

# Ispitivanje mogućnosti detekcije fluorohinolona u tkivima bubrega šarana mikrobiološkom difuzionom metodom

Dorđević Vesna<sup>1</sup>, Kilibarda Nataša<sup>2</sup>, Baltić Ž. Milan<sup>3</sup>, Ćirković Miroslav<sup>4</sup>, Dimitrijević Mirjana<sup>3</sup>, Trbović Dejana<sup>1</sup>, Parunović Nenad<sup>1</sup>

*S a d r ž a j:* Riba je, zbog sadržaja i količina proteina, masti, minerala, vitamina, esencijalnih n-3 polinezasićenih masnih kiselina (PNMK) i holesterola, jedna od nutritivno najvrednijih namirnica koja se koristi u ishrani ljudi. Da bi se zadovoljile rastuće potrebe stanovništva za ovom vrstom namirnice, riba se sve više gaji u akvakulturi. Intenzivna proizvodnja ribe, zbog povećane gustine nasada, pogoduje nastanku bakterijskih oboljenja. Kao posledica toga, javlja se povećan morbiditet i mortalitet, smanjen prirast i smanjenje nasadnog materijala, što predstavlja ozbiljan problem za akvakulturu i dovodi do masovne upotrebe hemioterapeutika u terapijske svrhe. Za lečenje bakterijskih infekcija riba u ribnjacima koriste se antibiotici. Kao antibiotik izbora u uzgojnom ribarstvu se koriste fluorohinoloni. Fluorohinoloni su grupa antibiotika koji imaju širok spektar delovanja, nisku toksičnost i mali broj neželjenih dejstava na tretiranu ribu. Međutim, ostaci antibiotika u tkivima riba predstavljaju realan rizik za zdravlje ljudi. Ishrana ribom koja sadrži ostatke antibiotika može da dovede do pojave alergijskih, toksičnih, karcinogenih, mutagenih i teratogenih efekata. Stoga je neophodno da se ustanove rezidualne količine antibiotika u tkivima riba, što se može postići korišćenjem pouzdanih laboratorijskih metoda i tehnika kojima se ispituju ostaci antibiotika u mesu riba. Zbog navedenog, kao cilj rada definisano je da se ispita mogućnost identifikacije i kvantifikacije fluorohinolona u bubrezima šarana mikrobiološkom difuzionom metodom uz pomoć test mikroorganizma, *E. coli* ATCC 11303.

Ispitivanjima je ustanovljeno da mikrobiološka difuziona metoda omogućava detekciju svih pet fluorohinolona (oksolinska kiselina, enrofloksacin, sarafloksacin, difloksacin i flumekvin) u tkivima bubrega šarana na različitim nivoima maksimalno dozvoljenih količina, MDK (100 µg/kg, 100 µg/kg, 30 µg/kg, 300 µg/kg i 600 µg/kg, respektivno). Identifikacija i kvantifikacija fluorohinolona na nivou MDK moguće je samo za enrofloksacin, difloksacin i flumekvin. Ovi fluorohinoloni mogu da se detektuju i kvantifikuju i na nivou ispod MDK, odnosno na nivou od ¼ MDK. Za razliku od navedenih fluorohinolona, sarafloksacin se može detektovati samo na nivou od 2 MDK. Oksolinska kiselina se može detektovati na nivou od 4 MDK. Propisi EU predviđaju da trijažna (screening) metoda može biti primenjiva samo ukoliko se neko jedinjenje može detektovati u visini MDK, a preporučljivo je do ½ MDK. To znači da se mikrobiološka difuziona metoda može koristiti u rutinskoj analitičkoj praksi za identifikaciju i kvantifikaciju enrofloksacina, difloksacina i flumekvina u tkivima bubrega šarana.

**Ključne reči:** šaran, fluorohinoloni, mikrobiološka difuziona metoda, test agar, *E. coli* 11303.

## Uvod

Poslednjih godina XX veka u svetu se sektor akvakulture najbrže razvijao, tako da se čak 40% svetskih potreba za ribom obezbeđuje kontrolisanim uzgojem (Josupeit i Lem, 2010; Cole i dr., 2009).

Visok sadržaj proteina, nizak sadržaj masti i relativno nizak sadržaj holesterola, kao i značajan sadržaj minerala, vitamina i esencijalnih n-3

polinezasićenih masnih kiselina (PNMK) svrstavaju ribu u jednu od nutritivno najvrednijih namirnica u ishrani ljudi (Sahena i dr., 2009). U ponudi, na našem tržištu, je najzastupljenija slatkodvodna riba iz akvakulture (šaran, amur, tolstolobik i pastrmka). Prosečna potrošnja ribe po stanovniku, u svetu, na godišnjem nivou, iznosi 15,8 kg (Ćirković i dr., 2002a), dok se kod nas nalazi u opsegu od 4.5 do 5 kg (Milijašević i dr., 2012.). Dokazano je da

**Napomena:** Rezultati prikazani u radu proistekli su iz projekata ev. br. TR 31011 i TR31075, koje finansira Ministarstvo prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije.

<sup>1</sup>Institut za higijenu i tehnologiju mesa, Kačanskog 13, 11000 Beograd, Republika Srbija;

<sup>2</sup>Veterinarski specijalistički institut „Subotica“, Segedinski put 88, 24000 Subotica, Republika Srbija;

<sup>3</sup>Univerzitet u Beogradu, Fakultet veterinarske medicine Beograd, Bulevar oslobođenja 18, 11000 Beograd, Republika Srbija;

<sup>4</sup>Naučni Institut za veterinarstvo „Novi Sad“, Rumenački put 20, 21000 Novi Sad, Republika Srbija.

**Autor za kontakt:** Vesna Dorđević, [vesna@inmesbgd.com](mailto:vesna@inmesbgd.com)

ishrana ribom pozitivno utiče na zdravlje ljudi (*Sahena i dr.*, 2009). Povećana potrošnja ribe u ishrani utiče na sprečavanje nastanka kardiovaskularnih oboljenja, posebno infarkta miokarda, na smanjenje hipertenzije, sprečavanje nastanka arterioskleroze (*Mayneris-Perxachs i dr.*, 2010), mentalnih disfunkcija, crevnih oboljenja, astme, artritisa i dr. Američko udruženje za srce (American Heart Association) preporučuje da se riba jede dva puta nedeljno, jer dugolančane n-3 PNMK, pre svega pentaen-eikozonska kiselina, EPA i heksaen-dokozonska kiselina, DHA, utiču na smanjenje pomenutog rizika (*Dewailly i dr.*, 2007), kao i rizika od autoimunih i malignih oboljenja (*Terry i dr.*, 2004) i dijabetesa (*Nettleton i Katz*, 2005).

Riba iz akvakulture podleže čestim bakterijskim infekcijama. Intenzivna proizvodnja ribe, zbog povećane gustine nasada, pogoduje nastanku bakterijskih oboljenja. Kao posledica toga, javlja se povećan morbiditet i mortalitet, smanjen prirast i nedostatak nasadnog materijala, što predstavlja ozbiljan problem za ovu granu poljoprivrede, odnosno za akvakulturu. Najčešće dijagnostikovane bakterijske bolesti kod riba, u Srbiji, su septikemije izazvane aeromonadama, pseudomonas septikemije, furunkuloze, eritrodermatiti, jersinioze, renibakterioze, bakterijska oboljenja škrga i *columnaris* bolest (*Jeremić i dr.*, 2005). Mnoge bakterijske bolesti se javljaju posle izlaganja riba stresu (*Čirković i dr.*, 2002b). Uspešno preveniranje i suzbijanje oboljenja podrazumeva redovne preglede riba, čime se postiže pravovremena dijagnostika i ciljana terapija, koja, uz poboljšanje zoohigijenskih mera, predstavlja osnovu u borbi sa bolestima.

Za lečenje bakterijskih infekcija riba u ribnjacima koriste se antimikrobni lekovi, ili hemioterapeutici. Najveći deo antimikrobnih lekova, koji se koriste, su antibiotici (*Čupić i dr.* 2004), koji se primenjuju preko medicinirane hrane, ili se dodaju u medicinirane kupke za ribe (*Dinović i dr.*, 2010). Fluorohinoloni su grupa antibiotika koji se najviše koriste u uzgojnom ribarstvu. Oni su relativno nova grupa antibiotika koji imaju širok spektar delovanja, nisku toksičnost i imaju malo neželjenih dejstava (*Čupić i dr.*, 2004). Ako se koriste u dozama većim od propisnih, kod pogrešnih i diferencijalnih dijagnoza, kod laboratorijski pogrešno identifikovanih uzročnika bolesti i bez potvrde njihovog delovanja antibiogramom, kao i u profilaktičke svrhe i za potrebe povećanog prirasta, fluorohinoloni dovode do stvaranja rezistencije bakterija i dobijanja „superbakterija“, koje predstavljaju otporne i neosetljive sojeve na delovanje antibiotika (*Čupić i dr.*, 2011).

Ostaci antibiotika u tkivima riba predstavljaju realan rizik za zdravlje ljudi. Ishrana ribom koja

sadrži ostatke antibiotika može dovesti do pojave alergijskih, toksičnih, karcinogenih, mutagenih i teratogenih efekata. Posebno su osetljiva deca u najranijem uzrastu (zbog nezrelog enzimskog sistema jetre i nezrelosti bubrega za eliminaciju lekova), kao i osobe u poznim godinama, kod kojih organi gube svoju normalnu aktivnost. Rezidue antibiotika u hrani mogu da reaguju sa hranom koja se unosi u organizam, a mogu i da umanjuju delovanje nekih lekova koji se koriste u terapijske svrhe, tj. da negativno utiču na tok bolesti.

Kada se ima u vidu gore navedeno, dolazi se do zaključka da je značaj laboratorijskih metoda i tehnika za ispitivanje ostataka antibiotika u mesu riba izuzetno veliki. Metode kojima se mogu ustanoviti rezidue antibiotika u tkivima su: 1) mikrobiološke (inhibicija rasta test mikroorganizama); 2) imunoenzimske metode (ELISA, Enzime Linked Immuno Sorbent Assay); 3) metode gasne hromatografije (GC, GC/MS) i 4) metode tečne hromatografije (HPLC, LC/MS, LC/MS/MS). Utvrđivanje prisustva rezidua antibiotika može biti kvalitativno, odnosno, „screening“ (mikrobiološka i ELISA), ili kvantitativno (ELISA, GC, GC/MS, HPLC, LC/MS, LC/MS/MS). Metoda kojom se dokazuju rezidue antibiotika u tkivima riba je izuzetno važan činilac u proceni bezbednosti mesa riba.

Cilj ovog rada je bio da se ispita mogućnost identifikacije i kvantifikacija rezidua fluorohinolona u bubrezima šarana mikrobiološkom difuzionom metodom uz pomoć test mikroorganizma *E. coli* ATCC 11303.

## Materijal i metode

U radu je korišćen homogenat tkiva bubrega šarana u koji su dodate različite količine fluorohinolona (oksolinska kiselina, enrofloksacin, sarafloksacin, difloksacin i flumekvin), na nivou od 4 MDK (maksimalno dozvoljena količina), 2 MDK, 1 MDK, ½ MDK, i ¼ MDK, prema Regulativi EU 37/2010 (Commission Regulation (EU) no 37/2010). MDK za fluorohinolone u ribi su: 100 µg/kg za oksolinsku kiselinu, 100 µg/kg za enrofloksacin, 30 µg/kg za sarafloksacin, 300 µg/kg za difloksacin i 600 µg/kg za flumekvin.

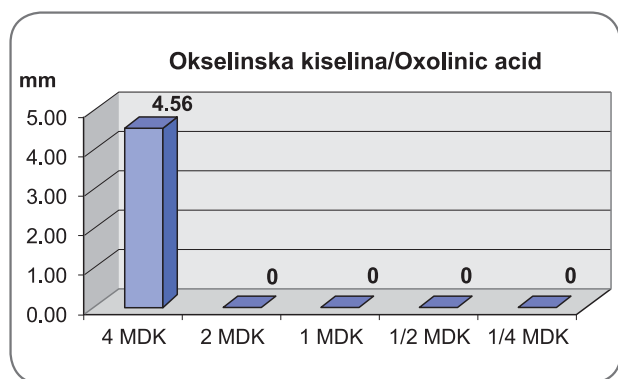
Sva ispitivanja su rađena u šest ponavljanja.

Princip metode: obogaćeni uzorci bubrega šarana se stavljaju na površinu inokulisanog test agra, pH 8 (MERCK kat. br. 10664). Test agar se inokuliše sa *E. coli* ATCC1303 u količini od 10<sup>5</sup> ćelija/ml. Nakon toga se Petri ploče inokulišu sa uzorcima tkiva bubrega i inkubiraju na 37° najmanje 18 sati. Posle završene inkubacije mikroorganizama i difuzije

fluorohinolona u inokulisani Test agar uočava se zona inhibicije oko ispitivanog homogenata. Uočena zona inhibicije test mikroorganizma se meri i iskažuje u milimetrima.

### Rezultati

Veličine zona inhibicije obogaćenih uzoraka tkiva bubrega riba fluorohinolonom na različitim nivoima MDK vrednosti, na test agaru inokulisanim sa *E. coli* ATCC 11303, prikazane su u tabelama 1–5 i na grafikonima 1–5.



**Grafikon 1.** Grafički prikaz veličina zona inhibicije obogaćenih uzoraka tkiva bubrega oksolinskom kiselinom na različitim MDK vrednostima, na test agaru inokulisanim sa *E. coli* ATCC 11303

**Graph 1.** Graphic presentation of the inhibition zones of spiked kidney samples with oxolinic acid at different MRL levels, on the test agar inoculated with *E. coli* ATCC 11303

U tabeli 1 i na grafikonu 1 prikazane su veličine zona inhibicije obogaćenih uzoraka tkiva bubrega oksolinskom kiselinom na različitim nivoima MDK vrednosti. Pri količini oksolinske kiseline na nivou 4 MDK zona inhibicije na test agaru inokulisanim sa *E. coli* ATCC 11303 bila je  $4,56 \pm 0,47$  mm. Na nivoima od 2 MDK, 1 MDK, 1/2 MDK i 1/4 MDK nisu utvrđene vidljive zone inhibicije.

U tabeli 2 i na grafikonu 2 mogu se videti veličine zona inhibicije obogaćenih uzoraka tkiva bubrega enrofloksacinom. Veličine zone inhibicije bile su u opsegu od  $10,08 \pm 0,79$  mm (1/4 MDK) do  $17,46 \pm 0,54$  mm (4 MDK). Razlike u veličini zone inhibicije na nivoima od 4 MDK, 2 MDK, 1 MDK i 1/2 MDK enrofloksacina bile su statistički značajne ( $p < 0,001$ ). Nisu utvrđene statistički značajne razlike ( $p > 0,05$ ) u veličini zona inhibicije obogaćenih uzoraka bubrega enrofloksacinom pri količini enrofloksacina od 1/2 i 1/4 MDK.

Statistički značajne razlike ( $p < 0,001$ ) u veličini zona inhibicije obogaćenih uzoraka bubrega sa sarafloksacinom, na test agaru inokulisanim sa *E. coli* ATCC 11303, ustanovljene su na nivoima od 4 MRL i 2 MRL. Dobijeni rezultati prikazani su u tabeli 3 i na grafikonu 3. Kod uzoraka bubrega obogaćenih sarafloksacinom na nivoima od 1 MDK, 1/2 MDK i 1/4 MDK, na test agaru, nisu utvrđene zone inhibicije.

U tabeli 4 i na grafikonu 4 prikazane su veličine zone inhibicije obogaćenih uzoraka tkiva bubrega difloksacinom na različitim nivoima MDK. Na test agaru inokulisanim sa *E. coli* ATCC 11303 zone inhibicije su bile u opsegu od  $8,00 \pm 0,52$  mm, za nivo od 1/4 MDK, do  $15,67 \pm 0,33$  mm,

**Tabela 1.** Zone inhibicije obogaćenih uzoraka tkiva bubrega na različitim MDK vrednostima oksolinske kiseline, na test agaru inokulisanim sa *E. coli* ATCC 11303

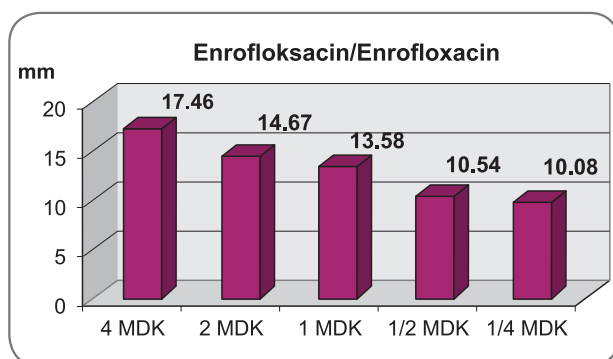
**Table 1.** Inhibition zones of the spiked kidney samples at different MRL values of oxolinic acid, on the test agar inoculated with *E. coli* ATCC 11303

Količina oksolinske kiseline/ Quantity of oxolinic acid	$\bar{X}$	Mere varijacije/Variation measure				
	Zona inhibicije(mm)/ Inhibition zone (mm)	S <sub>d</sub>	S <sub>e</sub>	I <sub>v</sub>		C <sub>v</sub> %
				X <sub>max</sub>	X <sub>min</sub>	
4 MDK/MRL	4,56	0,47	0,14	5,5	4,0	10,23
2 MDK/MRL	0,00	0,00	0,00	0,0	0,0	0,00
1 MDK/MRL	0,00	0,00	0,00	0,0	0,0	0,00
1/2 MDK/MRL	0,00	0,00	0,00	0,0	0,0	0,00
1/4 MDK/MRL	0,00	0,00	0,00	0,0	0,0	0,00

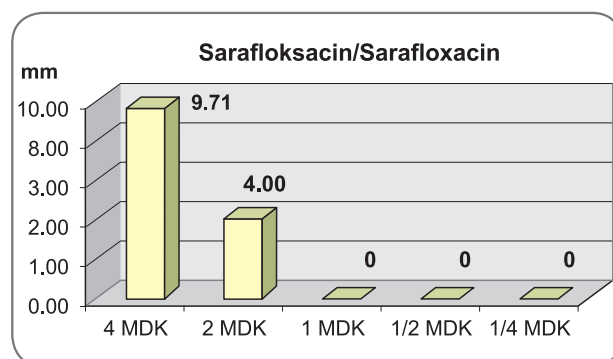
**Tabela 2.** Zone inhibicije obogaćenih uzoraka tkiva bubrega na različitim MDK vrednostima enrofloksacina, na test agaru inokulisanim sa *E.coli* ATCC 11303**Table 2.** Inhibition zones of the spiked kidney samples at different MRL values of enrofloxacin, on the test agar inoculated with *E. coli* ATCC 11303

Količina enrofloksacina/ Quantity of enrofloxacin	$\bar{X}$ Zona inhibicije(mm)/ Inhibition zone (mm)	Mere varijacije/Variation measure				
		S <sub>d</sub>	S <sub>e</sub>	I <sub>v</sub>		C <sub>v</sub> %
				X <sub>max</sub>	X <sub>min</sub>	
4 MDK/MRL	17,46 <sup>α</sup>	0,54	0,16	18,0	16,5	3,10
2 MDK/MRL	14,67 <sup>β</sup>	0,39	0,11	15,0	14,0	2,65
1 MDK/MRL	13,58 <sup>γ</sup>	0,51	0,15	14,5	13,0	3,79
1/2 MDK/MRL	10,54 <sup>nz,δ</sup>	0,50	0,14	11,5	10,0	4,73
1/4 MDK/MRL	10,08 <sup>nz,δ</sup>	0,79	0,23	11,0	9,0	7,86

nz – p>0,05; a,b,c – p<0,05; x,y, z – p<0,01; α, β, γ – p<0,001

**Grafikon 2.** Grafički prikaz veličina zona inhibicije obogaćenih uzoraka tkiva bubrega enrofloksacinom na različitim MDK vrednostima, na test agaru inokulisanim sa *E.coli* ATCC 11303

**Graph 2.** Graphic presentation of the inhibition zones of spiked kidney samples with enrofloxacin at different MRL levels, on the test agar inoculated with *E. coli* ATCC 11303

**Grafikon 3.** Grafički prikaz veličina zona inhibicije obogaćenih uzoraka tkiva bubrega sarafloksacinom na različitim MDK vrednostima, na test agaru inokulisanim sa *E.coli* ATCC 11303

**Graph 3.** Graphic presentation of the inhibition zones of spiked kidney samples with sarafloxacin at different MRL levels, on the test agar inoculated with *E. coli* ATCC 11303

**Tabela 3.** Zone inhibicije obogaćenih uzoraka tkiva bubrega na različitim MDK vrednostima sarafloksacina, na test agaru inokulisanim sa *E.coli* ATCC 11303**Table 3.** Inhibition zones of the spiked kidney samples at different MRL values of sarafloxacin, on the test agar inoculated with *E. coli* ATCC 11303

Količina sarafloksacina/ Quantity of sarafloxacin	$\bar{X}$ Zona inhibicije(mm)/ Inhibition zone (mm)	Mere varijacije/Variation measure				
		S <sub>d</sub>	S <sub>e</sub>	I <sub>v</sub>		C <sub>v</sub> %
				X <sub>max</sub>	X <sub>min</sub>	
4 MDK/MRL	9,71 <sup>α</sup>	0,33	0,10	10,0	9,0	3,44
2 MDK/MRL	4,00 <sup>β</sup>	0,43	0,12	4,5	3,5	10,66
1 MDK/MRL	0,00	0,00	0,00	0,0	0,0	0,00
1/2 MDK/MRL	0,00	0,00	0,00	0,0	0,0	0,00
1/4 MDK/MRL	0,00	0,00	0,00	0,0	0,0	0,00

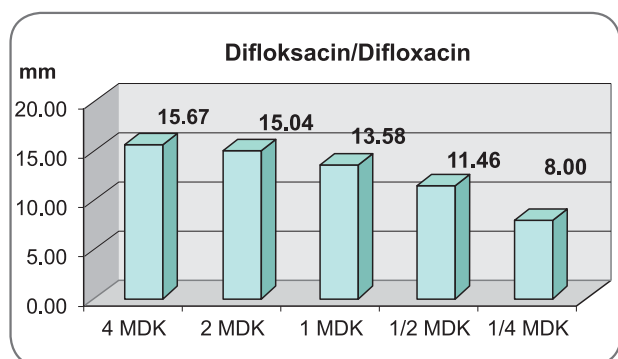
nz – p>0,05; a,b,c – p<0,05; x,y, z – p<0,01; α, β, γ – p<0,001

**Tabela 4.** Zone inhibicije obogaćenih uzoraka tkiva bubrega na različitim MDK vrednostima difloksacina, na test agaru inokulisanim sa *E.coli* ATCC 11303

**Table 4.** Inhibition zones of the spiked kidney samples on different MRL values of difloxacin, at the test agar inoculated with *E. coli* ATCC 11303

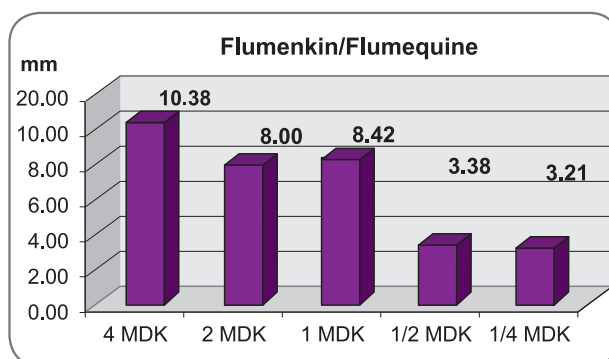
Količina difloksacina/ Quantity of difloxacin	$\bar{X}$	Mere varijacije/Variation measure				
	Zona inhibicije(mm)/ Inhibition zone (mm)	S <sub>d</sub>	S <sub>e</sub>	I <sub>v</sub>		C <sub>v</sub> %
				X <sub>max</sub>	X <sub>min</sub>	
4 MDK	15,67 <sup>xα</sup>	0,33	0,09	16,0	15,0	2,08
2 MDK/MRL	15,04 <sup>yα</sup>	0,26	0,07	15,5	14,5	1,71
1 MDK/MRL	13,58 <sup>β</sup>	0,51	0,15	14,5	13,0	3,79
1/2 MDK/MRL	11,46 <sup>γ</sup>	0,66	0,19	12,0	10,0	5,72
1/4 MDK/MRL	8,00 <sup>δ</sup>	0,52	0,15	9,0	7,5	6,53

nz – p>0,05; a,b,c – p<0,05; x,y, z – p<0,01; α, β, γ – p<0,001



**Grafikon 4.** Grafički prikaz veličina zona inhibicije obogaćenih uzoraka tkiva bubrega difloksacinom na različitim MDK vrednostima, na test agaru inokulisanim sa *E.coli* ATCC 11303

**Graph 4.** Graphic presentation of the inhibition zones of spiked kidney samples with difloxacin at different MRL levels, on the test agar inoculated with *E. coli* ATCC 11303



**Grafikon 5.** Grafički prikaz veličina zona inhibicije obogaćenih uzoraka tkiva bubrega flumekvinom na različitim MDK vrednostima, na test agaru inokulisanim sa *E.coli* ATCC 11303.

**Graph 5.** Graphic presentation of the inhibition zones of spiked kidney samples with flumequine at different MRL levels, on the test agar inoculated with *E. coli* ATCC 11303

**Tabeli 5.** Zone inhibicije obogaćenih uzoraka tkiva bubrega na različitim MDK vrednostima flumekvina, na test agaru inokulisanim sa *E.coli* ATCC 11303

**Table 5.** Inhibition zones of the spiked kidney samples at different MRL values of flumequines, on the test agar inoculated with *E. coli* ATCC 11303

Količina flumekvina/ Quantity of flumequines	$\bar{X}$	Mere varijacije/Variation measure				
	Zona inhibicije(mm)/ Inhibition zone (mm)	S <sub>d</sub>	S <sub>e</sub>	I <sub>v</sub>		C <sub>v</sub> %
				X <sub>max</sub>	X <sub>min</sub>	
4 MDK	10,38 <sup>a</sup>	0,38	0,11	11,0	10,0	3,63
2 MDK	8,00 <sup>a,β</sup>	0,67	0,19	9,0	7,0	8,43
1 MDK	8,42 <sup>b,β</sup>	0,29	0,08	9,0	8,0	3,43
1/2 MDK	3,38 <sup>nz,γ</sup>	0,38	0,11	4,0	3,0	11,17
1/4 MDK	3,21 <sup>nz,γ</sup>	0,26	0,07	3,5	3,0	8,02

nz – p>0,05; a,b,c – p<0,05; x,y, z – p<0,01; α, β, γ – p<0,001



za nivo od 4 MDK. Utvrđene su statički značajne razlike ( $p < 0,01$ ) u veličini zona inhibicije obogaćenih uzoraka bubrega na nivoima od 4 MDK i 2 MDK ( $15,67 \pm 0,33$  mm i  $15,04 \pm 0,26$  mm). Zone inhibicije obogaćenih uzoraka bubrega na nivoima od 4 MDK, 2 MDK, 1 MDK i  $\frac{1}{2}$  MDK bile su statistički značajno veće ( $p < 0,001$ ) od zona inhibicije obogaćenih uzoraka bubrega na nivou od  $\frac{1}{4}$  MDK difloksacina. Veličine zona inhibicije obogaćenih uzoraka bubrega na različitim nivoima MDK difloksacina, na test agaru inokulisanim sa *E. coli* ATCC 11303, bile su statistički značajno različite ( $p < 0,001$ ).

Zone inhibicije obogaćenih uzorka tkiva bubrega riba flumekvinom prikazane su u tabeli 5 i na grafikonu 5.

Na osnovu prikazanih rezultata može da se vidi da su zone inhibicije bile u opsegu od  $3,21 \pm 0,26$  mm, na nivou  $\frac{1}{4}$  MDK, do  $10,38 \pm 0,38$  mm, za uzorke bubrega obogaćenih na nivou od 4 MDK flumekvina. Nisu utvrđene statički značajne razlike ( $p > 0,05$ ) u veličini zona inhibicije kada su uzorci bubrega obogaćeni na nivoima od  $\frac{1}{2}$  MRL i  $\frac{1}{4}$  MRL flumekvina. Statistički značajne razlike ( $p < 0,001$ ) u veličini zona inhibicije utvrđene su u slučajevima kada su uzorci obogaćeni na nivoima od 4 MDK, 2 MDK, 1 MDK u odnosu na veličinu zona inhibicije kada su uzorci obogaćeni na nivoima od  $\frac{1}{2}$  MDK i  $\frac{1}{4}$  MDK flumekvina. Veličine zona inhibicije uzorka bubrega obogaćenih sa količinom od 4 MDK flumekvina bile su statistički značajno veće ( $p < 0,001$ )

u odnosu na veličine zona inhibicije uzoraka bubrega obogaćenih na nivoima od 2 MDK i 1 MDK flumekvina.

## Zaključci

Mikrobiološka difuziona metoda omogućava detekciju svih pet fluorohinolona (oksolinska kiselina, enrofloksacin, sarafloksacin, difloksacin i flumekvin) u tkivima bubrega šarana na različitim nivoima MDK.

Dokazivanje, odnosno kvantifikacija fluorohinolona na nivou MDK moguća je samo za enrofloksacin, difloksacin i flumekvin.

Enrofloksacin, difloksacin i flumekvin se mogu detektovati i kvantifikovati i na nivoima ispod MDK, odnosno na nivoima od  $\frac{1}{2}$  MDK i  $\frac{1}{4}$  MDK.

Za razliku od navedenih fluorohinolona, sarafloksacin se može detektovati i kvantifikovati samo na nivoima od 2 MDK i većim.

Oksolinska kiselina se može kvantifikovati samo na nivou od 4 MDK, a na nivou od 2 MDK se ne može detektovati.

Propisi EU predviđaju da trijažna metoda može biti primenjiva samo ukoliko se neko jedinjenje može detektovati u visini MDK i niže, do najviše  $\frac{1}{2}$  MDK. To znači da se mikrobiološka difuziona metoda može koristiti u rutinskoj analitičkoj praksi za identifikaciju i kvantifikaciju enrofloksacina, difloksacina i flumekvina u tkivima bubrega šarana.

## Literatura

- Cole D. W., Cole R., Gaydos S. J., Gray J., Hyland G., Jacques M. L., Powell-Dunford N., Sawhney C., Au W.W., 2009. Aquaculture: Environmental, toxicological, and health issues. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 212, 369–377.
- Commission decision (EU) no 657/2002/EC, implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and interpretation of results, *Official Journal of the European Communities*, L 221/8.
- Commission Regulation (EU) no 37/2010, on pharmacologically active substances and their classification regarding maximum residue limits in foodstuffs of animal origin, *Official Journal L 15*, 20.1.2010, 1.
- Ćirković M., Jovanović B., Maletin S., 2002a. Ribarstvo–biologija–tehnologija–ekologija–ekonomija. Poljoprivredni fakultet u Novom Sadu, 234–240.
- Ćirković M., Jeremić S., Jurakić Ž., 2002b. Problem zimoavanja toplovodnih riba. Zbornik radova i kratkih sadržaja, 14. Savetovanje veterinara Srbije, 257–265.
- Ćupić V., Dobrić S., Trailović D. R., Pejčić Z. S., 2004. Savremeni pravci razvoja i upotrebe anti-mikrobnih lekova u veterinarskoj medicini, *Veterinarski glasnik*, 58, 5–6, 577–594.
- Ćupić V., Dobrić S., Antonijević B., Čelebićanin S., 2011. Značaj racionalne primene lekova u veterinarskoj medicini za bezbednost hrane, *Tehnologija mesa*, 52, 1, 74–79.
- Dewailly E., Ayotte P., Lucas M., Blanchet C., 2007. Risk and benefits from consuming salmon and trout: A Canadian perspective, *Food and Chemical Toxicology*, 45, 1343–1348.
- Đinović J., Trbović D., Vranić D., Janković S., Spirić D., Radičević T., Spirić A., 2010. Stanje ekosistema, kvaliteta i bezbednost mesa šarana (*Cyprinus carpio*) iz akvakulture u toku uzgoja. *Tehnologija mesa*, Beograd, 51, 2, 124–131. <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/009/a0282e/a0282e00.pdf>.
- Jeremić S., Radosavljević V., Jakić-Dimić D., 2005. Aktuelna bakterijska oboljenja slatkovodnih riba, *Biotechnology in Animal Husbandry*, 21, 3–4, 141–151.

- Josupeit H., Lem A., 2010.** Aquaculture products: quality, safety, marketing and trade. International Conference on Aquaculture in the Third Millennium, Network of Aquaculture Centries in Asia-Pacific, NACA/FAO Book of Synopses, 173–175, 20–25 February, Bangkok, Thailand.
- Mayneris-Perxachs J., Bondia-Pons I., Serra-Majem L., Castellote A. I., 2010.** Long-chain n-3 fatty acid cardiovascular disease risk factors among the Catalan population. *Food Chemistry*, 119, 54–61.
- Milijašević M., Babić J., Baltić Ž. M., Dorđević V., Spirić D., Janković S., Spirić A., 2012.** Parametri higijenske ispravnosti četiri vrste riba koje su najzastupljenije na tržištu Srbije. *Tehnologija mesa*, Beograd, 53, 2, 127–132.
- Nettleton J. A., Katz R., 2005.** N-3 long-chain polyunsaturated fatty acids in type 2 diabetes: a review. *Journal of the American Dietetic Association*, 105, 428–440.
- Sahena F., Zaidul I.S.M., Jinap S., Saari N., Jahurul H.A., Abbas K.A., Norulaini N.A., 2009.** PUFAs in fish: extraction, fractionation, importance in health. *Comprehensive Reviews in food science and food safety*, 8, 59–74.
- STAR PROTOCOL** (Scriming Test for Antibiotic Residues, Laboratoire d'études et de recherches sur les médicaments vétérinaires et les désinfectants; Community Reference Laboratory, 2005).
- Terry P. D., Terry J. B., Rohan T. E., 2004.** Long-chain (3-n) fatty acid intake and risk of cancers of the breast and the prostate: recent epidemiological studies, biological mechanisms, and directions for future research. *Journal of Nutrition*, 134, 3412S–3420S.

## Investigation of the possibility of detection of fluoroquinolones in carp kidney by microbiological diffusion method

Dorđević Vesna, Kilibarda Nataša, Baltić Ž. Milan, Ćirković Miroslav, Dimitrijević Mirjana, Trbović Dejana, Parunović Nenad

*S u m m a r y:* Fish is one of the most valuable food products used in human nutrition, due to the content of proteins, fat, minerals, vitamins, essential n-3 polyunsaturated fatty acids (PUFAs) and cholesterol. To meet the growing needs of the population for this kind of food, fish are increasingly grown in aquaculture. Intensive fish production, due to increased stock density, is favoring the occurrence of bacterial diseases. As a consequence, there is increased morbidity and mortality, reduced growth and reduced feeding efficiency, which pose a serious problem for the aquaculture and lead to massive use of chemotherapeutics. Antibiotics are the common practice for the treatment of bacterial infections in fish ponds, and fluoroquinolones are used as antibiotics of choice. Fluoroquinolones are a group of antibiotics that have a broad spectrum of activity, low toxicity and only a few side effects in the treated fish. However, residues of antibiotic in fish tissues represent a real risk to human health. Consumption of fish containing residues of antibiotics can cause allergic, toxic, carcinogenic, mutagenic and teratogenic effects. Therefore, it is necessary to establish the residual amounts of antibiotics in fish tissues, that can be achieved by using reliable laboratory methods and techniques. Because of this, the goal of the work was set to investigate the possibility of identification and quantification of fluoroquinolones in the kidneys of carp by microbiological diffusion method, using the test organism *E. coli* ATCC 11303.

The investigations revealed that microbiological diffusion method enables detection of all five fluoroquinolones (oxolinic acid, enrofloxacin, sarafloxacin, difloxacin and flumequine) in kidney of carp at different maximum residue levels, MRL (100 mg/kg, 100 mg/kg, 30 mg/kg, 300 mg/kg and 600mg/kg, respectively). Identification and quantification of fluoroquinolones at MRL levels was only achieved for enrofloxacin, flumequine and difloxacin. These fluoroquinolones can be detected and quantified at the level below the MRL, i.e. at the level of 1/4 MRL. Contrary to these fluoroquinolones, sarafloxacin can be detected only at the level of 2MRL and oxolinic acid can be detected at the level of 4MRL, as well. EU regulations provide that a screening method can be applicable only if a compound can be detected in the amount of at least at the MRL, and the 1/2MRL is recommended. This means that the microbiological diffusion method can be used in routine analytical practice for the identification and quantification of enrofloxacin, flumequine and difloxacin in kidney tissues of carp.

**Key words:** carp, fluoroquinolones, microbiological diffusion method, test medium, *E. coli* 11303.

Rad primljen: 1.10.2013.

Rad prihvaćen: 21.11.2013.