

Rezidue kokcidiostatika u proizvodima animalnog podrijetla nakon primjene u peradi



Ivana Varenina, Nina Bilandžić, Đurđica Božić Luburić, Božica Solomun Kolanović, Ines Varga i Relja Beck*

Uvod

U humanoj i veterinarskoj medicini u uporabi je veliki broj veterinarskih lijekova u koje ubrajamo antibakterijske, antifungalne, antiviralne i antiparazitske lijekove. Samo su neke od tih tvari dopuštene za uporabu u profilaktičke svrhe pri uzgoju životinja čiji se proizvodi stavljaju na tržište kao hrana, a nakon njihove primjene u terapiji se propisuje karencija.

Zbog pretjerane uporabe antibiotika i drugih veterinarskih lijekova pri uzgoju životinja na gospodarstvima, kao promotora rasta i u terapijske svrhe, u hrani životinjskog podrijetla pojavljuju se rezidue, tj. ostaci farmakološki djelatnih tvari za koje je dokazano ili postoji sumnja da su škodljivi po ljudsko zdravlje. Moguće su toksične i alergijske reakcije u potrošača, ili neizravno mogu prouzročiti i probleme, kroz indukciju antibiotske rezistencije u bakterija. Konzumacija malih količina antimikrobnih tvari može izazvati razvoj rezistencije kod bakterija koje čine uobičajenu

mikrobiotu intestinalnog trakta ljudi i životinja, a tako se stečena rezistencija često prenosi među bakterijama horizontalnim i vertikalnim transferom gena odgovornih za rezistenciju (Andam i sur., 2011.).

Brojnim veterinarskim lijekovima ili je propisana najveća dopuštena količina (NDK) ili su zabranjeni za uporabu. Kod primjene veterinarskih lijekova bitno je poznavati način na koji se tvar kad dođe u organizam životinje metabolizira, koja su ciljna tkiva u kojima se mogu detektirati njihovi zaostaci i koliko je vremena potrebno da se iz organizma izluče. Za svaki lijek odobren za uporabu u životinja provode se toksikološke i kinetičke studije. Kod određivanja prisutnosti zaostataka veterinarskih lijekova u svrhu određivanja vremena zadržavanja i eliminacije lijeka i njegovih metabolita, potrebne su selektivne i precizne analitičke metode. Metode se podvrgavaju validacijskim postupcima koji u potpunosti opisuju njene karakteristike.

Dr. sc. Ivana VARENINA*, dipl. ing. biotehnol. (dopisni autor, e-mail: kurtes@veinst.hr), dr. sc. Nina BILANDŽIĆ, dipl. ing. biotehnol., znanstvena savjetnica, Đurđica BOŽIĆ LUBURIĆ, dipl. ing. biotehnol., Ines VARGA, mag. primj. kemije, Božica SOLOMUN KOLANOVIĆ, dipl. ing. prehr. tehnol., dr. sc. Relja BECK, znanstveni savjetnik, Hrvatski veterinarski institut, Zagreb, Hrvatska

Intenzivni uzgoj peradi zahtijeva korištenje kokcidiostatika u preventivne i terapijske svrhe. Studije koje istražuju stupanj zaostajanja i eliminacije kokcidiostatika u organizmu peradi kao i zadržavanje rezidua u njihovim tkivima i jajima važne su u kontroli zdravstvene ispravnosti hrane. Cilj ovog rada je prikazati kemijske karakteristike kokcidiostatika, njihovu kinetiku u organizmu nakon primjene te važnost provedbe eliminacijskih studija o njihovom zadržavanju u ciljnim tkivima.

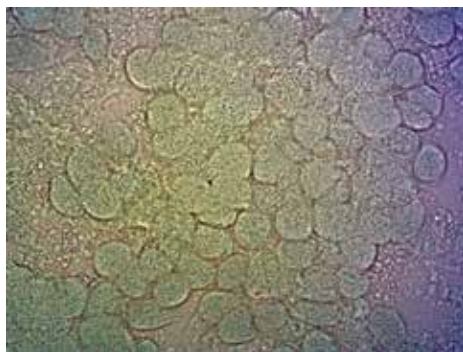
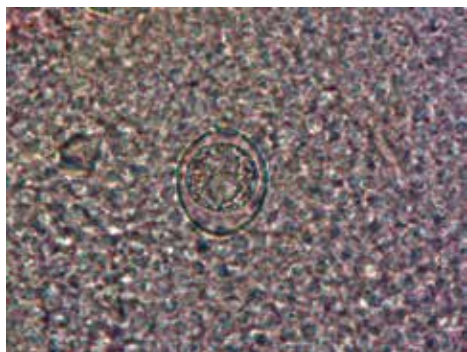
Kokcidiostatici i mehanizam djelovanja na parazite iz roda *Eimeria*

Kokcidioza je parazitska bolest prouzročena jednostaničnom protozoonom roda *Eimeria* koja prouzroči narušavanje integriteta mukoze što pogoduje rastu bakterija (Taylor i sur., 2015.).

Zbog velikog reproduktivnog potencijala, preživljavanja sporuliranih oocisti u stelji te različite patogenosti, kokcidioza predstavlja najčešću bolest intenzivne proizvodnje peradi. Iz navedenog jasno je da današnja intenzivna proizvodnja peradi nije moguća bez kontrole kokcidija kokcidiostaticima, kokcidiocidima ili cijepljenjem (Taylor i sur., 2015.). (Slika 1).

Antiprotozoarni lijekovi suljerkovi koji imaju važnu ulogu u terapiji parazitoza, posebice u peradarskoj industriji (Slika 2), prouzročeni vrstama iz roda *Eimeria* (Božičković i sur., 1993.). Kokcidiostatici namijenjeni za prevenciju kokcidioze u ptica koriste se pojedinačno ili u kombinaciji, a značajni među njima su: amprolij, klopidol, diklazuril, etopabat, halofuginon, lasalocid, maduramicin, monenzin, narazin, nikarbazin, robenidin i salinomycin te ponekad sulfonamid sulfakvinoksalin (Taylor i sur., 2015.). Spomenuti lijekovi su već duže vrijeme u primjeni, stoga se u profilaksi i liječenju trebaju primjenjivati procedure koje se temelje na kontroliranoj izmjeni lijekova. Cjepiva koja sadrže oslabljene sojeve patogenih vrsta kokcidija za primjenu u peradi najčešće se kod dugoživućih životinja koriste u preventivne svrhe, a rjeđe za brojlere (Taylor i sur., 2015.).

Kokcidiostatici se dijele na karboksilirane ionofore: monensin, lasalocid, narasin, salinomycin, maduramicin i semduramicin, koji su prema kemijskoj strukturi klasificirani kao antibiotici polietari. Ionofori se koriste samostalno ili u kombinaciji s kemijskim kokcidiostaticima. Sljedeća grupa kokcidiostatika su kemijski kokcidiostatici koji imaju različite kemijske strukture: karbanilidi (nikarbazin), triazinoni (toltrazuril), benzenski acetonitrili (diklazuril), gvanidini



Slika 1. Prikaz oociste i meronata (shizonata) kokcidije *Eimeria tenella* - nativni razmaz strugotine sljepog crijeva kokoši s cecalnom kokcidiozom (100 x) (Fotografija Hrvatskog veterinarskog instituta).

(robenidin), piridini (klopidol), tiaminski antagonisti (amprolij), kinozalini (halofuginon), kinoloni (dekokvinat, nekvinat).

Način djelovanja polieterskih ionofora razlikuje se od ostalih antimikrobnih supstancija. Nazivaju ih još i transportnim antibioticima jer djeluju na način da se inkorporiraju u membranu stanice tvoreći svojevrsne ionske tunele te prouzročavaju gubitak iona i oštećenje stanice (Novilla, 2007.).

U uporabi je 7 karboksilnih ionofora u svrhu terapije kokcidioza ili kao promotora rasta te boljeg iskorištenja krmne smjese. Prva primjena kokcidostatika zabilježena je 1971. godine uporabom monenzina u liječenju kokcidioze u pilića (Novilla, 2007.). Nekoliko godina kasnije monenzin je uporabljen kao promotor rasta stoke i kao sredstvo za povećanje iskorištenosti krmne hrane (Novilla, 2007.). Zatim je 1977. godine primijenjen lasalocid za sprječavanje kokcidioze i poticanje rasta pri uzgoju peradi (Novilla, 2007.). Dopuštenje za korištenje u peradstvu ubrzo su dobili i salinomycin (1983. godine), narasin (1986. god.) i maduramicin (1989. god.) (Novilla, 2007.). Razvoj genetičkog i biokemijskog inženjersva je omogućio ekonomičniju proizvodnju polieterskih antibiotika maduramicina (soj producent *Actinomyces yunnanensis*), monenzina (soj producent *Streptomyces cinnamomensis*), lasalocida (soj producent *Streptomyces lasaliensis*) i salinomicina (soj producent *Streptomyces albus*), najvažnijih komercijalnih kokcidostatika (Dworkin i sur., 2006.).

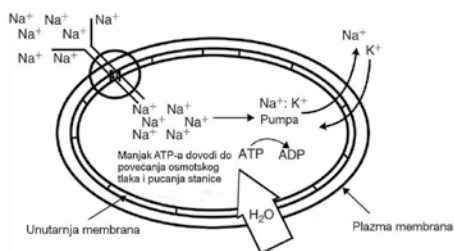
Ionofori su tvari koje su topive u mastima, a tvore dinamičke reverzibilne komplekse s Na^+ , K^+ i Ca^{2+} ionima i na taj način olakšavaju protok specifičnih iona kroz biološke membrane (Novilla, 2007.). Rezultat velike specifičnosti karboksilnih ionofora prema Na^+ ionima su visoke koncentracije unutarstaničnog Na^+ (Slika 3). Prema najnovijim istraživanjima ionofor veže natrijev kation i tvori sol pri čemu se s



Slika 2. Prikaz kaveznog uzgoja kokoši nesilica (Fotografija Hrvatskog veterinarskog instituta).

karboksilne grupe otpušta proton; zatim u takvom kompleksu premješta kation na suprotnu stranu lipidne membrane i otpušta ga, a karboksilna se skupina protonira. Takva neutralna molekula prelazi na vanjsku stranu membrane i može započeti novi prijenos (Lowicki i Huczynski, 2013.). Kod povećanja koncentracije Na^+ iona, stanica pokušava izjednačiti ionski gradijent izbacivanjem K^+ iona. Protok K^+ iona je sporiji pa se povećanje koncentracije Na^+ unutar stanice kompenzira izlaskom H^+ iona iz stanice i povećanjem alkaliteta unutar stanice (Dorne i sur., 2013.). Promjene u koncentraciji iona unutar stanice prouzročavaju promjene na organelama i oštećenje stanice (Novilla, 2007.); ujedno povećani maseni udio Na^+ iona unutar stanice povećava i unutarstaničnu koncentraciju Ca^{2+} zahvaljujući mehanizmu izmjene $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (Greif i sur., 2001.).

Uvođenjem neravnoteže koncentracijskog gradijenta iona, polieterski antibiotici prouzročavaju povećan ulazak vode u stanicu, promjenu unutarstanične pH vrijednosti, povećanje koncentracije Ca^{2+} iona, peroksidaciju lipida, bubrenje



Slika 3. Utjecaj ionofora na dinamiku iona kod kokcidija [prilagođeno iz Novilla, 2007.].

i razaranje citoplazmine membrane i iscrpljivanje energetskih zaliha stanice (Reeves, 2012.).

Različiti ionofori ne pokazuju jednaki afinitet za sve katione, što ovisi o afinitetu karboksilnih grupa prema protonima ili afinitetu liganda prema metalnim kationima (Bergen i Bates, 1984.).

Karboksilni ionofori izravno utječu na spolni i nespolni stadij rasta u kokcidija *Eimeria* vrsta. Ionofori utječu na stabilnost membrane i osmotskog tlaka ekstracelularnih sporozoita i merozoita. Nedostatak organela za regulaciju osmotskog tlaka kokcidije čini osjetljivima na male promjene osmotskog tlaka (Lindsay i Blagburn, 1995.).

U studijama u kojima je istraživana utjecaj karboksilnih ionofora na slobodne sporozoite *Eimeria* spp. uočen je povećan maseni udio Na^+ u parazitu, smanjena razina ATP-a unutar sporozoita što stimulira glikolizu, povećanje osmotskog tlaka unutar sporozoita u razvoju te ulazak vode, tada parazit bubri te nastaju oštećenja organela iz čega proizlazi ugibanje stanice. Kokcidije u stadijima sporozoita i merozoita, prisutne u intestinalnom sustavu ciljevi su mnogih ionofora, dok su prve unutarstanične generacije dokazano najviše osjetljive na kokcidiostatik lasalocid (Novilla, 2007.).

Molekula maduramicina, molarne mase 934,16 g/mol, je razgranata struktura s polioksigeniranim karboksilnim kiselinama (EFSA, 2008.b). Maduramicin se pojavljuje u dva

strukturna oblika; α - i β -maduramicin s razlikom u funkcionalnoj grupi na A prstenu koja može biti $-\text{OCH}_3$ ili $-\text{OH}$. Zahvaljujući svojoj strukturi bogatoj alkilnim grupama te samoj činjenici što je molekula razgranata, alfa-maduramicin ima veći afinitet za monovalentne katione te se uglavnom u tom obliku koristi ili kao aditiv u hrani za životinje ili u terapijske svrhe.

Ellestad i sur. (1985.) su ustanovili da maduramicin tvori soli s monovalentnim i divalentnim kationima, a tijekom uzgoja *Actinomadura yumaensis* se u hranjivoj podlozi nalazi u formi slobodne kiseline. Veliki afinitet prema kationima dovodi do brzog hvatanja prisutnih monovalentnih kationa. Dokazano je da najveći afinitet pokazuje prema amonijevim, kalijevim i natrijevim ionima. Kristalografijom su dobivene slike nastalih soli maduramicina pri čemu su vidljive pseudocikličke strukture s liofilnim metilnim grupama na vanjskim krajevima i atomima kisika u obliku etera prema središtu strukture što ih čini molekulama koje se lako mogu uklopiti u stanične membrane. Metalni ion osiguravajući maksimalni dodir s kisikovim atomima uklapa se u prostornu strukturu i neutralizira naboj molekule (Ellestad i sur., 1985.).

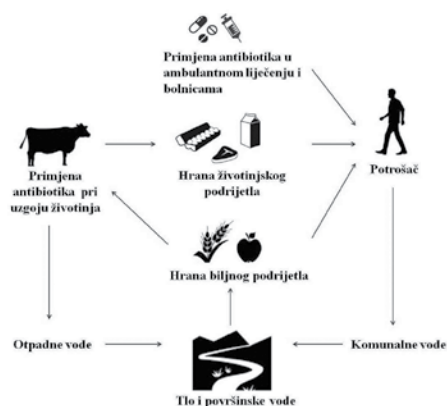
Monenzin, kao monokarboksilna kiselina polietera se koristi i kao lijek protiv kokcidioze, a ujedno ima i antimikrobno djelovanje. Monenzin je odobren kao kokcidiostatik za piliće u tovu s maksimalnim dopuštenim masenim udjelom od 100-125 mg/kg te procijenjenim vremenom zadržavanja rezidua od 3 dana. Kinetičke studije pokazuju da se monenzin većinom zadržava u jetri, a podatci za neciljne skupine kao što su kokoši nesilice nisu dostupne. Toksikološke studije dale su prosječnu NOAEL (Engl., *No-observed-adverse-effect-level*) vrijednost od 0,3 mg/kg tjelesne težine, tj. ADI (Engl., *Acceptable daily intake*) iznosi 3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (EFSA, 2008.a).

Toltrazuril se kao triazintrionski derivat često koristi i u prevenciji i terapiji kokcidioze u pilića s terapijskom dozom od 7 mg/kg tjelesne težine po danu (EMA, 1998.) te u pura, svinja i ostale stoke, a zabranjen je za uporabu u peradi čija se jaja koriste za prehranu ljudi. Utvrđen je toksikološki ADI limit za toltrazuril od 120 µg/kg tjelesne mase. Toltrazuril sulfon je glavni marker toltrazurila jer je u najvećem postotku detektiran u svim tkivima, s najvećim udjelom od 92% u jetri. Provedena je studija eliminacije toltrazuril sulfona u goveda nakon primjene 15 mg/kg tjelesne težine. Najveći zaostatci toltrazuril sulfona zamijećeni su u jetri pri masenom udjelu od 4500 µg/kg 28 dana nakon administracije lijeka, a tek nakon 70 dana maseni udio u jetri je bio ispod limita kvantifikacije metode. Metoda kojom je određeno vrijeme eliminacije toltrazurila imala je limit kvantifikacije od 40 µg/kg za jetru (EMA, 2008.).

Rezistencija na kokcidiostatike

Širenje rezistencije na antimikrobne tvari temelji se na vertikalnom i horizontalnom prijenosu gena. Zajednički termin za sve gene odgovorne za rezistenciju je antibiotski rezistom. Rezistencija na antibiotike očituje se kroz 4 glavna biokemijska mehanizma: inaktivacija antibiotika modifikacijom njegove strukture, promjena ciljanog mjesta djelovanja antibiotika, promjena aktivnosti efluks-pumpi i promjene u permeabilnosti stanične membrane te premošćivanje ciljanog mjesta djelovanja antibiotika mijenjanjem inhibiranog metabolizamskog puta (Džidić i sur., 2008.).

Učestalost korištenja veterinarskih lijekova u prevenciji i liječenju životinja, kao i uporaba u svrhu promotora rasta životinja, razlog je rasprostranjenosti tih tvari u prirodnim ekosustavima (Martinez, 2009.) (Slika 4).



Slika 4. Kruženje antimikrobnih supstancija u prirodnim ekosustavima (vlastita slika)

Iako se u početku smatralo da kokcidijske peradi ne mogu brzo razviti rezistenciju, uporaba istih kokcidiostatika kroz određeno vrijeme ipak je prouzročila pojavu smanjene osjetljivosti i rezistencije (Chen i sur., 2008.). Javlja se i unakrižna rezistencija što znači da uz prisutnu rezistenciju na određeni kokcidiostatik i drugi sličan proizvod pokazuje slabiju učinkovitost u liječenju. Takav oblik rezistencije je raširen za ionoforne kokcidiostatike jer imaju isti mehanizam djelovanja (Peek i Landman, 2003.). Sve su češći dokazi o pojavi rezistencije kokcidijske na poznate kokcidiostatike (Peek i Landman, 2003., Chen i sur., 2008.). Detektirane su grupe gena koji pridonose fiziološkim i biokemijskim promjenama povezanim s mehanizmom razvoja rezistencije na maduramicin i monenzin u vrsta *Eimeria tennella*. Vrsta *E. tenella* razvila je rezistenciju na način da smanjuje aktivnost ionofora kroz smanjenje afiniteta vezanja ionofora na membranu. Chen i sur. (2008.) navode različite mehanizme rezistencije za maduramicin i monenzin. U soja *E. tennella* rezistentnog na maduramicin (gen za MadR) istaknuta je povećana ekspresija gena za strukturni protein kolagena kao i pojačana ekspresija gena odgovornih za polimerizaciju i depolimerizaciju mikrotubula koji osiguravaju

staničnu čvrstoću, pokretljivost i unutarstanični transport. Takve promjene u genskoj ekspresiji dovode do povećane čvrstoće membrane, smanjene propusnosti, a time i teže postizanje neravnoteže osmotskog tlaka. U fazi razvoja sporozoita i merozoita javlja se smanjena ekspresija dva transportna proteina, čime se znatno smanjila potrošnja energije, a time i ugradnja antikokcidijskih tvari. Ionoforni kokcidiostatiki, kao inhibitori enzima za biosintezu amilopektina (spremišta ugljikohidrata kod mnogih parazita iz roda *Apicomplexa*), prouzročite smanjenje količine dostupne energije za preživljavanje parazita, posebno potrebne za stadije razvoja parazita izvan nositelja (Schmatz, 1997., Harris i sur., 2004.). Upravo je to glavni uzrok ugibanja osjetljivih parazita. Rezistentni sojevi imaju inhibirani metabolizam šećera te su stoga otporniji na djelovanje kokcidiostatika maduramicina (Chen i sur., 2008.). Rezistencija na kokcidiostatike se smatra fiziološkom adaptacijom, a ne mutacijom *per se*, jer je posredovana izvanstaničnim polisaharidima koji onemogućuju vezanje kokcidiostatika na membranu kokcidija.

Utjecaj kemijskih svojstava kokcidiostatika na kinetiku raspodjele rezidua u jajima

Kokoši nesilice su najčešća neciljna skupina koja je izložena kokcidiostaticima. Hrana za neciljne skupine životinja je najčešće kontaminirana zaostacima kokcidiostatika, koje su u hranu dospjele iz prethodnih šarža proizvedene hrane s kokcidiostaticima namijenjene ciljnim vrstama (Olejniki i sur., 2014.). Granične koncentracije koje opisuju dopuštenu količinu kokcidiostatika u jajima i krmnoj smjesi često nisu potkrijepljene valjanim istraživanjima o zadržavanju i eliminaciji. Štoviše, zbog razlika u kinetici među kokcidiostaticima, studije o zadržavanju i eliminaciji potrebno je provesti za

svaki pojedini kokcidiostatik. Kinetika zadržavanja razlikuje se za područja primjene od minimalnog dopuštenog masenog udjela u krmnoj smjesi u kojem kokcidiostatik može zaostati kao kontaminant, do masenog udjela koji je propisan za krmnu smjesu za životinjske vrste za koje je primjena kokcidiostatika dopuštena (Varenina, 2015.).

Afinitet vezanja veterinarskih lijekova u tkivu nakon njihove primjene ovisi o njihovim kemijskim svojstvima kao što su molarna masa, lipofilnost, konstanta disocijacije i afinitet vezanja na proteine. Kokoš nesilica nese jaje svaka 24 sata, a svakom jajetu je potrebno nekoliko dana kako bi se razvilo *in vivo*, pri čemu su neke komponente jajeta prisutne u organizmu i nekoliko mjeseci prije nego li je jaje sasvim razvijeno i sneseno. Nakon primjene veterinarskih lijekova može biti potrebno čak nekoliko tjedana da jaje ne bi sadržavalo rezidue primijenjenog lijeka (Goetting i sur., 2011.). Uzimajući u obzir tri glavne komponente jajeta, žumanjak ima najduži razvojni period. Lipoproteini kao prekursori žumanjka nastaju u jetri i cirkulacijom se transportiraju u folikule ovarija. Prije nego li je jaje izneseno žumanjak intenzivno raste tijekom 10 dana, čime je i ubrzana akumulacija veterinarskih lijekova u žumanjku, dok se nakon toga bjelanjak formira kroz svega nekoliko sati, ali može biti i mjesto zaostajanja veterinarskih lijekova (Goetting i sur., 2011.).

Tendencija vezanja lijeka za proteine u plazmi, hidrofobnost ili hidrofilitet te mogućnost transporta kroz različite vrste tkiva su glavne karakteristike koje utječu na distribuciju lijeka u žumanjku ili bjelanjku jajeta (Martinez i sur., 2006.). Iako je u prijašnjem istraživanju postavljen model koji opisuje prijenos veterinarskih lijekova (Vandenberge, 2012.), njime se ne može objasniti distribucija kokcidiostatika.

Distribucija i vrijeme zadržavanja zaostataka kokcidiostatika u jajima

ne može se predvidjeti na temelju postojećih kinetičkih podataka utvrđenih u eksperimentima s pilićima (EFSA, 2008.b).

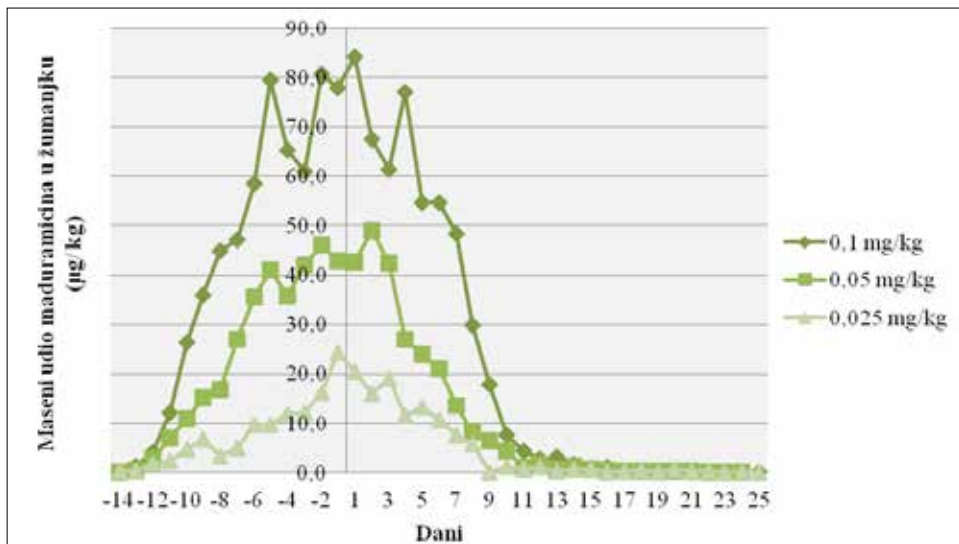
Istraženi su zaostaci maduramicina, monenzina i toltarzurila u jajima nesilica, koje su kao neciljne vrste često izložene aditivima za ciljne vrste (Varenina i sur., 2015.). Poznavanjem kinetike kokcidiostatika u ovisnosti o primijenjenom udjelu u krmnoj smjesi moguće je predvidjeti vrijeme zadržavanja pojedinih kokcidiostatika koji su po kemijskim svojstvima slični.

U istraživanju gdje su uzorkovana jaja kokoši nesilica kojima je putem krmne smjese primjenjivan maduramicin kroz 14 dana (5; 1; 0,5; 0,1; 0,05; 0,025 mg/kg), maseni udio maduramicina u bjelanjcima ako ga usporedimo s masenim udjelima u uzorcima žumanjaka bio je zanemariv. Deseti dan tretmana krmnom smjesom s maksimalnim udjelom maduramicina od 5 mg/kg detektiran je maksimalni maseni udio maduramicina u bjelanjku od 3,0 µg/kg, dok je u uzorku žumanjka jaja uzorkovanih istog dana za tu grupu maseni udio maduramicina iznosio 2369,2 µg/kg. Za ostale grupe nesilica u uzorcima bjelanjaka maseni udjeli maduramicina nisu iznosili više od 0,8 µg/kg (Varenina i sur., 2015.). Takvi rezultati ukazuju na visoku lipofilnost molekule te rezidue neće biti zastupljene u bjelanjcima pri značajnim masenim udjelima niti nakon korištenja krmnih smjesa s visokim udjelima tog kokcidiostatika.

U pokusu u kojem su kokoši nesilice tretirane toltarzurilom zaostajanje toltarzurila bilo je znatno veće u žumanjcima nego u bjelanjcima, dok je raspodjela metabolita toltarzuril sulfona u bjelanjcima i žumanjcima bila ujednačena (Varenina i sur., 2012.). U istraživanju provedenom s halofuginonom, čija molekula ukazuje na bolju polarnost, zapažena je približno jednaka distribucija halofuginona u žumanjku i bjelanjku (Yakkundi i sur., 2002.), dok su zahvaljujući manjoj

polarnosti molekula, slično kao i za maduramicin, zaostaci dinitrokarbanilida (Cannavan i sur., 2000.) i lasalocida (Kennedy i sur., 1996.) u većem postotku u žumanjku jajeta. U eksperimentu s monenzinom gdje je najveći primijenjeni maseni udio monenzina u krmnoj smjesi bio 125 mg/kg uočena je podjednaka raspodjela monenzina između žumanjka i bjelanjka (Varenina i sur., 2016.). Iz toga se da zaključiti da će se nepolarne molekule s visokom lipofilnošću slabije apsorbirati, ali će se pri uporabi visokih masenih udjela u terapiji preko krmne smjese, rezidue moći detektirati i u bjelanjcima.

Primjenom maduramicina u kokoši nesilica dolazi do blagog porasta zaostataka maduramicina u jajima od prvog do trećeg dana tretmana, nakon čega dolazi do naglog porasta masenih udjela do maksimalnih vrijednosti. Maseni udjeli maduramicina dosežali su maksimalne vrijednosti između zadnjeg dana tretmana do trećeg dana nakon završetka tretmana u masenim udjelima u žumanjcima od 24,3 µg/kg do 3313,1 µg/kg (Slika 5). Jedino uporabom krmne smjese koja je kontaminirana s 0,5% maksimalnog dopuštenog masenog udjela maduramicina u krmnoj smjesi namijenjenoj za piliće i pure, može se osigurati da su ostatci maduramicina u jajima ispod propisanog limita (Varenina i sur., 2015.). Prema direktivi Europske zajednice, 2009., već kod kontaminacije krmne smjese u omjeru od 1%, koji je ujedno i dopušteni maseni udio maduramicina u krmnoj smjesi kao neizbježno onečišćenje hrane za životinje za koje ti dodatci nisu odobreni za uporabu (Direktiva, 2009.), maseni udio maduramicina u jajima prelazi dopuštenu količinu u jajima od 12 µg/kg (Uredba, 2012.). Maksimalni udio od 16,6 µg/kg postignut je 3. dan nakon završetka tretmana. Može se zaključiti da korištenje krmne smjese s dopuštenom razinom kontaminacije od 1% ne može osigurati



Slika 5. Akumulacija i eliminacija maduramicina iz žumanjaka uz primjenu 0,1; 0,05 i 0,025 mg/kg maduramicina u stočnoj hrani (Varenina i sur., 2015.)

rezultat analize maduramicina u jajima niži od propisane NDK vrijednosti.

Prilikom uporabe krmne smjese s predviđenim postotkom kontaminacije monenzinom od 1%, u uzorcima jaja monenzin zaostaje u masenim udjelima manjim od propisane najveće dopuštene količine od 2 µg/kg u jajima. Ipak, nakon primjene krmne smjese s masenim udjelom od 10%, analiza jaja na prisutnost rezidua monenzina pokazala je nesukladne rezultate (Varenina i sur., 2015.), tj. određeni maseni udjeli u jajima iznosili su 4,72 µg/kg, tj. više od propisanog limita od 2 µg/kg utvrđenog Uredbom Europske zajednice, 2009.

Prema uredbi Europske zajednice, 2010., toltrazuril je zabranjen za uporabu kao dodatak vodi za piće za perad čija jaja se koriste za hranu te nije propisana najveća dopuštena količina u jajima. U pokusu gdje je toltrazuril primijenjen na kokošima nesilicama u vodi za piće, terapijske doze su bile 75, 125 i 175 mg/L toltrazurila, a primijenjene su u 3 ponavljanja s razlikom od 5 dana. Drugi dan nakon prve primjene toltrazurila,

maseni udjeli toltrazurila i toltrazuril sulfona u jajima bili su višestruko veći od LOQ vrijednosti (Varenina i sur., 2012.).

Izražavanje faktora prijenosa rezidua kokcidiostatika

U svrhu izračuna faktora prijenosa kokcidiostatika iz krmne smjese u matriks jaja, za svaki od matriksa izračunata je plato vrijednost masenih udjela eliminacijskih krivulja, pomoću kojih se može međusobno usporediti zaostajanje svakog od kokcidiostatika. Faktor prijenosa za svih šest grupa nesilica hranjenih različitim masenim udjelima maduramicina u krmnoj smjesi se kretao od 0,13 do 0,37. Slične vrijednost su utvrdili Bodi i sur. (2012.) koji su proveli pokus s masenim udjelima maduramicina u krmnoj smjesi u rasponu od 0,01 do 0,05 mg/kg, gdje je faktor prijenosa bio od 0,18 do 0,34. Iz dobivenih rezultata se može zaključiti da je prijenos maduramicina iz krmne smjese u jaja neovisan o povećanju masenog udjela u krmnoj smjesi te je

srednja vrijednost faktora prijenosa maduramicina iz krmne smjese u matriks jaja iznosila 0,267 (Varenina i sur., 2015.).

Faktor prijenosa monenzina iz krmne smjese iznosio je 0,0004, a faktor prijenosa toltrazurila i toltrazuril sulfona iz vode za piće u jaja iznosio je 0,011 za toltrazuril te 0,033 za toltrazuril sulfon.

U usporedbi s drugim studijama o zadržavanju kokcidiostatika u jajima, prijenos maduramicina je izrazito visok. Za lasalocid, halofuginon i nikarbazin vrijednosti faktora prijenosa iznosile su 0,051 do 0,077, dok je za salinomycin, monenzin i narazin omjer masenih udjela u jajima i krmnoj smjesi iznosio od 0,0001 do 0,004 (Kennedy i sur., 1996., Cannavan i sur., 2000., Yakkundi i sur., 2002., Olejnik i sur., 2014.).

Povećanje masenog udjela maduramicina u krmnoj smjesi linearno utječe na povećanje udjela u jajima. Za područje masenog udjela u krmnoj smjesi od 0,025 do 1 mg/kg procijenjeno je da je maseni udio maduramicina u jajima ($\mu\text{g}/\text{kg}$) jednak 356,8 puta maseni udio maduramicina u krmnoj smjesi (mg/kg). Takav faktor može koristiti u proračunu prosječnog masenog udjela u jajima nakon primjene kontaminirane krmne smjese kokcidiostaticima (Varenina i sur., 2015.).

Maseni udio monenzina u jajetu za grupe I, II i III pokazale su linearnu ovisnost o teoretskom masenom udjelu monenzina u krmnoj smjesi. Za područje masenog udjela u krmnoj smjesi od 1,25 do 62,5 mg/kg procijenjeno je da je maseni udio monenzina u jajima ($\mu\text{g}/\text{kg}$) jednak 0,22 puta maseni udio monenzina u krmnoj smjesi (mg/kg) (Varenina i sur., 2016.).

Maseni udjeli zaostataka toltrazurila linearno su povezani s koncentracijom toltrazurila u vodi čime se može postaviti definicija da je za područje koncentracije toltrazurila od 75 do 175 mg/L maseni udio toltrazurila u jajima ($\mu\text{g}/\text{kg}$) jednak 31,9 puta koncentracije u vodi (mg/L) (Varenina i sur., 2012.).

Usporedbom s prijašnjim istraživanjima najveći faktor prijenosa ostvaruje maduramicin. U prijašnjim istraživanjima izračunati su faktori akumulacije za ostale kokcidiostatike; za semduramicin 61,9 (Olejnik i sur., 2014.), za halofuginon 77,2 (Yakkundi i sur., 2002.), za nikarbazin 51 (Cannavan i sur., 2000.), za lasalocid 64 (Kennedy i sur., 1996.). Maseni udio u jajima za monenzin iznosi 0,12 puta maseni udio u krmnoj smjesi (Kennedy i sur., 1998., Vandenberge i sur., 2012.), dok je maseni udio salinomicina 3,3 puta maseni udio u krmnoj smjesi (Kennedy i sur., 1996.).

Kinetika eliminacije rezidua kokcidiostatika u jajima

Maseni udjeli maduramicina u žumanjku nakon primjene pokazuju eksponencijalni pad te logaritamska funkcija masenog udjela maduramicina u jajima rezultira linearnom ovisnošću o vremenu. Na taj način je prikazano i određeno vrijeme potrebno da vrijednost masenog udjela maduramicina padne ispod vrijednosti najveće dopuštene količine (NDK) ili ispod limita kvantifikacije metode (LOQ). Prilikom primjene krmne smjese koja sadrži dopuštenu razinu maduramicina ($< 1\%$ onečišćenja zbog kontaminacije, grupa V) maseni će udio maduramicina u jajetu biti ispod regularnog limita tek 5,3 dana nakon tretmana. U slučaju da krmna smjesa sadrži propisani maseni udjel maduramicina za ciljne skupine, 5 mg/kg maduramicina potrebno je 16,6 dana da maseni udio maduramicina padne ispod NDK vrijednosti (12 $\mu\text{g}/\text{kg}$) (Varenina i sur., 2015.). Prijašnja su istraživanja pokazala slično zaostajanje rezidua za semduramicin, gdje je maseni udio semduramicina u jajima bio manji od propisane NDK vrijednosti 7 dana nakon završetka tretmana (Olejnik i sur., 2014.). Za maseni udio monenzina u krmnoj smjesi od 125 mg/kg maseni udio

u jajima manji je od 2 µg/kg nakon 11,7 dana (Varenina i sur., 2015.).

Administracijom toltrazurila postignute su dvije faze maksimalnih masenih udjela primarnog oblika lijeka, toltrazurila, i njegovog metabolita, toltrazuril-sulfona, nakon čega funkcija masenih udjela ima ekspanzibilni pad. Na početku administracije dominiraju ostatci toltrazurila s većim omjerom masenog udjela toltrazurila prema toltrazuril-sulfonu (TOL/TOL-SULF), nakon čega taj omjer opada, što dokazuje da se većina toltrazurila metabolizira i zadržava u obliku toltrazuril-sulfona, čiji se rezidui mogu kvantificirati i nakon 32 dana od prestanka zadnje primjene lijeka (Varenina i sur., 2012.). Može se zamijetiti da koncentracija toltrazurila u vodi za piće više utječe na vrijeme eliminacije toltrazuril-sulfona, te je stoga odabran kao glavni marker zaostajanja toltrazurila nakon njegove administracije. Čak 32 dana nakon prestanka terapije u žumanjku je toltrazuril i dalje bio prisutan u masenom udjelu od 55,8 µg/kg, a toltrazuril-sulfon u masenom udjelu od 270,9 µg/kg, za grupu s koncentracijom toltrazurila u vodi od 75 mg/L, što odgovara dozi od 10,35 mg toltrazurila po kg mase nesilice i po danu. Toltrazuril, koji je uz diklazuril jedan od predstavnika triazinskih kokcidiostatika, distribuira se kroz sva tkiva, lako se apsorbira u gastrointestinalnom traktu te stoga ima dugo vrijeme zadržavanja u jajima (Goetting i sur., 2011.).

Zaključci

Uzimajući u obzir zastupljenost istraženih kokcidiostatika u žumanjcima i bjelanjcima, može se zaključiti da ukoliko tvari dominiraju u žumanjku jajeta kao rezidui, velika je vjerojatnost da će vrijeme zadržavanja biti i više od 10 dana. To se može protumačiti činjenicom da razvojni proces žumanjka započinje nekoliko dana prije nego li će jaje biti snijeto, i to u jetri gdje nastaju prvi

prekursori žumanjka. U usporedbi s tim, bjelanjak se razvija svega nekoliko sati prije nesjenja jajeta.

Apsorpcija kemikalija iz gastrointestinalnog sustava ovisi o fizikalno-kemijskim svojstvima spoja, kao što su lipofilnost i stupanj disocijacije. Pretpostavka da s lipofilnošću raste i apsorpcija kemikalija ne vrijedi za supstance s izrazito visokom lipofilnošću koje mogu imati nisku bioraspoloživost. Razlog tome je da jako lipofilne molekule mogu zaostati u lipidnoj strukturi plazmine membrane, a pored toga su slabo topljive u fluidima gastrointestinalnog sustava što onemogućuje kontakt sa sluznicom i njihovu apsorpciju (Dirikolu i sur., 2009.). Tako se može objasniti pojava da primjena monenzina u visokim masenim udjelima, zbog svoje viske lipofilnosti i niske bioraspoloživosti rezultira kratkim periodom zadržavanja u tkivima i jajima. To podržavaju i prijašnja istraživanja u kojima se broj nesukladnih uzoraka krmne smjese uglavnom odnosio na monenzin, dok su najčešći uzroci nesukladnih uzoraka jaja bili povišeni maseni udjeli lasalocida i nikarbazina (Canavan i sur., 2000., O'Keeffe i sur., 2007.). Stoga na učestalost pojave zaostataka rezidua u neciljnim tkivima, ne utječe samo stupanj kontaminiranosti krmne smjese za neciljne skupine, nego i farmakokinetička svojstva i stupanj akumulacije svakog pojedinog kokcidiostatika. Zbog visokog faktora zaostajanja lasalocida i nikarbazina, učestalost nesukladnih uzoraka jaja za njih je veća u odnosu na druge kokcidiostatike.

Sažetak

U veterinarskoj medicini u uporabi je veliki broj antimikrobnih tvari i antiparazitika te ih dijelimo na antibakterijske, antifungalne, antiviralne i antiparazitske lijekove. Samo su neke od tih tvari dopuštene za uporabu u profilaktičke svrhe pri uzgoju životinja čiji

se proizvodi na tržište stavljaju kao hrana. Usprkos tome, u hrani životinjskog podrijetla česta je pojava rezidua veterinarskih lijekova. U te lijekove ubrajamo i kokcidiostatike čija je primjena raširena u peradarstvu, kako u profilaksi, tako i u terapiji. Kokcidioza je parazitska bolest prouzročena jednostaničnom protozoonom roda *Eimeria*. Zbog velikog reproduktivnog potencijala, preživljavanja sporuliranih oocisti u stelji te različite patogenosti, kokcidioza predstavlja najznačajniju bolest intenzivne proizvodnje peradi. Iz navedenog je jasno da današnja intenzivna proizvodnja peradi nije moguća bez kontrole kokcidija kokcidiostaticima, kokcidiocidima ili cijepljenjem. Kokcidiostatici, tj. polieterskih ionofori, se razlikuju od ostalih antimikrobnih tvari. Nazivaju ih još i transportnim antibioticima jer djeluju na način da se inkorporiraju u membranu stanice tvoreći svojevrstne ionske tunele te prouzročavaju gubitak iona i oštećenja stanice. Kokcidiostatici se često detektiraju u hrani za neciljane skupine životinja, kao posljedica onečišćenja tijekom proizvodnje. U literaturi nedostaju podatci o raspodjeli kokcidiostatika u organizmu životinje nakon primjene kao i podatci o kinetici njegovog izlučivanja iz organizma. Kokoši nesilice su najčešća neciljna skupina koja je izložena kokcidiostaticima. Ovaj pregledni rad daje sažetak znanstvenih pokusa u kojima su istraženi kokcidiostatici i njihova akumulacija i vrijeme zadržavanja u organizmu. Afinitet vezanja veterinarskih lijekova u tkivu nakon njihove primjene ovise o njihovim kemijskim svojstvima kao što su: molarna masa, lipofilnost, konstanta disocijacije i afinitet vezanja na proteine. Pregledom znanstvenih istraživanja o zastupljenosti kokcidiostatika u jajima može se zaključiti da ukoliko tvari dominiraju u žumanjku jajeta kao rezidua, velika je vjerojatnost da će vrijeme zadržavanja biti i više od 10 dana. To se može protumačiti činjenicom da razvojni proces žumanjka započinje nekoliko dana prije nego li će jaje biti snijeto i to u jetri gdje nastaju prvi prekursori žumanjka. U usporedbi s tim, bjelanjak se razvija svega nekoliko sati prije nesjenja jajeta. Stoga na učestalost pojave zaostataka rezidua u neciljnim tkivima ne utječe samo stupanj kontaminiranosti krmne smjese za neciljne

skupine, nego i farmakokinetička svojstva i stupanj akumulacije svakog pojedinog kokcidiostatika.

Ključne riječi: *kokcidiostatici, vrijeme zadržavanja, perad*

Literatura

1. ANDAM, C. P., G. P. FOURNIER and J. P. GOGARTEN (2011): Multi-level populations and the evolution of antibiotic resistance through horizontal gene transfer. *FEMS Microbiol. Rev.* 35, 756-767.
2. Anon. (2009): DIREKTIVA KOMISIJE (2009) 2009/8/EZ od 10. veljače 2009. o izmjeni Priloga I. Direktivi 2002/32/EZ Europskog parlamenta i Vijeća u odnosu na najveće dopuštene količine neizbježnog onečišćenja hrane za životinje kokcidiostaticima ili histomonostaticima za one vrste i/ili kategorije životinja za koje njihovo dodavanje u hrani nije namijenjeno.
3. Anon. (2010): Uredba Komisije (EU) (2010) br. 37/2010 od 22. prosinca 2009. godine o farmakološki djelatnim tvarima i njihovoj klasifikaciji u odnosu na najveće dopuštene količine rezidua farmakološki djelatnih tvari u hrani životinjskog podrijetla (SL L 15, 20. 1. 2010., sa svim izmjenama i dopunama).
4. Anon. (2012): Uredba Komisije (EU) (2012) br. 610/2012 od 9. srpnja 2012. o izmjeni Uredbe (EZ) br. 124/2009 od 10. veljače 2009. o određivanju najviših dopuštenih količina kokcidiostatika ili histomonostatika u hrani koji su posljedica neizbježnog prenošenja tih tvari u neciljnu hranu za životinje.
5. DIRIKOLU, L., W. KARPESIUK, A. F. LEHNER, C. HUGHES, D. E. GRANSTROM, T. D. ETOBIN (2009): Synthesis and detection of toltrazuril sulfone and its pharmacokinetics in horses following administration in dimethylsulfoxide. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* 32, 368-378.
6. BERGEN, W. G. and D. B. BATES (1984): Ionophores: Their Effect on Production Efficiency and Mode of Action. *J. Anim. Sci.* 58, 1465-1483.
7. BODI, D., H. FRY, H. SCHAFFT, M. LAHRSEN-WIEDERHOLT and A. PREISS-WEIGERT (2012): Carryover of maduramicin from feed containing cross-contamination levels into eggs of laying hens. *J. Agric. Food. Chem.* 60, 6946-6952.
8. BOŽIČKOVIĆ, P., S. MUDRIĆ i G. KRIVEC (1993): Antikokcidijski lijekovi i njihova učinkovitost protiv kokcidioze peradi. *Praxis vet.* 41, 109-120.
9. CANNAN, A., G. BALL and D. G. KENNEDY (2000): Nicarbazin contamination in feeds as a cause of residues in eggs. *Food Addit. Contam.* 17, 829-836.
10. CHEN, T., ZHANG, W., WANG, J. M., H. T. DONG and M. WANG (2008): *Eimeria tenella*: Analysis of differentially expressed genes in the monensin- and maduramicin-resistant lines using cDNA array. *Exp. Parasitol.* 119, 264-271.

11. DORNE, J. L., M. L. FERNÁNDEZ-CRUZ, U. BERTELSEN, D. W. RENSCHAW, K. PELTONEN, A. ANADON, A. FELI, P. SANDERS, P. WESTER and J. FINK-GREMMELS (2013): Risk assessment of coccidiostats during feed cross-contamination: animal and human health aspects. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 270, 196-208.
12. DWORKIN, M., S. FALKOW, E. ROSENBERG, K. H. SCHLEIFER and E. STACKEBRANDT (2006): *The Prokaryotes*, 3. ed., Springer Science, Singapore.
13. DŽIDIĆ, S., J. ŠUŠKOVIĆ and B. KOS (2008): Antibiotic resistance mechanisms in bacteria: biochemical and genetic aspects. *Food Tech. Biotech.* 46, 11-21.
14. EFSA (2008a): Cross-contamination of non-target feeding stuffs by monensin authorised for use as a feed additive. *The EFSA Journal* 592, 1-40.
15. EFSA (2008b): Opinion of the Scientific Panel on Contaminants in the Food Chain on a request from the European Commission on cross-contamination of non-target feeding stuffs by maduramicin authorised for use as a feed additive. *The EFSA Journal* 594, 1-30.
16. ELLESTAD, G. A., N. CANFIELD, R. A. LEESE, G. O. MORTON, J. C. JAMES, M. M. SIEGEL W. J. and McGARHEN (1985): Chemistry of maduramicin I. Salt formation and normal ketalization. *J. Antibiot.* 39, 447-456.
17. EMEA (1998): The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products, Veterinary Medicines Evaluation Unit, COMMITTEE FOR VETERINARY MEDICINAL PRODUCTS, Summary Report on Toltrazuril, EMEA/MRL/314/97-FINAL April 1998.
18. GOETTING, V., K. A. LEE and L. A. TELL (2011): Pharmacokinetics of veterinary drugs in laying hens and residues in eggs: a review of the literature. *Vet. Pharmacol. Ther.* 34, 521-556.
19. GREIF, G., A. HARDER and A. HABERKORN (2001): Chemotherapeutic approaches to protozoa: Coccidia - current level of knowledge and outlook. *Parasitol. Res.* 87, 973-975.
20. HARRIS, J. R., M. ADRIAN and F. PETRY (2004): Amylopectin: a major component of the residual body in *Cryptosporidium parvum* oocysts. *Parasitology* 128, 269-282.
21. KENNEDY, D. G., W. J. BLANCHFLOWER, P. J. HUGHES and W. J. McCAUGHEY (1996): The incidence and cause of lasalocid residues in eggs in Northern Ireland. *Food Add. Contam.* A 13, 787-794.
22. LINDSAY, D. L. and B. L. BLAGBURN (1995): Antiprotozoal drugs. In: *Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 7. ed., H. R. (Ed.) Iowa State University Press, Ames, Iowa, USA, 955-983.
23. ŁOWICKI, D. and A. HUCZYŃSKI (2013): Structure and Antimicrobial Properties of Monensin A and Its Derivatives: Summary of the Achievements. *BioMed Res. Internat.* 1-14.
24. MARTINEZ, M., P. McDERMOTT and R. WALKER (2006): Pharmacology of the fluoroquinolones: a perspective for the use in domestic animals. *Vet. J.* 172, 10-28.
25. MARTINEZ, J. L. (2009): The role of natural environments in the evolution of resistance traits in pathogenic bacteria. *Proc. Biol. Sci.* 276, 2521-2530.
26. NOVILLA, M. N. and R. C. GUPTA (2007): *Veterinary Toxicology, Ionophores*, 2. ed., Elsevier & Academic Press.
27. O'KEEFFE, M., E. CAPURRO, M. DANAHAR, K. CAMPBELL and C. T. ELLIOTT (2007): Investigation of the causes for the occurrence of residues of the anticoccidial feed additive nicarbazin in commercial poultry. *Food Addit. Contam.* 24, 923-934.
28. OLEJNIK, M., T. SZPRENIGER-JUSZKIEWICZ and P. JEDZINIAK (2014): Semduramicin in eggs - The incompatibility of feed and food maximum levels. *Food. Chem.* 149, 178-182.
29. PEEK, H. W. and W. J. LANDMAN (2003): Resistance to anticoccidial drugs of Dutch avian *Eimeria* spp. field isolates originating from 1996, 1999 and 2001. *Avian Pathol.* 32, 391-401.
30. REEVES, P. T. (2012): Antibiotics: Groups and properties. In: *Chemical analysis of antibiotic residues in food*, 1st ed., John Wiley & Sons, New Jersey, 1-53.
31. SCHMATZ, D. M. (1997): The mannitol cycle in *Eimeria*. *Parasitology* 114, S81-89.
32. TAYLOR, M. A., R. L. COOP and R. L. WALL (2015): Antiparasitics. In: *Veterinary Parasitology*, 5th ed., Wiley-Blackwell, New Jersey.
33. Uredba Komisije (EZ) (2009) br. 124/2009 od 10. veljače 2009. o određivanju najviših dopuštenih količina kokcidostatika ili histomonostatika u hrani koji su posljedica neizbježnog prenošenja tih tvari u neciljnu hranu za životinje.
34. VANDENBERGE, V., E. DELEZIE, G. HUYGHEBAERT, P. DELAHAUT, G. PIERRET, P. DE BACKER, S. CROUBELS and E. DAESELEIRE (2012): Transfer of the coccidiostats monensin and lasalocid from feed at cross-contamination levels to whole egg, egg white and egg yolk. *Food Addit. Contam. Part A Chem. Anal. Control Expo Risk Assess.* 29, 1881-1892.
35. VARENINA, I., N. BILANDŽIĆ, Z. CVETNIĆ, L. CVETNIĆ, T. NEKIĆ, Đ. BOŽIĆ and B. SOLOMUN KOLANOVIĆ (2012): Deposition of toltrazuril residues in eggs during and after treatment with dose over the therapeutic dose. In: Schilt, R., ed. *Residues of veterinary drugs in food: Proceedings of the EuroResidue VII Conference; 2012 May 14-16. Egmond aan Zee: EuroResidue Conference Foundation.*
36. VARENINA, I., N. BILANDŽIĆ, L. CVETNIĆ, B. KOS, Đ. BOŽIĆ, B. SOLOMUN KOLANOVIĆ and Ž. CVETNIĆ (2015): Deposition and depletion of maduramicin residues in eggs after oral administration to laying hens determined by LC-MS. *Food Additiv. Contamin.* A 32, 324-332.
37. VARENINA, I., N. BILANDŽIĆ, B. SOLOMUN KOLANOVIĆ, Đ. LUBURIĆ BOŽIĆ, I. VARGA, Ž. CVETNIĆ and L. CVETNIĆ (2016): Deposition and depletion of maduramicin and monensin residues in eggs resulting from misuse of

feed for target species. Proceedings of the EuroResidue VIII Conference, Egmond aan Zee, The Netherlands, 23-25 May. Proceedings p.p. 250-257.

38. YAKKUNDI, S., A. CANNAVAN, P. B. YOUNG, C. T. ELHOTT and D. G. KENNEDY (2002): Halofuginone contamination in feeds as a cause of residues in eggs. *Anal. Chim. Acta* 473, 177-182.

Residues of coccidiostats in products of animal origin after administration in poultry

Ivana VARENINA, PhD, Grad. Biotechnology Eng., Nina BILANDŽIĆ, PhD, Grad. Biotechnology Eng., Scientific Advisor, Đurdica BOŽIĆ LUBURIĆ, Grad. Biotechnology Eng., Božica SOLOMUN KOLANOVIĆ, Grad. Food Technol. Eng., Ines VARGA, Mag. Appl. Chem., Relja BECK, DVM, PhD, Scientific Advisor, Croatian Veterinary Institute Zagreb, Croatia

Antimicrobial agents are widely applied in human and veterinary medicine, including antibacterial, antifungal, antiviral and antiparasitic drugs. Few of these substances are approved for use in prophylaxis during intensive breeding of animals whose products are targeted for the market. Despite this, veterinary drug residues are often present in food of animal origin. Coccidiostats are also classified into this group of drugs that are highly present in poultry-farming for prophylaxis and therapy. Coccidiosis is a parasitic disease caused by the unicellular protozoon of the genus *Eimeria*. Due to its great reproductive potential, survival of sporulated oocysts in soil and various pathogenicities, coccidiosis is the most significant disease of intensive poultry production. From this, it is evident that today's intensive poultry production would not be possible without the control of coccidiosis by coccidiostats or vaccination. Coccidiostats, *i.e.* polyether ionophores, differ from other antimicrobial substances. They are specified as transport antibiotics as they act by incorporation into the cell membrane through the formation of an ionic tunnel, causing ion loss and cell damage. Coccidiostats are often detected in feed for non-target animals as a result of cross-contamination during industrial production.

Studies on the occurrence of coccidiostats in animal tissues or elimination time from the organism are rather scarce. Hens are the most common non-target group exposed to coccidiostats. This is an overview of the scientific experiments examining coccidiostats and their accumulations and depletion times. The affinity of the compound to accumulate in tissues after implementation depends on its chemical properties, such as molar mass, lipophilicity, dissociation constant and protein binding affinity. In summarising the current literature on the presence of coccidiostats in eggs, it can be concluded that if the substances dominate in egg yolk as residuals, the depletion time is likely to be longer than 10 days. This can be interpreted by the fact that egg yolk development begins a few days prior to hatching, e.g. in the liver, where the first egg yolk precursors are formed. In comparison, egg whites develop only hours before hatching. Therefore, the frequency of residues occurring in non-target tissues is dependent not only on the degree of contamination of the feed mixture for non-target groups, but also on the pharmacokinetic properties and the rate of accumulation of each individual coccidiostat.

Key words: *coccidiostats, depletion time, poultry*