon 5. Korelacija rezultata ispitivanja rezidua enrofloksacina u uzorcima jetre (n = 40) dobivenih metodom mikrobiološkog testa i ELISA metodom. Koeficijent korelacije (j) = 0,95; p << 0,001.

G3 prvog dana klanja su se kretale od $258,27 \pm 23,93$ ppb. Tijekom narednih sedam dana klanja nivo rezidua enrofloksacina u uzorcima iz eksperimentalne skupine G3 je bio konstantan s nešto blažim oscilacijama zabilježenih koncentracija (Grafikon 2). Od drugog do trećeg dana klanja uočava se blagi porast koncentracija, a zatim

blagi pad do petog dana klanja, te ponovni porast do posljednjeg dana klanja, gdje su zabilježene i najveće koncentracije: $390,43 \pm 7,25$ ppb.

Ostaci enrofloksacina su također detektirani u uzorcima iz eksperimentalne skupine G4 u svim danima klanja u znatno višim koncentracija-

ma u odnosu na ostale eksperimentalne skupine (Grafikon 2). Već prvog dana klanja zabilježene su koncentracije od $486,95 \pm 75,51$ ppb, a počevši od trećeg do petog dana uočava se blagi trend porasta koncentracija. Najniža zabilježena vrijednost očitanih koncentracija enrofloksacina izmjerena je šestog dana i iznosila je $457,91 \pm 77,72$ ppb, a nakon toga uslijedio je porast do osmog dana gdje je ujedno zabilježena i najveća koncentracija rezidua enrofloksacina u odnosu na sve eksperimentalne skupine i sve dane klanja ($709,75 \pm 50,46$). Rezultati detekcije rezidua enrofloksacina ELISA metodom u uzorcima jetre prikazani su u Tablici 5. i Grafikonu 3. Uzorci jetre iz profilaktičke skupine (P) tijekom svih dana klanja su bili negativni tj. nivoi detektiranih rezidua su bili ispod limita detekcije i MRL-a. Skupni uzorak jetre od tri brojlera iz iste eksperimentalne skupine (G1) prvog dana klanja je bio negativan odnosno koncentracije rezidua enrofloksacina su bile ispod MRL (200 ppb) i iznosile su 72.529 ppb. Tijekom narednih dana klanja uočava se blagi pad koncentracija detektiranih rezidua, a posljednji dan klanja (8. dan) koncentracija rezidua iznosila je 13.79 ppb. Analizom rezultata uzoraka jetre iz prve skupine G2 uočavamo da je samo uzorak iz ove skupine prvog dana klanja bio pozitivan s očitom vrijednošću 240.40 ppb, a od drugog do osmog dana klanja uočava se konstantni pad koncentracija s vrijednostima ispod MRL. Koncentracije rezidua enrofloksacina u uzorcima jetre iz eksperimentalne skupine G3 su bile izrazito visoke i već od prvog dana klanja je iznosila 700.78 ppb, a najveća koncentracija je zabilježena drugog dana klanja i iznosila je 888.41 ppb. Tijekom narednih dana klanja uočavaju se blage oscilacije u nađenim koncentracijama u vidu smanjenja koncentracija od trećeg i šestog dana klanja, te blagog povećanja do posljednjeg dana klanja, gdje je koncentracija rezidua enrofloksacina osmi dan iznosila

773.09 ppb. Koncentracije rezidua eksperimentalne skupine G4 su veće u odnosu na grupu G3 s inicijalnom koncentracijom 988.07 ppb u prvom danu klanja, a zatim slijedi blagi porast koncentracija drugog, trećeg i četvrtog dana klanja, kad su utvrđene i najveće koncentracije u ovoj skupine 1023.72, 1060.65 i 1009.86 ppb, te je uslijedio pad koncentracije petog dana, a koja je ujedno i najniža koncentracija ove skupine (745.85 ppb). Nakon toga uslijedio je porast šestog, sedmog i osmog dana klanja, gdje su očitane koncentracije od 820.34, 940.76 i 993.50 ppb.

Anadon i sur. (1995.) su također proveli sličan eksperiment tretirajući piliće s 10/mg/kg/dan tijekom četiri dana. Dan nakon posljednje aplikacije lijeka utvrdili su 540 ng/g enrofloksacina i 650 ng/g ciprofloksacina u mišićnom tkivu, te 990 ng/g enrofloksacina i 960 ng/g ciprofloksacina u jetri.

Slična istraživanja su provedena od strane Petrovića i sur. (2006.) s ciljem utvrđivanja ciljnog tkiva ostataka enrofloksacina i njegovog osnovnog metabolita ciprofloksacina, te su peroralno tretirali piliće enrofloksacinom dozom od 10/mg/kg/dan tijekom pet dana. Uzorci mišićnog tkiva i jetre tretiranih životinja tokom pet dana terapijskog perioda su bili pozitivni, odnosno dostigli su vrijednosti iznad MRL-a, a koncentracije rezidua enrofloksacina u jetri su bile i do 3,8 puta veće u odnosu na uzorke mišićnog tkiva. Četvrtog dana od posljednjeg terapijanja nisu utvrđene koncentracije lijeka u ispitujućim uzorcima, što je u skladu s našim rezultatima.

Usporedbom ukupnih rezultata primijenjenih „screening“ metoda detekcije ostataka enrofloksacina u uzorcima mišićnog tkiva i jetre iz profilaktičke skupine (P) uočljivo je da su svi uzorci bili negativni, odnosno da su nađene koncentracije bile ispod

MRL-a. U izvještaju European Medicines Agency (Anonymous, 1998.) se mogu pronaći slični podaci o rezultatima analiza iz sličnog eksperimenta, gdje se navodi da su koncentracije ostataka enrofloksacina 15. dan od posljednje aplikacije bile ekstremno niske, što opravdava naše nalaze da 35 dana od posljednje aplikacije terapijske doze enrofloksacina, njegova koncentracija je bila ispod MRL.

Phi koeficijentom korelacije ustanovljeno je da postoji statistički visoko signifikantna pozitivna korelacija ($p \ll 0,001$) između podataka mikrobiološke i ELISA metode (uz nivo signifikantnosti manji od 5%) u smjeru: ako ELISA >100 ppb, onda mikrobiološki test >13mm i obratno, neovisno o vremenu uzimanja uzorka (redni dan klanja), odnosno količini apliciranog enrofloksacina (Grafikon 4). Drugim riječima, u eksperimentalnim uvjetima, mikrobiološka i ELISA metoda daju jednako pouzdane rezultate detekcije dozvoljenih količina ostataka enrofloksacina, iako je riječ o različitim mjerama (mm ili ppb) istog fenomena. Od 72 uzorka mišićnog tkiva prikupljenih tijekom osam dana klanja, u različitim eksperimentalnim skupinama brojlera, a koji su na ELISA testu pokazali negativan rezultat (količina rezidua manja od 100 ppb koliko iznosi MRL za mišićnog tkivo), svih 72 uzorka rezultiralo je također negativnim mikrobiološkim testom (MRL > 13 mm). S druge strane, ostalih 48 uzoraka pozitivnih ELISA metodom (MRL > 100 ppb), također su bili pozitivni mikrobiološkim testom (MRL > 13 mm). Niti jedan slučaj nije zabilježen kao slučaj koji odstupa od gore navedenih nalaza, zbog čega ove dvije dijagnostičke metode pokazuju 100% pozitivnu korelaciju ($j = 1,00$).

Osim mišićnog tkiva, ove dvije metode za detekciju ostataka enrofloksacina primijenjene su i na jetri. Dozvoljeni MRL za jetru iznosi 200 ppb, tako da je ova vrijednost korištena

kao kriterij dihotomije podataka (pozitivno-negativno) dobivenih ELISA metodom, dok je kod mikrobiološke metode taj granični kriterij iznosio 22 mm dijametra zone inhibicije rasta testnog mikroorganizma.

Phi koeficijentom korelacije ustanovljeno je da postoji statistički značajna pozitivna korelacija između podataka dobivenih mikrobiološkom metodom i ELISA metodom (uz nivo signifikantnosti manji od 5%) u smjeru: ako ELISA >200 ppb, onda mikrobiološki test >22 mm i obratno, neovisno o vremenu uzimanja uzorka (redni dan klanja), odnosno količini apliciranog enrofloksacina (Grafikon 5). Od 23 uzorka jetre prikupljenih tijekom osam dana klanja u različitim eksperimentalnim skupinama brojlera, a koja su na ELISA testu rezultirala količinom rezidua manjom od 200 ppb (negativni uzorci), također je rezultiralo i negativnim mikrobiološkim testom (dijametar zone inhibicije < 22 mm). S druge strane, od ostalih 17 slučajeva koji su ELISA testom rezultirali pozitivnim nalazom (> 200 ppb), zabilježen je samo jedna slučaj mikrobiološkog testiranja koji je rezultirao dijametrom zone inhibicije većim od 22 mm. Naravno, taj jedan slučaj nije dovoljno veliko odstupanje od ostatka podataka da bi se narušila signifikantnost korelacije ($j = 0,95$; $p \ll 0,001$) između mikrobiološkog testa i ELISA testa i kada je riječ o jetri, a ne samo mišićnom tkivu.

Zaključci

Metoda mikrobiološkog testa inhibicije rasta (difuzijska metoda) uz primjenu referentnog soja *E. coli* ATCC 10 536 kao test-mikroorganizma, može se smatrati dovoljno pouzdanom metodom za detekciju ostataka enrofloksacina u konzumnom mesu brojlera u odnosu na vrijednosti MRL;

U eksperimentalnim uvjetima, mikrobiološka i ELISA metoda daju jednako pouzdane rezultate detekcije rezidua enrofloksacina u konzumu

Detektion der Rückständen von Enrofloxacin im Hühnerkonsumfleisch mittels mikrobiologischem Hemmstofftest und ELISA Methode nach der experimentalen prophylaktischen und therapeutischen Applikation

Zusammenfassung

In der Arbeit sind Resultaten der Detektion der Rückständen von Enrofloxacin in Muskel- und Lebergewebe von Broilern nach der experimentalen Applikation der prophylaktischen und therapeutischen Dosen des zu prüfenden Medikamentes dargestellt. Zur Detektion der Rückständen von Enrofloxacin in Muskel- und Lebergewebe wurden zwei Methoden verwendet: mikrobiologische Hemmstofftest und ELISA Methode. Das Ziel dieser Untersuchung war, die Zuverlässigkeit der Methode des mikrobiologische Hemmstofftest der Wachsinhibition (Diffusionsmethode) unter Anwendung der Referentart *E. coli* ATCC 10 536 als Testorganismus für Detektion der Rückständen von Enrofloxacin im Konsumfleisch von Broilern festzustellen, sowie die verwendeten Methoden zu vergleichen. Durch den Phi Korrelationskoeffizient wurde festgestellt, dass eine statistisch hohe signifikante positive Korrelation ($p < 0,001$) zwischen den Angaben des mikrobiologische Hemmstofftest und der ELISA Methode sowohl in den Mustern des Muskelgewebes als auch in den Mustern des Leber gewebes besteht, und dass in experimentalen Bedingungen der mikrobiologische Hemmstofftest und die ELISA Methode gleichwertig zuverlässige Resultate für die Detektion der erlaubten Mengen des Rückständen von Enrofloxacin geben, obwohl es um verschiedene Maße (mm und ppb) desselben Phänomens geht.

Schlüsselwörter: Enrofloxacin, mikrobiologische Hemmstofftest, ELISA

Ricerca dei residui di enroflossacina in carni pollami di consumo usando il metodo microbiologico (il testo di inibizione della crescita), e il metodo ELISA dopo l'applicazione sperimentale profilattica e terapeutica

Sommario

polli da carne (i 'brojler') dopo l'applicazione sperimentale di dosi profilattiche e terapeutiche del farmaco da testo. Per la ricerca dei residui di enroflossacina nel tessuto muscolare e nel tessuto del fegato sono stati usati i due seguenti metodi: il metodo microbiologico (la prova di inibizione della crescita) e la prova ELISA. L'obiettivo della ricerca è di esaminare l'affidabilità del metodo della prova microbica di inibizione della crescita (il metodo di diffusione) utilizzando la razza *E. coli* ATCC 10 536 come il microorganismo di verifica per la ricerca di residui di enroflossacina nella carne di pollo di consumo, e di confrontare i due metodi applicati. Dal Phi coefficiente di correlazione è emersa una correlazione statisticamente altamente significativa e positiva ($p < 0,001$) tra i dati del metodo microbiologico e il metodo ELISA, sia nei campioni di tessuto muscolare che nel tessuto del fegato, e che in condizioni sperimentali, sia il metodo microbiologico che il metodo ELISA forniscono i risultati della ricerca dei residui consentiti di enrofloxacin ugualmente affidabili, anche se si tratta di diverse misure (mm o ppb) di uno stesso fenomeno.

Parole chiave: enroflossacina, prova di inibizione della crescita, ELISA

mnom mesu brojlera u odnosu na vrijednosti MRL.

Primjenom metoda mikrobiološkog testa inhibicije rasta uz primjenu referentnog soja *E. coli* ATCC 10 536 i ELISA testa mogu se uspješno utvrditi ostaci enrofloksacina u mišićnom tkivu i jetri brojlera već nakon 24 sata od početka terapijske aplikacije.

Literatura

Giguère, S., J. F. Prescott, D. Baggot, R.D. Walker, P.M Dowling (2007.): *Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine, 4th Edition*, ISBN: 978-0-8138-0656, Blackwell Publishing, UK.

De Brabander, H.F., H. Noppe, K. Verheyden, J. Vanden Bussche, K. Wille, L. Okerman, L. Vanhaecke, W. Reybroeck, S.Ooghe, S. Croubel (2009.): *Residue analysis: Future trends from a historical perspective*. J Chromatogr A.;1216(46):7964-76.

Bonagura, J.D. (2000.): Kirk's Current Veteri-

nary Therapy XIII. Small animal practice. W.B. Saunders Company. Philadelphia, London, New York, St. Louis, Sydney.

Boothe, D.M. (2001.): *Small Animal Clinical Pharmacology and Therapeutics*. W.B. Saunders Company. Philadelphia, London, New York, St. Louis, Sydney, Toronto.

Rivier, J. E., Papich, M. G. (2009.): *Veterinary Pharmacology and Therapeutics*. 9th Edition, Wille-Blackwell, USA.

Prescott, J.F., J.D. Baggot, H.A. Wallace (2000.): *Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine*, 3rd ed. Ames, Iowa, USA, pp. 3-11.

Anadon, A., M.R. Martinez-Larranga, M.J. Diaz, P. Bringas, M.A. Martinez, M.L. Fernandez-Cruz, M.C. Fernandez, R.Fernandez (1995.): *Pharmacokinetics and residues of enrofloxacin in chickens*. Am. J. Vet. Res. 56, 4, 501-506.

Kirbiš, A. (2007.): *MICROBIOLOGICAL SCREENING METHOD FOR DETECTION OF AMINOGLYCOSIDES, β-LACTAMES, MACROLIDES, TETRACYCLINES AND QUINOLONES IN MEAT SAMPLES*, Slov Vet Res 2007; 44 (1/2).

Petrović Jelena, Baltić M., Jupić V., Stefanović S. i Stojanović Dragica (2006.): *RESIDUES OF ENROFLOXACIN AND ITS MAIN METABOLITE CIPROFLOXACIN IN BROILER CHICKENS*, Acta Veterinaria (Beograd), Vol. 56, No. 5-6, 497-506.

Anonymous, (1998.): *Committee for veterinary medicinal products, Enrofloxacin. Summary report (2)*, EMEA/MRL/388/98-FINAL, 1-6.

EC, (2010.). *European Community. COMMISSION REGULATION No 37/2010 of 22 December 2009 on pharmacologically active substances and their classification regarding maximum residue limits in foodstuffs of animal origin*, Off. J. Eur. Communities. L 15, pp. 1-72.

Dollery, C. (1999.): *Therapeutic Drugs*. Second edition. Churchill Livingstone. Edinburgh, London, New York, Philadelphia, San Francisco, Sydney, Toronto.

Dostavljeno: 29.3.2011.

Odobreno: 12.4.2011. 