

LATVIJAS UNIVERSITĀTE

BIOLOĢIJAS FAKULTĀTE

Uzturzinātnes maģistra studiju programmas

2. kursa studente

Agnese Kapace

Stud. apl. nr. ak09324

**AMINOGLIKOZĪDU KLAŠES ANTIBIOTIKU
SASTOPAMĪBA LATVIJĀ PIEEJAMĀJĀ MEDŪ**

MAĢISTRA DARBS

Darba vadītāji:

Dr. ķīm., asoc. prof. Vadims Bartkevičs

Mg. ķīm., doktorants Ingus Pērkons

RĪGA

2017

ANOTĀCIJA

Aminoglikozīdu klases antibiotiku sastopamība Latvijā pieejamajā medū. Kapace Agnese, zinātniskie vadītāji: Dr. ķīm., asoc. prof. Vadims Bartkevičs, Mg. ķīm. doktorants Ingus Pērkons. Maģistra darbs, 36 lappuses, 6 attēli, 9 tabulas, 42 literatūras avoti. Latviešu valodā.

Maģistra darbā apskatīta literatūra par aminoglikozīdu klases antibiotiku atliekvielu sastopamību medū, kā arī to izcelsmes avotiem. Izmantojot augsti efektīvo šķidrums hromatogrāfu apvienojumā ar nolidojuma laika masspektrometru, tika analizēti 49 medus paraugi no Gruzijas un 30 medus paraugi no Latvijas. Tika veikta izmantotās metodes validācija, lai pārliecinātos, ka tā atbilst Eiropas Komisijas lēmuma 2002/657/EC prasībām. Antibiotiku atliekvielu klātbūtne tika konstatēta četros medus paraugos no Gruzijas, savukārt Latvijas paraugos atliekvielas netika konstatētas.

MEDUS, AMINOGLIKOZĪDI, STREPTOMICĪNS, AUGSTI EFEKTĪVĀ ŠĶIDRUMA HROMATOGRĀFIJA, NOLIDOJUMA LAIKA MASSPEKTROMETRIJA

ABSTRACT

Occurrence of aminoglycoside antibiotics in honey for consumers in Latvia.

Kapace Agnese, supervisors: Dr. chem., asoc. prof. Vadims Bartkevičs, Mg. chem. doctoral student Ingus Pērkons. Master's thesis, 36 pages, 6 figures, 9 tables, 42 references. In Latvian.

Occurrence data, contamination sources and analytical methods for determination of aminoglycoside class antibiotics in honey were summarized in literature review. Using high performance liquid chromatography coupled to time-of-flight mass spectrometry 49 honey samples from Georgia and 30 honey samples from Latvia were analyzed. The method was validated in accordance to the European Commission decision 2002/657/EC. Residues of streptomycin and gentamycin were found in four Georgian honey samples; however no traces of aminoglycosides were detected in honey samples from Latvia.

HONEY, AMINOGLYCOSIDES, STREPTOMYCIN, HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY, MASS SPECTROMETRY

SATURS

SATURS	4
APZĪMĒJUMI.....	5
IEVADS.....	6
1. LITERATŪRAS APSKATS.....	7
1.1. Medus, tā raksturojums	7
1.1.1. Medus sastāva un uzturvērtības izvērtējums	7
1.1.2. Medus patēriņš.....	9
1.2. Medus piesārņojums ar antibiotiku atliekvielām.....	10
1.3. Aminoglikozīdu klases antibiotikas.....	15
2.1.1. Aminoglikozīdu struktūra un darbības mehānisms	15
2.2.2. Aminoglikozīdu izraisītie blakusefekti	17
1.4. Antibakteriālā rezistence	18
1.5. Aminoglikozīdu noteikšanas metodes	19
2. EKSPERIMENTĀLĀ DAĻA	22
2.1. Izmantotie reaģenti un palīgvielas	22
2.2. Izmantotā aparatūra un trauki	22
2.3. Darba šķīdumi.....	22
2.4. Standartvielas un standartšķīdumi	23
2.4.1. Pamatšķīdumu pagatavošana	23
2.4.2. Darba standartšķīdumu pagatavošana	24
2.5. Analizējamo paraugu izvēle	25
2.6. Paraugu sagatavošanas procedūra.....	26
2.7. AEŠH-NL-MS/ddMS ² analīze	26
2.7.1. AEŠH parametri.....	26
2.6.2. Masspektrometra parametri	27
3. REZULTĀTI UN TO IZVĒRTĒJUMS	28
3.1. Metodes validācija	28
3.2. Aminoglikozīdu klases antibiotiku atliekvielu klātbūtne medus paraugos.....	30
SECINĀJUMI	32
IZMANTOTĀ LITERATŪRA	33

APZĪMĒJUMI

ES	Eiropas Savienība
RASFF	Ātrās brīdināšanas sistēma pārtikas un barības jomā
GI	Glikēmiskais indekss
EFSA	Eiropas pārtikas nekaitīguma iestāde
CFE	Cietās fāzes ekstrakcija
AEŠH	Augsti efektīvā šķidrums hromatogrāfija
MS	Masspektrometrija

IEVADS

Antibakteriālā rezistence ir globāla mēroga problēma. Pēc Pasaules Veselības organizācijas datiem tā ir sastopama visos pasaules reģionos [1]. Par tās galveno cēloni uzskata nepamatotu antibakteriālo preparātu lietošanu. Taču cilvēki ir pakļauti antibiotiku iedarbībai ne tikai tās apzināti lietojot kā medikamentus, bet arī neapzināti, – uzņemot ar uzturu. Šādā kontekstā paaugstinātu uzmanību galvenokārt pievērš gaļai, olām un piena produktiem, tomēr arī medus, ko izsenis uzskata par vērtīgu un veselīgu dabas produktu, var saturēt antibiotiku atliekvielas. Kā vienas no sastopamākajām antibiotikām, kuru atliekvielu klātbūtne konstatēta medū, ir aminoglikozīdu klases antibiotikas, kas tiek plaši izmantotas veterinārajā medicīnā, bišu bakteriālo slimību apkarošanā, kā arī cīņā ar ābelēm un bumbierēm sastopamo slimību bakteriālo iedegu.

Eiropas Savienības (ES) likumdošana nosaka, ka medus nedrīkst saturēt antibiotiku atliekvielas, taču Ātrās brīdināšanas sistēmas pārtikas un barības jomā (RASFF) dati liecina, ka atliekvielas ir konstatētas gan ES ražotajā, gan importētajā medū. Latvijā līdz šim nav veikts pētījums, kurā noteiktu aminoglikozīdu klases antibiotiku sastopamību patērētajiem pieejamajā medū. Šāds darbs ļautu izvērtēt, kāds risks pastāv Latvijas patērētājiem, lietojot medu, uzņemt aminoglikozīdu klases antibiotikas. Lai to veiktu ir nepieciešams izmantot selektīvu un jutīgu metodi. Aminoglikozīdu un veterināro medikamentu noteikšanā atzītākā metode ir šķidrums hromatogrāfija ar masspektrometrisko detektoru, kas tiks izmantota arī šajā darbā.

Darba mērķis: noteikt aminoglikozīdu klases antibiotikas Latvijā ražotajā un importētajā medū.

Darba uzdevumi:

1. apkopot literatūrā pieejamo informāciju par aminoglikozīdu klases antibiotiku atliekvielu noteikšanas metodēm un izplatību medū;
2. savākt Latvijā ražotā un importētā medus paraugus;
3. noteikt aminoglikozīdu klases antibiotiku klātbūtni paraugos, izmantojot augsti efektīvo šķidrums hromatogrāfiju apvienojumā ar masspektrometrisko detektoru, un veikt iegūto rezultātu izvērtējumu.

1. LITERATŪRAS APSKATS

1.1. Medus, tā raksturojums

1.1.1. Medus sastāva un uzturvērtības izvērtējums

Medus ir dabīga, salda viela, ko bites ražo no augu nektāra, augu dzīvo daļu sekrēta vai sūcējzinsektu izdalījumiem uz augu dzīvajām daļām, kurus tās ievāc, pārveido, nogulsnē, dehidrē, uzglabā un atstāj medus šūnās nobriest un nogatavoties. Pēc iegūšanas izcelsmes medu iedala: ziedu jeb nektāra medus, ko iegūst no augu nektāra, un lapu izsvīduma medus, ko iegūst no sūcējzinsektu izdalījumiem uz augu dzīvajām daļām vai no augu dzīvo daļu sekrēta [2]. Medus aptuveni līdz 18. gadsimta beigām, kad to pakāpeniski sāka aizstāt ar rūpnieciski iegūtu cukuru, bija vienīgais plaši pieejamais saldinātājs [3].

Medus ķīmiskais sastāvs ir sarežģīts un ļoti atkarīgs no ievāktā augu nektāra, bišu barības, klimatiskajiem apstākļiem, bišu sugas un daudziem citiem faktoriem. Visbiežāk bišu barība ir dabisks ziedu nektārs, bet bites var tikt piebarotas arī mākslīgi, piemēram, ar cukura sīrupu vai kandiju – biezu, mīkstu cukura masu, kurai var būt pievienoti ziedputekšņi. Kopumā medus var saturēt vairāk nekā 200 dažādas vielas [4].

Medus enerģētiskā vērtība ir aptuveni 304 kcal/100 g [5], bet cukura, kuru mēdz aizstāt ar medu, enerģētiskā vērtība ir 400 kcal/100 g. Kā redzams 1.1. tab. medus galvenokārt sastāv no ogļhidrātiem un ūdens. Ogļhidrāti veido aptuveni 95 % no medus sausās masas. Galvenie ogļhidrāti medū ir monosaharīdi fruktoze un glikoze, kas sastāda līdz pat 75 % no kopējā ogļhidrātu satura. 100 gramos medus vidēji ir 38 gramu fruktozes, 30 g glikozes un tikai 0,7 gramu saharozes [3]. Vēl no izplatītākajiem ogļhidrātiem medū ir jāatzīmē monosaharīds galaktoze (apmēram 3 g) un disaharīds maltose (apmēram 1,4 gramu) [5]. Medū kopumā ir konstatēti aptuveni 25 dažādi oligosaharīdi. Lapu izsvīduma medū ir mazāks monosaharīdu, bet lielāks disaharīdu un oligosaharīdu, it īpaši melozitozes un rafinozes, daudzums nekā ziedu medū.

Medus glikēmiskais indekss (GI) variē robežās no 31 (zems GI) līdz 78 (augsts GI). Tas ir atkarīgs no medus veida jeb fruktozes un glikozes attiecības tajā. Jo medus vairāk satur fruktozi, kuras GI ir 25, jo zemāks ir tā GI indekss. Cukura glikēmiskais indekss vidēji ir nedaudz augstāks nekā medum 58–65 [6]. No tā var secināt, ka šķidrākam medum ir zemāks glikēmiskais indekss, jo tas vairāk satur fruktozi.

Olbaltumvielu saturs medū ir aptuveni 0,5 %. Galvenokārt tie ir enzīmi un brīvās aminoskābes. No enzīmiem medū visvairāk ir amilāzes, invertāzes un glikozes oksidāzes [3]. Medū kopumā ir 18 brīvās aminoskābes, bet to daudzums ir ļoti niecīgs. No tām visvairāk ir prolīns, asparagīnskābe, glutamīnskābe un neaizstājamā aminoskābe fenilalanīns [5].

1.1. tabula

Medus ķīmiskais sastāvs

	Ziedu medus		Izsvīduma-lapu medus	
	Vidēji, g/100 g	Min – max, g/100 g	Vidēji, g/100 g	Min – max, g/100 g
Ūdens	17,2	12–20	16,3	15–20
Monosaharīdi:				
fruktoze	38,2	30–45	31,8	28–40
glikoze	31,3	24–40	26,1	19–32
Disaharīdi:				
saharoze	0,7	0,7–4,8	0,5	0,1–4,7
citi	5,0	2–8	4,0	0,3–22,0
Trisaharīdi:				
melezitoze	0,8	0,5–6	4,0	0,3–22,0
citi	0,5		1,0	0,1–6
Oligosaharīdi:	3,1	0,5–1	10,1	0,1–6
Cukuri (kopā)	79,7		80,5	
Minerālvielas	0,2	0,1–0,5	0,9	0,6–2,0
Aminoskābes, olbaltumvielas	0,3	0,2–0,4	0,6	0,4–0,7
Organiskās skābes	0,5	0,2–0,8	1,1	0,8–1,5
pH	3,9	3,5–4,5	5,2	4,5–6,5

Vitamīnu un minerālvielu daudzums medū ir niecīgs. No uzturvērtības viedokļa, kā būtiskākās minerālvielas var minēt hromu, mangānu un selēnu, bet no vitamīniem visvairāk ir B grupas vitamīnu. Medus satur 0,3–25 mg/kg holīna un 0,06–5 mg/kg acetilholīna. Holīns ir nozīmīgs kardiovaskulārajām un smadzeņu funkcijām, kā arī šūnu membrānas sastāvdaļa, bet acetilholīns darbojas kā neurotransmiters [3].

Polifenoli ir nozīmīga ķīmisko savienojumu grupa, jo tiem piemīt antioksidantu īpašības. Kopējais fenolu daudzums, kas variē dažāda veida medū ir no 56 līdz 500 mg/kg medus. Galvenokārt tie ir flavanoīdi (kvertecīns, luteolīns, apigenīns, galangīns,

kaempferīds), fenolskābes un fenolskābju atvasinājumi. Flavanoīdu daudzums variē no 60 līdz 460 µg/100 g atkarībā no medus veida [3]. Tumšākā medū ir lielāks antioksidantu daudzums nekā gaišākā medū [7]. Pētījumā, kur tika analizēts antioksidantu daudzums dažādas izcelsmes medus paraugos, Ilinoizas griķu medū, kas bija tumšākais no analizētajiem paraugiem, antioksidantu koncentrācija bija 20 reizes lielāka nekā gaišākajā analizētajā medū – Kalifornijas salviju medū [8]. Ja daļu no ikdienā paterētājiem saldinātājiem aizvietotu ar medu, tas radītu antioksidantu pieaugumu cilvēku uzturā.

Tiek veikti pētījumi par medū esošajiem oligosaharīdiem kā prebiotikām. *In vitro* un *in vivo* pētījumi ar pelēm uzrāda, ka medus veicina bifidobaktēriju straujāku augšanu. *In vitro* pētījumos konstatēts, ka medus oligosaharīdu prebiotiskais indekss ir robežās no 3,38 līdz 4,24. Taču nepieciešami papildu pētījumi, lai patiešām pierādītu medus kā efektīva prebiotika iedarbību uz cilvēku gastrointestinālo sistēmu [9,10].

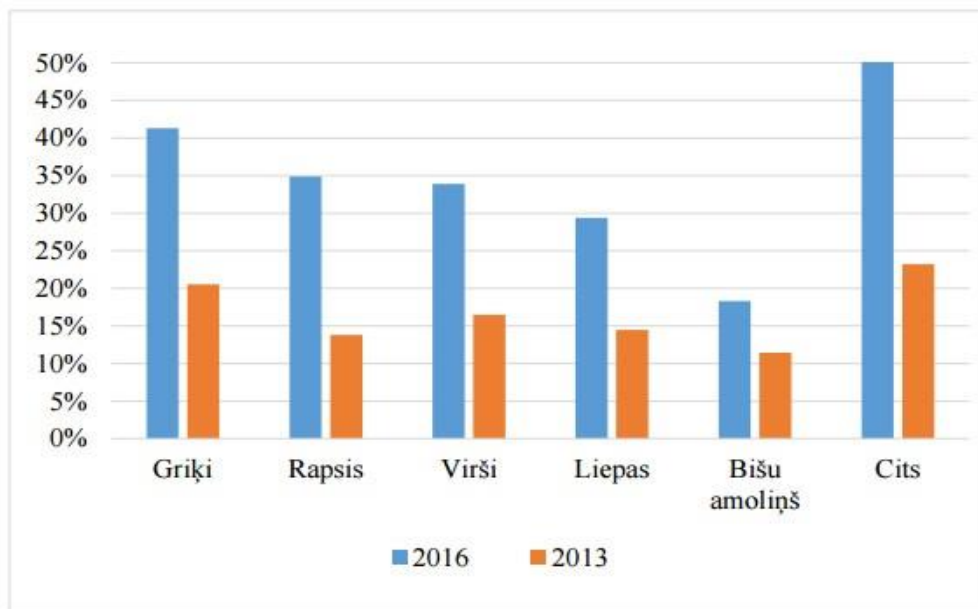
Bērniem līdz 1 gada vecumam nevajadzētu lietot medu, jo tas var saturēt baktērijas *Clostridium botulinum* sporas, kas izraisa zīdaiņu botulismu. Līdz šim vecumam zīdaiņu gremošanas trakts vēl nav pilnībā attīstījies – vēl nav izveidojušās baktērijas, kas būtu konkurētspējīgas ar *Clostridium botulinum* sporām, tāpēc tās nokļūstot zīdaiņa gremošanas traktā kolonizējas un izdala toksīnu botulīnu [11]. Medus piesārņojuma ar *Clostridium botulinum* avoti ir ziedputekšņi, putekļi, gaiss, augsne, bišu gremošanas trakts. Vislielākā sporu koncentrācija ir stropā, bišu vaskā, bišu šūnās un vietās, kur glabājas ziedputekšņi [12]. Vēl no medus lietošanas vajadzētu izvairīties cilvēkiem, kuriem ir fruktozes nepanesamība vai alerģija pret ziedputekšņiem.

1.1.2. Medus patēriņš

Eiropa ir otrais lielākais medus ražotājs pasaulē, taču saražotais apjoms nespēj pilnībā nodrošināt pieprasījumu, tāpēc 40 % no kopējā apjoma veido importa medus. Visvairāk medus tiek importēts no Ķīnas un Meksikas [13].

Saskaņā ar Lauksaimniecības datu centra datiem (01.01.2015.) Latvijā ir reģistrēti 3393 biškopji un 95 335 bišu saimes. Kopumā ir vērojama pozitīva tendence – katru gadu pieaug bišu saimju skaits, kā arī saražotais medus daudzums. Valstī 2013. gadā kopumā saražotas 1 666 t medus, 2014. gadā – 1 704 t, bet 2015. gadā 1 907 t medus. Lielākā daļa saražotā medus gala patērētājam tiek pārdots tieši no ražotāja saimniecības, un otra daļa – tirgū un veikalos. Specializēto medus veikalu īpatsvars medus izplatīšanā ir zems.

Visvairāk Latvijā tiek saražots dažādu ziedu medus, bet arvien lielāku popularitāti gūst kāda viena konkrēta auga medus. Tradicionāli Latvijā populārākās monoflorā medus šķirnes ir griķu, viršu un rapša medus (skatīt 1.1. att.).



1.1. att. Bišu izvešana ganībās, atbilžu skaits (%) un rezultātu salīdzinājums, apkopojot 2013. gada aptaujas un 2016. gada aptaujas datus [14]

Medus patēriņš uz vienu iedzīvotāju Latvijā ir aptuveni 1,2 kg [14]. Taču ņemot vērā, ka mūsdienās patērētēji uzturā arvien vairāk izvēlas lietot dabiskas izcelsmes produktus, medus patēriņš nākotnē varētu pieaugt.

1.2. Medus piesārņojums ar antibiotiku atliekvielām

Medus sastāvs atspoguļo gan ģeogrāfiskās vietas floru, gan vides vispārējo kvalitāti, kā arī pesticīdu un antibiotiku lietošanu lauksaimniecībā. Tāpēc bites un to produkciju var uzskatīt par noteiktas teritorijas piesārņojuma indikatoru. Galvenie medus piesārņojuma veidi ir smagie metāli un organiskie savienojumi – polihlorbifenili, gaistošie oglekļaūdeņraži, pesticīdi un antibiotikas.

Medū sastopamas vairākas antibiotiku klases: tetraciklīni, amfenikoli, makrolīdi, beta-laktāmi un aminoglikozīdi, kuru izplatība medū tiks apskatīta turpmāk [12]. Atliekvielu avoti ir baktēriju izraisītu slimību apkarošana biškopībā, augkopībā un lopkopībā.

Eiropas Komisijas regulā Nr. 37/2010 par farmakoloģiski aktīvajām vielām un to klasifikāciju pēc to atlieku maksimāli pieļaujamā satura dzīvnieku izcelsmes pārtikas produktos norādītas tikai divu vielu – amitrāza un kumafosa – maksimāli pieļaujamās vērtības

medū – 200 µg/kg un 100 µg/kg attiecīgi. Abas aktīvās vielas izmanto bišu slimības varrozes apkarošanā [15]. Amitrāzs un kumafoss ir nepolāri organiskie savienojumi, tāpēc galvenokārt tie atrodami bišu vaskā, kuram, salīdzinājumā ar medu, likumdošana pašlaik nenosaka atliekvielu maksimāli pieļaujamās vērtības [16]. Bišu vasku izmanto farmaceitiskos preparātos, pārtikas ražošanā un iepakojumā, kā arī kosmētikā. Praksē mēdz veikt bišu vaska pārkausēšanu un atkārtotu izmantošanu biškopībā, kas var izraisīt atliekvielu uzkrāšanos vaskā [15]. Kumafoss medū saglabājas vairāk nekā 30 dienas, bet bišu vaskā – vairāk nekā gadu pēc pretvarrozes līdzekļu lietošanas. Tā pussabrukšanas laiks medū ir 69 dienas, bet vaskā – no 115 līdz 346 dienām [17].

Eiropas Savienībā antibiotikām medū ir noteikta tā saucama “nulles tolerance”, kas nozīmē, ka tajā nedrīkst atrasties antibiotiku atliekvielas, izņemot divas iepriekš minētās vielas noteiktajā daudzumā. Šādā gadījumā ļoti nozīmīga ir antibiotiku atliekvielu noteikšanas metodes jutība un precizitāte, lai spētu noteikt pat visnecīgāko atliekvielu daudzumu.

Saskaņā ar Komisijas regulu Nr. 37/2010 noteikts maksimāli pieļaujamais aminoglikozīdu atliekvielu daudzums gaļas izstrādājumos (nierēs, muskuļos, taukos, plaušās), pienā un olās, bet ne medū. Tik stingru regulējumu par pesticīdu un antibiotiku lietošanu nav citos pasaules reģionos, no kuriem Eiropas Savienība importē medu. Kopš 2003. gada ES Ātrās brīdināšanas sistēma pārtikas un barības jomā (RASFF) regulāri ES dalībvalstīm ir ziņojusi par antibiotiku atliekvielām medū [18]. 1.2 tab. redzami autora apkopotie dati no RASFF datu bāzes par streptomicīna, visplašāk izmantotās aminoglikozīdu klases antibiotikas, atliekvielām medū, to koncentrāciju un medus izcelsmes valstis laika periodā no 2003. gada līdz 2015. gadam.

RASFF dati par streptomicīnu medū

Gads	Streptomicīns, µg/kg	Izcelsmes valsts	Gads	Streptomicīns, µg/kg	Izcelsmes valsts
2003	220	Bulgārija	2005	14	Argentīna
	56,5	Bulgārija		13; 11; 16	Vjetnama
	51,8	Vjetnama		12,8	Vjetnama
	40	Meksika	2006	47,7	Rumānija
	20 ≤ 40	Spānija, Itālija		13	Ēģipte
	0,49	Meksika	2007	870; 520	Argentīna
	0,30	Meksika		179	Ķīna
2004	190	Meksika	2008	16,9	Ķīna
	120	Meksika		9	Ķīna
	120; 90	Spānija, Polija	2009	22	Meksika
	72	Rumānija		10	Meksika
	0,15	Rumānija	2010	49	Meksika
2005	46	Vjetnama		43	Meksika
	42	Vjetnama	2015	42,8; 43,6	Ukraina
	21	Vjetnama		18,8	Ukraina
	19,3	Indija			

Redzams, ka streptomicīns galvenokārt konstatēts medus paraugos no valstīm, kas atrodas ārpus Eiropas Savienības, izņemot Spānijas, Polijas un Itālijas gadījumus. Ķīna un Meksika ir vienas no galvenajām importa valstīm, un redzams, ka tajās pārkāpumi ir konstatēti daudz biežāk nekā ES dalībvalstīs. Noteiktā streptomicīna koncentrācija ļoti variē – no 0,15 µg/ kg līdz pat 870 µg/kg. No aminoglikozīdu klases antibiotikām RASFF datu bāzē ir minēts tikai streptomicīns, izņemot 2015. gadu, kad medus paraugos no Ukrainas, konstatēts 455; 434 µg/kg dihidrostreptomicīna. Atsevišķās valstīs (Šveicē, Lielbritānijā, Beļģijā) tomēr ir noteikta antibiotiku atliekvielu maksimāli pieļaujamā vērtību, kuru pārsniedzot medus nav lietojams patērētājiem. Tas ir 10–50 µg/kg visām antibiotiku grupām [19]. Eiropas Savienības references laboratorija antibiotiku atliekvielu noteikšanai pārtikā (*European Union Reference Laboratory for antimicrobial and colouring agent residues*) ir rekomendējusi maksimāli pieļaujamo streptomicīna daudzumu medū – 40 µg/kg [20].

Biežākās biškopībā sastopamās bakteriālās slimības ir Amerikas peru puve un Eiropas peru puve. Peru puves neietekmē medus kvalitāti un nav bīstamas cilvēka veselībai,

taču iznīcina bišu saimes, rada risku kopējā bišu veselībā un finansiālus zaudējumus saimniecībai.

Amerikas peru puvi izraisa sporas veidojoša baktērija *Paenibacillus larvae*, kas inficē medus bišu perus. Slimība izplatās sporu veidā ar inficētām peru vai medus kārēm, biškopības inventāru un stropiem, kuros ir mitinājušās slimas bišu saimes. Bišu saimi var arī inficēt, piebarojot ar kandiju, kas satur ziedputekšņus, vai medu, ja tas iegūts no slimas saimes vai tādas, kurā ir augsts *Paenibacillus larvae* sporu saturs. Tā kā sporas ir dzīvotspējīgas gadiem, Eiropas Savienībā, kā arī citās valstīs, Ameriku peru puves gadījumā ir jāveic slimo saimju iznīcināšana un visa infekciozā inventāra sadedzināšana. Atsevišķās valstīs, piemēram, ASV, Kanādā un Argentīnā, ir atļauta antibiotiku lietošana slimības kontroles nolūkos. Antibiotiku lietošana var tikai atvieglot slimības gaitu, nevis to pilnībā izbeigt, tāpēc inficētie stropi nepārtraukti jāapstrādā ar antibiotikām, lai izvairītos no slimības uzliesmojuma, kas var iznīcināt ne tikai vienu saimi, bet pat visu bišu dravu. Lai gan antibiotikas nespēj pilnībā izārstēt šo slimību, biškopju forumos visbiežāk ieteiktās un arī izmantotās antibiotikas ir oksitetraciklīns, tilozīns un aminoglikozīdu klases antibiotika – streptomīns [21,22].

Latvijā Amerikas peru puve visbiežāk uzliesmo karstākajā vasaras laikā, kad iekrīt bezienesuma periods – jūnija beigas līdz augusta sākums, parasti jūlija vidū. Lai gan saimniecība saņem kompensācijas par iznīcinātajām slimajām bišu saime, pašlaik nav statistikas datu par šīs slimības izplatību Latvijā, jo biškopji parasti neziņo par slimību un cīnās pašrocīgi.

Eiropas peru puvei ir līdzīgi simptomi, taču atšķirībā no Amerikas peru puves, to izraisošā baktērija *Melissococcus plutonius* neveido sporas, tāpēc šī slimība tiek uzskatīta par mazāk bīstamu. Tās apkarošanā visbiežāk izmantotā antibiotika ir oksitetraciklīns [22].

Istabas temperatūrā streptomīns neizmainītā veidā medū saglabājas vairāk nekā 4 mēnešus. Bišu stropu apstrādājot ar 1 g streptomīna saharozes šķīdumā, visaugstākā streptomīna koncentrācija medū bija pēc 7 dienām – 124 mg/kg, 28. dienā samazinoties līdz 8 mg/kg, bet pēc 332 dienām koncentrācija samazinājās līdz 6,5 mg/kg [22]. Tas vairāk nekā simts reižu pārsniedz rekomendēto drošības koncentrāciju (40 µg/kg).

Streptomīnu izmanto baktērijas *Erwinia amylovora* izraisītās slimības – bakteriālās iedegas apkarošanā. Šī baktērija var inficēt ābeles, bumbieres, korintes, cidonijas, klintenes, vilkābeles, eriobotrijas, mespili un pīlādžus. Slimība parādās reizumis, taču tās

attīstību veicina klimatiskie apstākļi. Patogēns pārziemo zaru dobumos un inficētos audos, bet pavasarī vairojas un ar kukaiņu, vēja un lietus starpniecību nonāk ziedā, kur sākas auglīga inficēšana. Streptomicīna lietošana nav efektīva, ja jau ir redzamas slimības pazīmes, tāpēc tādās valstīs, kā Izraēlā, Jaunzēlandē, Kanādā un Meksikā streptomicīns ir reģistrēts lietošanai preventīvi. Tas iespējams izskaidro streptomicīna atliekvielas medus paraugos no Meksikas, ko konstatēja RASFF (sk. 1.2. taB.). ASV aptuveni 90 % no lauksaimniecībā izmantotā streptomicīna ir lietots tieši bakteriālās iedegas apkarošanā. Stingri ierobežotos apstākļos un ārkārtas gadījumā, streptomicīnu ir atļauts lietot arī Vācijā, Austrijā un Šveicē [23]. Literatūrā norādīts, ka Vācijā 21 % no 183 medus paraugiem bija piesārņots ar streptomicīnu [19]. Var secināt, ka aminoglikozīdu klases antibiotikas var atrasties arī Eiropas Savienībā ražotā medū, tāpēc nepieciešamas regulāras pārbaudes un efektīvas analizēšanas metodes.

Valsts augu aizsardzības dienests bakteriālo iedegu Latvijā pirmo reizi konstatēja 2007. gadā. Šinī gadā arī tika konstatēts līdz šim lielākais bakteriālo iedegu perēkļu skaits – 26 perēkļi. 1.3. tab. ir apkopoti Valsts augu aizsardzības dienesta dati par konstatētajiem bakteriālās iedegas perēkļiem Latvijā.

Pēc tabulas datiem redzams, ka bakteriālā iedega visvairāk ir konstatēta Zemgales reģionā, kur visticamāk tā izplatījusies no Lietuvas, jo tur bakteriālā iedega konstatēta 2005. gadā.

Saskaņā ar Ministru kabineta noteikumiem Nr. 644 “Dzīvniekos un to produktos esošo noteiktu vielu un to atliekvielu kontroles un finansēšanas kārtība” medū nosaka vielas ar pretmikrobu iedarbību, tostarp sulfanilamīdus un hinolonus, karbamātus un piretroīdus, hlororganiskos savienojumus, tostarp polihlorbifenilus, fosfora organiskos savienojumus, un ķīmiskos elementus.

Latvijā konstatētie bakteriālās iedegas perēkli 2007.–2015. gads

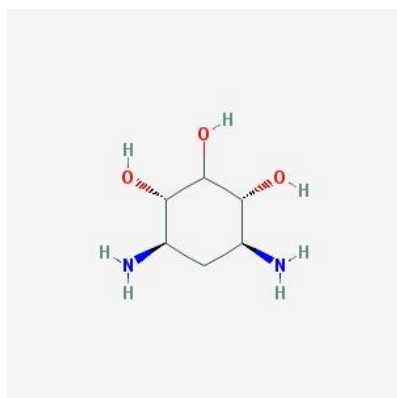
Gads	Perēkļu skaits	Reģions
2007	26	Zemgales – 17, Rīgas – 4, Latgales – 3, Vidusdaugavas – 1, Dienvidkurzemes – 1
2008	5	Zemgales – 5
2009	2	Zemgales – 2
2010	3	Zemgales – 3
2011	1	Zemgales – 1
2012	0	–
2013	8	Zemgales – 4, Rīgas – 3, Kurzemes – 1
2014	8	Rīgas – 4, Zemgales – 3, Kurzemes – 1
2015	2	Zemgales – 2

1.3. Aminoglikozīdu klases antibiotikas

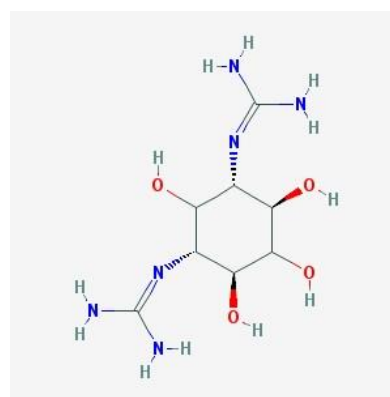
2.1.1. Aminoglikozīdu struktūra un darbības mehānisms

Aminoglikozīdi ir baktericīdās antibiotikas, kas iznīcina aerobas gram- negatīvās baktērijas. Pirmo aminoglikozīdu klases antibiotiku streptomicīnu atklāja 1943. gadā. To izdalīja no augsnes baktērijas *Streptomyces griseus*. Streptomicīns bija pirmais efektīvais līdzeklis turberkulozes ārstēšanā. Mūsdienās ir zināmi jau vairāk nekā 15 aminoglikozīdu grupas savienojumi [24,25].

Aminoglikozīdi sastāv no diviem vai vairāk amino cukuriem, kas ar glikozīdiskajām saitēm ir saistīti ar 2-deoksistreptamīnu, kura struktūra redzama 2.1. att.



2.1. att. 2-Deoksistreptamīns



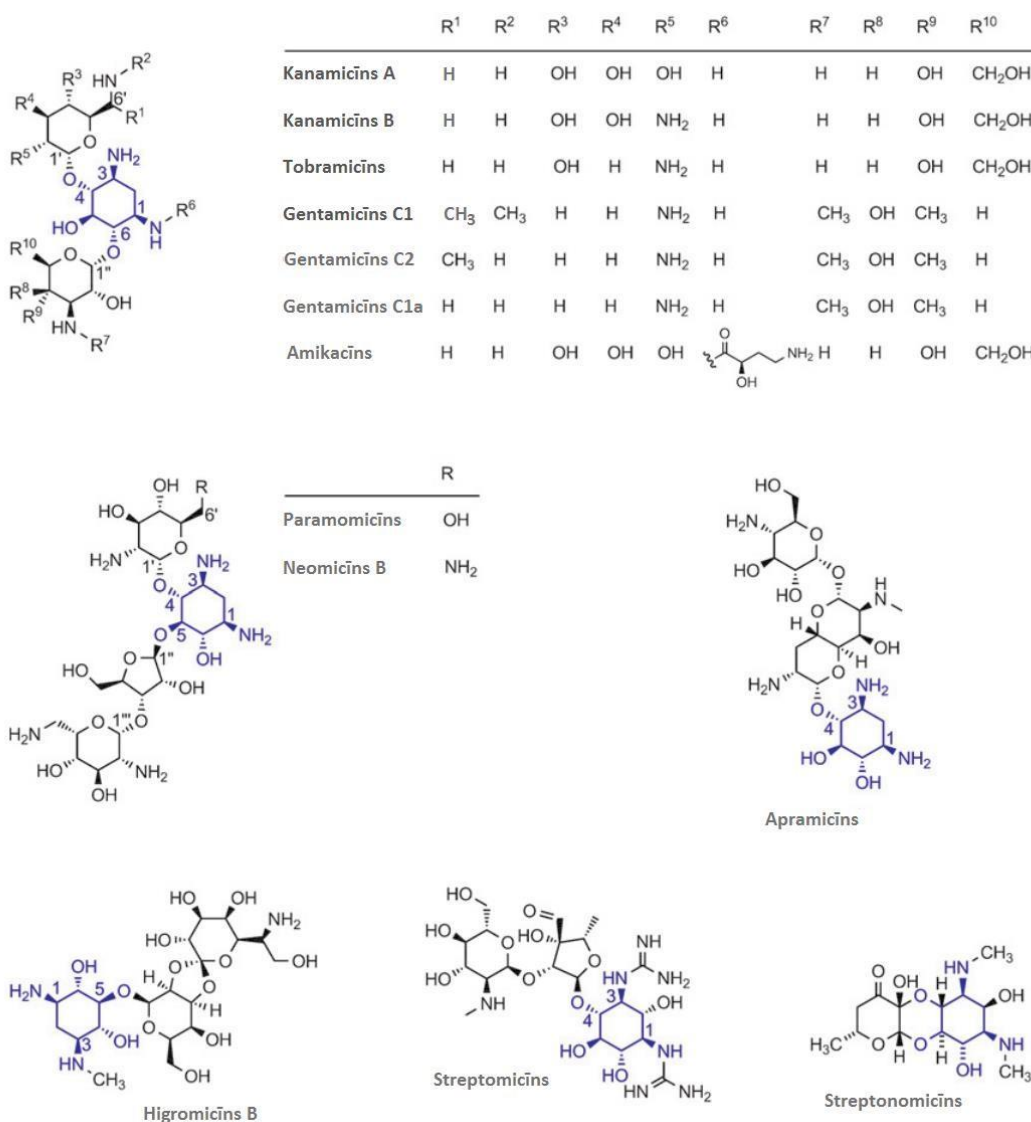
2.2. att. Streptidīns

Izņēmumi ir streptomīcīns un dihidrostreptomīcīns, jo tiem 2-deoksistreptamīna vietā ir streptidīns, kura struktūra redzama 2.2. attēlā [26].

Aminocukuri pie 2-deoksistreptamīna var atrasties 4-, 5- vai 6- vietā. Atkarībā no tā izdala divas galvenās aminoglikozīdu grupas:

- 4,5- diaizvietotie 2-deoksistreptamīni (neomicīns B, paramomicīns);
- 4,6- diaizvietotie 2-deoksistreptamīni (kanamicīns A, kanamicīns B, gentamicīns C1, gentamicīns C2, gentamicīns C1a, tobramicīns, amikacīns).

Apramicīns ir vienīgais 4- monoizvietotais 2-deoksistreptamīns. 2.3. attēlā redzams pārskats par aminoglikozīdu klases antibiotiku struktūru, kurā ietverti arī tie savienojumi, kas neietilpst abās galvenajās grupās [26].



2.3. att. Aminoglikozīdu klases antibiotiku struktūras [27]

Aminoglikozīdi vāji uzsūcas kunga–zarnu traktā, tāpēc tos injicē vai arī lieto ārīgi kā ziedes, krēmus, ausu, deguna pilienus [26,28]. No organisma tie neizmainītā veidā izdalās ar urīnu [26]. Slimību ārstēšanā aminoglikozīdus vienus pašus izmanto tikai tularēmijas – akūtas cilvēku un dzīvnieku infekcijas slimības, ko pārnēsā galvenokārt grauzēji, gadījumā. Parasti gram negatīvu baktēriju izraisītu slimību ārstēšanā tos izmanto kopā ar plaša spektra beta laktāma klases antibiotikām. Piemēram, gentamicīnu, retāk streptomicīnu, kopā ar citām antibiotikām izmanto infekcioza endokardīta ārstēšanā [25].

Veterinārajā medicīnā visvairāk lieto gentamicīnu ar neomicīnu; piemēram, lai ārstētu mastītu slaucamām govīm un enterītu teļiem [20]. Streptomicīna un dihidrosteptomicīna lietošanas apjomus cenšas samazināt to toksicitātes un rezistences dēļ [26]. Antibiotikas lopkopībā izmanto ne tikai ārstēšanai vai profilaksei, bet arī kā piedevu barībai, jo tās veicina barības ātrāku pārstrādāšanos un efektīvāku uzturvielu uzsūkšanos. [29]. Eiropas Savienībā kopš 2006. gada, antibiotikas ir aizliegts pievienot barībai ar mērķi veicināt lopu augšanu. Amerikas Savienotajās Valstīs un citās valstīs šāds regulējums vēl nepastāv. Piemēram, Ķīnā, vēl joprojām ir atļauta dažu aminoglikozīdu izmantošana kā piedevu dzīvnieku barībā. Cūku barībai pievieno 80–100 mg/kg apramicīna sulfātu un 22 mg/kg spektomicīna sulfāta. Neomicīna sulfāta daudzums, ko pievieno cūku barībai ir 77 mg/kg, bet vistu barībai – 154 mg/kg [32].

Aminoglikozīdi efektīvi iznīcina baktērijas, kas strauji vairojas. Tiem nepieciešams īss kontakta laiks un to darbība ir atkarīga no koncentrācijas. Aminoglikozīdu darbības mehānisms – tās neatgriezeniski piesaistās pie 30S ribosomas un, inhibējot proteīnu sintēzi, iznīcina baktērijas. Taču, lai nokļūtu pie ribosomām, aminoglikozīdiem ir jāšķērso lipopolisaharīdu slānis, kas klāj šūnas sienīgu, un arī šūnas membrānu. Pirmais solis ir katjonu aminoglikozīdam saistīties pie šūnas membrānā esošajiem anjoniem, kam seko polārā aminoglikozīda katjona transports cauri citoplazmatiskajai membrānai, lai varētu notikt saistīšanās ar ribosomām. Transportu iespējams veicina membrānas potenciāls. Šis process vislabāk notiek aerobos apstākļos, tāpēc aminoglikozīdi spēj iznīcināt aerobas, nevis anaerobas baktērijas [30].

2.2.2. Aminoglikozīdu izraisītie blakusefekti

No aminoglikozīdu klases antibiotikām literatūrā visvairāk apskatīti gentamicīna un streptomicīna izraisīti blakusefekti. Izplatītākie ir vestibulārā aparāta bojājumi, nefrotoksicitāte un ototoksicitāte. Vestibulārā aparāta bojājumi sastāda 15 % līdz 30 % no

visiem gadījumiem. Vestibulopātijas simptomi ir nestabilitāte, attēla izplūšana, kustinot galvu. Gentamicīna izraisītas dzirdes izmaiņas konstatētas 5 %–10 % gadījumu. Dzirdes zudums notiek galvenokārt augstākajās frekvencēs – aptuveni 8000 kHz līdz 12 000 kHz. Neskatoties uz to, ka aminoglikozīdu izraisīti dzirdes bojājumi ir pierādīti vairākos pētījumos, nav precīzi zināms mehānisms kā un kāpēc tie bojā matiņaudu šūnas. Aminoglikozīdi var izraisīt galvas smadzeņu bojājumus, kā dēļ rodas dažādi traucējumi (atmiņas traucējumi, intelekta spēju pazemināšanās). Toksicitātes un antibakteriālās rezistences dēļ, šīs aminoglikozīdu klases antibiotikas infekciju slimību ārstēšanā izmanto arvien retāk.

1.4. Antibakteriālā rezistence

Baktērijas kļūst antibiotiku rezistentas, kad specifiskās antibiotikas ir zaudējušas spēju tās nonāvēt vai apturēt to augšanu. Dažas baktērijas, kas parasti ir jutīgas pret antibiotikām, ģenētisku pārmaiņu dēļ var kļūt rezistentas, izdzīvot, turpināt vairoties, tādējādi paildzinot infekcijas slimību ārstēšanu vai atsevišķos gadījumos to padarot neefektīvu. Šī iemesla dēļ rezistentu baktēriju izraisītām infekcijām var būt nepieciešama alternatīva ārstēšanas metodika un dārgākas antibiotikas, iespējams, ar daudz nopietnākām blakusparādībām [31]. Ik gadu antibakteriālā rezistence ir nāves iemesls aptuveni 25 000 cilvēkiem Eiropas Savienībā un 700 000 cilvēkiem visā pasaulē. Pastāv bažas, ka ap 2050. gadu no bakteriālās rezistences ies bojā vairāk cilvēku nekā no vēža. 2016. gada *Eurobarometra* pētījums par antibiotiku lietošanu un zināšanām par tām rāda, ka pēdējo septiņu gadu laikā kopumā ES antibiotiku lietošana ir samazinājusies par 6 %. Tostarp otrs lielākais samazinājums – 8 % novērots tieši Latvijā, Dānijā un Nīderlandē [32].

Bez efektīvām antibiotikām nopietnu operāciju un ķīmijterapijas veiksmīga norise nākotnē būs apdraudēta [33]. Eiropā uzraudzības dati liecina, ka antibakteriālā rezistence ir pieaugoša sabiedrības veselības problēma. Pārmērīga un neatbilstoša antibiotiku lietošana paātrina rezistentu baktēriju parādīšanos un izplatību [31]. Piemēram, antibiotiku lietošana saaukstēšanās gadījumā, kuru izraisījis vīruss, nevis baktērija, un antibiotiku lietošana kā barības piedevu vai profilakses līdzekli lopkopībā un zivkopībā veicina rezistentu baktēriju attīstību [33]. Farmācijas industrijas, dzīvnieku fermu un arī slimnīcu notekūdeņi satur ievērojamu antibiotiku atliekvielu daudzumu, tāpēc rezistenti mikroorganismi ir atrasti gan cilvēkos, dzīvniekos un pārtikā, gan arī apkārtējā vidē (augsnē, ūdenī un gaisā) [28,33]. Tie var izplatīties starp cilvēkiem un dzīvniekiem, neievērojot higiēnas normas.

Antibakteriālā rezistence pastāv ikvienā valstī. Rezistenta *Klebsiella pneumonia* baktērija, kas atrodas zarnās un var izraisīt dzīvībai bīstamas infekcijas, ir izplatījusies pa visiem pasaules reģioniem [33]. Antibiotikas, ko lieto, lai ārstētu un novērstu bakteriālas infekcijas dzīvniekiem, ir tās pašas, ko lieto cilvēki. Streptomicīnu kopā ar citām antibiotiku klasēm lieto infekcijas slimību gadījumā gan cilvēkiem, gan dzīvniekiem, kā arī peru puņķu un bakteriālās iedegas apkarošanā atsevišķās valstīs. Tātad pastāv vairāki veidi, kādos cilvēks var uzņemt vienu un to pašu antibiotiku [31].

Eiropas pārtikas nekaitīguma iestādes (EFSA) kopsavilkuma ziņojumā par antibiotiku rezistenci baktērijām, kas izdalītas no cilvēkiem, dzīvniekiem un pārtikas 2012. gadā atrodami šādi dati. *Salmonella spp.* rezistence pret streptomicīnu 23,6 % (N = 16 643) gadījumā. Visaugstākais rādītājs konstatēts Itālijā 62,4 % (N = 133), Igaunijā – 10,7 % (N = 169 %), Lietuvā – 6,6 % (N = 623). Baktērijai *Salmonella Typhimurium* rezistence pret streptomicīnu – 46,2 %, gentamicīnu – 3,2 %. Īpaši augsta *Salmonella Typhimurium* rezistence pret gentamicīnu ir sastopama Slovākijā (92,9 %; N = 56), savukārt pret streptomicīnu – Vācijā (82,3 %; N = 744) [34]. Par plašu problēmu ir kļuvusi enterokoku rezistence pret aminoglikozīdiem. Jo enterokoku izraisīta endokardīta ārstēšanā nepieciešama ilgstoša potenciāli nefrotoksiskā un ototoksiskā aminoglikozīda lietošana kopā ar citām antibiotikām [25].

1.5. Aminoglikozīdu noteikšanas metodes

Aminoglikozīdi ir ūdenī šķīstoši, polāri savienojumi, kuru struktūrā ir vairāki slāpekļa atomi, kas atrodas gan amino grupu sastāvā (streptomicīna un dihidrostreptomicīna gadījumā arī guanidīna funkcionālās grupas sastāvā). Šī iemesla dēļ aminoglikozīdu klases antibiotikas var tikt pieskaitītas pie organiskām bāzēm un tām piemīt relatīvi augstas pKa vērtības. Aminoglikozīdi nesatur hromoforas un fluoroforas grupas. Tos nav iespējams noteikt ar vairāku savienojumu klašu noteikšanas metodēm (multimetodēm), jo to fizikālās un ķīmiskās īpašības stipri atšķiras no citiem veterinārajiem medikamentiem [35].

Kā skrīninga metodi aminoglikozīdu noteikšanai var izmantot mikrobioloģiskos testus. Piemēram, ELISA testu streptomicīna un dihidrostreptomicīna noteikšanai medū. To darbības pamatā ir baktēriju augšanas inhibēšana. Ja analizējamais paraugs satur antibiotikas virs noteikšanas robežas, tās aptur baktēriju augšanu, kas savukārt izraisa pH izmaiņas, jo baktērijas augot izdala skābi [42]. Būtiski, lai noteikšanas robeža nebūtu augstāka nekā noteiktā vai rekomendētā maksimāli pieļaujamā vērtība, piemēram, streptomicīna gadījumā

tie būtu 40 µg/kg. Šādus testus izmanto ātrai, lētai un kvalitatīvai aminoglikozīdu noteikšanai.

Lai kāda būtu izvēlētā analīzes metode, jebkurā gadījumā ir jāveic parauga homogenizēšana un, olbaltumvielu izgulsnēšana, jo aminoglikozīdi spēj saistīties ar olbaltumvielām, pēc kuras seko selektīva antibiotiku ekstrakcija, attīrīšana no traucējošajiem matricas komponentiem.

Aminoglikozīdi pārsvarā atrodas dzīvnieku izcelsmes produktos, kas bagāti ar olbaltumvielām. Medū olbaltumvielu saturs ir niecīgs, bet, arī analizējot to, veic olbaltumvielu izgulsnēšanu. Visbiežāk tam izmanto organiskos šķīdinātājus, piemēram, acetonitrilu, vai skābes – trihloretikskābi vai perhloskābi. Aminoglikozīdu ekstrakciju no parauga lielākoties veic ar šķidrums–šķidrums ekstrakciju, kurai seko cietās fāzes ekstrakcija (CFE). Ja paraugs, kā, piemēram, piens vai aknas, satur taukus, tad ir nepieciešams veikt parauga attaukošanu. Kā šķīdinātāju tam var izmantot heksānu. CFE izmantošanas gadījumā kārtidžu sagatavo ar polāru organisko šķīdinātāju, piemēram, metanolu, pēc tam ar ūdeni un pēc tam pievieno ekstrakcijas šķīdumu. Pēc ekstrakcijas kārtidžu skalo ar nelielu daudzumu ūdens un žāvē [28].

Gāzu hromatogrāfija. Šo metodi izmanto, lai noteiktu gaistošus, termiski stabilus savienojumus zemā koncentrāciju līmenī. Tā kā aminoglikozīdi nav gaistoši, lai to noteikšanai varētu izmantot gāzu hromatogrāfiju, ir jāiegūst gaistoši atvasinājumi. To var panākt sililējot hidroksilgrupas un acilējot amino grupas. ASV Farmakopejā aprakstīts, ka gāzu hromatogrāfiju var izmantot, lai noteiktu spektinomicīnu (Trobicīns) pirms tam to sililējot ar heksametildisilazānu [26].

Augsti efektīvā šķidrums hromatogrāfija (AEŠH). Aminoglikozīdu īpašības – ūdenī šķīstoši, ļoti polāri savienojumi – ir atbilstošas, lai izmantotu AEŠH metodi, piemēram, jonu apmaiņas vai apgrieztās fāzes hromatogrāfiju. Tomēr, kā tika minēts iepriekš, aminoglikozīdi nesatur hromoforas vai fluoroforas grupas, tāpēc to noteikšana ar UV vai fluorescences detektoru ir apgrūtināta. To var padarīt iespējamu, tomēr tādā gadījumā ir jāveic savienojumu derivatizēšana, iegūstot hromoforās vai fluoroforās grupas. Derivatizāciju var veikt pirms parauga ievadīšanas kolonnā (*pre-column derivatization*) vai arī pēc izdalīšanās no kolonnas pirms savienojumu detektēšanas (*post-column derivatization*) [26]. Jāatzīmē, ka derivatizācija nevienam pagarina analīzes veikšanas laiku, bet var arī piesārņot pašu paraugu, kā arī iegūtie atvasinājumi var sadalīties dažu stundu laikā pēc to iegūšanas. Literatūrā

aprakstītajās metodēs, kur tiek izmantota šķidrums hromatogrāfija apvienojumā ar fluorescences detektoru, noteikšanas robeža streptomcīnam un dihirostreptomcīnam dažāda veida matricās (medū, pienā, olās un aknās) ir 7,5–15 µg/kg, savukārt gentamicīna noteikšanas robeža pienā – 15 µg/L.

Kapilārā elektroforēze. Metodes priekšrocības ir augsta sadalīšanas efektivitāte, īss analizēšanas laiks un neliels reaģentu patēriņš. 60 % gadījumu ar kapilāro elektroforēzi nosakot vairāku aminoglikozīdu atliekvielas, tiek izmantots fluorescences detektors. Tāpēc arī šajā metode veic derivatizāciju ar fluorescentu reaģentu [26].

Augstefektīvā šķidrums hromatogrāfija apvienojumā ar masspektrometriju (AEŠH-MS). Šī ir visbiežāk izmantotā un atzītākā metode medikamentu atliekvielu noteikšanā. Ar šo metodi var arī identificēt analizēto savienojumu, ne tikai noteikt tā koncentrāciju. Salīdzinot ar iepriekšējo metodi, tai ir daudz zemāka noteikšanas robeža – 2 µg/kg streptomicīna medū [35].

Vairumā literatūrā aprakstīto metožu aminoglikozīdu klases antibiotiku izdalīšanai no medus paraugiem tiek veikta CFE, kuras laikā sagatavotajam parauga ekstraktam plūstot cauri cietajai (stacionārajai) fāzei, aminoglikozīdi ar to saistās un paliek uz tās virsmas. Praksē dominē divas apgrieztās fāzes CFE metodoloģijas. Pirmā galvenokārt balstās uz polaritātes atšķirībām un ūdeņraža saišu ierosinātām mijiedarbībām starp analizējamo savienojumu un SPE kolonnu, savukārt otrajā tiek izmantots jonapmaiņas mehānisms, kas balstās uz elektrostatisko mijiedarbību starp cieto fāzi un analītu [24,36,37]. Analizējamus savienojumus lielākoties eluē no CFE kolonnas, izmantojot amonija formiātu ūdens šķīdumu [20] vai paskābinātu metanolu [36], un visbeidzot analizē ar AEŠH-MS.

2. EKSPERIMENTĀLĀ DAĻA

2.1. Izmantotie reaģenti un palīgvielas

- Trihloretiķskābe (ACS tīrības pakāpe)
- Metanols (AEŠH tīrības pakāpe)
- Dejonizēts ūdens (*Milli-Q* attīrīšanas sistēma)
- Skudrskābe (ACS tīrības pakāpe)
- Nātrija hlorīds (ACS tīrības pakāpe)
- Amonija acetāts (ACS tīrības pakāpe)
- Amonija formiāts (ACS tīrības pakāpe)
- Etilēndiamīntetraetiķskābes dinātrija sāls (ACS tīrības pakāpe)
- Nātrija hidroksīds (ACS tīrības pakāpe)
- Centrifūgas filtri ar poru izmēru 0,22 μm
- Cietfāzu ekstrakcijas kolonnas *Strata-X PRP 200 mg/3 mL (Phenomenex)*
- Universālinдикатора sloksnes, pH-Fix 0–14, Macherey-Nagel.

2.2. Izmantotā aparatūra un trauki

- Analītiskie svāri ar precizitāti $\pm 0,0001$ g
- Termostatējama centrifūga
- Sildīšanas iekārta ar slāpekļa ietvaicēšanas sistēmu
- Automātiskās pipetes ar maināmu tilpumu
- Mehāniskais kratītājs
- Mērkolbas, A klase

2.3. Darba šķīdumi

- *Ekstrakcijas šķīdums: 4% trihloretiķskābes, 0,5% nātrija hlorīda, 10 mM amonija acetāta un 0,5 mM EDTA šķīdums ūdenī*

Iesver 40 g trihloretiķskābes, 5 g nātrija hlorīda, 0,77 g amonija acetāta, 0,186 g etilēndiamīntetraetiķskābes dinātrija sāls un 1000 mL mērkolbā izšķīdina 500 mL dejonizēta ūdens, atšķaida līdz 1000 mL atzīmei un vienmērīgi sajauc.

- *1 M nātrija hidroksīda šķīdums ūdenī*

100 mL mērkolbā iesver 4 g nātrija hidroksīda, atšķaida ar dejonizētu ūdeni līdz atzīmei un vienmērīgi sajauc.

- *1 M amonija formiāta šķīdums ūdenī*

100 mL mērkolbā iesver 6,80 g amonija formiāta, atšķaida ar dejonizētu ūdeni līdz atzīmei un vienmērīgi sajauc.

- *5% skudrskābes šķīdums ūdenī (95:5, v/v)*

100 mL mērkolbā pievieno 5 mL skudrskābes, atšķaida ar ūdeni līdz atzīmei un vienmērīgi sajauc.

- *Kustīgā fāze "A": 1 % skudrskābes šķīdums ūdenī*

10 mL skudrskābes atšķaida ar 990 mL dejonizēta ūdens, sajauc un degazē 10 minūtes ultraskaņas vannā.

- *Kustīgā fāze "B": acetonitrils*
- *Kustīgā fāze "C": ūdens*

2.4. Standartvielas un standartšķīdumi

2.4.1. Pamatšķīdumu pagatavošana

Pamatšķīdumus ar koncentrāciju 1000 ng/μL pagatavo vadoties pēc 2.1. tab. norādītajiem vielu daudzumiem. 10 mL mērkolbā iesver nepieciešamo standartvielas daudzumu, izšķīdina dejonizētā ūdenī un atšķaida līdz atzīmei. Šķīdums derīgs 6 mēnešus, glabājot +4 °C temperatūrā. Aprēķinot nepieciešamo iesvaru vērtības, ņem vērā gan standartvielu tīrības pakāpi, gan veidu, kādā savienojums atrodams standartvielā.

Standartvielu iesvari, lai pagatavotu šķīdumus ar koncentrāciju 1000 ng/μL uz 10 mL ūdens

Standartviela	Savienojums	Vielas tīrība, %	Iesvars, mg
Spektinomicīna dihidrohlorīda sulfāts	Spektinomicīns	98,0	13,00
Neomicīna sulfāts	Neomicīns	90,0	16,43
Gentamicīna-2,5-sulfāta hidrāts	Gentamicīns	96,5	11,23
Streptomicīna sulfāts	Streptomicīns	98,0	12,79
Kanamicīna sulfāts	Kanamicīns	99,0	12,15
Dihidrostreptomicīna seskvisulfāts	Dihidrostreptomicīns	98,0	12,78

Standartvielas iesvaru, kas ir nepieciešams, lai pagatavotu 10 mL standartšķīduma ar koncentrāciju 1000 ng/μL, aprēķina pēc šādas formulas:

$$m_{\text{vielas}}(\text{mg}) = \frac{C_{\text{st}} \left(1000 \frac{\text{ng}}{\mu\text{L}} \right) \cdot 10 \text{ mL} \cdot 100 \%}{1000 \cdot \text{vielas tīrība, \%}} \times \frac{M_{\text{Savienojums}}}{M_{\text{Standartviela}}}$$

Pamatšķīdumus ar koncentrāciju 100 ng/μL pagatavo šādi: 10 mL mērkolbā pievieno 1 mL pamatšķīduma (1000 ng/μL), atšķaida ar dejonizētu ūdeni līdz atzīmei un vienmērīgi sajauc.

2.4.2. Darba standartšķīdumu pagatavošana

Darba standartšķīdumus pagatavo, vadoties pēc 2.2. tab. norādītajām pamatšķīdumu tilpumu vērtībām. Darba šķīduma pagatavošanā pievieno konkrētu tilpumu individuālo standartvielu pamatšķīduma (100 ng/μL) un atšķaida 10 mL mērkolbā ar dejonizētu ūdeni. Darba šķīdums derīgs 2 nedēļas, glabājot +4 ° C temperatūrā.

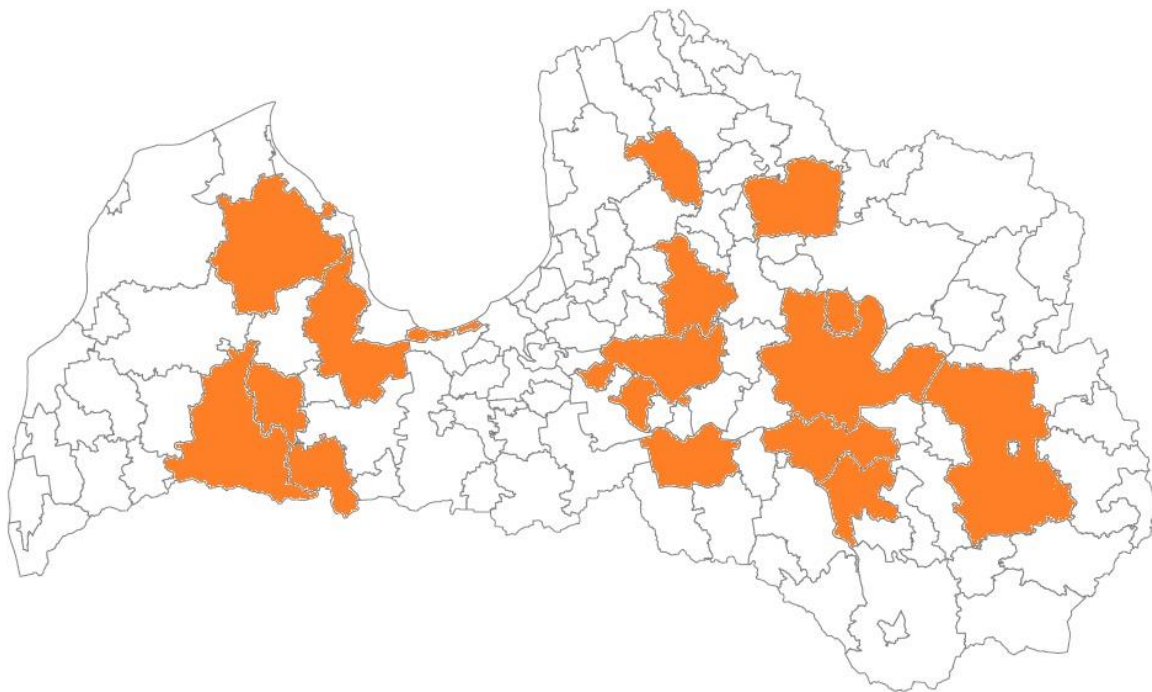
Darba standartšķīdumu pagatavošanai nepieciešamais pamatšķīduma tilpums

Savienojums	Medus analīzes izšķiršanas robeža CCα, μg/kg	Pamatšķīduma tilpums, μL
Dihidrostreptomicīns	12,9	129,5
Gentamicīns	11,9	119,4
Kanamicīns	16,4	164,2
Neomicīns	29,7	296,7
Spektinomicīns	14,0	139,8
Streptomicīns	13,4	134,0

2.5. Analizējamo paraugu izvēle

Darbā tika analizēti 30 medus paraugi, no kuriem 10 paraugi bija importa medus – ES un ārpus ES medus maisījums, un 20 paraugi bija Latvijā ražotais medus. Visi medus paraugi bija dažādu ziedu medus, izņemot vienu importa –, kas bija akāciju medus. Importa medus paraugi tika iegādāti lielākajos tirdzniecības tīklos Latvijā, bet vietējie medus paraugi galvenokārt – tirgos vai no biškopjiem. Medus paraugu vākšanas laiks bija no 2017. gada janvāra līdz aprīlim, kad tirgū galvenokārt bija pieejams pagājušajā vasarā ievāktais ziedu medus.

2.1. att. redzams no kuriem Latvijas novadiem medus paraugi tika savākti. Kopā tie bija 16 novadi, kur no Rēzeknes novada bija 3 dažādi medus paraugi, un diviem veikalā pirktajiem medus paraugiem nebija precīzi norādīta iegūšanas vieta, tāpēc šie medus paraugi nav atspoguļoti kartē.



2.1. att. Analizēto medus paraugu sadalījums pa novadiem

Papildus Latvijā iegūtajiem medus paraugiem, tika analizēti 49 medus paraugi, kas iegūti no dažādiem reģioniem Gruzijā 2016. gada vasaras periodā. Šifrētā veidā paraugi tika piešķirti metodes aprobācijai ar Pārtikas drošības, dzīvnieku veselības un vides zinātniskā institūta “BIOR” atļauju.

2.6. Paraugu sagatavošanas procedūra

50 mL polipropilēna stobriņā iesver 5 g homogenizēta medus parauga. Pievieno 20 mL ekstrakcijas šķīduma, 15 minūtes maisa ar mehānisko kratītāju un 10 minūtes centrifugē pie 3500 apgr./min. Ekstraktu dekantē jaunā polipropilēna stobriņā un neitralizē ar 1 M nātrija hidroksīda šķīdumu līdz pH sasniedz vērtību robežās no 4 līdz 5. Neitralizēto ekstraktu attīra, izmantojot cietfāzu ekstrakcijas kolonnas (*Strata-X PRP* 200 mg/3 mL):

- kolonnas kondicionē ar 3 mL metanola un pēc tam ar 3 mL dejonizēta ūdens;
- uznes ekstraktu;
- kolonnas skalo ar 6 mL dejonizēta ūdens un 15 minūtes žāvē pazeminātā spiedienā;
- eluē ar 2,5 mL 5 % skudrskābes šķīduma ūdenī (95:5, v/v).

Attīrītajam ekstraktam pievieno 25 µL 1 M amonija formiāta ūdens šķīduma, 10 sekundes maisa uz orbitālā maisītāja un 250 µL alikvotu no gala ekstrakta pārnes autosamplera stikla pudelītē, filtrē, izmantojot centrifugu filtrus ar poru izmēru 0,22 µm.

2.7. AEŠH-NL-MS/ddMS² analīze

Atliekvielu noteikšanai tika izmantots augsti efektīvais šķidrums hromatogrāfs, kas savienots ar nolidojuma laika masspektrometru (AEŠH – *UltiMate 3000*, *Thermo Scientific*; nolidojuma laika masspektrometrs – *Compact qTOF*, *Bruker*).

2.7.1. AEŠH parametri

- Kolonna – *Obelisc R* 2,0 x 150 mm, daļiņu izmērs 5 µm vai analoga
- Injekcijas tilpums – 10 µL
- Kolonnas temperatūra – 30° C
- Temperatūra paraugu nodalījumā – 10° C
- Plūsmas ātrums – 0,5 mL/min

2.3. tab. dots gradienta režīms pēc AEŠH instrumentālās programmas.

2.3. tabula

AEŠH gradienta programma

Laiks, min	“A”	“B”	“C”
0	3	90	7
0,5	3	90	7
2,5	80	20	0
5	100	0	0
8	100	0	0
8,1	3	90	7
12,5	3	90	7

2.6.2. Masspektrometra parametri

- Avots – termālās elektroizsmidzināšanas interfeiss (*IonBooster™, Bruker*)
- Spriegums uz kapilāra – 1000 V
- Desolvatācijas temperatūra – 400° C
- Izvaicētāja gāzes plūsmas ātrums – 4 L/h
- Izvaicētāja temperatūra – 200° C
- Produkta jonu skenēšanas diapazons – no 50 līdz 900 m/z.

2.4. tab. apkopoti analizējamo aminoglikozīdu instrumentālie raksturlielumi.

2.4. tabula

Analizējamo savienojumu instrumentālie raksturlielumi

Savienojums	Formula	L ¹ , min	[M+H] ⁺ , m/z	Izolācijas platums, ±m/z	E ² , eV	MS/MS fragmenti, m/z		Q ₂ /Q ₁ ³
Spektinomicīns	C ₁₄ H ₂₆ N ₂ O ₈	4,60	351,1762	1,50	35	333,16	207,13	0,49
Streptomicīns	C ₂₁ H ₃₉ N ₇ O ₁₂	4,80	582,2729	0,75	45	263,14	246,12	0,45
Dihidrostrepto-Micīns	C ₂₁ H ₄₁ N ₇ O ₁₂	4,80	584,2886	0,75	45	263,15	246,12	0,27
Kanamicīns	C ₁₈ H ₃₆ N ₄ O ₁₁	5,10	485,2453	1,50	20	163,11	205,12	0,37
Gentamicīns C1	C ₂₁ H ₄₃ N ₅ O ₇	5,80	478,3235	1,50	30	157,13	322,20	0,23
Neomicīns	C ₂₃ H ₄₆ N ₆ O ₁₃	6,00	615,3196	1,50	30	161,09	293,13	0,17

¹Izdalīšanās laiks

²Sadursmju enerģija

³Attiecība starp iegūtajiem fragmentācijas joniem

3. REZULTĀTI UN TO IZVĒRTĒJUMS

3.1. Metodes validācija

Lai izvērtētu metodes analītiskos parametrus un veiktu tālāku paraugu analīzi, tika veikta metodes validācija piecos koncentrāciju līmeņos divu dienu periodā, katram koncentrāciju līmenim saturot četrus atkārtojumus. Paraugi tika sagatavoti pēc iepriekš aprakstītās procedūras, pievienojot noteiktu standartpiedevas daudzumu tīram medus paraugam. Validācijas ietvaros kopā tika analizēti 40 paraugi ar standartpiedevu.

Saskaņā ar Eiropas Komisijas lēmumu 2002/657/EC validācijas ietvaros tika novērtēti sekojoši analītiskās metodes veiktspējas parametri: selektivitāte, relatīvā standartnovirze, atgūstamība, linearitāte, izšķiršanas robeža ($CC\alpha$) un noteikšanas spēja ($CC\beta$). Validācijas apkopojums attēlots 3.1. un 3.2. tabulās.

3.1. tabula

Validācijā noteikto atgūstamību un relatīvo standartnoviržu vērtību apkopojums

Savienojums	Koncentrāciju līmenis, $\mu\text{g}/\text{kg}$	Pirmā diena (n=4)		Otrā diena (n=4)		Starpdienu salīdzinājums	
		RSN ¹ , %	A ² , %	RSN, %	A, %	RSN, %	A, %
Dihidro-streptomicīns	10	5,4	115,6	4,6	93,7	5,0	104,7
	25	6,3	94,8	4,8	93,1	5,6	93,9
	50	5,3	94,3	2,2	99,8	3,8	97,1
	100	5,5	92,7	2,7	99,6	4,1	96,1
	250	4,2	95,7	4,2	103,1	4,2	99,4
Gentamicīns	10	6,0	119,1	3,7	91,2	4,8	105,1
	25	5,9	95,5	5,6	90,6	5,7	93,0
	50	5,6	88,2	5,5	93,0	5,5	90,6
	100	7,0	85,1	1,5	90,9	4,3	88,0
	250	4,8	96,0	2,6	97,6	3,7	96,8
Kanamicīns	10	9,4	115,7	5,1	126,1	7,3	120,9
	25	9,5	112,8	3,8	110,4	6,7	111,6
	50	3,3	92,9	0,9	97,5	2,1	95,2
	100	1,7	80,9	6,2	100,2	3,9	90,6
	250	7,8	96,2	3,9	100,2	5,9	98,2
Neomicīns	25	6,4	96,3	3,2	108,1	4,8	102,2
	50	6,3	91,4	3,9	102,1	5,1	96,8
	100	6,7	92,1	2,1	91,8	4,4	92,0
	250	2,8	94,2	5,0	89,9	3,9	92,1
	500	3,4	112,5	1,8	99,4	2,6	105,9

3.1. tabulas turpinājums

Savienojums	Koncentrāciju līmenis, µg/kg	Pirmā diena (n=4)		Otrā diena (n=4)		Starpdienu (n=8)	
		RSN ¹ , %	A ² , %	RSN, %	A, %	RSN, %	A, %
Spektinomicīns	10	5,0	105,8	3,8	96,6	4,4	101,2
	25	4,0	100,1	6,0	106,6	5,0	103,4
	50	5,3	95,4	5,1	104,4	5,2	99,9
	100	1,5	98,4	3,4	106,3	2,4	102,4
	250	1,4	92,7	2,0	102,6	1,7	97,6
Streptomicīns	10	3,8	107,2	10,8	91,2	7,3	99,2
	25	8,9	90,0	5,9	89,2	7,4	89,6
	50	7,1	94,9	4,3	98,1	5,7	96,5
	100	5,0	94,1	1,9	100,0	3,4	97,0
	250	3,7	95,7	4,8	102,1	4,2	98,9

¹Relatīvā standartnovirze

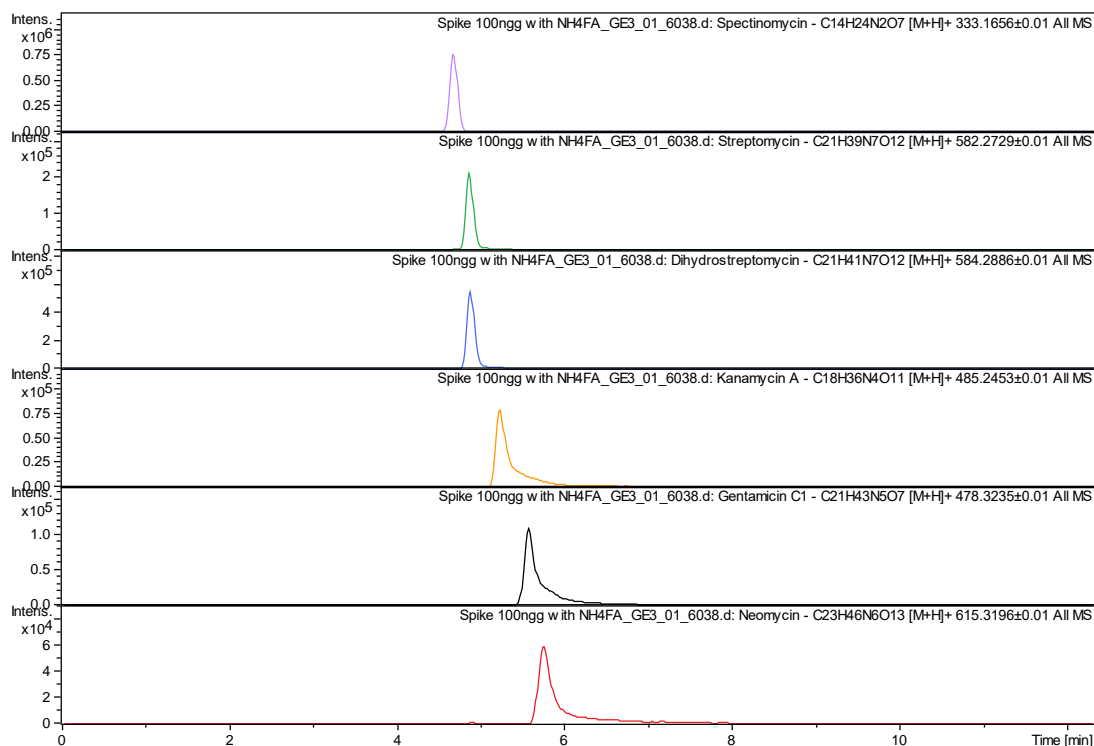
²Atgūstamība

3.2. tabula

Linearitātes, izšķiršanas robežas (CC α) un noteikšanas spējas (CC β) vērtību apkopojums

Savienojums	Linearitāte	Izšķiršanas robeža, µg/kg	Noteikšanas spēja, µg/kg
Dihidrostreptomicīns	0,999	12,9	14,4
Gentamicīns	0,997	11,9	12,4
Kanamicīns	0,996	16,4	20,5
Neomicīns	0,995	29,7	30,0
Spektinomicīns	0,999	14,0	17,0
Streptomicīns	0,999	13,4	15,1

Metodes selektivitāte tika izvērtēta aplūkojot iegūtās AEŠH-NL-MS/ddMS² hromatogrammas visiem analizētajiem savienojumiem. Tracējošas smailes netika konstatētas analizējamo savienojumu izdalīšanās laika diapazonā (3.1. att).



3.1. att. AEŠH-NL-MS/ddMS² hromatogramma medus paraugam ar aminoglikozīdu standartpiedevu (100 µg/kg)

3.2. Aminoglikozīdu klases antibiotiku atliekvielu klātbūtne medus paraugos

Metodes aprobācijas nolūkos tika analizēti 49 Gruzijas medus paraugi. Trīs paraugos tika konstatēta streptomicīna atliekvielu klātbūtne (117 ng/g; 35 ng/g; 14 ng/g), savukārt vienā paraugā tika konstatēts gentamicīns C1 (32 ng/g). Iegūtie rezultāti ir saskaņā ar literatūras apskatā minēto secinājumu, ka tieši streptomicīna un gentamicīna atliekvielu klātbūtne medū ir pati izplatītākā. Ņemot vērā, ka analizētie Gruzijas medus paraugi nebija paredzēti eksportam uz ES, padziļināts rezultātu novērtējums netika veikts.

Lai izvērtētu Latvijas patērētājiem pieejamā medus kvalitāti attiecībā uz aminoglikozīdu klases antibiotiku atliekvielu klātbūtni, tika analizēt 30 dažādas izcelsmes medus paraugi. Nevienā no paraugiem atliekvielu klātbūtne netika konstatēta.

Lai arī iegūtais rezultāts ir negatīvs - tas noteikti neizslēdz to, ka patērētājiem Latvijā pieejamais medus nesatur aminoglikozīdu atliekvielas. Iegūtie medus paraugi bija no dažādiem Latvijas novadiem, lai iegūtie dati būtu reprezentatīvi, bet tādā gadījumā paraugu skaitam vajadzēja būt lielākam. Kā labu piemēru analogam pētījumam var minēt Beļģijas zinātnieku veikto monitoringu, kurā tika noteiktas antibiotiku atliekvielas Beļģijā

sastopamajā medū. Streptomicīns tika konstatēts 4 no 248 (1,4 %) Beļģijā ražotajiem medus paraugiem un 51 no 108 (47,2 %) importētā medus paraugiem [41]. Šajā pētījumā tika izvēlēts daudz lielāks analizēto paraugu skaits un rezultāti uzrādīja pavisam nelielu vietējās izcelsmes paraugu piesārņojumu. Maģistra darbā tika analizēti 20 vietējās izcelsmes paraugi no visas valsts, kas, acīmredzot, nav bijis statistiski pietiekams paraugu daudzums, lai veiktu objektīvu riska novērtējumu. Lielāka varbūtība konstatēt aminoglikozīdu atliekvielas būtu, ja analizētu paraugus, kas iegūti tikai vienā vēsturiskajā novadā, piemēram, Zemgalē, kur vairākkārtīgi konstatēta bakteriālā iedega. Koncentrējoties uz vienu reģionu, iegūtie dati varētu būt vairāk saistīti ar apkārtējo vidi – fermu, augļkopības dārzu utt. – kā potenciālo atliekvielu avotu. Šajā darbā analizētie medus paraugi nesniedz tik pilnīgu informāciju par medus izcelsmi. Tāpat jāņem vērā Latvijas klimatiskie apstākļi, kas, salīdzinājumā ar ES rietumos un dienvidos esošajām valstīm, samazina riskus augļkokiem un bitēm inficēties ar patogēniem, tādējādi arī samazinot nepieciešamību pēc antibiotikām un to potenciālo klātbūtni medū.

ES pārtikas drošības regulējumi ir vieni no stingrākajiem pasaulē un regulāri tiek papildināti balstoties uz jaunākajiem pētījumiem, savukārt valstīm, kuras savu produkciju vēlas importēt ES, ir jānodrošina atbilstoša kvalitāte, kas ir saskaņā ar ES likumdošanu. Antibiotiku atliekvielu klātbūtne importētajā medū pēdējo gadu laikā ir samazinājusies (balstoties uz datiem, kas pieejami RASFF datubāzē), kas lielākoties skaidrojams ar augstajām kvalitātes prasībām ES un pakāpeniskiem uzlabojumiem citu valstu pārtikas drošības nozarē. Pārlicību par to sniedz arī tas, ka nevienā no 10 importētajiem medus paraugiem netika konstatētas aminoglikozīdu atliekvielas, tomēr balstoties uz rezultātiem, kas iegūti analizējot Gruzijas medus paraugus var secināt, ka vēl joprojām riski pastāv un šāda veida pētījumi ir jāveic, lai būtu iespējams nodrošināt augstus kvalitātes standartus.

Ņemot vērā iepriekš minēto, var secināt, ka Latvijas patērētājiem risks iegādāties medu, kas satur aminoglikozīdu klases atliekvielas, ir zems.

SECINĀJUMI

1. AEŠH-NL-MS/ddMS² ir piemērota metodoloģija aminoglikozīdu klases antibiotiku noteikšanai medū un iegūtie metodes validācijas raksturlielumi atbilst Eiropas Komisijas lēmuma 2002/657/EC prasībām.
2. Patērētājiem Latvijā, lietojot uzturā medū, risks uzņemt aminoglikozīdu atliekvielas ir zems un aminoglikozīdu klases antibiotiku lietošana bišu bakteriālu slimību apkarošanā ir reti izplatīta.
3. Iegūtie Gruzijas medus paraugu rezultāti norāda uz vēl joprojām pastāvošajiem riskiem lietojot uzturā ārpus ES izcelsmes medu.

IZMANTOTĀ LITERATŪRA

4. World Health Organization. Antimicrobial resistance: global report on surveillance 2014. Pieejams: <http://www.who.int/drugresistance/documents/surveillancereport/en/> [skatīts: 07.05.2017.]
5. Latvijas Republikas Ministru kabinets *Kvalitātes, klasifikācijas un papildu marķējuma prasības medum*. Apstiprināts ar LR MK rīkojumu Nr. 251 2016. gada 26. maijā. Pieejams: <http://likumi.lv/ta/id/274304-kvalitates-klasifikācijas-un-papildu-markejuma-prasibas-medum> [skatīts: 14.01.2017.]
6. Bogdanon, S.; Jurendic, T.; Sieber, R.; Gallmann, P. A. Review: Honey for Nutrition and Health. *J Am Coll Nutr.* **2008**, *27*, 678–689.
7. Vincēviča-Gaile, Z. Makro- un mikroelementu saturs medū. **2010**, *Latvijas Lauksaimniecības Universitātes Raksti*, 56–66.
8. USDA National Nutrient Database, Agricultural Research Service, atjaunota 2015. gada oktobrī. Full Report (All Nutrients): 19296, Honey".
9. Arcot, J.; Brand-Miller, J. A Preliminary Assessment of the Glycemic Index of Honey. A report for the Rural Industries Research and Development Corporation. 2005.
10. Gheldof, N.; Wang, X. H.; Engeseth, N. J. Identification and quantification of antioxidant components of honeys from various floral sources. *J Agric Food Chem.*, **2002**, *50*, 5870–5877.
11. Schramm, D. D; Karim, M.; Schrader, H. R.; Holt, R. R.; Cardetti, M.; Keen, C. L. Honey with High Levels of Antioxidants Can Provide Protection to Healthy Human Subjects. *J Agric Food Chem.* **2003**, *51*, 1732–1735.
12. Sanz, M. L.; Polemis, N.; Morales, V.; Corzo, N.; Drakoularakou, A.; Gibson, G. R.; Rastall, R. A. In vitro investigation into the potential prebiotic activity of honey oligosaccharides. *J Agric Food Chem.* **2005**, *53*, 2914–2921.
13. Shamala, T. R.; Shri Iyothy, Y.; Saibaba, P. Stimulatory effect of honey on multiplication of lactic acid bacteria under in vitro and in vivo conditions. *Lett. Appl. Microbiol.* **2000**, *30*, 453–455.
14. Sobel, J. Botulism. *Clin Infect Dis.* **2005**, *41* 1167–1173.

15. Grigoryan, K.; Prakash, V.; Martin-Belloso, O.; Keener, L.; Astley, S. B.; Braun, S.; McMahon, H.; Lelieveld, H. Safety of Honey. Regulating Safety of Traditional and Ethnic Foods. Elsevier Science, **2015**.
16. Centre for the Promotion of Imports from developing countries. What is the demand for honey in Europe? **2016** Pieejams: <https://www.cbi.eu/market-information/honey-sweeteners/trade-statistics/> [skatīts: 02.05.2017]
17. Latvijas biškopības programma 2017.–2019. gadam. Pieejams: https://www.zm.gov.lv/public/files/CMS_Static_Page_Doc/00/00/00/84/38/LV_Biskopibas_programma_2017_2019_gadam_ISAMM.pdf [skatīts: 14.01.2017.]
18. Latvijas biškopības biedrība. Varrozes invāzijas ierobežošana dravā. Pieejams: <http://www.strops.lv/attachments/article/66/varroze.pdf> [skatīts: 24.04.2017.]
19. Wilmart, O.; Legreve, A. Residues in Beeswax: A Health risk for the Consumers of Honey and Beeswax? *J. Agric. Food Chem.*, **2016**, *64*, 8425–8434.
20. Martel, A. C.; Zeggane, S.; Auries, C.; et al. Acaricide residues in honey and wax after treatment of honey bee colonies with Apivar or Asunto150, *Apidologie*, 2007, *38*, 534–544.
21. Moreno-Gonzalez, D.; Lara, F. J.; Jurgovksa, N.; Gamiz-Gracia, L.; Garcia-Kapana A. M. Determination of aminoglycosides in honey by capillary electrophoresis tandem mass spectrometry and extraction with molecularly imprinted polymers. *Anal Chim Acta*. **2015**, *891*, 321–328.
22. Al-Waili, N.; Salom, K.; Al-Ghamdi, A.; Ansari M. J. Antibiotic, Pesticide, and Microbial Contaminants of Honey: Human Health Hazards. *Sci World J*. **2012**.
23. Rúbies, A.; Companyó, R.; Centrich, F. Determination of aminoglycoside residues in kidney and honey samples by hydrophilic interaction chromatography- tandem mass spectrometry. *J Sep Sci*. **2012**, *35*, 2710–2717.
24. Mutinelli, F. Practical application of antibacterial drugs for the control of honey bee diseases. *Apiacta*, **2003**, *38*, 149–155.
25. Reybrock, W.; Daeseleire, E.; De Brabander, H. F.; Herman, L. Antimicrobials in beekiping. *J Ved Med*. **2012**, *158*, 1–12.
26. Stockwell, V. O.; Duffy, B. Use of antibiotics in plant agriculture. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.* **2012**, *31*, 199–210.

27. Tao, Y.; Chen, D.; Yu, H.; Huang, L.; Liu, Z. Cao, X. Yan, C.; Pan, Y. Liu, Z.,; Yuan Z. Simultaneous determination of 15 aminoglycoside(s) residues in animal derived foods by automated solid-phase extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Food Chem.* **2012**, *135*, 676–683.
28. Schlecht, H. P.; Bruno, C. Aminoglycosides, *The Merck Manual* **2015** Pieejams: <http://www.merckmanuals.com/professional/infectious-diseases/bacteria-and-antibacterial-drugs/aminoglycosides?qt=&sc=&alt=> [skatīts 29.04.2017].
29. McGlinchey, T. A.; Rafter, P. A.; Regan, F.; McMahon, GP. A review of analytical methods for the determination of aminoglycoside and macrolide residues in food matrices. *Anal Chim Acta.* **2008**, *624*, 1–15.
30. Hermann T. Aminoglycoside antibiotics: old drugs and new therapeutic approaches. *Cell Mol Life Sci.* **2007**, *64*, 1841–1852.
31. Farouk, F.; Azzazy, H. M.; Niessen, W. M. Challenges in the determination of aminoglycoside antibiotics, a review. *Anal Chim Acta.*, **2015**, *890*, 21–43.
32. Liu, Q.; Li, J.; Song, X.; Zhang, M.; Li, E.; Gaob, F.; He, L. Simultaneous determination of aminoglycoside antibiotics in feeds using high performance liquid chromatography with evaporative light scattering detection. *RSC Adv.*, **2017**, *3*, 1251–1259.
33. Boothe, D. M. Aminoglycosides Pieejams: <http://www.merckvetmanual.com/pharmacology/antibacterial-agents/aminoglycosides> [skatīts: 19.01.2017]
34. Eiropas iniciatīva veselības jomā. Pieejams: <http://ecdc.europa.eu/lv/eaad/antibiotics-get-informed/factsheets/pages/general-public.aspx#sthash.koFv96vw.dpuf> [skatīts: 20.01.2017.]
35. Antimicrobial Resistance. Antibiotics in the EU – Use and Perceptions. Pieejams: http://ec.europa.eu/dgs/health_food-safety/amr/docs/eb445_amr_generalfactsheet_en.pdf [skatīts: 05.05.2017.]
36. World Health Organization. Antimicrobial resistance. Atjaunots 2016. gadā. Pieejams: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs194/en/> [skatīts 7.05.2017.]
37. EFSA kopsavilkums par antibiotiku rezistenci baktērijām, kas izdalītas no cilvēkiem, dzīvniekiem un pārtiku 2012. gadā. Pieejams: <http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/antimicrobial->

[resistance-in-zoonotic-and-indicator-bacteria-summary-report-2012.pdf](#) [skatīts: 21.01.2017.]

38. Yi-Fang, T., Methodology Studies on Detection of Aminoglycoside Residues. *Food Anal Method*, **2015**, 8, 1842–1857.
39. Rodrigo Granjaa, H. M. M.; Alfredo Montes Nino, M.; Roberto Zucchetti, A.M.; Rosario Montes Nino, E.; Raj Patel; Alessandro Salerno, G. Determination of streptomycin residues in honey by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Anal Chim Acta*. **2009**, 637, 64–67.
40. Díez, C.; Guillarme, D.; Staub Spörri, A.; Cognard, E.; Ortelli, D., Edder, P.; Rudaz, S. Aminoglycoside analysis in food of animal origin with a zwitterionic stationary phase and liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Anal Chim Acta*. **2015**, 882, 127–139.
41. Karazafiris, E.; Tananaki, Ch.; Thrasyvoulou, A. Pesticides in the modern world – risks and benefits. *InTech*, **2011**, 90–101.
42. Gaudin, V.; De Courville, A.; Hedou, C. Evaluation and validation of two microbiological tests for screening antibiotic residues in honey according to the European guideline for the validation of screening methods. *Food Add Contam*. **2013**, 30, 234–243.

APLIECINĀJUMS

Maģistra darbs “Aminoglikozīdu klases antibiotiku sastopamība Latvijā pieejamajā medū” izstrādāts Pārtikas drošības, dzīvnieku veselības un vides zinātniskajā institūtā “BIOR” Šķidrums hromatogrāfijas nodaļā.

Ar savu parakstu apliecinu, ka pētījums veikts patstāvīgi, izmantoti tikai tajā norādītie informācijas avoti un iesniegtā darba elektroniskā kopija atbilst izdrukai.

Autors: Agnese Kapace _____
(paraksts) (datums)

Rekomendēju darbu aizstāvēšanai

Vadītāji:

Dr. ķīm., asoc. prof. Vadims Bartkevičs _____
(paraksts) (datums)

Mg., ķīm., doktorants Ingus Pērkons _____
(paraksts) (datums)

Recenzents: _____ Dr. ķīm., asoc. Prof. Ida Jākobsone
(paraksts)

Darbs iesniegts Bioloģijas fakultātē _____
(datums)

Metodiķe: Diāna Marcinkēviča

Darbs aizstāvēts maģistra gala pārbaudījuma komisijas sēdē
_____ prot. Nr. _____, vērtējums _____
(datums)

Komisijas sekretārs/e: _____