

PREGLEDNI RAD / REVIEW

Tetraciklinski antibiotici i određivanje njihovih rezidua u hrani

Tetracycline antibiotics and determination of their residues in food

Sanja Makovec¹, Blaženka Kos², Jagoda Šušković², Nina Bilandžić³¹Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Pierottijeva 6, Zagreb²Laboratorij za tehnologiju antibiotika, enzima, probiotika i starter kultura, Zavod za biokemijsko inženjerstvo, Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Pierottijeva 6, Zagreb³Laboratorij za određivanje rezidua, Odjel za veterinarsko javno zdravstvo, Hrvatski veterinarski institut, Savska 143, Zagreb

Sažetak

Od ukupno proizvedenih antibiotika na svjetskoj razini, gotovo 50% ih se primjenjuje u prevenciji i liječenju domaćih životinja namijenjenih ljudskoj prehrani, a među njima značajno mjesto zauzimaju tetraciklinski antibiotici. Zbog širokog spektra djelovanja prema Gram-pozitivnim i Gram-negativnim bakterijama, riketcijama i virusima, relativno niske toksičnosti, dobre podnošljivosti i mogućnosti primjene u različitim farmaceutskim oblicima, tetraciklinski antibiotici su našli široku primjenu i u humanoj i u veterinarskoj medicini. Proizvodi su sekundarnog metabolizma bakterijskih vrsta iz roda *Streptomyces*, a u upotrebi se nalaze i polusintetski tetraciklini. Određivanje rezidua antibiotika, pa tako i tetraciklina, u uzorcima životinjskog podrijetla, postalo je nužnim u svrhu zaštite krajnjih potrošača i sprječavanja širenja antibiotske rezistencije. Kontrola ostataka antibiotika i najveće dopuštene količine (NDK) antibiotika u pojedinim organima, mlijeku i tkivima životinjskog podrijetla regulirana je na razini Europske unije. U svrhu kontrole ostataka tetraciklinskih antibiotika u hrani koriste se orijentacijske metode, kao što su npr. različiti mikrobiološki testovi i ELISA metoda. U slučaju pozitivnih rezultata na tetraciklinske antibiotike, iznad propisanih NDK vrijednosti, primjenjuje se potvrdna metoda, najčešće tekućinska kromatografija s tandemskom spektrometrijom masa (LC-MS/MS).

Ključne riječi: antibiotici, tetraciklini, antibiotska rezistencija, hrana životinjskog podrijetla, kontrola hrane

Summary

At the global level, almost 50% of the produced antibiotics are used in the prevention and therapies of domestic animals intended for human consumption, and among them, tetracyclines are significant. Due to the broad spectrum of activity against Gram-positive and Gram-negative bacteria, rickettsia and viruses, relatively low toxicity, good tolerability and applications in various pharmaceutical forms, tetracycline antibiotics are widely used in human and veterinary medicine. Tetracyclines are products of secondary metabolism of bacteria of the genus *Streptomyces*, and are in use also as semisynthetic tetracyclines. Determination of antibiotic residues, including tetracyclines, in samples of animal origin, has become necessary in order to protect consumers and prevent the spread of antibiotic resistance. Control of antibiotic residues and maximum residue limits (MRLs) of antibiotics in certain organs, milk and tissues of animal origin are regulated at EU level. In order to control tetracycline residues in food screening methods are used, such as various microbiological tests and ELISA methods. In case of positive results to tetracycline residues, above the prescribed maximum levels, confirmatory methods is applied, usually liquid chromatography with tandem mass spectrometry (LC-MS/MS).

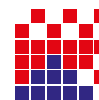
Key words: antibiotics, tetracyclines, antibiotic resistance, food of animal origin, food control

Uvod

U povijesti čovječanstva bakterijske infekcije pokazale su se glavnim uzrokom bolesti ljudi. Otkrićem i kasnijom širokom upotrebom antibiotika, problem bakterijskih infekcija smatrao se riješenim, no velik broj bakterijskih vrsta humano i animalnog podrijetla razvio je određene mehanizme rezistencije koji te vrste čine otpornim na djelovanje većeg broja do sada korištenih antibiotika. Bakterije rezistentne na širok spektar antibiotika, klasificirane kao MDR (eng. "multidrug-resistant") bitno ograničavaju izbor načina liječenja pacijenata, a time i uspješnu terapiju (Džidić i sur., 2008).

U nedostatku učinkovite platforme za razvoj novih antibiotika, te povećane pojave kroničnih infekcija izazvanih bakterijama s višestrukom rezistencijom na antibiotike, preporučuje se provođenje preventivnih mjera, u smislu upotrebe antibiotika samo kada je to nužno (i od strane za to kvalificirane osobe), kako bi se usporio razvoj novih rezistentih vrsta i usporilo širenje antibiotske rezistencije (Okeke i sur., 2005). Dodatno, uz edukaciju proizvođača hrane animalnog podrijetla i veterinarske kontrole, učestalost pojave rezidua veterinarskih lijekova u hrani može se smanjiti. Kako bi se to postiglo, važan je multidisciplinarni pristup, odgovarajuća edukacija uzgajivača životinja i suradnja uzgajivača životinja s veterinarima (Kos, 2011). Uz prevenciju nekontrolirane upo-

Corresponding author: bilandzic@veinst.hr



rabe antibiotika, razvoj novih terapeutika nužnih za suzbijanje rezistentnih bakterija jedno je od trenutno najzastupljenijih područja istraživanja, u svrhu postizanja učinkovite terapije infektivnih bolesti sadašnjih i budućih generacija.

Problem razvoja rezistentnih vrsta ne odnosi se samo na široku upotrebu antibiotika u liječenju ljudi, već i na upotrebu antibiotika u veterinarskoj medicini (Barbosa i Levy, 2000; Feinman, 1998; Blackman, 2002), agrikulturi (Angulo i sur., 2004) i akvakulturi (Reilly i Kaferstein, 1997). Od ukupne količine primijenjenih antibiotika na svjetskoj razini, polovina ih se primjenjuje na domaćim životinjama namijenjenim ljudskoj prehrani te se posljedično rezistentne bakterijske vrste iz peradi, svinja i stoke mogu naći u prehrani namijenjenoj ljudima, a kozumacijom te hrane one koloniziraju gastrointestinalni trakt ljudi i na taj način mogu prenijeti genetsku informaciju crijevnoj mikrobioti pa geni za antibiotsku rezistenciju postaju dio humanog mikrobioma (WHO, 1997; Wegener, 2003; Perreten, 1997; Teuber i sur., 1999). Osim toga, većina antibiotika koji se upotrebljavaju u prevenciji i liječenju infekcija ljudi i životinja, kao i u poticanju rasta životinja, parcijalno se metaboliziraju i izlučuju sekretima u prirodne ekosustave čime posljedično dolazi do sistemskih promjena u sastavu (kvalitativnom i kvantitativnom) mikrobne populacije mikrobiosfere (Dolliver i Gupta, 2008; Sarmah i sur., 2006).

Primjena lijekova iz tetraciklinske skupine antibiotika pri uzgoju životinja i u terapijske svrhe bila je raširena zbog njihovog širokog spektra djelovanja i pristupačne cijene. Stoga su propisane najveće dopuštene količine (NDK) tetraciklinskih antibiotika i njihova se prisutnost uobičajeno kontrolira u uzorcima mišića, jetra i bubrega goveda, kokoši, kunića, ovaca, patki, purana i svinja, kao i u uzorcima mlijeka i jaja, u svrhu prevencije i zaštite krajnjih potrošača (EC, 2010).

Antibiotici

Antibiotici su specifični proizvodi mikrobnog metabolizma koji imaju visoku fiziološku aktivnost prema određenim grupama mikroorganizama (bakterije, plijesni, protozoe, virusi) ili zloćudnih tumora, sprječavajući im rast ili uništavajući ih. Osim prirodnih, dobivenih mikrobnom biosintezom, postoje sintetski i polusintetski antibiotici odnosno kemijski spojevi nastali kemijskom modifikacijom mikrobnom biosintezom proizvedenih antibiotika. Antibiotike proizvode mnogi organizmi (bakterije, gljive, alge, lišaji, biljke, životinje), a industrijski se proizvode pomoću mikroorganizama te ih je u upotrebi oko 200 različitih vrsta (Šušković, 2012a).

Klasifikacija antibiotika

Antibiotici se uobičajeno klasificiraju prema mikroorganizmu producentu, kemijskoj strukturi, načinu djelovanja, spektru djelovanja te prekursoru i metaboličkom putu biosinteze. Antibiotici koji se koriste u veterinarskoj medicini pripadaju sljedećim osnovnim skupinama:

- β-laktamski antibiotici koji predstavljaju grupu najčešće primjenjivanih antibiotika u tretiranju bakterijskih infekcija stoke na farmama te obuhvaćaju dvije glavne skupine antibiotika: peniciline i cefalosporine;
- aminoglikozidni antibiotici koji se koriste u liječenju animalnih i humanih bolesti čiji su najpoznatiji predstavnici

gentamicin, linkomicin, neomicin, streptomycin, kanamicin, amikacin i apramicin;

- makrolidni antibiotici su grupa antibiotika koja se u veterinarskoj praksi koristi za tretiranje respiratornih bolesti, a najpoznatiji predstavnici su acetilsovaleriltilvalozin, eritromicin, spiramicin, tilmikozin, tilozin i tulatromicin;
- peptidni antibiotici s najčešćom primjenom u liječenju upalnih procesa urinarnog trakta čiji su najpoznatiji predstavnici cink-bacitracin, efrotomicin i virginijamicin;
- tetraciklinski antibiotici su često primjenjivana grupa antibiotika radi širokog spektra djelovanja, a najpoznatiji predstavnici su klortetraciklin, oksitetraciklin, tetraciklin i doksiciklin;
- kinoloni odnosno sintetički antimikrobni agensi širokog spektra djelovanja koji se upotrebljavaju u stočarstvu i za akvakulture, a najpoznatiji predstavnici su sarafloksacin i difloksacin (Kos, 2011).

Mehanizam djelovanja antibiotika

Poznavanje mehanizma djelovanja antibiotika omogućuje racionalniji pristup pronalaženju novih i modificiranju postojećih antibiotika.

Prema mjestu djelovanja u stanici mikroorganizama dijele ih u sljedeće glavne skupine:

- antibiotici inhibitori biosinteze stanične stijenke (penicilini, cefalosporini, cikloserin, bacitracin) koji onemogućuju umrežavanje peptidoglikanskog sloja stanične stijenke bakterija što dovodi do lize stanice;
- antibiotici inhibitori biosinteze proteina (antibiotici širokog spektra djelovanja – tetraciklini, streptomycin, kloramfenikol) koji onemogućuju proces očitavanja amino-kiselina i sintezu peptida sa mRNA u ribosomima;
- antibiotici inhibitori funkcije DNA (antitumorni antibiotici – aktinomycin, bleomicin, daunomicin) koji onemogućuju sintezu nukleozida, replikaciju DNA i transkripciju mRNA na DNA kalupu;
- antibiotici koji se vežu na citoplazminu membranu (polipeptidni antibiotici: bacitracin, gramicidin, polimiksin, nisin) koji dovode do disfunkcije citoplazmine membrane (osmotska barijera) i nekontroliranog prolaza otopljenih molekula u stanicu i iz stanice (Šušković, 2012b).

Antibiotska rezistencija

Rezistencija na antibiotike može biti urođena i stečena otpornost na antibiotike koja nastaje genetičkim promjenama u stanici mikroorganizma.

Osnovni mehanizmi antibiotske rezistencije, u širem smislu, slični su kod većeg broja bakterijskih vrsta. Najrašireniji mehanizam je direktna (enzimska) inaktivacija molekule antibiotika. Slijedi modifikacija ciljnog mjesta djelovanja, zatim promjene permeabilnosti vanjske membrane čime posljedično dolazi do smanjenja koncentracije antibiotika u stanici bez modifikacije njegove strukture te na kraju mijenjanje inhibiranog metaboličkog puta (eng. *by-passing*). Ovo su osnovni mehanizmi rezistencije, no zahvaljujući velikoj bioraznolikosti bakterijskih vrsta, svaka pojedina vrsta može razviti više različitih mehanizama rezistencije što ovisi o strukturi antibiotika, njegovom ciljnom mjestu djelovanja i genetičkim promjenama unutar bakterijske stanice koje mogu biti posljedica mutacija i/

ili transfera gena za antibiotsku rezistenciju (Džidić i sur., 2008).

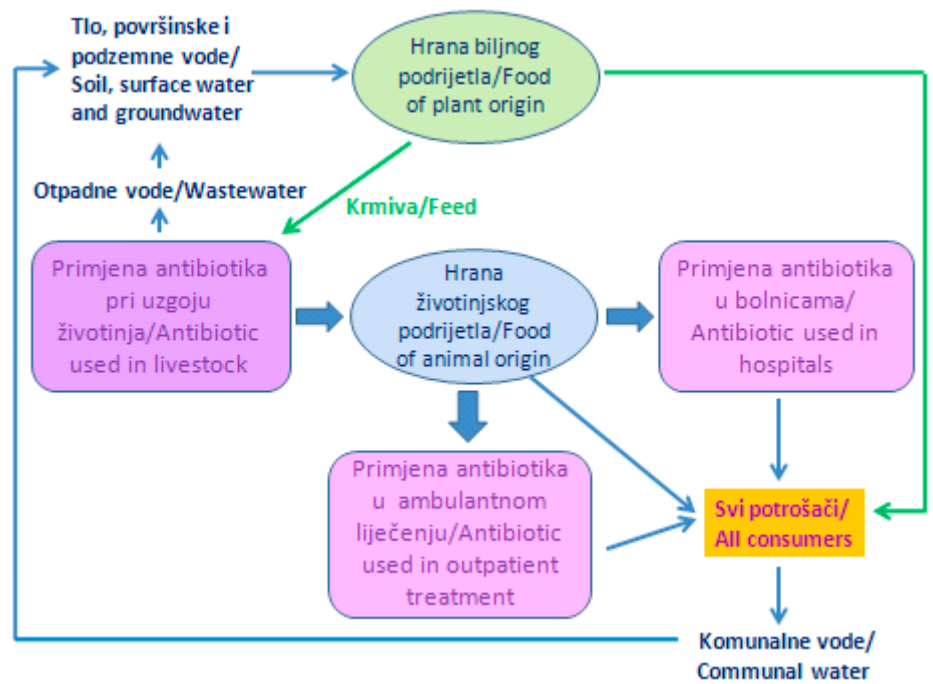
Najpoznatiji mikroorganizmi s višestrukom rezistencijom na antibiotike su: MRSA (meticilin rezistentni *Staphylococcus aureus*), VRSA (vankomicin rezistentni *Staphylococcus aureus*), VRE (vankomicin rezistentni enterokoki, *Enterococcus faecium* i *Enterococcus faecalis*), ESBL (producenti β -laktamaza širokog spektra učinka, mikroorganizmi rezistentni na cefalosporinske antibiotike i monobaktame) i PRSP (penicilin rezistentni *Streptococcus pneumoniae*). Prijenos antibiotske rezistencije moguć je vertikalnim transferom gena (tijekom razmnožavanja bakterijske stanice) i horizontalnim transferom gena (između bakterijskih stanica koje pripadaju istoj vrsti ili različitim bakterijskim vrstama) i to: konjugacijom, transformacijom ili transdukcijom (Džidić i sur., 2008).

Bakterijske vrste koje čine humanu mikrobiotu intestinalnog trakta mogu međusobno prenositi gene za antibiotsku rezistenciju što predstavlja veliki problem jer bezopasne, komensalne bakterije, mogu razviti patogeni oblik, a jednom stečeni geni za antibiotsku rezistenciju su stabilni te lako postaju dio bakterijskog genoma.

Rezistencija na široki spektar antibiotika otkrivena je kod nekih sojeva patogenih bakterijskih vrsta: *Escherichia coli*, *Salmonella enterica*, *Shigella dysenteriae*, *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Haemophilus influenzae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Xanthomonas* spp. i *Burkholderia* spp. (Mathur i Singh, 2005).

Ostatci antibiotika i antibiotski rezistentni mikroorganizmi u biosferi

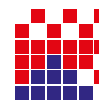
Kao što je prikazano na slici 1, većina antibiotika koji se upotrebljavaju u prevenciji i liječenju infekcija životinja, kao i u poticanju rasta životinja, parcijalno se metaboliziraju i izlučuju sekretima u vode i tla, dok antibiotici primijenjeni u humanoj terapiji, u okoliš dospjevaju preko komunalnih voda (Dolliver i Gupta, 2008). Posljedica pretjerane uporabe antibiotika, kao promotora rasta životinja i u terapijske svrhe, je pojava rezistentnih vrsta bakterija u tlu i podzemnim vodama. U drugoj polovici 20. stoljeća, kada je došlo do primjene antibiotika kao dodataka stočnoj hrani, nije bilo zakonske regulative i svaki je antibiotik mogao biti primijenjen, bez obzira rabi li se i u humanoj medicini. Istovremeno, postala je uobičajena praksa da se stoka i perad smješta u velikom broju u iste nastambe u kojima im je kretanje potpuno ograničeno. Posljedica je bila brzo širenje infekcija, što je povećalo upotrebu antibiotika za sprječavanje širenja infekcija. Uobičajena uporaba antibiotika na farmama dovela je do pojave rezistentnih gena kod bakterija



Slika 1. Kruženje antibiotika hranidbenim lancem (Kos, 2011)
Figure 1. Circulation of antibiotics in food chain (Kos, 2011)

koje čine prirodnu mikrobnu populaciju stoke, a ostaci antibiotika dospjeli su hranidbenim lancem do čovjeka, te su na isti način potakli razvoj antibiotske rezistencije u humanih patogena. Osim toga, uzgoj ribe u ribnjacima također pogoduje brzom širenju infekcija pa su antibiotici često dodavani u riblju hranu što je dovelo do povećanja njihove koncentracije, kako u vodi, tako i u sedimentima (Cabello, 2006). Upotreba antibiotika za tretiranje biljaka znatno je manja nego u humanoj i veterinarskoj medicini (McManus i sur., 2002). Prema tome, u okolišu se mogu naći i ostaci antibiotika i mikroorganizmi s genima za antibiotsku rezistenciju koji ih čine otpornim na djelovanje antibiotika. Međutim, brzina razgradnje pojedinih vrsta antibiotika u okolišu je različita. Neki antibiotici, koje proizvode mikroorganizmi prisutni u tlu, su u interakciji sa biosferom milijunima godina, te su biorazgradivi te čak mogu poslužiti i kao izvor hrane za pojedine mikroorganizme u tom ekosustavu (Dantas i sur., 2008). Sintetski antibiotici, kao što su npr. kinoloni, također pokazuju različitu otpornost na proces biorazgradnje. Primjerice, ciprofloksacin je pronađen u rijekama gdje se u potpunosti razgradi nakon tri mjeseca (Turjel i sur., 2005). Međutim, neovisno o brzini njihove razgradnje, ne smiju se smatrati bezopasnim zagađivačima jer se mogu zadržati u ekosustavu dulje vrijeme ovisno o različitim čimbenicima. Primjerice, proces razgradnje se odvija sporije zimi radi nižih temperatura (Dolliver i Gupta, 2008) čime se povećava njihov utjecaj na mikrobni sastav tla (Stoob i sur., 2007).

Postoje dva slučaja u kojima se geni odgovorni za antibiotsku rezistenciju mogu smatrati zagađivačima. U prvom slučaju, kada integracijom antibiotika u prirodne ekosustave i daljnjim širenjem rezidua antibiotika, mikroorganizmi koji dođu u dodir s antibiotikom razvijaju antibiotsku rezistenciju pa ti geni, odgovorni za rezistenciju na antibiotik, postanu sastavni dio podjedinice genoma mikroorganizma odgovorne za transfer gena. Primjer su geni za rezistenciju na kinolone (*qnr*) pronađeni kod nekih bakterijskih vrsta prisutnih u vodi (Sanchez i



sur., 2008). U drugom slučaju, otpadni ostaci iz bolnica, kuća, farmi i drugih mjesta ljudske djelatnosti sadrže bakterije koje mogu biti nosioci gena za rezistenciju na antibiotike, te se ti geni prenose među kontinentima i oceanima spontanom kruženjem tvari kroz ekosustave (Sengupta i sur., 2013).

Tetraciklinski antibiotici

Tetraciklinski antibiotici su proizvodi sekundarnog metabolizma bakterija iz roda *Streptomyces*. Pokazuju široki spektar djelovanja prema mnogim vrstama mikroorganizama: Gram-pozitivnim i Gram-negativnim bakterijama, rikecijama i virusima. Zbog širokog spektra djelovanja, relativno niske toksičnosti, dobre podnošljivosti i mogućnosti primjene u različitim farmaceutskim oblicima našli su široku primjenu u medicini i veterini (Šušković, 2012b).

Tablica 1. Vrste roda *Streptomyces* za industrijsku proizvodnju tetraciklina (Šušković, 2012b).

Table 1. Species of *Streptomyces* for industrial production of tetracyclines (Šušković, 2012b).

Vrsta / Species	Proizvod / Products*
<i>S. albobiflavus</i>	CTC, TC, OTC, aktinomycin / actinomycin
<i>S. antibioticus</i>	OTC, TC
<i>S. aureofaciens</i>	CTC, TC
<i>S. aureus</i>	TC
<i>S. californicus</i>	TC, aktinomycin / actinomycin
<i>S. cellulosae</i>	OTC, aktinomycin / actinomycin
<i>S. feofaciens</i>	TC
<i>S. flaveolus</i>	TC
<i>S. flavus</i>	CTC, TC, OTC, aktinomycin / actinomycin
<i>S. lusitanus</i>	CTC, TC
<i>S. parvus</i>	OTC, TC, aktinomycin / actinomycin
<i>S. platensis</i>	OTC
<i>S. rimosus</i>	OTC, TC, rimocidin / rimocydin
<i>S. sayamaensis</i>	TC, CTC
<i>S. vendargensis</i>	OTC
<i>S. viridifaciens</i>	CTC, TC

* CTC = 7-klortetraciklin; TC = tetraciklin;
OTC = oksitetraciklin
* CTC = 7-chlortetracycline; TC = tetracycline;
OTC = oxytetracycline

Era tetraciklinskih antibiotika počela je s otkrićem klortetraciklina u filtratu kulture *Streptomyces aureofaciens* vrste 1948. godine. Za tetraciklin, koji je prvi put dobiven dehalogeniranjem klortetraciklina, je ustanovljeno da ga proizvodi vrsta *Streptomyces viridifaciens*. Zatim je 1950. uslijedilo otkriće oksitetraciklina u filtratu kulture *Streptomyces rimosus*. U tablici 1 navedeno je šesnaest različitih bakterijskih vrsta iz roda *Streptomyces* koje se koriste za industrijsku proizvodnju tetraciklinskih antibiotika.

Kemijska struktura i svojstva tetraciklinskih antibiotika

Tetraciklinski antibiotici pripadaju skupini poliketidnih antibiotika. Pronađeno je više od 30 različitih tetraciklinskih antibiotika koje proizvode mikroorganizmi pronađeni u prirodi, a kojima je zajednička osnovna kemijska struktura prikazana u tablici 2 (Hunter i Hill, 1997).

Tetraciklini su žuto obojene, gorkaste, kristalne i fotosenzitivne supstancije. Prirodni tetraciklini su slabo topivi u fiziološkom pH području. Imaju amfoterna svojstva zbog OH skupina i lužnate dimetil amino grupe na C-4 atomu i $-\text{CONH}_2$ skupine na C-2 atomu. Tvore soli sa bazama i kiselinama (Ca^{2+} , Mg^{2+} , HCl). Stabilni su u otopinama pH od 2 do 9. Dobro su topivi u vodi pri pH 2 (20°C) – 5 mg/ml (Šušković, 2012b).

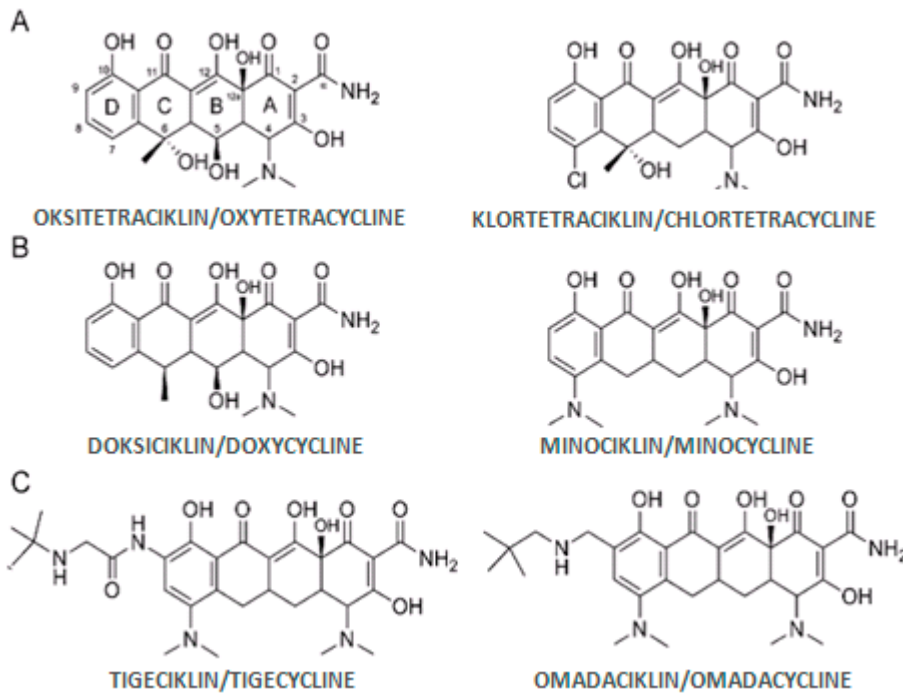
Tablica 2. Osnovna kemijska struktura tetraciklinskih antibiotika (Kos, 2011).

Table 2. Basic chemical structure of tetracycline antibiotics (Kos, 2011).

Tetraciklini/Tetracyclines	R1	R2	R3	R4
Klortetraciklin/Chlortetracycline	Cl	CH ₃	OH	H
Oksitetraciklin/Oxytetracycline	H	CH ₃	OH	OH
Tetraciklin/Tetracycline	H	CH ₃	OH	H
Doksiciklin/Doxycycline	H	CH ₃	H	OH
Minociklin/Minocycline	N(CH ₃) ₂	H	H	H

Temeljna struktura tetraciklinske molekule uključuje kromoforni ketoenolni sustav u prstenovima A, B, C, D i bazičnu grupu u prstenu A (Tablica 2) što je važan preduvjet za antibiotsku aktivnost. Zadržavanje konfiguracije asimetričnih centara C-4, C-4a i C-12a je jako bitno, dok konfiguracija na C-5, C-5a i C-6 može biti promijenjena (Slika 2A). Amidni vodik može biti zamijenjen s metilnom grupom dok veće grupe imaju toksičan učinak osim onih koje se spontano eliminiraju u vodi. Dimetilamino grupa može biti zamijenjena primarnom amino grupom, bez gubitka aktivnosti *in vitro*, ali sve ostale promjene značajno smanjuju antibakterijsku aktivnost. Hidrofobni dio molekule tetraciklina od C-5 do C-9 može biti promijenjen primjerice modifikacijom na C-6 i C-7 te se tada dobiju proizvodi velike kemijske stabilnosti s povećanom antibiotskom aktivnošću (Šušković, 2012b).

Za tetraciklinske antibiotike karakteristično je da pod određenim uvjetima podliježu reverzibilnoj izomerizaciji na C-4 atomu. Utvrđeno je da do epimerizacije na C-4 atomu dolazi u vodenim otopinama pri pH od 2 do 6, a pospješuje je i prisutnost aniona fosfata, citrata ili acetata. Epimerizacija rezultira serijom supstancija naziva 4-epitetraciklini koji su u konačnici nepoželjni radi slabije antibiotske aktivnosti (Šušković, 2012b).



Slika 2. (A) Prirodni tetraciklini; (B) Druga generacija polusintetskih tetraciklina; (C) Treća generacija tetraciklina, glicilciklini, dobiveni kao derivati minociklina (Pickens i Tang, 2009).

Figure 2. (A) Natural tetracyclines; (B) Second generation of semi-synthetic tetracyclines; (C) Third generation of tetracyclines, glycylicyclines, as derivatives of minocycline (Pickens and Tang, 2009).

Tetraciklini su prema svojoj kemijskoj strukturi aromatski poliketidi te se njihova biosinteza odvija na multienzimskom kompleksu poliketid sintetazi (PKS) koji katalizira kondenzaciju jednostavnih karboksilnih kiselina aktiviranih s koenzimom A. Kemijske strukture najznačajnijih predstavnika prve (A), druge (B) i treće (C) generacije tetraciklinskih antibiotika prikazane su na slici 2.

Genski klasteri za tetraciklinske antibiotike

Proučavanjem genskih klastera klortetraciklina i oksitetraciklina uočena je njihova velika sličnost (Ryan i sur. 1999; Hunter i sur. 2002). Tako geni koji kodiraju za sintezu enzima koji su esencijalni u biosintezi oksitetraciklina imaju odgovarajuće homologe u genskim klasterima klortetraciklina. Poznata sekvencija tih genskih klastera postala je temeljem za primjenu kombinatorijskih tehnika metaboličkog i genetičkog inženjerstva te kemijske sinteze u svrhu dobivanja novih generacija tetraciklinskih antibiotika (Pickens i Tang, 2009).

Biosinteza tetraciklina ovisi o opskrbi primarnim građevnim jedinicama čiji je osnovni izvor proces glikolize (primarni metabolizam) i ciklus trikarbonskih kiselina (TCA). Međutim, taj put je u direktnoj konkurenciji sa sintezom i aktivnošću enzima sekundarnog metabolizma. Utvrđeno je da nisku koncentraciju enzima TCA ciklusa prati niska koncentracija ATP-a i polifosfata u miceliju što potvrđuje pretpostavku da visokoproduktivni sojevi tetraciklinskih antibiotika imaju slabo izražen energetske metabolizam. Pad aktivnosti enzima koji kataliziraju fosforilaciju heksoza (kao alternativni put za sintezu malonil-CoA) dokazuje da se tvorba intermedijera pri biosintezi

tetraciklina katalizira enzimima primarnog (alternativno) i sekundarnog metabolizma (Šušković, 2012b).

Ekspresiju bakterijskih genskih nakupina poliketid sintaza obično reguliraju različiti vrlo specifični proteini koji su uglavnom usmjereni samo na ciljane gene u nakupini gena ili je riječ o regulatornim genima koji djeluju na stanične procese, takozvani pleiotropni regulatori. Prema načinu djelovanja ti se regulatorni proteini mogu podijeliti u više skupina, kao što su SARP (engl. Streptomyces Antibiotic Regulatory Proteins), skupina ribosomski povezanih regulatornih proteina nazvanih ppGpp sintaze, γ -butirolaktonskih vezanih i dvokomponentnih regulatornih proteina. U genskoj nakupini koja kodira biosintezu klortetraciklina nalazi se takozvani SARP regulatorni gen. Međutim, homolog toga gena ne postoji u nakupini gena za biosintezu oksitetraciklina. U genskoj nakupini za biosintezu oksitetraciklina identificiran je novi regulatorni protein iz skupine LAL (LuxR), nazvan OtcG. Taj se genski homolog nalazi i u genskoj nakupini za biosintezu klortetraciklina. Inaktivacijom i povećanom ekspresijom gena *otcG* eksperimentalno je

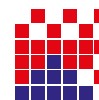
utvrđeno njegovo djelovanje kao uvjetno pozitivnog regulatora u biosintezi oksitetraciklina. Molekularna genetika takvih regulatornih mehanizama, koji utječu na biosintezu tetraciklina, još je uvijek slabo istražena (Lešnik i sur., 2009).

Mehanizam djelovanja tetraciklina

Tetraciklinski antibiotici su antibiotici širokog spektra djelovanja. Difuzijom i aktivnim transportom prodiru u bakterijsku stanicu i djeluju na stanicu mikroorganizma u fazi biosinteze proteina. Reverzibilnim vezanjem tetraciklinskog antibiotika na 30S podjedinicu ribosoma onemogućeno je vezanje aminoacil-tRNA na akceptorsko mjesto i na taj način reprimirano produljvanje peptidnog lanca (Šušković, 2012b).

Rezistencija na tetraciklinske antibiotike

Bakterije su, u dodiru s antibioticima, razvile različite mehanizme kojima se nastoje zaštititi od djelovanja antibiotika na samu stanicu. Tako je pronađeno čak 45 različitih determinanti odgovornih za rezistenciju bakterija na tetraciklinske antibiotike. Među njima, 26 je različitih *tet* gena, 2 su *otr* gena, jedan *ter* gen koji kodira za membranske proteine koji učinkovito izbacuju antibiotik iz stanice, dok 11 *tet* gena i 1 *otr* gen kodiraju za proteine odgovorne za zaštitu ribosoma koji sprječavaju vezanje tetraciklinskih antibiotika na ciljano mjesto djelovanja. Za enzimsku inaktivaciju tetraciklinskih antibiotika kodiraju 3 *tet* gena, dok se za *tet(U)* gen tek treba ustanoviti mehanizam koji uzrokuje rezistenciju na tetraciklinske antibiotike (Roberts i sur. 2012).

**Tablica 3.** Najveće dopuštene količine (NDK) tetraciklina u hrani životinjskog podrijetla (EC, 2010).**Table 3.** Maximum residue limits (MRL) of tetracyclines in food of animal origin (EC, 2010).

Farmakološki djelatna tvar/ <i>Pharmacologically active substance</i>	Marker rezidua/ <i>Marker residue</i>	Vrsta životinje/ <i>Animal species</i>	NDK/ MRL (µg/kg)	Ciljno tkivo/ <i>Target tissue</i>	Napomene (u skladu s člankom 14 (7) Uredbe (EZ) br. 470/20092)/ <i>Notes (in accordance with Article 14 (7) of Regulation (EC) 470/20092)</i>
Doksiciklin/ Doxycycline	Doksiciklin/ Doxycycline	Goveda/ Bovine	100 300 600	Mišić / <i>Muscle</i> Jetra / <i>Liver</i> Bubreg / <i>Kidney</i>	Ne primjenjuje se kod životinja čije se mlijeko koristi za hranu./ <i>Not for use in animals from which milk is produced for human consumption.</i>
		Svinje, perad/ <i>Porcine, poultry</i>	100 300 300 600	Mišić / <i>Muscle</i> Koža i masno tkivo / <i>Muscle Skin and fat</i> Jetra / <i>Liver</i> Bubreg / <i>Kidney</i>	Ne primjenjuje se kod životinja čija se jaja koriste za hranu/ <i>Not for use in animals from which eggs are produced for human consumption.</i>
Klortetraciklin/ Chlortetracycline	Zbroj izvornog spoja i njegovog 4-epimera/ <i>Sum of parent drug and its 4-epimer</i>	Sve vrste životinja koje se koriste za proizvod- nju hrane/ <i>All food- producing species</i>	100	Mišić / <i>Muscle</i> Jetra / <i>Liver</i> Bubreg / <i>Kidney</i> Mlijeko / <i>Milk</i> Jaja / <i>Eggs</i>	Za ribe koštunjače NDK za mišić se odnosi na "mišić i kožu u prirodnom omjeru". NDK za jetru i bubreg ne odnosi se na ribe koštunjače./ <i>For fin fish the muscle MRL relates to 'muscle and skin in natural proportions'. MRLs for liver and kidney do not apply to fin fish.</i>
			300		
			600		
			100		
			200		
Oksitetraciklin/ Oxytetracycline	Zbroj izvornog spoja i njegovog 4-epimera/ <i>Sum of parent drug and its 4-epimer</i>	Sve vrste životinja koje se koriste za proizvod- nju hrane/ <i>All food- producing species</i>	100	Mišić / <i>Muscle</i> Jetra / <i>Liver</i> Bubreg / <i>Kidney</i> Mlijeko / <i>Milk</i> Jaja / <i>Eggs</i>	Za ribe koštunjače NDK za mišić se odnosi na "mišić i kožu u prirodnom omjeru". NDK za jetru i bubreg ne odnosi se na ribe koštunjače./ <i>For fin fish the muscle MRL relates to 'muscle and skin in natural proportions'. MRLs for liver and kidney do not apply to fin fish.</i>
			300		
			600		
			100		
			200		
Tetraciklin/ Tetracycline	Zbroj izvornog spoja i njegovog 4-epimera/ <i>Sum of parent drug and its 4-epimer</i>	Sve vrste životinja koje se koriste za proizvod- nju hrane/ <i>All food- producing species</i>	100	Mišić / <i>Muscle</i> Jetra / <i>Liver</i> Bubreg / <i>Kidney</i> Mlijeko / <i>Milk</i> Jaja / <i>Eggs</i>	Za ribe koštunjače NDK za mišić se odnosi na "mišić i kožu u prirodnom omjeru". NDK za jetru i bubreg ne odnosi se na ribe koštunjače./ <i>For fin fish the muscle MRL relates to 'muscle and skin in natural proportions'. MRLs for liver and kidney do not apply to fin fish.</i>
			300		
			600		
			100		
			200		

Zakonski propisi koji se odnose na rezidue antibiotika u hrani životinjskog podrijetla

U svrhu sprječavanja pojave infekcija 50-tih godina 20. stoljeća antibiotici su se dodavali hrani za životinje u koncentraciji 5-15 ppm, a kasnije 100-200 ppm, te kao promotori rasta životinja jer se upotrebom antibiotika povećava iskorištenje stočne hrane za 17% kod tovne junadi, 15% kod svinja i 10% kod janjadi. U ranim 70-tim godinama 20. st. u zemljama EEZ-a (Europske ekonomske zajednice) zabranjena je primjena onih antibiotika koji se koriste u humanoj medicini, a u svrhu poticanja rasta životinja i to radi pojave rezistencije patogenih bakterija na glikopeptidne antibiotike (kao posljedica raširene primjene avoparcina kao promotora rasta životinja na farma-

ma) jer je glikopeptidni antibiotik vankomicin postao važan u humanoj medicini (Kos, 2011).

Naime, određeni sojevi bakterijskih vrsta roda *Enterococcus*, rezistentni na glikopeptidne antibiotike, izolirani su ne samo na klinikama, nego i iz životinja na farmama u Velikoj Britaniji, Njemačkoj i Danskoj gdje se primjenjivao avoparcin u krmivima kao promotor rasta životinja. Stoga je zaključeno da su životinje na farmama izvor enterokoka rezistentnih na glikopeptidne antibiotike koji su hranidbenim lancem dospjeli do čovjeka i pojavili se i na klinikama. Sve te spoznaje su dovele do zabrane uporabe antibiotika cink bacitracina, spiramicina, virginijamicina i olakvindoksa od 1998. godine. Zabrana primjene antibiotika kao promotora rasta životinja 2006. godine je proširena na sve vrste antibiotika i srodnih lijekova važnih u humanoj medicini (Martinez, 2009). U Europi je, pre-

ma podacima Internacionalne federacije za zdravlje animalnih vrsta (eng. IFAH - International Federation for Animal Health), u razdoblju od 1997. do 1999. godine upotreba antibiotika u animalne svrhe porasla za 10%, a u humane svrhe za 5%. Stoga su odluke o zabrani nemedicinske upotrebe antibiotika vrlo važne, budući da se rezistentni patogeni mogu prenijeti sa životinja na ljude (npr. *Campylobacter jejuni*, *E. coli*, *Salmonella* vrste, *Enterococcus faecium* i drugi patogeni) (Kos, 2011).

Kontrola ostataka veterinarskih lijekova u Europskoj Uniji provodi se u skladu s Uredbom Komisije 96/23/EC (EC, 1996) i Odlukom Komisije 97/747/EC (EC, 1997). Od 01. srpnja 2013. godine stupanjem Republike Hrvatske u Europsku Uniju izravno je preuzeta navedena Uredba i Odluka odnosno Uredba Komisije 37/2010.

Državnim programom monitoringa rezidua Republike Hrvatske, prema Pravilniku o monitoringu određenih tvari i njihovih rezidua u živim životinjama i proizvodima životinjskoga podrijetla (2008) i Pravilniku o izmjenama i dopunama Pravilnika o monitoringu određenih tvari i njihovih rezidua u živim životinjama i proizvodima životinjskog podrijetla (2013), analize se provode na uzorcima tkivima životinja (goveda, svinje, koze, ovce, konji, kunići, kokoši, pure, patke, divljač u ulovu i uzgoju, morska riba u uzgoju i ulovu i slatkododna riba) mlijeku (kravlje, ovčje i kozje), jajima i medu. Prema zakonskim propisima obavezna je kontrola rezidua slijedećih tetraciklinskih antibiotika: tetraciklina, klortetraciklina, oksitetraciklina i doksiciklina. U Tablici 3. navedene su najveće dopuštene količine (NDK) tetraciklinskih antibiotika u hrani životinjskog podrijetla prema Uredbi Komisije 37/2010.

Metode određivanja ostataka veterinarskih lijekova u hrani životinjskog podrijetla

U hrani životinjskog podrijetla mogu zaostati tetraciklinski antibiotici te se zbog štetnih utjecaja koje mogu imati na zdravlje ljudi provodi njihova kontrola. Neočekivani ostaci tih tvari mogu se pojaviti u tkivima zbog: pogrešnog liječenja određene životinjske vrste, prevelike količine unesenog lijeka u odnosu na preporučenu dozu, nepoštivanja karence ili zato što je životinja konzumirala hranu kontaminiranu antibioticima.

Određivanje ostataka veterinarskih lijekova obuhvaća odabir uzorka i odabir metode. Uzorci životinjskih tkiva su jetra, bubreg, mišić, mlijeko ili mast (organi i mišići mogu biti analizirani samo nakon klanja). Analizira se i hrana za životinje te voda u kojoj koncentracija lijekova može biti puno veća (1-10 mg/ml) nego u tkivima životinja (1-100 µg/kg); zatim gnojivo, urin i dlake koje se često koriste za određivanje zabranjenih supstancija, a svi navedeni uzorci mogu biti uzeti prije žrtvovanja životinja (Kos, 2011).

Odabir metode temelji se na određivanju koncentracije rezidua te se u tu svrhu koriste:

- kvantitativne metode – metode kojima se određuje je li koncentracija prisutnih lijekova u uzorcima iznad ili ispod dozvoljene koncentracije (npr. HPLC, GC)
- metode za potvrdu (engl. confirmatory methods) – metode kojima se identitet lijeka (rezidua) i njegova koncentracija potvrđuju s najvećom mogućom preciznošću i točnošću (spektrometrija masa (MS): GC-MS, LC-MS, LC-MS/MS, GC-MS/MS).

Orijentacijske (engl. screening) metode uzoraka moraju omogućiti obradu velikog broja uzoraka u što kraćem vremenu, detekciju svih potencijalno pozitivnih uzoraka, uz što manje lažno pozitivnih rezultata. Pozitivni uzorci i oni za koje se sumnja da su pozitivni na antibiotik dalje se analiziraju kvantitativnom potvrdnom metodom koja omogućuje jasnu identifikaciju i kvantifikaciju analita. Kvantitativne metode i metode kojima se potvrđuje prisutnost rezidua i njegova koncentracija ne smiju davati lažno-pozitivne rezultate (Šušković i Kos, 2007).

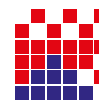
Na tržištu je velik broj komercijalnih, kemijskih i mikrobioloških testova koji su relativno brzi, jednostavni za izvođenje, ne zahtijevaju skupu opremu i daju pouzdane rezultate za detekciju antibiotika. Mikrobiološki testovi su uglavnom zasnovani na *in vitro* inhibiciji rasta test mikroorganizma: *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Bacillus subtilis* var. *mycoides* ATCC 9634, *Kocuria rhizophila* ATCC 9341 (opsoletan naziv *Sarcina lutea* ili *Micrococcus luteus*) i *Geobacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* (opsoletan naziv *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis*).

Tablica 4. Kontrola iskorištenja tetraciklina (TTC), oksitetraciklina (OTTC), klortetraciklina (CITTC) i doksiciklina (DTTC) ELISA metodom u uzorcima mišićnih tkiva kojima je dodano 100 ng/g TTC (*), 100 ng/g OTTC (**), 100 ng/g CITTC (***), 100 ng/g DTTC (****).

Table 4. Recovery control of tetracycline (TTC), oxytetracycline (OTTC), chlortetracycline (CITTC) and doxycycline (DTTC) by ELISA method in samples of muscle tissues with added 100 ng/g TTC (*), 100 ng/g OTTC (**), 100 ng/g CITTC (***), 100 ng/g DTTC (****).

Uzorci/ Samples	Matriks/ Matrix	TTC ng/g	OTTC ng/g	CITTC ng/g	DTTC ng/g
SMO-08**	mišić/ muscle tissue	-	106,232	-	-
SMO-08**		-	107,775	-	-
SMO-08**		-	124,974	-	-
SMO-08**		-	120,916	-	-
SMO-09***		-	-	62,9565	-
SMO-09***		-	-	66,3959	-
SMO-07*		73,6196	-	-	-
SMO-07*		93,7238	-	-	-
SMO-005****		-	-	-	112,035
SMO-005****		-	-	-	113,674

ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) test je najčešće korištena imunotehnika kao orijentacijska metoda u kontroli određenih tvari i njihovih rezidua u životinjama i proizvodima životinjskog podrijetla (Bilandžić i sur., 2011). Temelji se na osjetljivosti enzimske reakcije između antitijela i antigena čija se reakcija mjeri kolorimetrijski (Kos, 2011). Primjeri određivanja koncentracije ostataka doksiciklina, klortetraciklina, oksitetraciklina i tetraciklina u mišićnom tkivu životinja primjenom ELISA metode prikazani su u Tablicama 4 i 5. Najprije su provedene analize obogaćenih uzoraka deri-



Tablica 5. Određivanje rezidua tetraciklina (TTC), oksitetraciklina (OTTC), klortetraciklina (CITTC) i doksiciklina (DTTC) u uzorcima mišićnog tkiva goveda, kokoši, kunića, ovaca, patki, purana i svinja ELISA metodom.

Table 5. Determination of residues of tetracycline (TTC), oxytetracycline (OTTC), chlortetracycline (CITTC) and doxycycline (DTTC) in samples of muscle tissue of cattle, chickens, rabbits, sheep, ducks, turkeys and pigs by ELISA method.

Uzorak / Sample	Matriks / Matrix	TTC ng/g	OTTC ng/g	CITTC ng/g	DTTC ng/g	Najniža granična koncentracija određivanja / Threshold concentration (ng/g)				Rezidui prema legislativi / Residues according to legislative
						TTC	OTTC	CITTC	DTTC	
3791	goveđi mišić / bovine muscle tissue	22,8477	38,087	5,71191	2,85596	46	56,5	49,6	64,1	negativno / negative
3769	kokošji mišić / chicken muscle tissue	23,7123	39,5284	5,92807	2,96404	46	56,5	49,6	64,1	negativno / negative
5716	mišić kunića / rabbit muscle tissue	43,9494	43,9494	13,7342	6,86709	46	56,5	49,6	64,1	negativno / negative
5268	ovčji mišić / sheep muscle tissue	44,7372	51,1283	15,9776	7,98879	46	56,5	49,6	64,1	negativno / negative
4748	pačji mišić / duck muscle tissue	31,2471	52,0889	7,81177	3,90589	46	56,5	49,6	64,1	negativno / negative
3783	mišić purana / turkey muscle tissue	30,5098	50,8598	7,62745	3,81372	46	56,5	49,6	64,1	negativno / negative
3790	svinjski mišić / porcine muscle tissue	32,4296	54,0601	8,1074	4,0537	46	56,5	49,6	64,1	negativno / negative

vatima tetraciklina (u uzorke je dodano 100 ng/g tetraciklinskih antibiotika) kako bi se provjerila točnost ELISA metode. Utvrđeno je da dobivene vrijednosti za koncentracije svakog pojedinog tetraciklinskog antibiotika približno odgovaraju dodanim koncentracijama tetraciklina u ispitivanim uzorcima te se primijenjena ELISA metoda može smatrati preciznom, dovoljno osjetljivom i stoga pogodnom za određivanje rezidua tetraciklinskih antibiotika u mišićnom tkivu životinja (Tablica 4). Rezultati analize mišićnog tkiva različitih životinja su pokazali da nije bilo nedopuštenih koncentracija navedenih derivata tetraciklina u ispitivanim uzorcima, odnosno svi uzorci su bili negativni na rezidue tetraciklinskih antibiotika (Tablica 5). U slučaju dobivanja pozitivnih ili sumnjivih rezultata analize uzoraka na tetraciklinske antibiotike primjenom ELISA metode, mora se primijeniti jedna od metoda za potvrdu.

Suvremene potvrdne metode za analizu rezidua antibiotika su točne, selektivne, osjetljive, precizne, automatizirane i primjenjive na širok raspon analita i vrsta uzoraka te omogućavaju nedvosmisleno određivanje strukture molekula. U tu svrhu se najčešće koristi tandemska spektrometrija masa u kombinaciji s tekućinskom kromatografijom (LC-MS/MS) (Stolker i Brinkman, 2005; Stolker i sur., 2007). Zbog snažne fluorescencije s metalnim ionima, tetraciklinski spojevi se često određuju tekućinskom kromatografijom s fluorescentnom detekcijom (Oka i sur., 2000; Spisso i sur., 2007). Međutim, masene spektrometrije za određivanje tetraciklinskih spojeva primjenom elektroraspršenja (ESI-MS) i kemijske ionizacije pri atmosferskom tlaku (APCI-MS) pokazale su i preko 10

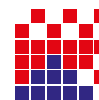
puta veću osjetljivost od na primjer UV metode određivanja tetraciklina (Bruno i sur., 2002; Cherlet i sur., 2003). U zadnjem desetljeću u laboratorijima koji provode analize rezidua antibiotika teži se razvoju multirezidualnih metoda koje uključuju istovremenu analizu većeg broja supstanci koje pripadaju različitim skupinama antibiotika (Stolker i sur., 2008).

Literatura

- Angulo, F.J., Baker, N.L., Olsen, S.J., Anderson, A., Barrett, T.J. (2004): Antimicrobial use in agriculture: Controlling the transfer of antimicrobial resistance to humans. *Seminars in Pediatric Infectious Diseases* 15, 78–85.
- Barbosa, T., Levy, S.B. (2000): The impact of antibiotic use on resistance development and persistence. *Drug Resistance Updates* 3, 303–311.
- Bilandžić, N., Solomun K.B., Varenina, I., Scortichini, G., Brstilo, M., Rudan, N. (2011): Veterinary drug residues determination in raw milk in Croatia. *Food Control* 22, 1941–1948
- Blackman, B.T. (2002): Resistant bacteria in retail meats and antimicrobial use in animals. *The New England Journal of Medicine* 346, 777–779.
- Bruno, F., Curini, R., Di Corcia, A., Nazzari, M., Pallagrosi, M. (2002): An original approach to determining traces of tetracycline antibiotics in milk and eggs by solid-phase extraction and liquid chromatography/mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 16, 1365–1376.



- Cabello, F.C. (2006): Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: a growing problem for human and animal health and for the environment. *Environmental Microbiology* 8, 1137–1144.
- Cherlet, M., De Baere, S., De Backer, P. (2003): Quantitative analysis of oxytetracycline and its 4-epimer in calf tissues by high-performance liquid chromatography combined with positive electrospray ionization mass spectrometry. *Analyst* 128, 871–878.
- Dantas, G., Sommer, M.O., Oluwasegun, R.D., Church, G.M. (2008): Bacteria subsisting on antibiotics. *Science* 320, 100–103.
- Dolliver, H., Gupta, S. (2008): Antibiotic losses in leaching and surface runoff from manure-amended agricultural land. *Journal of Environmental Quality* 37, 1227–1237.
- Džidić, S., Šušković, J., Kos, B. (2008): Antibiotic resistance mechanisms in bacteria: biochemical and genetic aspects. *Food Technology and Biotechnology* 46, 11–21.
- EC (1996): Council Directive 96/23/EC of 29 of April 1996 on measures to monitor certain substances and residues thereof in live animals and animal products and repealing Directives 85/358/EEC and 86/469/EEC and Decisions 89/187/EEC and 91/664/EEC. *Official Journal of the European Communities* L 125, 10–32.
- EC (1997): Commission Decision 97/747/EC of 27 October 1997 fixing the levels and frequencies of sampling provided for by Council Directive 96/23/EC for the monitoring of certain substances and residues thereof in certain animal products. *Official Journal of the European Communities* L 303, 12–15.
- 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. *Official Journal of the European Communities* L15, 1–72
- Feinman, S.E. (1998): Antibiotics in animal feed, drug resistance revisited. *The American Society for Microbiology (ASM) News* 64, 24–30.
- Finlay, A.C., Hobby, G.L., P'an, S.Y., Regna, P.P., Roughton, J.B., Seeley, D.B., Shull, G.M., Sobin, B.A., Solomons, I.A., Vinson, J.W., Kane, J.H. (1950): Terramycin, a new antibiotic. *Science* 111, 85.
- Hunter, I.S., Fierro, F., Martin, J.F. (2002): Tetracyclines. Microbial Secondary Metabolites: Biosynthesis, Genetics and Regulation. *Research Signpost, Lucknow*, 141–166.
- Hunter, I.S. i Hill, R.A. (1997) Tetracyclines. U: *Biotechnology of Antibiotics*, W.R. Strohl (ED.), Marcel Dekker, New York, str. 659–682.
- Kos, B. (2011): predavanja iz modula “Ostatci antibiotika u hrani”, Prehrambeno-biotehnoški 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>. Pristupljeno 12. lipnja 2013.
- Lešnik, U., Gormand, A., Magdevska, V., Fujs, Š., Raspor, P., Hunter, I., Petković, H. (2009): Regulation of the Production of Oxytetracycline. *Food Technology and Biotechnology* 47, 323–330.
- Martinez, J.L. (2009): Environmental pollution by antibiotics and by antibiotic resistance determinants. *Environmental Pollution* 157, 2893–2902.
- Mathur, S., Singh, R. (2005): Antibiotic resistance in food lactic acid bacteria – A review. *International Journal of Food Microbiology* 105, 281–295.
- McManus, P.S., Stockwell, V.O., Sundin, G.W., Jones, A.L. (2002): Antibiotic use in plant agriculture. *Annual Review of Phytopathology* 40, 443–465.
- Oka, H., Ito, Y., Matsumoto, H. (2000): Chromatographic analysis of tetracycline antibiotics in foods. *Journal of Chromatography A* 882, 109–133.
- Okeke, I.N., Klugman, K.P., Bhutta, Z.A., Duse, A.G., Jenkins, P., O'Brien, T.F., Pablos-Mendez, A., Laxminarayan, R. (2005): Antimicrobial resistance in developing countries. Part II: Strategies for containment. *The Lancet Infectious Diseases* 5, 568–580.
- Perreten, V., Schwarz, F., Cresta, L., Boeglin, M., Dasen, G., Teuber, M. (1997): Antibiotic resistance spread in food. *Nature* 389, 801–802.
- Pickens, B.L., Tang, Y. (2009): Decoding and engineering tetracycline biosynthesis. *Metabolic Engineering* 11, 69–75.
- Pravilnik o monitoringu određenih tvari i njihovih rezidua u živim životinjama i proizvodima životinjskoga podrijetla (2008) *Narodne novine* 079, Zagreb.
- Pravilnik o izmjenama i dopunama Pravilnika o monitoringu određenih tvari i njihovih rezidua u živim životinjama i proizvodima životinjskog podrijetla (2013) *Narodne novine* 051, Zagreb.
- Reilly, A., Kaferstein, F. (1997): Food safety hazards and the application of the principles of the hazard analysis and critical control point (HACCP) system for their control in aquaculture production. *Aquaculture Research* 28, 735–752.
- Roberts, M. C., Schwarz S., Aarts, H.J.M. (2012) Erratum: Acquired antibiotic resistance genes: an overview, *Frontiers in Microbiology* 3, 1–17.
- Ruiz, G.M., Rawlings, T.K., Dobbs, F.C., Drake, L.A., Mullady, T., Huq, A., Colwell, R.R., (2000): Global spread of microorganisms by ships. *Nature* 408, 49–50.
- Ryan, M.J., Milford, W., Lotvin, J.A., Strathy, N., Monsey, N.Y., Fantini, S.E., Ridgewood, N.J. (1999): Cloning of the biosynthetic pathway for chlortetracycline and tetracycline formation and cosmids useful therein. US Patent 5,866,410.
- Sanchez, M.B., Hernandez, A., Rodriguez-Martinez, J.M., Martinez-Martinez, L., Martinez, J.L. (2008): Predictive analysis of transmissible quinolone resistance indicates *Stenotrophomonas maltophilia* as a potential source of a novel family of Qnr determinants. *BioMed Central (BMC) Microbiology* 8, 148.
- Sarmah, A.K., Meyer, M.T., Boxall, A.B. (2006): A global perspective on the use, sales, exposure pathways, occurrence, fate and effects of veterinary antibiotics (VAs) in the environment. *Chemosphere* 65, 725–759.
- Sengupta, S., M. K. Chattopadhyay, M.K., Grossart, H.-P. (2013) The multifaceted roles of antibiotics and antibiotic resistance in nature, *Frontiers in Microbiology* 4, Article 47, 1–13. doi: 10.3389/fmicb.2013.00047
- Spisso, B.F., Jesus, A.L.O., Araújo, M.A.G., Monteiro, M.A. (2007): Validation of a high-performance liquid chromatographic method with fluorescence detection for the simulta-



neous determination of tetracyclines residues in bovine milk. *Analytica Chimica Acta* 581, 108–117.

Stolker, A.A.M., Brinkman, U. A. Th. (2005): Analytical strategies for residue analysis of veterinary drugs and growth-promoting agents in food-producing animals - a review. *Journal of Chromatography A* 1067, 15–53

Stolker, A.A.M., Dema, T, Nielen, M. W. F. (2007): Residue analysis of veterinary drugs and growth-promoting agents. *Trends in Analytical Chemistry* 26, 967-979.

Stolker, A.A.M., Rutgers, P., Oosterink, E., Lasaroms, J.J.P., Peters, R.J.B., Van Rhijn, J.A., Nielen, M. W. F. (2008): Comprehensive screening and quantification of veterinary drugs in milk using UPLC-ToF-MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 391, 2309-2322.

Stoob, K., Singer, H.P., Mueller, S.R., Schwarzenbach, R.P., Stamm, C.H. (2007): Dissipation and transport of veterinary sulfonamide antibiotics after manure application to grassland in a small catchment. *Environmental Science & Technology* 41, 7349–7355.

Šušković, J. (2012a): predavanja iz modula “Biotehnologija 4”, Prehrambeno-biotehnoški fakultet Sveučilišta u Zagrebu <<http://moodle.srce.hr/2012-2013/course/view.php?id=2965>>. Pristupljeno 13. lipnja 2013.

Šušković, J. (2012b): predavanja iz modula “Tehnologija antibiotika”, Prehrambeno-biotehnoški fakultet Sveučili-

šta u Zagrebu <<http://moodle.srce.hr/2012-2013/course/view.php?id=2965>>. Pristupljeno 13. lipnja 2013.

Šušković, J., Kos, B. (2007): Mikrobiološke metode za određivanje antibiotika. U: Ambriović Ristov, A. i sur. (ured), Metode u molekularnoj biologiji, Institut Ruder Bošković, Zagreb.

Teuber, M., Meile, L., Schwarz, F. (1999): Acquired antibiotic resistance in lactic acid bacteria from food. *Antonie van Leeuwenhoek* 76, 115–137.

Turiel, E., Bordin, G., Rodriguez, A.R. (2005): Study of the evolution and degradation products of ciprofloxacin and oxolinic acid in river water samples by HPLC-UV/ MS/MS-MS. *Journal of Environmental Monitoring* 7, 189–195.

Wegener, H.C. (2003): Antibiotics in animal feed and their role in resistance development. *Current Opinion in Microbiology* 6, 439–445.

Wenjun, Z., Watanabe, K., Wang, C.C., Tang, Y. (2007) Investigation of Early Tailoring Reactions in the Oxytetracycline Biosynthetic Pathway. University of California Los Angeles <<http://www.jbc.org/content/282/35/25717.full>>. Pristupljeno 13. lipnja 2013.

WHO (1997): The medical impact of the use of antimicrobials in food animals. *Report of a WHO Meeting*. WHO – World Health Organization, Berlin.