

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ**



ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΕΠΙΠΕΔΩΝ ΣΟΥΛΦΟΝΑΜΙΔΩΝ ΚΑΙ
ΑΜΙΝΟΓΛΥΚΟΣΙΔΩΝ ΣΕ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΝΩΠΟΥ ΚΡΕΑΤΟΣ**

Μαρία Αυγενάκη

Υπεύθυνος Καθηγητής: Αθανάσιος Κουτσολέλος

Επιβλέπων Καθηγητής: Αριστείδης Τσατσάκης

ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2020

**UNIVERSITY OF CRETE
DEPARTMENT OF CHEMISTRY**



Undergraduate Thesis

**DETERMINATION OF SULFONAMIDES AND
AMINOGLYCOSIDES LEVELS IN RAW MEAT
SAMPLES**

Maria Avgenaki

**Professor in charge: Athanasios Coutsolelos
Supervisor: Aristidis Tsatsakis**

HERAKLION 2020

Ευχαριστίες

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω, τον Καθηγητή κ. Αθανάσιο Κουτσολέλο, που μου έδωσε την ευκαιρία να διεκπεραιώσω τη διπλωματική μου εργασία, σχετικά με τον προσδιορισμό αντιβιοτικών ουσιών σε δείγματα ναπού κρέατος.

Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Καθηγητή κ. Αριστείδη Τσατσάκη, Διευθυντή του Εργαστηρίου Τοξικολογίας και Εγκληματολογικής Χημείας για την παραχώρηση των χώρων του εργαστηρίου του για την διεξαγωγή των πειραμάτων μου.

Πάνω από όλα, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Εμμανουήλ Τζατζαράκη για τις πολύτιμες συμβουλές και την υπομονή του, καθώς και τα λοιπά μέλη του εργαστηρίου για την βοήθεια, την άριστη συνεργασία και τη συμπαράσταση καθ' όλη τη διάρκεια της διπλωματικής εργασίας.

Τέλος, θέλω να ευχαριστήσω την οικογένεια και τους φίλους μου για την υποστήριξη τους.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα αντιβιοτικά αποτελούν αναπόσπαστο κομμάτι της συστηματικής εκτροφής των παραγωγικών ζώων, καθώς χορηγούνται για τον έλεγχο των λοιμώξεων, της αναπαραγωγικής διαδικασίας και των παρασιτώσεων. Ωστόσο, η αλόγιστη χρήση των αντιβιοτικών έχει ως αποτέλεσμα την παραμονή καταλοίπων αυτών των ουσιών στου ιστούς των ζώων και μεταφορά αυτών στα τρόφιμα ζωικής προέλευσης (γάλα, αυγά, κρέας).

Με στόχο την μελέτη αυτού του φαινομένου στην παρούσα εργασία μελετήθηκαν 54 δείγματα νωπού κρέατος, ώστε να προσδιοριστούν οι συγκεντρώσεις των σουλφοναμίδων (σουλφαμεθοξαζόλης, σουλφαδιαζίνη) και των αμινογλυκοσίδων (στρεπτομυκίνη), οι οποίες αποτελούν βασικές κατηγορίες αντιβιοτικών. Τα ειδή κρέατος που επιλέχθηκαν για να μελετηθούν ήταν τα βοοειδή, τα χοιρινά και τα κοτόπουλα, ενώ οι ιστοί ήταν οι μύες, το ήπαρ και τα νεφρά. Οι τεχνικές που θεωρήθηκαν κατάλληλες για την ανάλυση αυτών των χημικών ενώσεων ήταν το ELISA και η υγρή χρωματογραφία συζευγμένη με φασματοόμετρο μάζας (LC – MS).

Μέσω της τεχνικής ELISA βρέθηκε ότι όλα τα δείγματα κρέατος ήταν θετικά ως προς τις σουλφοναμίδες και τα ποσοστά ήταν αρκετά υψηλά (>80%). Αντιθέτως, η στρεπτομυκίνη δεν ανιχνεύθηκε σε όλα τα δείγματα (ανιχνεύθηκε στα νεφρά χοιρινού, στα νεφρά κοτόπουλου και στους μύες και στο ήπαρ βοοειδούς) και τα ποσοστά ήταν αρκετά μικρότερα (17 – 50 %). Παρόλα αυτά παρατηρείται ότι ο μέσος όρος της συγκέντρωσης ήταν μεγαλύτερος για την στρεπτομυκίνη με εύρος 53,44 – 188,88 μg/kg, ενώ για τις σουλφοναμίδες ο μέσος όρος συγκέντρωσης κυμαινόταν σε μικρότερα πλαίσια από 4,82 έως 47,22 μg/kg.

Η μέθοδος LC–MS χρησιμοποιήθηκε για την διερεύνηση των ουσιών σουλφαμεθοξαζόλη και σουλφαδιαζίνη. Παρατηρήθηκε ότι κανένα δείγμα δεν ήταν θετικό στην σουλφαδιαζίνη, ενώ υπήρχαν θετικά δείγματα στην σουλφαμεθοξαζόλη με εξαίρεση το ήπαρ βοδινού και το νεφρό κοτόπουλου. Τα ποσοστά θετικότητας της σουλφαμεθοξαζόλης ήταν 22 – 89 %, ενώ ο μέσος όρος κυμαινόταν από 4,49 – 22,42 μg/kg (εύρος 33,96 – 66,95 μg/kg).

Η σύγκριση των αποτελεσμάτων μας με τη βιβλιογραφία σχετικά με το βοδινό κρέας έδειξε ότι δεν υπήρχε συμφωνία καθώς τα ποσοστά θετικότητας της στρεπτομυκίνης των δειγμάτων μας ήταν υψηλότερα. Αντιθέτως, όταν συγκρίναμε τα αποτελέσματα των χοιρινών με

την αντίστοιχη βιβλιογραφία παρατηρήσαμε παρόμοια τάση στις συγκεντρώσεις με εξαίρεση τα δείγματα χοιρινού μυ στα οποία τα επίπεδα συγκεντρώσεων σουλφοναμιδών που ανιχνεύσαμε ήταν αρκετά υψηλότερα.

Η παρούσα έρευνα επισήμανε την ύπαρξη αντιβιοτικών σε νωπό κρέας. Είναι λοιπόν σημαντικό να μελετηθεί εάν αυτές οι ουσίες καταλήγουν μέσω της τροφικής αλυσίδας στον καταναλωτή.

ABSTRACT

Antibiotics are an integral part of systemic farming of productive animals, while they are administered in order to control infections, reproductive process and parasites. However, irrational use of antibiotics results in maintaining residues of these substances in animals' tissues while transferring them in dairy products (milk, eggs, meat).

Aiming to the investigation of this phenomenon, in the current study, 54 samples of raw meat were examined in order to determine the concentration levels of sulfonamides (sulfamethoxazole, sulfadiazine) and aminoglycosides which are two of the main antibiotics categories. Beef, pork and chicken were the types of meat that were examined while the tissues were the muscles, the liver and the kidneys. The analytical methods that were considered most appropriate were the ELISA and liquid chromatography – mass spectrometry (LC – MS).

The results obtained by ELISA technique showed that all meat samples were positive for sulfonamides with high percentages of positivity (>80%). On the contrary, streptomycin had not been detected in all of the samples (only in pork and chicken kidneys and beef muscles and liver) and the corresponding positivity percentages were much lower (17 – 50 %). Nevertheless, the mean concentration was higher ranging from 53.44 to 188.88 µg/kg, while for sulfonamides the mean concentration ranged from 4.82 to 47.22 µg/kg.

LC – MS method was used for the identification of sulfamethoxazole and sulfadiazine. It was observed that no sample was positive for sulfadiazine while all samples were positive for sulfamethoxazole except for beef liver and chicken kidney. Positivity percentages for sulfamethoxazole was 22 – 89 % and the mean concentration levels were 4.49 – 22.42 µg/kg (range 33.96 – 66.95 µg/kg).

Comparing our results with these from previous studies showed that there was no accordance concerning beef meat samples as our positivity percentages for streptomycin were higher. On the contrary, our results for pork samples were in agreement with those of previous studies presenting similar concentration levels except for pork muscles for which the sulfonamides levels in our study were much higher.

The current survey highlighted the presence of antibiotics in raw meat. It is of high importance to study the possibility of these substances to result through the food chain in consumers' food stuff.

Περιεχόμενα

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	4
ABSTRACT.....	6
ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ	9
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1	11
<i>Εισαγωγή</i>	11
1.1 Αντιβιοτικά.....	11
1.2 Σουλφοναμίδες	14
1.3 Αμινογλυκοσίδες	17
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2	22
<i>Μέθοδοι Ανάλυσης</i>	22
2.1 Δοκιμασία Ενζυμο-Συζευγμένης Ανοσοπροσρόφησης (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay-Elisa)	22
2.2. Υγρή Χρωματογραφία (Liquid Chromatography-LC).....	27
2.3 Φασματομετρία Μάζας (Mass Spectrometry-MS)	30
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3	32
<i>Πειραματικό Μέρος</i>	32
3.1 Σχεδιασμός και Υλοποίηση Πειράματος.....	32
3.2. Οργανολογία	35
3.2.1. Δοκιμασία Ενζυμο-Συζευγμένης Ανοσοπροσρόφησης (ELISA)	35
3.2.2 Υγρή Χρωματογραφία Συζευγμένη με Φασματόμετρο Μάζας (Liquid Chromatography-Mass Spectrometry: LC-MS).....	36
3.2.3. Λοιπός Εξοπλισμός.....	36
3.3. Αντιδραστήρια	38
3.4. Πειραματική Διαδικασία.....	39
3.4.1. Πειραματική Διαδικασία ELISA	39
3.4.2. Πειραματική Διαδικασία LC-MS	41
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4	43
<i>Αποτελέσματα</i>	43
4.1. Αποτελέσματα Elisa	43
4.2. Αποτελέσματα LC-MS.....	45
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5	47
<i>Συζήτηση Αποτελεσμάτων</i>	47

Βιβλιογραφία	49
Παράρτημα	51
I. Χρωματογραφήματα	51

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

SMX: Sulfamethoxazole (Σουλφαμεθοξαζόλη)

SDZ: Sulfadiazine (Σουλφαδιαζίνη)

ELISA: Enzyme-linked Immunosorbent Assay (Δοκιμασία Ενζυμο-Συζευγμένης Ανοσοπροσρόφησης)

E.E.: Ευρωπαϊκή Ένωση

IgG: Immunoglobulin G (Ανοσοσφαιρίνη G)

pg: picogram (πικογραμμάρια)

fg: femtogram (φεμτογραμμάρια)

Ab: Antibody (Αντίσωμα)

Ag: Antigen (Αντιγόνο)

Ig: Immunoglobulin (Ανοσοσφαιρίνη)

HRP: Horseradish peroxidase (Υπεροξειδάση)

AP: Alkaline Phosphatase (Αλκαλική Φωσφατάση)

β-Gal: β-galactosidase (β-γαλακτοσιδάση)

OD: Optical Density (Οπτική πυκνότητα)

LC: Liquid Chromatography (Υγρή Χρωματογραφία)

SFC: Supercritical Fluid Chromatography (Χρωματογραφία Υπερκρίσιμου ρευστού)

GC: Gass Chromatography (Αέρια Χρωματογραφία)

MS: Mass Spectrometry (Φασματομετρία Μάζας)

DC: Direct Current (Συνεχές Ρεύμα)

AC: Alternating Current (Εναλλασσόμενο Ρεύμα)

BM: Βοδινός μυς

BH: Βοδινό ήπαρ

XM: Χοιρινός μυς

XH: Χοιρινό ήπαρ

XN: Χοιρινό νεφρό

KM: Μυς κοτόπουλου

KH: Ηπαρ κοτόπουλου

KN:Νεφρό κοτόπουλου

ESI: Electrospray Ιοανιζατιο (Ιοντισμός με Φαινόμενο Ηλεκτροψεκασμού)

Rt: Retention time (Χρόνος κατακράτησης)

SIM: Selecting Ion Monitoring(Επιλεκτική Ανίχνευση Ιόντων)

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

Εισαγωγή

1.1 Αντιβιοτικά

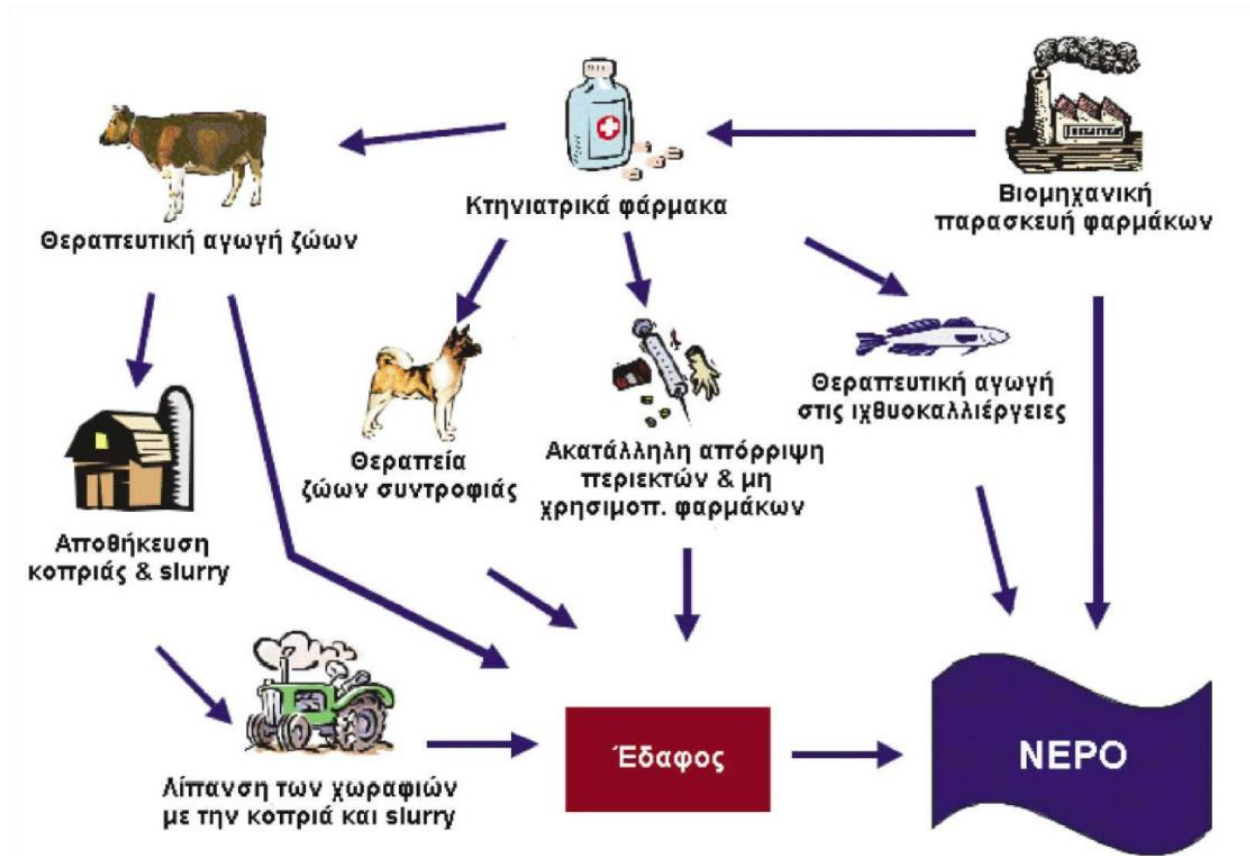
Ο όρος αντιβιοτικό αποδίδεται σε μια ποικιλία χημικών ενώσεων, φυσικών και ημισυνθετικών, οι οποίες έχουν αντιμικροβιακή δράση (Τυγρεπου, 2008).

Το 1928 ο Alexander Fleming ανακάλυψε τυχαία την πενικιλίνη. Ο Fleming δημοσίευσε τότε μια εργασία στην οποία περιέγραφε την ανασταλτική επίδραση που εκδήλωνε η παραγόμενη από τον μύκητα *Penicillium notatum* ουσία στους σταφυλόκοκκους. Η ουσία αυτή ονομάστηκε πενικιλίνη και χρησιμοποιήθηκε αρχικά σαν αντισηπτικό. Μετά από αυτήν την ανακάλυψη εκατοντάδες άλλα αντιβιοτικά άρχισαν να παρασκευάζονται και να κυκλοφορούν στην αγορά για τον έλεγχο των ασθενειών στον άνθρωπο και τα ζώα. Στα ζώα χρησιμοποιούνταν ως αυξητικοί παράγοντες αλλά και ως βελτιωτές της αποδοτικότητας των ζωοτροφών(Τυγρεπου, 2008).

Η πρώτη ουσία, με αντιμικροβιακές ιδιότητες, θεωρείται η κόκκινη χρωστική προντοζίλη, που χρησιμοποιήθηκε για τη βαφή νημάτων. Στις αρχές της δεκαετίας του 1930, ο Domagk διαπίστωσε τα θεραπευτικά αποτελέσματα της ουσίας αυτής όταν χορηγήθηκε σε ζώα με λοίμωξη από αιμολυτικό στρεπτόκοκκο. Η προντοζίλη δεν παρουσίαζε αντιμικροβιακή δράση *in vitro*, κάτι που εξηγήθηκε αργότερα με την διαπίστωση ότι η προντοζίλη στον οργανισμό του ζώου μεταβολίζεται σε σουλφοναμίδη, στην οποία αποδίδεται η αντιμικροβιακή δράση της προντοζίλης. Η σουλφοναμίδη αποτέλεσε την απαρχή σύνθεσης των σουλφοναμίδων (Μουζούρας, 1996).

Τα κτηνιατρικά φάρμακα αποτελούν αναπόσπαστο κομμάτι της συστηματικής εκτροφής των παραγωγικών ζώων και χωρίζονται σε διάφορες κατηγορίες όπως αντιβακτηριακά, αντιμικροβιακά, αναισθητικά, αντισταμινικά, στεροειδή, συμπληρώματα διατροφής και άλλα. Οι τρόποι χορήγησης των φαρμάκων αυτών στα ζώα ποικίλουν: χορηγούνται μέσω της τροφής ή/και του νερού, με ένεση και αλοιφές, ανάλογα με το είδος του ζώου. Η χρήση των κτηνιατρικών φαρμάκων συνιστάται κυρίως για τον έλεγχο και την παρεμπόδιση των λοιμώξεων, για τον έλεγχο της αναπαραγωγικής διαδικασίας και για τον έλεγχο των παρασιτώσεων(Rice DN, 1996). Οι απεκκρίσεις των ζώων (κόπρανα και ούρα)

χρησιμοποιούνται για τη λίπανση των χωραφιών. Έτσι, κατάλοιπα ή μεταβολίτες των χορηγούμενων φαρμάκων απορροφούνται από το έδαφος και φθάνουν στα επιφανειακά νερά έπειτα από την απόπλυση του εδάφους λόγω των έντονων βροχών (Σχήμα 1.1).



Σχήμα 1.1: Η διαδρομή των φαρμακευτικών ουσιών προς το νερό (Alistair B. A. Boxall, Dana W. Kolpin, Bent Halling-Sorensen, 2003).

Στην ιατρική θεραπεία και την κτηνιατρική, ο αριθμός των φαρμάκων που χρησιμοποιείται εκτεταμένα είναι αρκετά μεγάλος. Τα αντιβιοτικά αποτελούν την σημαντικότερη κατηγορία χημικών ουσιών που χρησιμοποιείται, η οποία προκαλεί και σοβαρά περιβαλλοντικά προβλήματα. Πρέπει όμως να επισημανθεί ότι τα αντιβιοτικά είναι εκείνα που απορροφούνται λιγότερο από το πεπτικό σύστημα των ζώων και το μεγαλύτερο μέρος τους απεκκρίνεται αμετάβλητο με τα κόπρανα και τα ούρα. Το γεγονός όμως ότι τα απόβλητα των ζώων χρησιμοποιούνται ευρέως για την λίπανση του εδάφους σε πολλές χώρες του κόσμου, προκαλεί ανησυχία για το αποτέλεσμα της εισόδου των καταλοίπων των αντιβιοτικών στο

περιβάλλον, με ιδιαίτερη έμφαση στο αν η συχνή χρήση τους προκαλεί την αύξηση της μικροβιακής αντιβιοαντοχής (Sarmah, Meyer and Boxall, 2006).

Η ευρεία και αλόγιστη χρήση αντιβιοτικών που χορηγούνται στα ζώα έχει ως αποτέλεσμα την παραμονή καταλοίπων των φαρμακευτικών αυτών ουσιών στους ιστούς του ζώου, με τελικό προορισμό τα τρόφιμα ζωικής προέλευσης, όπως γάλα, αυγά και κρέας. Το αντίκτυπο αυτό στην Δημόσια Υγεία ελλοχεύει κινδύνους καθώς επιφέρει δυσάρεστα αποτελέσματα όπως:

1. Προκαλεί ανάπτυξη ανθεκτικών στα αντιβιοτικά στελεχών μικροβίων
2. Προκαλεί τοξικά φαινόμενα στον άνθρωπο.
3. Προκαλεί αλλεργικές αντιδράσεις στον άνθρωπο
4. Προκαλεί αύξηση κρουσμάτων τοξολοιμώξεων.
5. Ευαισθητοποιεί τον οργανισμό του υγιούς καταναλωτή αυξάνοντας τον κίνδυνο να υποστεί αλλεργική κρίση.
6. Δημιουργία ακατάλληλων τροφίμων υποβαθμίζοντας τις οργανοληπτικές ιδιότητες των ζωικών προϊόντων.

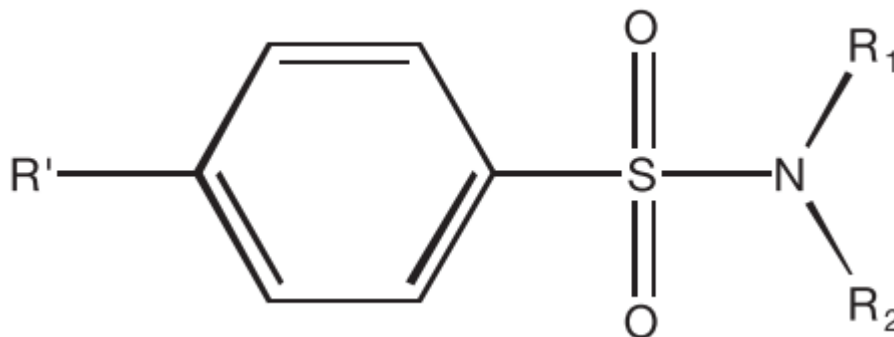
Για τα παραπάνω αποτελέσματα κρίνεται ως μέτρο πρόληψης η λογική χρήση αντιβιοτικών αλλά και η διακοπή της χορήγησής τους στο ζώο για ένα ικανοποιητικό διάστημα πριν την σφαγή του(Κωνσταντίνος Κοτροκόης, 2009).

Οι κύριες ομάδες αντιβιοτικών που χρησιμοποιούνται στην κτηνιατρική θεραπευτική είναι οι σουλφοναμίδες, οι αμινογλυκοσίδες, οι τετρακυκλίνες, οι β-λακτάμες και τα μακρολίδια.

Στην παρούσα εργασία θα μελετήσουμε τις κατηγορίες των σουλφοναμίδων και αμινογλυκοσίδων.

1.2 Σουλφοναμίδες

Οι σουλφοναμίδες, καθώς και τα δομικά συγγενή παράγωγα τους, όπως σουλφαμίδια και σουλφαμικά, έχουν γενικό τύπο H_2N-SO_2NHR (Σχήμα 1.2.) (Brackett, Singh and Block, 2004)



Σχήμα 1.2: Χημική δομή σουλφοναμιδών (Brackett, Singh and Block, 2004).

Οι σουλφοναμίδες είναι τα πρώτα επιλεκτικά τοξικά αντιμικροβιακά φάρμακα που συντέθηκαν επιτυχώς. Ο αριθμός των σουλφοναμιδών που έχει παραχθεί μέχρι τώρα με στόχο την βελτίωση της αντιμικροβιακής τους δράσης, την αύξηση της διαλυτότητας τους στα ούρα και την επιμήκυνση του χρόνου δράσης τους φτάνει περίπου τις 150. Από αυτές η πιο διαδεδομένη για την χρήση της στην θεραπεία των χοίρων ως προς τον έλεγχο της ατροφικής ρινίτιδας αλλά και άλλων λοιμώξεων είναι η σουλφαδιμίνη (σουλφαμεθαζίνη). Οι σουλφοναμίδες έχουν ένα ευρύ φάσμα δράσης και είναι οικονομικά προσιτές κάτι που τις κατατάσσει στην κατηγορία των φαρμακευτικών ουσιών που χρησιμοποιούνται, από το 1940 μέχρι και σήμερα, κατά των μικροβιακών και πρωτοζωικών μολύνσεων του ανθρώπου και των ζώων (Tacic *et al.*, 2017).

Δρουν ανταγωνιστικά προς το παρα-αμινο-βενζοϊκο οξύ, καθώς η χημική τους δομή είναι ανάλογη ως προς αυτό και έτσι αποτελούν χαρακτηριστικό παράδειγμα ανταγωνιστικής παρεμπόδισης κατά τη σύνθεση του DNA των μικροοργανισμών κάτι που καθιστά πιο εύκολη την καταστροφή τους από τις αμυντικές δυνάμεις του οργανισμού. Ο μηχανισμός της αντιμικροβιακής δράσης των σουλφοναμιδών περιλαμβάνει την ανταγωνιστική αναστολή του φολικού οξέος εμποδίζοντας την ανάπτυξη και αναπαραγωγή των μικροοργανισμών. Εξαιτίας αυτού του μηχανισμού δράσης κατατάσσονται στην ομάδα βακτηριοστατικών παραγόντων (Tacic *et al.*, 2017). Παρόλα αυτά η αντιμικροβιακή δράση μπορεί να αντιστραφεί

με την αφαίρεση σουλφαμινιδίου ή την προσθήκη παρα-αμινο-βενζοϊκου οξέος. Η βακτηριακή ανάπτυξη αναστέλλεται από τη βακτηριοστατική δράση. Τα ανασταλμένα βακτηρίδια μπορούν να εξαλειφθούν από το σύστημα άμυνας του ξενιστή κατά προτίμηση με φαγοκυττάρωση(Prithika, 2004).

Στην κτηνοτροφία δυστυχώς η κατάχρηση των σουλφοναμίδων δεν άργησε να επέλθει. Κύρια αιτία της κατάχρησης αυτής είναι ότι οι σουλφοναμίδες ενσωματώθηκαν στις ζωοτροφές για την πρόληψη διάφορων ασθενειών, αλλά και την αύξηση των αποδόσεων των παραγωγικών ζώων. Άλλη μια αιτία είναι ότι η χρήση τους στην κτηνιατρική θεραπευτική έγινε πιο έντονη όταν διαπιστώθηκε ότι ο συνδυασμός της χορήγησης τους με τριμεθοπρίμη αύξανε κατά πολύ την αποτελεσματικότητά τους. Αποτέλεσμα της κατάχρησης αυτής ήταν η εμφάνιση αυξημένων συγκεντρώσεων των κατάλοιπων τους στους ιστούς των παραγωγικών ζώων αλλά και στα ζωικά τρόφιμα. Σημαντική ήταν και η αύξηση τροφολοιμώξεων από *Salmonella* DT 104 κατά 10 φορές τα τελευταία 10 χρόνια, γεγονός που έχει συσχετισθεί με την αύξηση της αντίστασης των μικροοργανισμών στις σουλφοναμίδες(Prithika, 2004).

Όπως συμβαίνει με όλες τις φαρμακευτικές ουσίες, πέρα των θετικών επιδράσεων προκαλούν και κάποιες παρενέργειες στον εκάστοτε οργανισμό. Η πιο συχνή ανεπιθύμητη παρενέργεια από την έκθεση σε σουλφοναμίδες είναι η υπερευαισθησία σε αυτές και συχνά αναφέρεται ως «sulfa allergy». Έχουν αναφερθεί παρενέργειες όπως πυρετός, σοκ αναφυλαξίας, ασθένειες του ορού του αίματος, συστηματική αγγειίτιδα, πνευμονία, ηπατίτιδα, μυοκαρδίτιδα, διάμεση νεφρίτιδα, δυσκαρσία αίματος όπως η αιμολυτική αναιμία, ουδετεροπενία, θρομβοκυτταροπενία και πανκυτταροπενία, αλλά και διάφορες δερματικές αντιδράσεις, όπως το σύνδρομο Steven-Johnson και η τοξική επιδερμική νεκρόλυση(Prithika, 2004).

Σε ορισμένους οργανισμούς εμφανίζεται διαταραχή του ουροποιητικού συστήματος ως αποτέλεσμα της καθίζησης των ακετυλιωμένων σουλφοναμίδων (μεταβολίτες) ιδιαίτερα στην περίπτωση όξινων ούρων. Αυτό μπορεί να αποφευχθεί με τη χρήση διαλυτών σουλφαμονιδίων και διατηρώντας την αλκαλική αντίδραση των ούρων(Prithika, 2004).

Οι σουλφοναμίδες προκαλούν παρενέργειες μέσω διαφορετικών μηχανισμών. Για παράδειγμα η ανεπάρκεια του ενζύμου γλυκόζη-6-φωσφορική αφυδρογονάση οδηγεί σε αιμολυτική αναιμία σε ασθενείς που έλαβαν σουλφοναμίδες. Ωστόσο, ο μηχανισμός των ανεπιθύμητων ενεργειών σε σουλφοναμίδες δεν προσδιορίζεται με ακρίβεια στις περισσότερες περιπτώσεις. Θεωρείται ότι οι παρενέργειες των σουλφοναμίδων βασίζονται στον μηχανισμό

που περιλαμβάνει την άμεση δημιουργία των μεταβολιτών του σουλφοναμιδίου, οι οποίοι σχηματίζονται με την αντίδραση της Ν-οξειδωσης, που καταλύεται από το κυτόχρωμα Ρ450. Ακόμη, ο ανοσοποιητικός μηχανισμός ενδέχεται να συμβάλει στην ανάπτυξη αλλεργιών, καθώς το ανοσοποιητικό σύστημα αναγνωρίζει τον αλλεργιογόνο μεταβολίτη του σουλφοναμιδίου(Prithika, 2004).

Παράγοντες κινδύνου, όπως η υψηλή δόση φαρμάκου, η σοβαρή ανοσοανεπάρκεια, η πραγματοποίηση αργής ακετελίωσης του φαρμάκου και η έλλειψη γλουταθειόνης, επηρεάζουν την ανάπτυξη της υπερευαισθησίας στις σουλφοναμίδες. Θεωρείται ότι οι οργανισμοί που εμφανίζουν υπερευαισθησία στις αντιμικροβιακές σουλφοναμίδες, θα εμφανίσουν παρόμοιες αρνητικές επιδράσεις και σε άλλες κατηγορίες σουλφοναμιδίων. Αυτό αναφέρεται ως διασταυρούμενη αντιδραστικότητα (cross-reactivity)(Prithika, 2004).

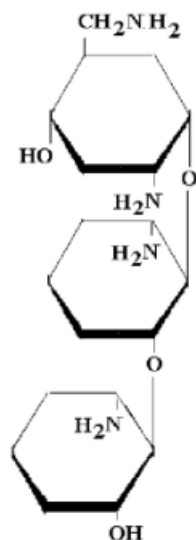
Παρότι η υπερευαισθησία στις αντιμικροβιακές σουλφοναμίδες έχει ως αποτέλεσμα τον αυξημένο κίνδυνο αλλεργικής αντίδρασης και σε άλλες κατηγορίες σουλφοναμιδίων, τα αποτελέσματα από άλλες μελέτες υποδηλώνουν ότι ο κίνδυνος αυτός δεν περιορίζεται στις σουλφοναμίδες. Συγκεκριμένα οργανισμοί με ιστορικό υπερευαισθησίας στις αντιμικροβιακές σουλφοναμίδες έχουν υψηλότερο κίνδυνο αντίδρασης υπερευαισθησίας στις πενικιλίνες, που έχουν παρόμοια δομή με τις σουλφοναμίδες(Prithika, 2004).

Τέλος, οι σουλφοναμίδες μπορούν να ενισχύσουν την δράση ορισμένων φαρμάκων, όπως τα αντιπηκτικά, τα υπογλυκαιμικά παράγωγα σουλφονουλουρίας και τα αντισπασμωδικά, κάτι που πρέπει να ληφθεί υπόψη κατά την ταυτόχρονη χορήγηση των σουλφοναμιδίων με άλλα φάρμακα.(Prithika, 2004).

1.3 Αμινογλυκοσίδες

Η ομάδα των αμινογλυκοσίδων περιλαμβάνει αντιμικροβιακούς παράγοντες με παραπλήσια χημικά, αντιμικροβιακά, φαρμακοκινητικά και τοξικολογικά χαρακτηριστικά.

Οι αμινογλυκοσίδες αποτελούνται από αμοносάκχαρα που συνδέονται μεταξύ τους με γλυκοζιτικό δεσμό (-O-) που συνδέεται με μια διβασική αμινοκυκλιτόλη, η οποία συνηθέστερα έχει την μορφή 2-δεοξυστρεπταμίνη (Σχήμα 1.3)(Mingeot-Leclercq, Glupczynski and Tulkens, 1999).



Σχήμα 1.3: Χημική δομή αμινογλυκοσίδων(Μουζούρας, 1996).

Οι αμινογλυκοσίδες χρησιμοποιούνται ευρέως στην κτηνιατρική. Χρησιμοποιούνται τόσο στα κατοικίδια όσο και σε ζώα παραγωγής τροφίμων. Η παρομομυκίνη έχει εγκριθεί σε ορισμένα κράτη μέλη για την θεραπεία της κολιβακλίωσης σε χοίρους και μόσχους και έχει χρησιμοποιηθεί για την πρόληψη της ιστομονίωσης σε γαλοπούλες(Kempf *et al.*, 2013). Πρέπει να σημειωθεί ότι για την αμικασίνη δεν έχουν καθοριστεί MRL (Maximum Residue Level) και ως εκ τούτου δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε ζώα παραγωγής τροφίμων.

Μέχρι το 1976 η νεομυκίνη και η υγρομυκίνη-B προσθέτονταν στις ζωοτροφές πουλερικών ως αυξητικός παράγοντας του βάρους. Από το 1976 οι αμινογλυκοσίδες καταργήθηκαν στα κράτη μέλη της ΕΕ ως αυξητικοί παράγοντες(Castanon, 2007). Επομένως στα κράτη μέλη της ΕΕ οι αμινογλυκοσίδες μπορούν να χρησιμοποιηθούν μόνο για κλινικούς σκοπούς. Η συχνότερη χρήση τους είναι για τη θεραπεία της σηψαιμίας και της λοίμωξης της

πεπτικής και της αναπνευστικής οδού και του ουροποιητικού συστήματος σε πολλά είδη ζώων όπως τα βοοειδή, οι χοίροι και τα πουλερικά, (τα είδη των ζώων που εξετάσαμε στο πείραμα μας) αλλά και άλλα είδη όπως πρόβατα, άλογα, σκύλοι και γάτες.

Η χρήση των πιο τοξικών αμινογλυκοσίδων, όπως η νεομυκίνη, περιορίζεται σε μεγάλο βαθμό στην τοπική ή στοματική θεραπεία, ενώ οι λιγότερο τοξικές, όπως η γενταμυκίνη, χρησιμοποιούνται για παρεντερική θεραπεία. Επιπλέον, χρησιμοποιούνται ως εμποτισμένα σφαιρίδια ή με περιφερειακή διάχυση για την θεραπεία μυοσκελετικών λοιμώξεων σε κατοικίδια ζώα και άλογα. Πιο συγκεκριμένα, η γενταμυκίνη ενδείκνυται για λοιμώξεις από *Pseudomonas aeruginosa* με ελάχιστες εναλλακτικές διαθέσιμες θεραπείες (Dowling, 2013).

Οι αμινοομάδες (NH_2) καθιστούν τις αμινογλυκοσίδες οργανικές βάσεις και είναι σταθερές σε αλκαλικό περιβάλλον. Οι υδροξυλικές ομάδες (OH) προσδίδουν στις αμινογλυκοσίδες υψηλή υδατοδιαλυτότητα και πολύ μικρή λιποδιαλυτότητα. Έτσι δεν περνάνε εύκολα τους βιολογικούς φραγμούς και κατά συνέπεια έχουν μικρό όγκο κατανομής.

Οι αμινογλυκοσίδες αναστέλλουν την σύνθεση των πρωτεϊνών όταν δεσμευτούν στην περιοχή A του ριβοσωμικού RNA 16S του ριβοσώματος 30S με υψηλή συγγένεια (Kotraetal,2000).Αν και τα μέλη της κατηγορίας των αμινογλυκοσιδών διαφοροποιούνται κατά την επιλεκτικότητα τους στα διάφορα σημεία της περιοχής A, όλα τα μέλη μεταβάλλουν τη διαμόρφωσή της. Αποτέλεσμα αυτής της αλληλεπίδρασης είναι το αντιβιοτικό να προάγει την εσφαλμένη μετάφραση προκαλώντας την λάθος ανάγνωση ενός κωδικονίου κατά την παράδοση του αμινοακυλίου tRNA. Αυτό το αποτέλεσμα στην εσφαλμένη πρωτεϊνοσύνθεση επιτρέπει στα λανθασμένα αμινοξέα να συναρμολογηθούν σε ένα πολυπεπτίδιο, που όταν απελευθερωθεί θα προκαλέσει ζημιά στην κυτταρική μεμβράνη(Mingeot-Leclercq, Glupczynski and Tulkens, 1999; Wilson, 2014).Ορισμένες αμινογλυκοσίδες μπορούν να εμποδίσουν την πρωτεϊνοσύνθεσης εμποδίζοντας την επιμήκυνση ή με άμεση αναστολή της έναρξης της (Wilson, 2014).

Ο ακριβής μηχανισμός δέσμευσης και οι μεταγενέστερες επιδράσεις ποικίλλουν ανά χημική δομή, αλλά όλες οι αμινογλυκοσίδες είναι ισχυρά βακτηριοκτόνα και τυπικά παράγουν παρατεταμένη δράση μετά την λήψη του αντιβιοτικού (postantibiotic effect-PAE). Το φαινόμενο της παρατεταμένης δράσης μετά την λήψη του αντιβιοτικού έχει αποδειχθεί ότι σχετίζεται άμεσα με την χρονική διάρκεια ανάκτησης της πρωτεϊνοσύνθεσης από τα βακτήρια(Stubbings *et al.*, 2006).

Η είσοδος των αμινογλυκοσίδων στα βακτηριακά κύτταρα χωρίζεται σε τρία στάδια, στο πρώτο στάδιο παρατηρείται αύξηση της διαπερατότητας της βακτηριακής μεμβράνης, ενώ το δεύτερο και τρίτο στάδιο εξαρτώνται από την ενέργεια. Το πρώτο στάδιο περιλαμβάνει την ηλεκτροστατική δέσμευση του πολυκατιοντικού αμινογλυκοσιδίου στα αρνητικά φορτισμένα μέρη της βακτηριακής μεμβράνης, όπως είναι τα φωσφολιπίδια και τα τεϊκοϊκά οξέα των Gram-θετικών βακτηρίων και τα φωσφολιπίδια και λιποσακχαρίτες των Gram-αρνητικών βακτηρίων, ακολουθούμενη από την μετατόπιση ιόντων μαγνησίου. Αυτά τα κατιόντα είναι υπεύθυνα για την σταθεροποίηση των λιπιδικών συστατικών της βακτηριακής μεμβράνης και η αφαίρεση τους οδηγεί σε διαταραχή της εξωτερικής μεμβράνης, ενίσχυση της διαπερατότητας και εκκίνηση της πρόσληψης αμινογλυκοσίδων. Αυτό το φαινόμενο διευκολύνει την είσοδο στο κυτταρόπλασμα μέσω μιας αργής, ενεργο-εξαρτώμενης μεταφοράς ηλεκτρονίων (Ramirez and Tolmasky, 2010).

Η αναστολή της σύνθεσης της πρωτεΐνης και η λάθος μετάφραση των πρωτεϊνών εμφανίζεται όταν τα μόρια των αμινογλυκοσίδων έχουν πρόσβαση στο κυτταρόπλασμα. Οι λάθος μεταφρασμένες πρωτεΐνες προκαλούν βλάβη στην κυτταροπλασματική μεμβράνη και διευκολύνουν την επακόλουθη είσοδο των αμινογλυκοσίδων. Αυτό στη συνέχεια οδηγεί στην γρήγορη πρόσληψη επιπλέον αμινογλυκοσίδων στο κυτταρόπλασμα, αύξηση της αναστολής της πρωτεϊνοσύνθεσης, λάθος μετάφραση και επιτάχυνση του κυτταρικού θανάτου (Ramirez and Tolmasky, 2010).

Όλα τα αντιμικροβιακά φάρμακα της ομάδας των αμινογλυκοσίδων έχουν μικρό θεραπευτικό δείκτη. Υψηλές δόσεις μπορούν να προκαλέσουν νεφροτοξικά και ωτοτοξικά φαινόμενα καθώς και αναστολή μετάδοσης της νευρομυϊκής ώσης.

Η σημαντικότερη ανεπιθύμητη ενέργεια των αμινογλυκοσίδων θεωρείται η νεφροτοξικότητα. Οι αμινογλυκοσίδες συγκεντρώνονται επιλεκτικά στη μυελώδη μοίρα των νεφρών και πιο συγκεκριμένα στα επιθηλιακά κύτταρα των εσπειραμένων σωληναρίων Α τάξεως. Εκεί συνδέονται με τα ριβοσώματα και τα μιτοχόνδρια και η σύνδεση αυτή προκαλεί τον σοβαρό τραυματισμό των επιθηλιακών κυττάρων, επηρεάζοντας έτσι την σπειραματική διήθηση. Η ανεπάρκεια αυτή προκαλεί την αύξηση της συγκέντρωσης των αμινογλυκοσίδων με αποτέλεσμα περαιτέρω αλλοιώσεις, που παρόλο θεωρούνται αναστρέψιμες, η αποκατάστασή τους είναι συνήθως μακροχρόνια (Μουζούρας, 1996).

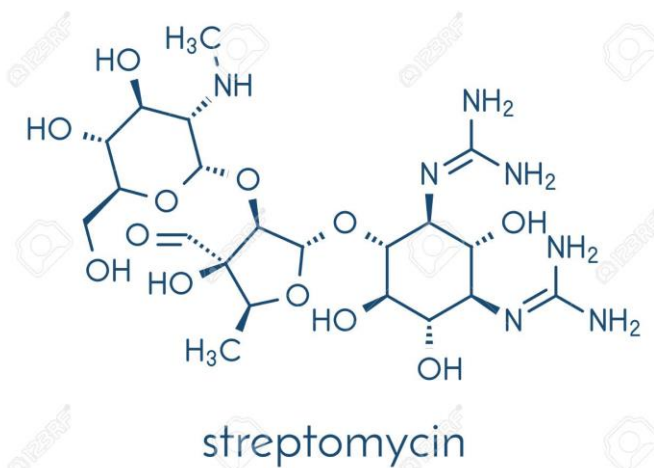
Για την πρόληψη των νεφροτοξικών φαινομένων προτείνεται η αποφυγή χορήγησης αμινογλυκοσίδων σε πολύ νεαρά ή γέρικά ζώα, σε περιπτώσεις αφυδάτωσης, οξέωσης και

τοξαιμικών ή σοβαρών σηψαιμικών καταστάσεων. Για τον λόγο αυτό δεν συνιστάται η ταυτόχρονη χορήγηση αμινογλυκοσίδων με διουρητικά και ιδιαίτερα με τη φουροσεμίδη. Προσοχή απαιτείται στην χρήση αμινογλυκοσίδων σε ζώα με νεφρική ανεπάρκεια. Η πλέον νεφροτοξική θεωρείται η νεομυκίνη και για το λόγο αυτό αποφεύγεται η παρεντερική χορήγηση της.

Οι αμινογλυκοσίδες, όπως αναφέρθηκε, μπορούν να προκαλέσουν ωτοτοξικότητα. Η ωξοτοξικότητα συνδέεται με βλάβες στο VIII κρανιακό νεύρο, που οδηγούν σε δυσλειτουργία του οπίσθιου λαβύρινθου. Κλινικό αποτέλεσμα αυτού είναι η εμφάνιση ιλίγγων, αστάθειας και, σε σοβαρές περιπτώσεις, κώφωσης. Ιδιαίτερα ευαίσθητες στις τοξικές παρενέργειες των αμινογλυκοσίδων θεωρούνται οι γάτες (Μουζούρας, 1996).

1.3.1 Στρεπτομυκίνη

Η στρεπτομυκίνη απομονώθηκε το 1944 από το στρεπτομύκητα *Streptomyces griseus* ύστερα από πολυετείς προσπάθειες που στόχευαν στην ανάπτυξη μιας συμπληρωματικής προς την πενικιλίνη αντιμικροβιακής ουσίας με ιδιαίτερη δράση έναντι των Gram-αρνητικών βακτηρίων. Σύντομα, αποδείχθηκε ότι πέρα από τη δράση της αυτή, η στρεπτομυκίνη ήταν ιδιαίτερα δραστική εναντίον του μυκοβακτηριδίου της φυματίωσης, γεγονός που χάρισε στον καθηγητή Waksman, ο οποίος πρωτοστάτησε στην ανακάλυψη της, το βραβείο Nobel το 1952 (Μουζούρας, 1996).



Σχήμα 1.4: Χημική δομή στρεπτομυκίνης (Μουζούρας, 1996)

Στην προσπάθεια να μειωθούν οι τοξικές παρενέργειες της στρεπτομυκίνης παράχθηκε το 1944 η διυδροστρεπτομυκίνη που φαρμακολογικά δε διαφέρει από την πρώτη με εξαίρεση μικρές διαφορές, όχι τόσο στο βαθμό τοξικότητας, αλλά στο μηχανισμό κατά τον οποίο προκαλούν τοξικότητα.

Η στρεπτομυκίνη έχει στενό φάσμα δράσης, είναι ιδιαίτερα δραστική έναντι των Gram-αρνητικών βακτηριδίων, όπως *Pasteurella* spp., *Salmonella* spp., *E.Coli*, *Shigella*. Επιπλέον θεωρείται πολύ δραστική έναντι του μυκοβακτηριδίου της φυματίωσης και εκδηλώνει δράση εναντίον της λεπτόσπειρας και μερικών σταφυλόκκοκων.

Δεν απορροφάται από το γαστρεντερικό σωλήνα, για αυτό η χορήγηση της από το στόμα δεν καλύπτει διασυστημικές λοιμώξεις. Ωστόσο η χορήγηση από το στόμα δίνει ικανοποιητικά αποτελέσματα στην αντιμετώπιση γαστρεντερικών λοιμώξεων. Χορηγείται κυρίως παρεντερικά δια της ενδομυϊκής και λιγότερο υποδερμικής οδού για την αντιμετώπιση γενικευμένων λοιμώξεων που οφείλονται στα ευαίσθητα σε αυτές βακτηρίδια. Η ενδοφλέβια χορήγηση δεν συνιστάται, καθότι προκαλεί σοβαρές τοξικές παρενέργειες που μπορούν να καταλήξουν σε σοκ και θάνατο. Προκαλούν επίσης θρομβοφλεβίτιδα (Μουζούρας, 1996).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

Μέθοδοι Ανάλυσης

2.1. Ενζυμο Συζευγμένη Ανοσοπροσρόφηση (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay-Elisa)

Μία σημαντική πρόοδος, σε επίπεδο λειτουργικών μελετών, επιτεύχθηκε στην ανοσολογία με την ανάπτυξη διαφόρων ανοσοδοκιμασιών (Immunoassays). Ορισμένες ανοσοδοκιμασίες στηρίχτηκαν στην ειδικότητα αναγνώρισης και αλληλεπίδρασης μεταξύ ενός αντιγόνου και ενός ειδικού αντισώματος (Crowther, 2000).

Το 1971 η Eva Engvall και ο Peter Perlmann δημοσίευσαν την πρώτη τους έρευνα πάνω στην ενζυμική ανοσοδοκιμασία ELISA μετρώντας ποσοτικά την IgG σε ορό κουνελιού.

Η ELISA είναι μια μέθοδος που χρησιμοποιείται τόσο στην έρευνα όσο και για διαγνωστικούς σκοπούς με εφαρμογές στην τεχνολογία τροφίμων, στον τομέα της τοξικολογίας, στην κλινική έρευνα και στην φαρμακευτική βιομηχανία. Η χρήση της μεθόδου στους τομείς αυτούς είναι για λόγους όπως η διάγνωση ασθενειών, βιοχημικές αναλύσεις αίματος και ούρων (ορμονικές, διαφόρων δεικτών), διάγνωση ορισμένων κατηγοριών ναρκωτικών ουσιών και φαρμάκων, ανακάλυψη και ανάπτυξη φαρμάκων, κατανόηση του φυσιολογικού και παθολογικού ρόλου βιολογικά δραστικών ουσιών και ανάπτυξη νέων διαγνωστικών εργαλείων (Crowther, 2000).

Η ELISA είναι μέθοδος υψηλής ευαισθησίας, η οποία επιτρέπει τον ποσοτικό προσδιορισμό αντισωμάτων, αντιγόνων, κυτταροκινονών, χημικών ουσιών, ορμονών σε βιολογικά υγρά με την χρήση ένζυμο-συζευγμένων αντισωμάτων και χρωμογόνου υποστρώματος και έχει την ικανότητα να ανιχνεύει τα υπό εξέταση μόρια σε συγκεντρώσεις έως και της τάξεως των pg και σε ειδικές περιπτώσεις fg.

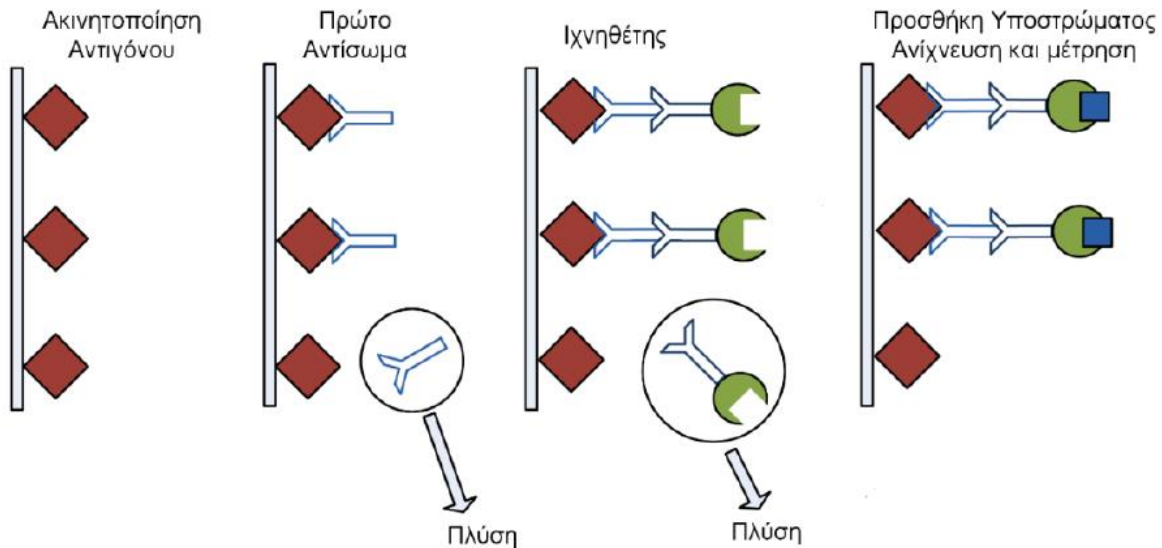
Τα βασικά πλεονεκτήματα της μεθόδου αυτής συγκριτικά με άλλες ανοσοδοκιμασίες είναι 1) η υψηλότερη ευαισθησία, 2) η επαναληψιμότητα, 3) η μη χρησιμοποίηση ραδιενέργειας.

Οι ανοσοχημικές μέθοδοι ανάλυσης χρησιμοποιούν αντισώματα (Ab) ως αντιδραστήρια μοριακής αναγνώρισης για να επιταχύνουν τη βιοειδική δέσμευση και ανίχνευση των αντιγόνων (Ag). Αντιγόνο θεωρείται κάθε ξένη ουσία που όταν εισέρχεται σε έναν οργανισμό αναγνωρίζεται από τα Β-λεμφοκύτταρα ή/και τα Τ-λεμφοκύτταρα και μπορεί να προκαλέσει

την ανάπτυξη της ειδικής ή επίκτητης ανοσίας. Τα αντισώματα είναι περίπλοκες σφαιρικές πρωτεΐνες που συντίθενται σε έναν οργανισμό όταν το ανοσοποιητικό σύστημα διεγερθεί από την παρουσία κάποιου ξένου μακρομορίου (αντιγόνου), καλούνται ανοσοσφαιρίνες και συμβολίζονται ως Ig(Crowther, 2000).

Οι ανοσοχημικές τεχνικές ανάλυσης βασίζονται στην επιλεκτική αντίδραση ενός αναλύτη (Ag) με το αντίσωμα (Ab), για να δώσει ένα προϊόν (Ag-Ab) το οποίο μπορεί να μετρηθεί. Ανάλογα με την εφαρμογή, τα αντιδραστήρια και την ευαισθησία που επιδιώκεται, η μέθοδος παρουσιάζει παραλλαγές, όπως η ELISA τύπου sandwich ή η ανταγωνιστική ELISA. Σε όλες τι παραλλαγές τα βασικά στάδια είναι τα εξής:

1. Η πρόσδεση και η ακινητοποίηση του αντιγόνου ή του αντισώματος σε στερεή επιφάνεια (Ανοσοπροσρόφηση, Immunosorbent),
2. Η χρήση ένζυμο-συζευγμένου (Enzyme-Linked) αντισώματος
3. Η χρήση χρωμογόνων υποστρωμάτων
4. Η ανίχνευση του προϊόντος



Σχήμα 2.1: Πορεία ELISA. Από αριστερά προς δεξιά: πρόσδεση και ακινητοποίηση αντιγόνου στην επιφάνεια, προσθήκη πρώτου αντισώματος, προσθήκη ενζύμου συζευγμένο σε αντίσωμα, προσθήκη χρωμογόνου υποστρώματος, ανίχνευση και μέτρηση.

Πρόσδεση και Ακίνητοποίηση αντιγόνου ή αντισώματος σε στερεά επιφάνεια (Ανοσοπροσρόφηση)

Αρχικά ακινητοποιείται το εξεταζόμενο αντιγόνο ή αντίσωμα σε στερεά επιφάνεια μέσω χημικού δεσμού είτε μέσω φυσικής προσρόφησης με υδρόφοβο δεσμό (προσρόφηση σε πλαστική επιφάνεια). Η πρακτική απλότητα χειρισμού των πλαστικών σκευών και η δυνατότητα εφαρμογής της μεθόδου σε μεγάλη κλίμακα χρησιμοποιώντας πλάκες μικροτιτλοδότησης καθιστά την φυσική προσρόφηση, με υδρόφοβο δεσμό, ευρύτερα χρησιμοποιούμενο τρόπο. Μειονέκτημά του αποτελεί η διαφορά προσρόφησης του αντιγόνου ή αντισώματος που μπορεί να εμφανίζουν διαφορετικά πλαστικά σκεύη ή διαφορετικά φρεάτια του ίδιου πλαστικού σκεύους. Ωστόσο, η χρήση πρωτεϊνών για τον αποκλεισμό της μη ειδικής προσρόφησης και απορρυπαντικών κατά τις επώσεις και τις εκπλύσεις καθιστούν το προαναφερόμενο πρόβλημα αμελητέο (Crowther, 2000).

Χρήση ενζυμο-συζευγμένου αντισώματος

Η χρήση ενζυμο-συζευγμένων αντισωμάτων αποτελεί ένα βασικό χαρακτηριστικό της μεθόδου ELISA, σε σύγκριση με άλλες ανοσοδοκιμασίες που χρησιμοποιούν ραδιενέργεια για την ανίχνευση των προϊόντων. Η σύζευξη ενζύμων στα αντισώματα προβλέπει το σχηματισμό ενός σταθερού ομοιοπολικού δεσμού μεταξύ του ενζύμου και του αντισώματος, ο οποίος δεν επηρεάζει την ικανότητα του αντισώματος να αναγνωρίζει το αντιγόνο αλλά ούτε την καταλυτική δραστηριότητα του ενζύμου. Ένας σημαντικός αριθμός ενζύμων χρησιμοποιείται επιτυχώς στη μέθοδο ELISA, όπως η υπεροξειδάση (horseradish peroxidase, HRP), η αλκαλική φωσφατάση (alkaline phosphatase, AP), η β-γαλακτοσιδάση (β-galactosidase, β-Gal), και διακρίνονται σε άμεσα δραστικά στο υπόστρωμα (αλκαλική φωσφατάση, β-γαλακτοσιδάση) και έμμεσα (υπεροξειδάση). Η επιλογή του ενζύμου εξαρτάται από την εφαρμογή της μεθόδου (Crowther, 2000).

Χρήση χρωμογόνου υποστρώματος

Η ανίχνευση του εξεταζόμενου αντιγόνου ή αντισώματος πραγματοποιείται με την προσθήκη χρωμογόνου υποστρώματος που αντιδρά με το ένζυμο παράγοντας έγχρωμο προϊόν (φως ή φθορισμό). Η επιλογή του ζεύγους ενζύμου-υποστρώματος της χρωμογόνου αντίδρασης καθορίζει την ευαισθησία της δοκιμασίας. Παράμετροι που συντελούν στην επιλογή ενζύμου-

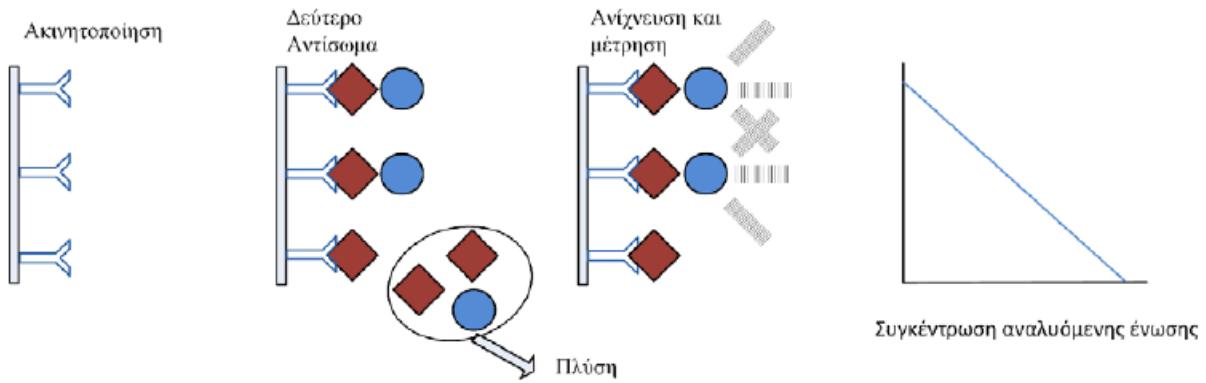
υποστρώματος και εξασφαλίζουν την υψηλότερη ευαισθησία της δοκιμασίας είναι: (i) η ταχύτερη αντίδραση μεταξύ ενζύμου και υποστρώματος προκειμένου να παράγεται έγχρωμο προϊόν σε μεγάλη ποσότητα, (ii) το έγχρωμο προϊόν της αντίδρασης να ανιχνεύεται με μεγάλη ευαισθησία και (iii) η ενζυμική δραστηριότητα να μην επηρεάζεται από παράγοντες του εξεταζόμενου δείγματος(Crowther, 2000).

Ανίχνευση προϊόντος

Η επιλογή του ενζύμου και του υποστρώματος καθορίζουν τη μέθοδο ανίχνευσης και μέτρησης του προϊόντος της ανοσοδοκιμασίας. Θα πρέπει να τονιστεί ότι σε κάθε περίπτωση το προϊόν της ανοσοδοκιμασίας είναι διαλυτό, γεγονός που αποτελεί ιδιαίτερο και το σημαντικότερο χαρακτηριστικό της μεθόδου. Η μέτρηση του τελικού προϊόντος μπορεί να πραγματοποιηθεί με φωταύγεια, φθορισμομετρία ή χρωματομετρία. Μολονότι, η χημειοφωταύγεια παρέχει αυξημένη ευαισθησία στη δοκιμασία, οι πιο διαδεδομένες μέθοδοι μέτρησης είναι οι χρωματομετρικές. Ο λόγος της ευρύτατης χρήσης τους είναι ότι παρέχουν: (1) γρήγορη οπτική εκτίμηση των αποτελεσμάτων, (2) σταθερότητα του έγχρωμου προϊόντος για αρκετό χρόνο μετά τον τερματισμό της ενζυμικής αντίδρασης και (3) απλή και οικονομική μέτρηση μέσω φωτομέτρησης. Η μέτρηση του προϊόντος της χρωμογόνου αντίδρασης πραγματοποιείται με μέτρηση της οπτικής πυκνότητας (Optical Density, OD) των δειγμάτων. Βασικό ρόλο στην ακρίβεια της δοκιμασίας διαδραματίζει ο χρόνος ανάπτυξης του προϊόντος της ενζυμικής αντίδρασης, ο οποίος ποικίλει ανάλογα με την ενζυμική δράση και την προσθήκη του διαλύματος τερματισμού της αντίδρασης (οξέος ή βάσης). Έτσι, η ακρίβεια βασίζεται αφενός στην προσθήκη του διαλύματος τερματισμού στην κατάλληλη χρονική στιγμή και αφετέρου στην προσθήκη σταθερού όγκου του προαναφερόμενου διαλύματος(Crowther, 2000).

Ανταγωνιστική ELISA

Στην Ανταγωνιστική ELISA (Σχήμα 1.5) αρχικά ακινητοποιείται το 1ο αντίσωμα στην πλάκα ή το σωλήνα. Προστίθεται το αντιγόνο και ο ιχνηθέτης (ο οποίος είναι το ίδιο αντιγόνο, συνήθως, επισημασμένο φθορισμομετρικά) και γίνεται δέσμευση. Μετά από πλύσεις για απομάκρυνση μη-δέσμευμένων αντιδραστηρίων μετράται φθορισμός ή απορρόφηση. Στην ανάλυση δειγμάτων όσο πιο μεγάλη η συγκέντρωση της ένωσης στο δείγμα τόσο πιο μικρή η δέσμευση του ιχνηθέτη στο αντίσωμα και άρα τόσο μικρότερο το τελικό σήμα(Crowther, 2000).



Σχήμα 2.2: Ανταγωνιστική ELISA. Από αριστερά προς τα δεξιά: Ακίνητοποίηση 1ου αντισώματος. Προσθήκη αντιγόνου/δείγματος ιχνηθέτη και ανταγωνισμός για δέσμευση στο αντίσωμα. Μέτρηση με φοθορισμό ή άλλη τεχνική. Όσο πιο μεγάλη η συγκέντρωση της ένωσης στο δείγμα τόσο πιο μικρή η δέσμευση του ιχνηθέτη στο αντίσωμα και άρα τόσο μικρότερο το τελικό σήμα.

2.2. Υγρή Χρωματογραφία (Liquid Chromatography-LC)

Η χρωματογραφία είναι μια πανίσχυρη τεχνική διαχωρισμού, η οποία βρίσκει εφαρμογές σε κάθε κλάδο της επιστήμης.

Εφευρέθηκε στις αρχές του 20^{ου} αιώνα από τον Ρώσο βοτανολόγο Mikhail Tswett, ο οποίος χρησιμοποίησε αυτή την τεχνική για να διαχωρίσει διάφορες φυτικές χρωστικές, όπως χλωροφύλλες και ξανθοφύλλες, με διαβίβαση διαλύματος τους μέσω γυάλινου σωλήνα, γεμάτου με εξαιρετικά λεπτόκοκκο ανθρακικό ασβέστιο. Η τεχνική αυτή πήρε το όνομά της από τον Tswett λόγω του ότι οι διαχωριζόμενες ουσίες εμφανίζονταν ως χρωστικές ζώνες στην στήλη(Skoog, Holler, 2007).

Ο όρος χρωματογραφία αποδίδεται σε μια σημαντική ομάδα ποικίλων μεθόδων, οι οποίες βοηθούν τον επιστήμονα να διαχωρίσει ουσίες με παραπλήσιες χημικές ιδιότητες από σύνθετα μίγματα.

Αρχικά σε όλους του χρωματογραφικούς διαχωρισμούς το δείγμα διαλύεται σε μια κινητή φάση, η οποία μπορεί να είναι ένα αέριο, ένα υγρό ή ένα υπερκρίσιμο ρευστό. Έπειτα, η κινητή φάση διέρχεται μέσω μιας στατικής φάσης, η οποία είναι καθηλωμένη σε μια στήλη ή σε μια στερεά επιφάνεια. Η επιλογή των φάσεων γίνεται με τρόπο τέτοιο ώστε τα συστατικά του δείγματος να κατανέμονται μεταξύ της κινητής και της στατικής φάσης σε διαφορετικό βαθμό. Τα συστατικά που κατακρατούνται ισχυρότερα από την στατική φάση κινούνται αργά κατά την ροή της κινητής φάσης, ενώ αντίθετα τα συστατικά που κατακρατούνται ασθενέστερα από την στατική φάση κινούνται ταχύτερα κατά την ροή της κινητής. Η διαφορά αυτή στην ευκινησία έχει ως αποτέλεσμα τον διαχωρισμό των συστατικών του δείγματος σε ξεχωριστές ζώνες, όπου στην συνέχεια τα συστατικά αυτά μπορούν να προσδιορισθούν ποιοτικά ή/και ποσοτικά(Skoog, Holler, 2007).

Η ταξινόμηση των χρωματογραφικών τεχνικών γίνεται με δύο τρόπους. Ο πρώτος τρόπος βασίζεται στο είδος της στατικής και την κινητής φάσης, που βρίσκονται σε επαφή. Ο δεύτερος τρόπος βασίζεται στον τύπο των κινητών και στατικών φάσεων και στον είδος των ισορροπιών, οι οποίες εμπλέκονται στην ανταλλαγή των διαλυμένων ουσιών μεταξύ των φάσεων.

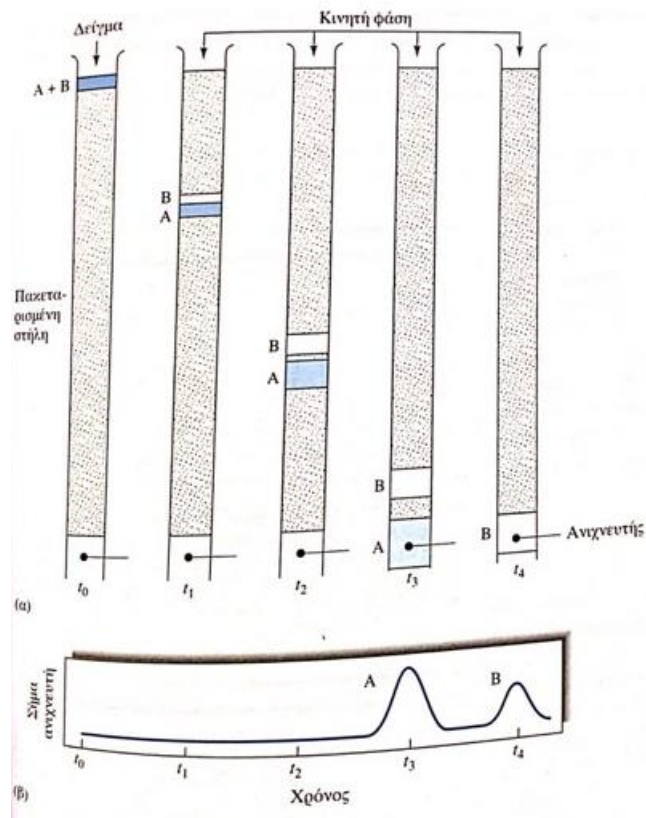
Στην χρωματογραφία έκλουσης δύο ουσίες, η A και η B , διαχωρίζονται σε μια πακεταρισμένη στήλη. Η στήλη αποτελείται από σωλήνα στενού ανοίγματος πακεταρισμένου με

λεπτόκοκκη αδρανής στερεά ουσία , η οποία συγκρατεί στην επιφάνεια της την ακίνητη φάση. Η κινητή φάση καταλαμβάνει τα ενδιάμεσα κενά μεταξύ των κόκκων πακεταρίσματος.

Αρχικά εισάγεται στην κινητή φάση , υπό μορφή ενός στενός βύσματος στην κεφαλή την στήλης, ένα διάλυμα δείγματος που περιέχει τα συστατικά A και B στον χρόνο t_0 . Εδώ τα δύο συστατικά του δείγματος κατανέμονται μεταξύ της ακίνητης και κινητής φάσης (Σχήμα 1.5 α). Η έκλυση συνιστάται στην παραλαβή των μορίων ή ιόντων των ουσιών από την στήλη με συνεχή προσθήκη καθαρού διαλύτη. Στα μοντέρνα χρωματογραφικά συστήματα , η συνεχής προσθήκη επιτυγχάνεται στις τεχνικές LC και SFC με αντλία ή με εφαρμογή πίεσης στην GC(Skoog, Holler, 2007).

Εισαγωγή επιπλέον κινητής φάσης ή υγρού έκλυσης εξαναγκάζει τον διαλύτη , ο οποίος περιέχει κλάσμα του δείγματος , να κινηθεί προς το κάτω μέρος της στήλης , όπου κατανέμεται μεταξύ της κινητής φάσης και νέου τμήματος της στατικής φάσης (χρόνος t_1) . Ταυτόχρονα , πραγματοποιείται κατανομή μεταξύ του καθαρού διαλύτη και της στατικής φάσης , στη θέση στην οποία βρισκόταν το αρχικό δείγμα.

Συνεχιζόμενες προσθήκες διαλύτη μετακινούν μόρια των εκλυόμενων ουσιών προς το κάτω μέρος (έξοδο) της στήλης με μία σειρά συνεχών μεταφορών μεταξύ κινητής και στατικής φάσης. Επειδή η κίνηση των ουσιών του δείγματος πραγματοποιείται μόνο στην κινητή φάση , η μέση ταχύτητα μετανάστευσης της αντίστοιχης ζώνης προς την έξοδο, εξαρτάται από το χρονικό κλάσμα παραμονής της ουσίας στη φάση αυτή. Το κλάσμα αυτό είναι μικρό για τις ουσίες οι οποίες κατακρατούνται ισχυρότερα από τη στατική φάση και είναι μεγάλο στην περίπτωση που η κατακράτηση στην κινητή φάση είναι περισσότερο πιθανή. Στην ιδανική περίπτωση οι διαφορές ταχύτητας διαχωρίζουν τα συστατικά σε ταινίες ή ζώνες κατά μήκος της στήλης. Η απομόνωση των διαχειριζόμενων ουσιών επιτυγχάνεται με το πέρασμα αρκετής ποσότητας κινητής φάσης μέσω της στήλης , ώστε να βγει η κάθε ζώνη από την έξοδο της στήλης , όπου μπορεί να ανιχνευθεί και να συλλεχθεί (Σχήμα 1.5 β)(Skoog, Holler, 2007).

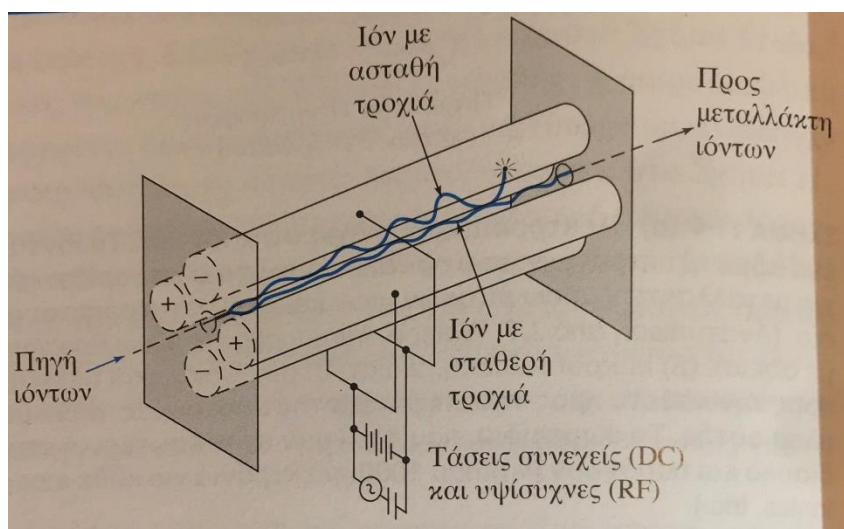


Σχήμα 2.3: (α) Διάγραμμα στο οποίο απεικονίζεται ο διαχωρισμός μείγματος δυο ουσιών A και B με χρωματογραφία έκλυσης στήλης. (β) Το σήμα εξόδου ενός ανιχνευτή σε διάφορα στάδια της διαδικασίας έκλυσης του (α)(Skoog, Holler, 2007).

2.3. Φασματομετρία Μάζας (Mass Spectrometry-MS)

Το φασματόμετρο μαζών (mass spectrometer) είναι ένα όργανο, το οποίο παράγει και διαχωρίζει ταχέως κινούμενα ιόντα με βάση τον λόγο μάζας-προς-φορτίο, m/z . Τα περισσότερα ιόντα που εξετάζονται είναι μονοφορτισμένα, επομένως ο λόγος ισούται απλά με τη μάζα του ιόντος.

Ο συνηθέστερος τύπος φασματομέτρου μαζών, που χρησιμοποιείται στη φασματομετρία μάζας, είναι ο τετραπολικός αναλυτής μαζών (quadrupole mass analyzer)(Σχήμα 1.7). Το όργανο αυτό έχει μικρό μέγεθος, χαμηλό κόστος και είναι μηχανικά ανθεκτικότερο από τους περισσότερους τύπους φασματομέτρων μαζών. Επίσης έχει το πλεονέκτημα των υψηλών ταχυτήτων σάρωσης, ώστε ολόκληρο το φάσμα μαζών να λαμβάνεται σε χρόνο μικρότερο των 100ms(Skoog, Holler, 2007).



Σχήμα 2.4: Τετραπολικό Φασματόμετρο Μαζών (Skoog, Holler, 2007).

Καρδιά του τετραπολικού φασματομέτρου είναι οι τέσσερις παράλληλες κυλινδρικές ράβδοι, οι οποίες δρουν ως ηλεκτρόδια. Οι διαγώνιες ράβδοι συνδέονται ηλεκτρικά μεταξύ τους. Το ένα ζεύγος συνδέεται με τον θετικό πόλο μιας πηγής μεταβλητής τάσης DC, ενώ το άλλο με τον αρνητικό πόλο της πηγής. Επιπλέον, σε κάθε ζεύγος ράβδων εφαρμόζονται μεταβλητές τάσεις AC(με συχνότητα στην περιοχή ραδιοσυχνοτήτων), που μεταξύ τους βρίσκονται σε διαφορά φάσης 180° . Για να ληφθεί το φάσμα μαζών με αυτή τη συσκευή, τα ιόντα

επιταχύνονται στο χώρο ανάμεσα στις ράβδους με ένα δυναμικό 5 έως 10 V. Τα εναλλασσόμενα και συνεχή δυναμικά των ράβδων αυξάνουν συγχρόνως διατηρώντας όμως τον λόγο τους σταθερό. Σε κάποια χρονική στιγμή όλα τα ιόντα, εκτός από αυτά που έχουν μια συγκεκριμένη τιμή λόγου m/z , φθάνουν στις ράβδους και μετατρέπονται σε ουδέτερα. Έτσι φθάνουν στον μεταλλάκτη μόνο τα ιόντα, των οποίων οι τιμές m/z βρίσκονται σε μια στενή περιοχή τιμών του λόγου m/z . Με τα τετραπολικά όργανα μπορούν εύκολα να διακριθούν ιόντα, που διαφέρουν κατά μια μονάδα μάζας (Skoog, Holler, 2007).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

Πειραματικό Μέρος

3.1 Σχεδιασμός και Υλοποίηση Πειράματος

Στην παρούσα έρευνα μελετήσαμε 54 δείγματα ναπού κρέατος, που λήφθηκαν από κρεοπωλεία των νομών Ηρακλείου και Ρεθύμνου, με στόχο τον προσδιορισμό των συγκεντρώσεων των σουλοφοναμίδων και των αμινογλυκοσίδων. Οι κατηγορίες των ζώων, που μελετήθηκαν είναι τα βοοειδή, τα χοιρινά και τα κοτόπουλα, ενώ οι ιστοί που επιλέχθηκαν είναι ο μυς, το ήπαρ και τα νεφρά. Πληροφορίες σχετικά με τα δείγματα (κωδικός δείγματος, είδος ζώου, είδος ιστού, ημερομηνία σφαγής, χώρα προέλευσης) παρατίθενται στον Πίνακα 3.1.

Πίνακας 3.1: Πληροφορίες εκάστοτε δείγματος

Αριθμός Δείγματος	Κωδικός Δείγματος	Είδος Ζώου	Είδος Ιστού	Ηλικία Ζώου	Ημερομηνία Σφαγής	Χώρα Προέλευσης
1	1BM	Βοοειδές	Μυς	18 μηνών	1/11/2018	Ελλάδα
2	2XM	Χοιρινό	Μυς	7 μηνών	31/10/2018	Ελλάδα
3	3KM	Κοτόπουλο	Μυς	70-90 ημερών	1/11/2018	Ελλάδα
4	4KH	Κοτόπουλο	Ήπαρ	70-90 ημερών	1/11/2018	Ελλάδα
5	5KH	Κοτόπουλο	Ήπαρ	60 ημερών	30/10/2018	Ιταλία/Ολλανδία
6	6BM	Βοοειδές	Μυς	12-14 μηνών	30/10/2018	Ιταλία/Ολλανδία
7	7XM	Χοιρινό	Μυς	6 μηνών	30/10/2018	Ιταλία/Ολλανδία
8	8KH	Κοτόπουλο	Ήπαρ	2 μηνών	4/11/2018	Ελλάδα
9	9BH	Βοοειδές	Ήπαρ	2 ετών	30/10/2018	Ελλάδα
10	10XH	Χοιρινό	Ήπαρ	4 μηνών	30/10/2018	Ελλάδα
11	11BM	Βοοειδές	Μυς	18 μηνών	31/10/2018	Γαλλία
12	12XM	Χοιρινό	Μυς	5 μηνών	30/10/2018	Γαλλία
13	13KM	Κοτόπουλο	Μυς	50 ημερών	2/11/2018	Ελλάδα
14	14KH	Κοτόπουλο	Ήπαρ	50 ημερών	2/11/2018	Ελλάδα
15	15BH	Βοοειδές	Ήπαρ	18 μηνών	31/10/2018	Γαλλία
16	16XM	Χοιρινό	Μυς	5-6 μηνών	29/10/2018	Ολλανδία
17	17BM	Βοοειδές	Μυς	10-14 μηνών	29/10/2018	Πολωνία
18	18KM	Κοτόπουλο	Μυς	2 μηνών	5/11/2018	Ελλάδα

19	19BH	Βοοειδές	Ήπαρ	10-14 μηνών	29/10/2018	Πολωνία
20	20BM	Βοοειδές	Μυς	8-12 μηνών	1/11/2018	Ελλάδα
21	21XM	Χοιρινό	Μυς	3 μηνών	2/11/2018	Ελλάδα
22	22KM	Κοτόπουλο	Μυς	2 μηνών	5/11/2018	Ελλάδα
23	23XM	Χοιρινό	Μυς	8 μηνών	6/11/2018	Ελλάδα
24	24BM	Βοοειδές	Μυς	12 μηνών	5/11/2018	Ελλάδα
25	25KM	Κοτόπουλο	Μυς	3-4 μηνών	7/11/2018	Ελλάδα
26	26BM	Βοοειδές	Μυς	15 μηνών	6/11/2018	Ελλάδα
27	27BH	Βοοειδές	Ήπαρ	15 μηνών	6/11/2018	Ελλάδα
28	28XM	Χοιρινό	Μυς	5-6 μηνών	6/11/2018	Ελλάδα
29	29KM	Κοτόπουλο	Μυς	2 μηνών	6/11/2018	Ελλάδα
30	30KH	Κοτόπουλο	Ήπαρ	2 μηνών	6/11/2018	Ελλάδα
31	31XM	Χοιρινό	Μυς	3 μηνών	11/11/2018	Ελλάδα
32	32BM	Βοοειδές	Μυς	12 μηνών	11/11/2018	Ελλάδα
33	33KM	Κοτόπουλο	Μυς	3 μηνών	11/11/2018	Ελλάδα
34	34KH	Κοτόπουλο	Ήπαρ	3 μηνών	11/11/2018	Ελλάδα
35	35XM	Χοιρινό	Μυς	6 μηνών	6/11/2018	Ελλάδα
36	36BM	Βοοειδές	Μυς	14 μηνών	6/11/2018	Ελλάδα
37	37KH	Κοτόπουλο	Ήπαρ	4 μηνών	6/11/2018	Ελλάδα
38	38BM	Βοοειδές	Μυς	18 μηνών	14/11/2018	Ελλάδα
39	39XM	Χοιρινό	Μυς	8 μηνών	14/11/2018	Ελλάδα
40	40KM	Κοτόπουλο	Μυς	40 ημερών	14/11/2018	Ελλάδα
41	41KH	Κοτόπουλο	Ήπαρ	40 ημερών	14/11/2018	Ελλάδα
42	42XH	Χοιρινό	Ήπαρ	8 μηνών	14/11/2018	Ελλάδα
43	43BH	Βοοειδές	Ήπαρ	18 μηνών	14/11/2018	Ελλάδα
44	44BH	Βοοειδές	Ήπαρ	12 μηνών	12/11/2018	Γαλλία
45	45KH	Κοτόπουλο	Ήπαρ	1,5-2 μηνών	12/11/2018	Ελλάδα
46	46KM	Κοτόπουλο	Μυς	1,5-2 μηνών	12/11/2018	Ελλάδα

47	47XN	Χοιρινό	Νεφρό	2-2,5 μηνών	19/11/2018	Ελλάδα
48	48XN	Χοιρινό	Νεφρό	2-2,5 μηνών	19/11/2018	Ελλάδα
49	49XN	Χοιρινό	Νεφρό	2 μηνών	20/11/2018	Ελλάδα
50	50XN	Χοιρινό	Νεφρό	3 μηνών	20/11/2018	Ελλάδα
51	51XN	Χοιρινό	Νεφρό	3-4 μηνών	22/11/2018	Ελλάδα
52	52XN	Χοιρινό	Νεφρό	3-4 μηνών	22/11/2018	Ελλάδα
53	53KN	Κοτόπουλο	Νεφρό	45 ημερών	20/11/2018	Ελλάδα
54	54KN	Κοτόπουλο	Νεφρό	45 ημερών	20/11/2018	Ελλάδα

3.2. Οργανολογία

Οι τεχνικές που χρησιμοποιήθηκαν για την ανάλυση των σουλφοναμιδών ήταν η ενζυμική ανοσοπροσρόφηση (ELISA) και η υγρή χρωματογραφία συζευγμένη με φασματόμετρο μάζας (Liquid Chromatography – Mass Spectrometry, LC-MS), ενώ για την ανάλυση των αμινογλυκοσίδων χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της ELISA.

3.2.1. Δοκιμασία Ενζυμο-Συζευγμένης Ανοσοπροσρόφησης (ELISA)

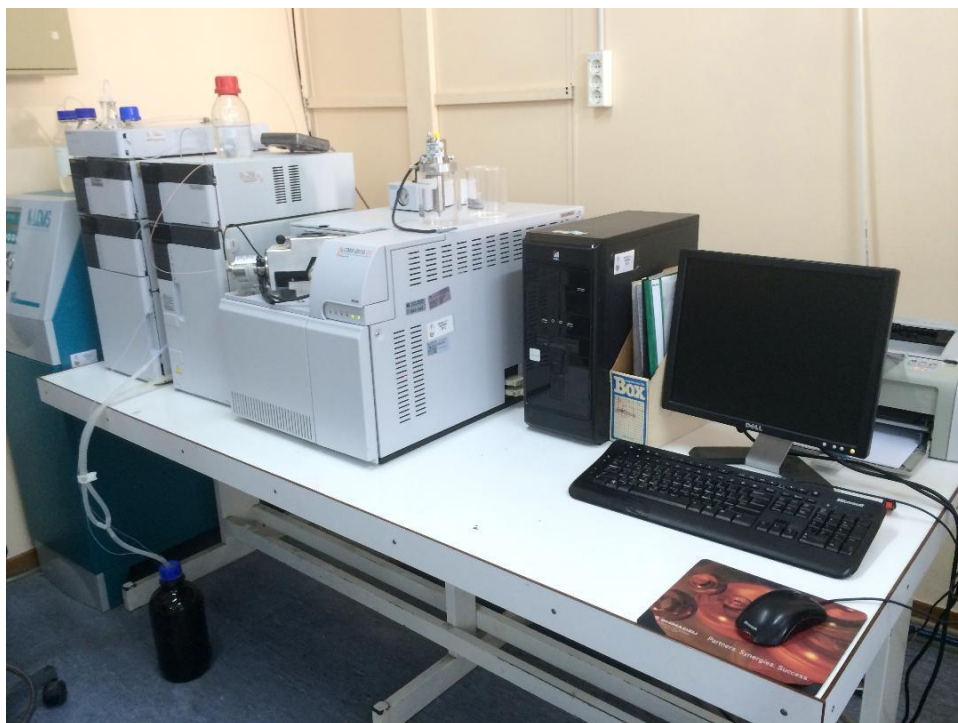
Η τεχνική της ενζυμικής ανοσοπροσρόφησης πραγματοποιήθηκε με Elisa kit της εταιρίας RIDA SCREEEN με κωδικό R3004 για τις σουλφοναμίδες και R3104 για τη στρεπτομυκίνη (της κατηγορίας των αμινογλυκοσίδων). Το Elisa kit reader που χρησιμοποιήθηκε ήταν της εταιρίας Tecan (μοντέλο Infinite M200 Pro). Το συγκεκριμένο όργανο χρησιμοποιήθηκε για την μέτρηση της απορροφητικότητας των υπό-μελέτη δειγμάτων μας στο μήκος κύματος των 450 nm, με στόχο τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης των εξεταζόμενων αντιβιοτικών στα δείγματα.



Σχήμα 3.1: Elisa kit reader.

3.2.2 Υγρή Χρωματογραφία Συζευγμένη με Φασματόμετρο Μάζας (Liquid Chromatography-Mass Spectrometry: LC-MS)

Το όργανο ανάλυσης υγρής χρωματογραφίας συζευγμένης με φασματόμετρο μάζας ήταν της εταιρίας Shimadzu (μοντέλο LC-MS 2010 EV). Το συγκεκριμένο όργανο περιλαμβάνει αυτόματο δειγματολήπτη και πραγματοποιεί τον ιοντισμό με το φαινόμενο του ηλεκτροψεκασμού (Electrospray Ionization, – ESI). Επιπλέον, ο αναλυτής μαζών είναι ένα τετραπολικό φασματόμετρο (quadropole mass filter).



Σχήμα 3.2: Το σύστημα υγρής χρωματογραφίας – φασματομετρίας μάζας (LC-MS) που χρησιμοποιήθηκε.

3.2.3. Λοιπός Εξοπλισμός

Η προετοιμασία των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε με την χρήση επιπρόσθετων οργάνων, τα οποία ήταν τα εξής:

1. Ομογενοποιητής δειγμάτων της εταιρίας Janke&Kunkel (μοντέλο Ultra turrax T25)
2. Αναλυτικός ζυγός ακρίβειας 4^{ov} δεκαδικών ψηφίων της εταιρείας AND (μοντέλο ER-120A), με δυνατότητα μέγιστου βάρους ζύγισης 120 gr

3. Αναδευτήρας vortex της εταιρείας Velpscientific (μοντέλο Zx³)
4. Σύστημα εξάτμισης μέσω αζώτου, της εταιρείας Techne (μοντέλο dri-blockDB-3A)
5. Σύστημα εκχύλισης της εταιρείας GFL
6. Φυγόκεντρος της εταιρείας Heraeus (μοντέλο Biofuge Primo R)
7. Φυγόκεντρος της εταιρείας Kubota (μοντέλο 3740)
8. Φυγόκεντρος της εταιρείας Hettich (μοντέλο EBA 12)
9. Σύστημα επώασης για τα Elisa kit, μοντέλο Radox (evidencen vestigator)



Σχήμα 3.3: 1)Φυγόκεντρος, 2)Vortex, 3)Σύστημα επώασης Elisa kit, 4)Φυγόκεντρος για Eppendorf, 5)Σύστημα εξάτμισης, 6)Σύστημα εκχύλισης, 7)Αναλυτικός ζυγός, 8)Φυγόκεντρος ισχυρής έντασης, 9)Ομογενοποιητής δειγμάτων

3.3. Αντιδραστήρια

Η επεξεργασία των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε με την χρήση χημικών αντιδραστηρίων, που ήταν τα εξής:

- ❖ Μεθανόλη (MeOH) [Honeywell]
- ❖ Απιονισμένο νερό [Direct-Q 3UV, Merck]
- ❖ Φορμικό οξύ
- ❖ Ακετονιτρίλιο (ACN) [Honeywell]
- ❖ n-hexane [Sigma Aldrich]
- ❖ NaCl [Penta]
- ❖ Ethyl acetate [Sigma Aldrich]
- ❖ $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ [Roth]
- ❖ $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ [Merck]
- ❖ NaOH [Merck]

3.4. Πειραματική Διαδικασία

Οι τεχνικές ανάλυσης, που χρησιμοποιήθηκαν (Elisa, LC-MS), απαιτούν διαφορετική προετοιμασία των δειγμάτων, και για αυτό το λόγο ακολουθήθηκαν δυο διαφορετικές πειραματικές διαδικασίες που παρουσιάζονται παρακάτω (παράγραφοι 3.4.1. & 3.4.2.).

3.4.1. Πειραματική Διαδικασία ELISA

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως η τεχνική ELISA πραγματοποιήθηκε για την ανάλυση των σουλφοναμίδων και των αμινογλυκοσίδων. Στην περίπτωση των σουλφοναμίδων πραγματοποιήσαμε διαφορετική επεξεργασία στα κοτόπουλα από ότι στα χοιρινά και τα βοδινά, ενώ στην περίπτωση των αμινογλυκοσίδων η επεξεργασία των δειγμάτων ήταν κοινή για κάθε είδος.

Σουλφοναμίδες

Επεξεργασία χοιρινού και βοδινού

Αρχικά, αναμείχθηκε 1 gr από κάθε ομογενοποιημένο δείγμα με 2 ml μεθανόλης και πραγματοποιήθηκε ανάδευση αυτών για 30 δευτερόλεπτα στο σύστημα vortex. Στην συνέχεια, τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν για 10 λεπτά, στα 4000 g, σε θερμοκρασία 20-25 °C. Έπειτα, λήφθηκε 1,5 ml από το προκύπτον διάλυμα και εξατμίστηκε μέχρι ξηρού. Η επαναδιαλυτοποίηση του δείγματος πραγματοποιήθηκε με 0,5 ml sample buffer, ενώ προστέθηκε και 1 ml n-εξάνιο για απολίπανση. Κατόπιν, επαναλήφθηκε ανακίνηση με το vortex για 10 δευτερόλεπτα και φυγοκέντρωση για 10 λεπτά, στα 4000 g και σε 20-25°C. Τέλος, λήφθηκαν 50 μl από την υδατική (κάτω) φάση για την πραγματοποίηση της τεχνικής ELISA.

Επεξεργασία κοτόπουλου

Αρχικά, αναμείχθηκαν 2 gr από κάθε ομογενοποιημένο δείγμα με 6 ml ακετονιτριλίου/νερού (84:16, v/v) και πραγματοποιήθηκε ανάδευση αυτών για 10 δευτερόλεπτα. Έπειτα, τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν για 10 λεπτά, στα 3000 g και σε 15°C. Στην συνέχεια, λήφθηκαν 4 ml από την υπερκείμενη φάση, τα οποία αναμείχθηκαν με 2 ml NaCl 2 M και 7 ml ethylacetate. Το δείγμα ανακινήθηκε για 10 λεπτά και φυγοκεντρήθηκε για 10 λεπτά, στα 3000 g και σε 15°C. Κατόπιν, η υπερκείμενη στοιβάδα εξατμίστηκε έως ξηρού. Η

επαναδιαλυτοποίηση του δείγματος πραγματοποιήθηκε με την προσθήκη 1 ml sample buffer και η απολίπανση έγινε με την χρήση 1ml n-εξανίου. Το δείγμα επανα-φυγοκεντρήθηκε για 10 λεπτά στα 3000 g και σε 15°C. Τέλος, λήφθηκαν 50 μl από την υδατική (κάτω) φάση για την πραγματοποίηση της τεχνικής ELISA.

Βήματα της τεχνικής ELISA

Αρχικά, τοποθετήθηκαν στις διάφορες θέσεις του ELISA kit 50 μl κάθε πρότυπου διαλύματος και κάθε δείγματος. Στην συνέχεια, στον πυθμένα κάθε κοιλότητας εναποτέθηκαν 50 μl διαλύματος συζευγμένου ενζύμου και προστέθηκαν 50 μl διαλύματος αντισωμάτων. Έπειτα, πραγματοποιήθηκε επώαση για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου (20 - 25 °C). Αφού, αφαιρέθηκε το υγρό από τις κοιλότητες προστέθηκε σε αυτές 250 μl ρυθμιστικού διαλύματος πλύσης και αφαιρέθηκε ξανά το υγρό. Η πλύση πραγματοποιήθηκε άλλες δύο φορές. Προστέθηκαν 100 μL υποστρώματος / χρωμογόνου σε κάθε κοιλότητα και το περιεχόμενο επώαστηκε για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου (20 – 25 °C) στο σκοτάδι. Έπειτα, προστέθηκαν 100 μL του διαλύματος διακοπής της αντίδρασης (stop solution) σε κάθε κοιλότητα και πραγματοποιήθηκε η μέτρηση της απορρόφησης στα 450 nm εντός 30 λεπτών μετά την προσθήκη του διαλύματος διακοπής.

Αμινογλυκοσίδες (Στρεπτομυκίνη)

Επεξεργασία κρέατος

Αρχικά, αναμίχθηκαν 5 gr ομογενοποιημένου δείγματος με 20 ml ρυθμιστικού διαλύματος πλύσης. Στην συνέχεια ανακινήθηκαν για 10 δευτερόλεπτα με το σύστημα vortex και εκχυλίστηκαν για 30 λεπτά. Έπειτα έγινε φυγοκέντρηση για 10 λεπτά, στα 4000 g, σε θερμοκρασία δωματίου (20 – 25°C). Κατόπιν, πραγματοποιήθηκε αραιώση του δείγματος 1:10 (συγκεκριμένα 50 μl υπερκείμενου υγρού με 450 μl ρυθμιστικού διαλύματος πλύσης) και ελήφθησαν 50 μl για την πραγματοποίηση της τεχνικής ELISA.

Βήματα της τεχνικής ELISA

Αρχικά, τοποθετήθηκαν στις διάφορες θέσεις του ELISA kit 50 μl κάθε πρότυπου διαλύματος και κάθε δείγματος. Στην συνέχεια, στον πυθμένα κάθε κοιλότητας εναποτέθηκαν 50 μl διαλύματος συζευγμένου ενζύμου και προστέθηκαν 50 μl διαλύματος αντισωμάτων.

Έπειτα, πραγματοποιήθηκε επώαση για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου (20 – 25 °C). Αφού, αφαιρέθηκε το υγρό από τις κοιλότητες προστέθηκαν σε αυτές 250 μl ρυθμιστικού διαλύματος πλύσης και αφαιρέθηκε ξανά το υγρό. Η πλύση πραγματοποιήθηκε άλλες δύο φορές. Προστέθηκαν 100 μL υποστρώματος / χρωμογόνου σε κάθε κοιλότητα και το περιεχόμενο επώαστηκε για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου (20 – 25 °C) στο σκοτάδι. Ύστερα, προστέθηκαν 100 μL του διαλύματος διακοπής της αντίδρασης (stop solution) σε κάθε κοιλότητα και πραγματοποιήθηκε η μέτρηση της απορρόφησης στα 450 nm εντός 15 λεπτών μετά την προσθήκη του διαλύματος διακοπής.

3.4.2. Πειραματική Διαδικασία LC-MS

Παρασκευή πρότυπων διαλυμάτων

Η παρασκευή των πρότυπων διαλυμάτων πραγματοποιήθηκε για τις ενώσεις σουλφομεθοξαζόλη (SMX) και σουλφοδιαζίνη (SDZ), που ανήκουν στην κατηγορία των σουλφοναμιδών. Το αρχικό διάλυμα είχε συγκέντρωση 10 ppm και σε αυτό πραγματοποιήθηκε αραίωση με στόχο την παρασκευή διαλύματος συγκέντρωσης 1 ppm. Τα διαλύματα αυτά χρησιμοποιήθηκαν για την δημιουργία 5 τελικών πρότυπων διαλυμάτων με συγκεντρώσεις 0, 50, 100, 250, 500 ng/ml.

Παρασκευή «φορτισμένων» δειγμάτων κρέατος

Τα «φορτισμένα» δείγματα (spiked) παρασκευάστηκαν χρησιμοποιώντας δείγματα νωπού κρέατος, που ήταν αρνητικά ως προς τις ενώσεις SMX και SDZ. Τα δείγματα αυτά εμβολιάστηκαν διαλύματα αυτών των ουσιών και οι τελικές συγκεντρώσεις τους ήταν 0, 10, 25, 50, 100 ng/gr.

Μέθοδος επεξεργασίας δειγμάτων κρέατος

Αρχικά, αναμείχθηκαν 5 gr κρέατος από κάθε δείγμα με 5 ml από οξιτισμένο ακετονιτρίλιο (0,1% φορμικό οξύ) και πραγματοποιήθηκε εκχύλιση, μέσω ανακίνησης για 10 λεπτά. Στην συνέχεια τα δείγματα τοποθετήθηκαν στην κατάψυξη (-20°C) για 30 λεπτά. Έπειτα,

ακολούθησε φυγοκέντρωση για 10 λεπτά στα 4000 rpm. Από την υπερκείμενη φάση λήφθηκαν 3 ml και πραγματοποιήθηκε εκ νέου η διαδικασία της εκχύλισης στα αρχικά δείγματα. Τα δείγματα επαναποθετήθηκαν στην κατάψυξη για 30 λεπτά, με στόχο την απομάκρυνση του νερού υπό μορφής πάγου. Κατόπιν έγινε εξάτμιση μέχρι ξηρού. Η επαναδιαλυτοποίηση του δείγματος έλαβε χώρα με την προσθήκη 500 μl από την κινητή φάση (98% νερό με 0,1% φορμικό οξύ και 2% ακετονιτρίλιο με 0,1% φορμικό οξύ). Έπειτα, τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν για 10 λεπτά στα 12000 rpm. Τέλος, 100 μl από την υπερκείμενη φάση, κάθε δείγματος, μεταφέρθηκαν σε vials των 2 ml για ανάλυση στο σύστημα LC-MS.

Συνθήκες λειτουργίας υγρού χρωματογράφου (LC)

Η κολώνα της υγρής χρωματογραφίας ήταν τύπου Discovery C18 (25cm) της εταιρίας Supelco και βρισκόταν σε φούρνο θερμοκρασίας 30°C. Ο ρυθμός ροής ήταν 0,6 ml/min, ενώ ο διαλύτης που χρησιμοποιήθηκε ήταν το νερό με 0,1 % φορμικό οξύ και ακετονιτρίλιο με 0,1% φορμικό οξύ.

Πίνακας 3.2: Χρόνος κατακράτησης (Rt), κύρια ιόντα, μοριακό βάρος των SDZ και SMX.

Ενώσεις	Rt (min)	Κύριο ιόν	Δευτερεύον ιόν	Μοριακό βάρος
SDZ	8,016	251	272,95	250,28
SMX	11,11	254	275,95	253,27

Συνθήκες λειτουργίας φασματομέτρου μαζών (MS)

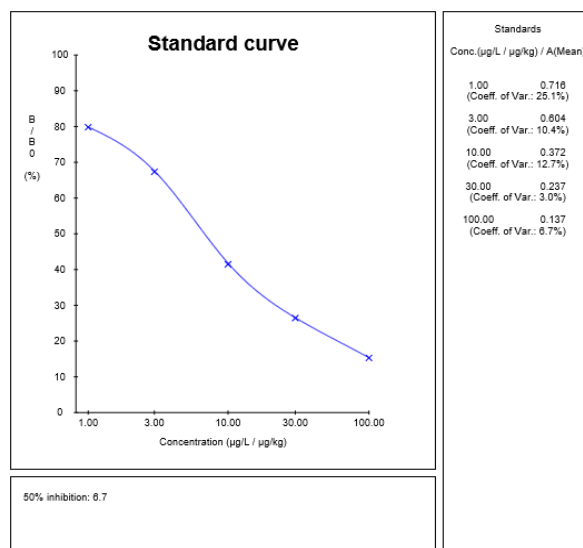
Ο ιονισμός του δείγματος πραγματοποιήθηκε με ηλεκτροψεκασμό (ESI), σε ρύθμιση θετικού ιονισμού. Για τη λήψη των χρωματογραφημάτων χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος SIM (Selecting Ion Monitoring).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

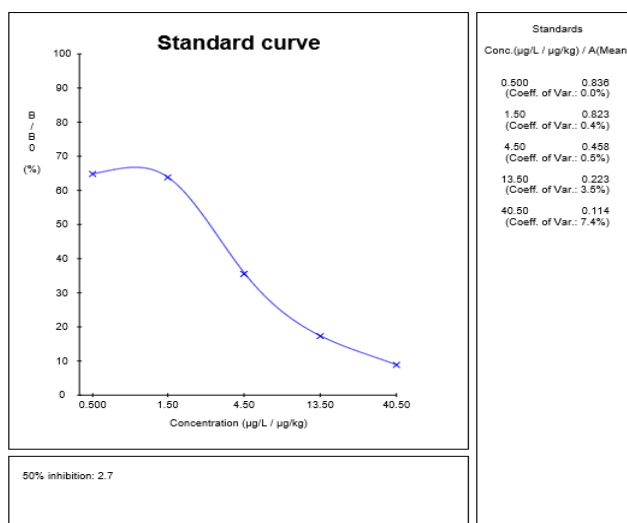
Αποτελέσματα

4.1. Αποτελέσματα Elisa

Αρχικά, δημιουργήθηκαν οι καμπύλες των πρότυπων διαλυμάτων της ELISA για τις σουλφοναμίδες και για τις αμινογλυκοσίδες:



Σχήμα 4.1: Φορτισμένα δείγματα σουλφοναμιδών σε συγκεντρώσεις 1, 3, 10, 30 και 100 µg/kg.



Σχήμα 4.2: Φορτισμένα δείγματα αμινογλυκοσίδων σε συγκεντρώσεις 0,5 , 1,5 , 4,5 , 13,5 και 40,5 µg/kg.

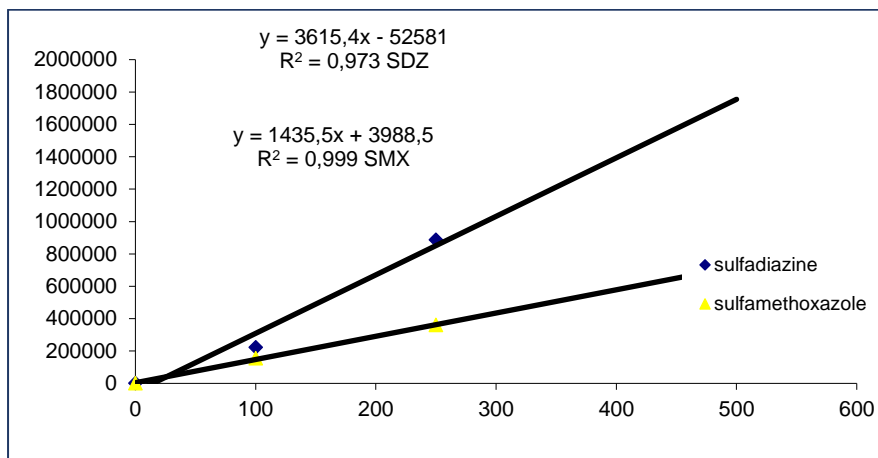
Πίνακας 4.1: Συγκενρωτικά αποτελέσματα ELISA

		<i>Σουλφοναμίδες</i>			<i>Αμινογλυκοσίδες</i>		
N (Αριθμός Δειγμάτων)		Θετικά(%)	Μέσος Όρος Συγκέντρωσης (μg/kg)	Εύρος (μg/kg)	Θετικά(%)	Μέσος Όρος Συγκέντρωσης (μg/kg)	Εύρος (μg/kg)
		Βοοειδή (μυς)	10	90	7,38	2,52-30,04	30
Βοοειδή (ήπαρ)	6	100	23,78	2,10-77,51	17	92,47	-
Χοιρινά (μυς)	10	100	6,31	2,84-18,9	-	-	-
Χοιρινά (ήπαρ)	2	100	47,22	8,41-86,03	-	-	-
Χοιρινά (νεφρό)	6	83	14,00	2,51-31,89	17	151,71	-
Κοτόπουλα (μυς)	9	89	22,87	1,78-157,32	-	-	-
Κοτόπουλα (ήπαρ)	9	100	4,82	2,54-7,18	-	-	-
Κοτόπουλα (νεφρό)	2	100	4,97	4,35-5,60	50	53,44	-

4.2. Αποτελέσματα LC-MS

Γραμμικότητα - Πρότυπα Διαλύματα, LC-MS

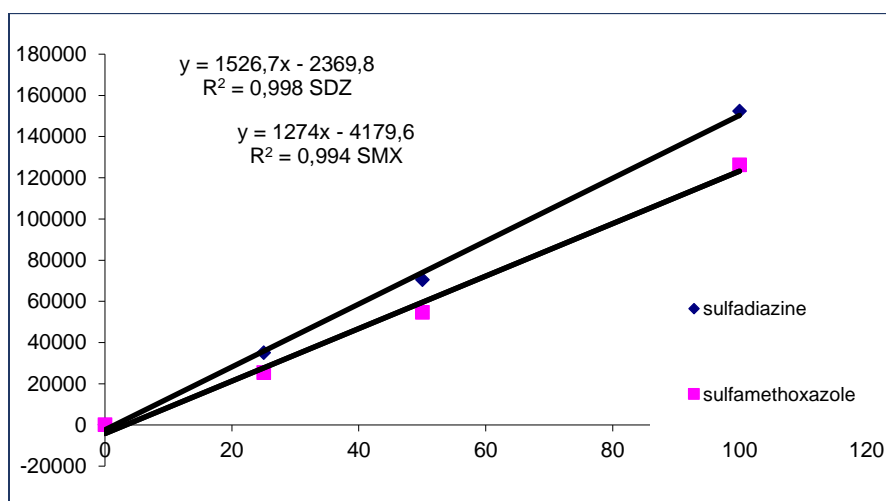
Το τετράγωνο του συντελεστή συσχέτισης (R^2), που χρησιμοποιήθηκε ως μέτρο γραμμικότητας για τα πρότυπα διαλύματα βρέθηκε 0,973 για τη SDZ και 0,999 για τη SMX.



Σχήμα 4.3: Πρότυπα διαλύματα σουλφοναμίδων.

Γραμμικότητα – «Φορτισμένα» Διαλύματα (Spiked), LC-MS

Το τετράγωνο του συντελεστή συσχέτισης (R^2), που χρησιμοποιήθηκε ως μέτρο γραμμικότητας για τα spiked διαλύματα βρέθηκε 0,998 για τη SDZ και 0,994 για τη SMX.



Σχήμα 4.4: Φορτισμένα διαλύματα για σουλφοναμίδες στους μυς.

Πίνακας 4.2: Συγκεντρωτικά αποτελέσματα LC-MS

		Σουλφοναμίδες					
		Σουλφομεθοξαζόλη			Σουλφοδιαζίνη		
	N (Αριθμός δειγμάτων)	Θετικά (%)	Μέσος Όρος Συγκέντρωσης (μg/kg)	Εύρος (μg/kg)	Θετικά (%)	Μέσος Όρος Συγκέντρωσης (μg/kg)	Εύρος (μg/kg)
Βοοειδή (μυς)	10	40	22,42	4,40-66,95	0	-	-
Βοοειδή (ήπαρ)	6	0	-	-	0	-	-
Χοιρινά (μυς)	10	60	12,73	7,23-21,68	0	-	-
Χοιρινά (ήπαρ)	2	50	4,49	-	0	-	-
Χοιρινά (νεφρό)	6	33	7,93	4,86-11,00	0	-	-
Κοτόπουλα (μυς)	9	89	8,23	4,51-22,60	0	-	-
Κοτόπουλα (ήπαρ)	9	22	4,75	3,96-5,54	0	-	-
Κοτόπουλα (νεφρό)	2	0	-	-	0	-	-

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

Συζήτηση Αποτελεσμάτων

Στόχος της παρούσας έρευνας ήταν η μελέτη δειγμάτων νωπού κρέατος ώστε να προσδιοριστούν οι συγκεντρώσεις των σουλφοναμίδων και των αμινογλυκοσίδων σε αυτά. Οι κατηγορίες των ζώων, που μελετήθηκαν είναι τα βοοειδή, τα χοιρινά και τα κοτόπουλα, ενώ οι ιστοί που επιλέχθηκαν είναι οι μύες, το ήπαρ και τα νεφρά.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα για τα δείγματα που επεξεργάστηκαν με την μέθοδο ELISA (Πίνακας 4.1.), τα μεγαλύτερα ποσοστά θετικότητας βρέθηκαν στη κατηγορία των σουλφοναμίδων (>80%). Θετικά ως προς τις σουλφοναμίδες βρέθηκαν όλα τα δείγματα κρέατος που μελετήθηκαν. Αντιθέτως, το ποσοστό θετικότητας ως προς την στρεπτομυκίνη ήταν πολύ μικρό (17 – 50 %) και υπήρξαν και δείγματα, στα οποία δεν ανιχνεύτηκε καθόλου η στρεπτομυκίνη. Τα δείγματα, στα οποία δεν ανιχνεύτηκε η στρεπτομυκίνη ήταν οι μύες και το ήπαρ χοιρινού, οι μύες και το ήπαρ κοτόπουλου.

Παρόλα αυτά παρατηρήθηκε ότι ο μέσος όρος της συγκέντρωσης ήταν μεγαλύτερος για την στρεπτομυκίνη με εύρος 53,44 – 188,88 $\mu\text{g}/\text{kg}$, ενώ για τις σουλφοναμίδες ο μέσος όρος συγκέντρωσης κυμαινόταν σε μικρότερα πλαίσια από 4,82 έως 47,22 $\mu\text{g}/\text{kg}$.

Πιο συγκεκριμένα, όσο αφορά τις σουλφοναμίδες παρατηρήθηκε ότι ο μέσος όρος συγκέντρωσης για το μυ βοοειδών ήταν 7,38 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (2,52 – 30,04 $\mu\text{g}/\text{kg}$), για το ήπαρ βοοειδών 23,78 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (2,10 – 77,51 $\mu\text{g}/\text{kg}$), για το μυ χοιρινών 6,31 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (2,84 – 18,9 $\mu\text{g}/\text{kg}$), για το ήπαρ χοιρινών 47,22 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (8,41 – 86,03 $\mu\text{g}/\text{kg}$), για το νεφρό χοιρινών 14,00 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (2,51 – 31,89 $\mu\text{g}/\text{kg}$), για το μυ κοτόπουλου 22,87 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (1,78 – 157,32 $\mu\text{g}/\text{kg}$), για το ήπαρ κοτόπουλου 4,82 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (2,54 – 7,18 $\mu\text{g}/\text{kg}$) και για το νεφρό κοτόπουλου 4,97 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (4,35 – 5,60 $\mu\text{g}/\text{kg}$). Αντίστοιχα για στην στρεπτομυκίνη ο μέσος όρος συγκέντρωσης ήταν για το για το μυ βοοειδών 188,88 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (135,62 – 239,47 $\mu\text{g}/\text{kg}$), για το ήπαρ βοοειδών 92,47 $\mu\text{g}/\text{kg}$, για το νεφρό χοιρινού 151,71 $\mu\text{g}/\text{kg}$ και για το νεφρό κοτόπουλου 53,44 $\mu\text{g}/\text{kg}$.

Με την μέθοδο LC–MS έγινε διερεύνηση για τις ουσίες σουλφαμεθοξαζόλη και σουλφαδιαζίνη. Όπως παρατηρείται και στον Πίνακα 4.2 δεν ανιχνεύθηκε σε κανένα από τα δείγματα ύπαρξη σουλφαδιαζίνης. Ωστόσο τα ποσοστά θετικότητας στη σουλφαμεθοξαζόλης ήταν 22 – 89 % . Ο μέσος όρος συγκέντρωσης για το μυ βοοειδών είναι 22,42 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (4,40 –

66,95μg/kg), για το μυ χοιρινών 12,73 μg/kg (7,23 – 21,68μg/kg), για το ήπαρ χοιρινών 4,49 μg/kg, για το νεφρό χοιρινών 7,93 μg/kg (4,86 – 11,00μg/kg) , για το μυ κοτόπουλου 8,23 μg/kg (4,51 – 22,60μg/kg) και για το ήπαρ κοτόπουλου 4,75 μg/kg (3,96 – 5,54 μg/kg). Πρέπει να αναφερθεί ότι στα δείγματα από βοδινό ήπαρ και νεφρό κοτόπουλου δεν ανιχνεύτηκε σουλφαμεθοξαζόλη.

Ελάχιστες είναι οι αναφορές στη βιβλιογραφία σχετικά με την ανίχνευση αντιβιοτικών σε δείγματα νωπού κρέατος. Σε έρευνα που διεξήχθη στο Ιράκ, έγινε εκτίμηση των επιπέδων στρεπτομυκίνης σε δείγματα βοδινού μυ με τη μέθοδο της ELISA (A. Abdullah, M. Shareef and H. Sheet, 2012). Το 61% των δειγμάτων που αναλύθηκαν βρέθηκε θετικό σε στρεπτομυκίνη με μέση συγκέντρωση 59,60 μg/kg (26,0 – 282,2 μg/kg). Ωστόσο τα αποτελέσματά μας διαφοροποιούνται σε σχέση με την προαναφερθείσα μελέτη καθώς στην παρούσα έρευνα το ποσοστό θετικότητας για τα δείγματα βοδινού μυ είναι 30% και η μέση συγκέντρωση 188,88 μg/kg (135,62 – 239,47μg/kg). Λίγα χρόνια μετά, στη Νότια Αφρική, πραγματοποιήθηκε μελέτη σε δείγματα χοιρινού μυ, ήπατος και νεφρού, με τη μέθοδο της ELISA. Ανιχνεύθηκαν υπολείμματα σουλφοναμίδων στα δείγματα χοιρινού ήπατος και νεφρού αλλά όχι στα δείγματα χοιρινού μυ (Ramatlal *et al.*, 2017). Συγκεκριμένα, το 9% των δειγμάτων χοιρινού ήπατος και το 36 % των δειγμάτων χοιρινού νεφρού βρέθηκαν θετικά με μέση τιμή συγκεντρώσεων 58,50 μg/kg (48,2-69,9 μg/kg) και 72,70 μg/kg (52,8 – 92,8 μg/kg), αντίστοιχα. Παρόμοια τάση παρατηρήθηκε και στα δικά μας δείγματα, όπου τα δείγματα χοιρινού ήπατος (47,22 μg/kg, εύρος 8,41-86,03 μg/kg) και νεφρού (14,00 μg/kg, εύρος 2,51 – 31,89μg/kg) παρουσίασαν αρκετά μεγαλύτερες συγκεντρώσεις σε σχέση με τα δείγματα χοιρινού μυ (6,31 μg/kg, εύρος 2,84 – 18,90 μg/kg).

Η παρούσα μελέτη συμβάλλει στην αξιολόγηση της εισβολής υπολειμμάτων αντιβιοτικών ουσιών στην τροφική αλυσίδα και πως αυτά επιβαρύνουν την τροφή του καταναλωτή. Η χορήγηση αντιβιοτικών αποτελεί ένα από τα πιο σημαντικά θέματα που καλείται να αντιμετωπίσει η επιστημονική κοινότητα καθώς διακυβεύεται η υγεία των καταναλωτών. Περαιτέρω έρευνες λοιπόν πρέπει να διεξαχθούν προκειμένου να διευκρινιστεί η έκταση της έκθεσης του καταναλωτή σε αυτές τις ουσίες μέσω της τροφής του.

Βιβλιογραφία

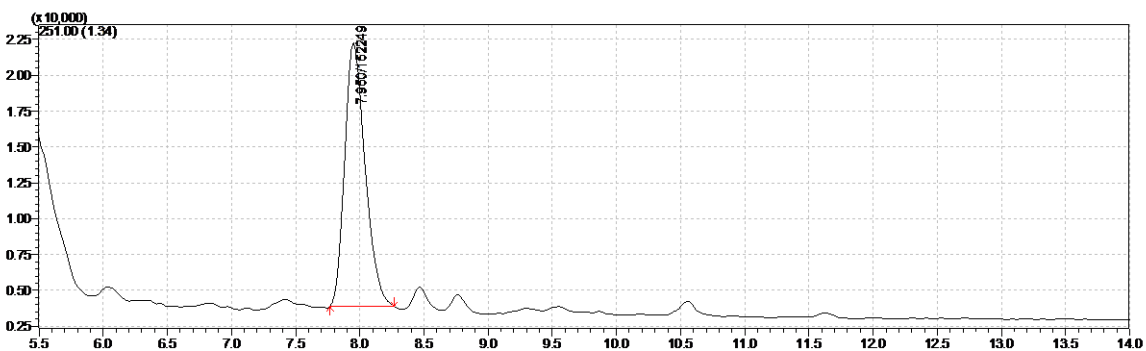
- [1] A. Abdullah, O., M. Shareef, A. and H. Sheet, O. (2012) ‘Detection of streptomycin residues in local meat of bovine and ovine’, *Iraqi Journal of Veterinary Sciences*, 26(1), pp. 43–46. doi: 10.33899/ijvs.2012.46958.
- [2] Alistair B. A. Boxall, Dana W. Kolpin, Bent Halling-Sorensen, J. T. (2003) ‘Are Veterinary Medicines Causing Environmental Risks?’, *Environmental Science & Technology*, 37, pp. 286A-294A. doi: 10.1016/b978-0-08-047163-1.00586-5.
- [3] Brackett, C. C., Singh, H. and Block, J. H. (2004) ‘Likelihood and mechanisms of cross-allergenicity between sulfonamide antibiotics and other drugs containing a sulfonamide functional group’, *Pharmacotherapy*, 24(7 I), pp. 856–870. doi: 10.1592/phco.24.9.856.36106.
- [4] Castanon, J. I. R. (2007) ‘History of the use of antibiotic as growth promoters in European poultry feeds’, *Poultry Science*, 86(11), pp. 2466–2471. doi: 10.3382/ps.2007-00249.
- [5] Crowther, J. R. (2000) *The ELISA guidebook., Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*. doi: 10.1134/s000629790909017x.
- [6] Dowling, P. M. (2013) *Aminoglycosides and Aminocyclitols. Principles of Antimicrobial Drug Selection and Use. In: Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine*. 5th editio. Edited by and P. M. D. Giguère, S., J.F. Prescott. In Wiley Blackwell, Ames, Iowa, USA, Oxford.
- [7] Kempf, I. *et al.* (2013) ‘Effect of in-feed paromomycin supplementation on antimicrobial resistance of enteric bacteria in turkeys’, *Veterinary Journal*. Elsevier Ltd, 198(2), pp. 398–403. doi: 10.1016/j.tvjl.2013.05.030.
- [8] Mingeot-Leclercq, M. P., Glupczynski, Y. and Tulkens, P. M. (1999) ‘Aminoglycosides: Activity and resistance’, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 43(4), pp. 727–737. doi: 10.1128/aac.43.4.727.
- [9] Prithika, S. (2004) ‘Sulfonamides: Chemistry, Classification and Adverse Reactions | Animals’, *Biology Discussion*.
- [10] Ramatla, T. *et al.* (2017) ‘Evaluation of antibiotic residues in raw meat using different analytical methods’, *Antibiotics*, 6(4), pp. 1–17. doi: 10.3390/antibiotics6040034.
- [11] Ramirez, M. S. and Tolmasky, M. E. (2010) ‘Aminoglycoside modifying enzymes’, *Drug Resistance Updates*. Elsevier Ltd, 13(6), pp. 151–171. doi: 10.1016/j.drug.2010.08.003.
- [12] Rice DN, S. B. (1996) *Use of animal drugs in livestock management*. Lincoln, Nebraska:

University of Nebraska Cooperative Extension, University of Nebraska.

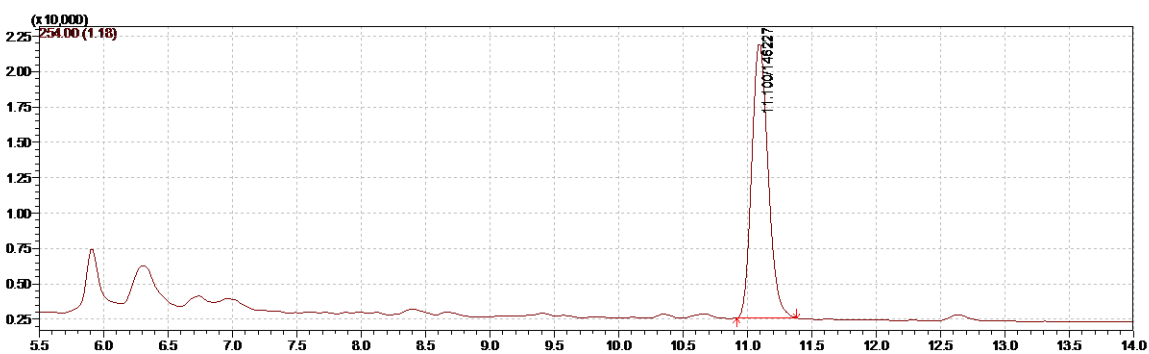
- [13] Sarmah, A. K., Meyer, M. T. and Boxall, A. B. A. (2006) ‘A global perspective on the use, sales, exposure pathways, occurrence, fate and effects of veterinary antibiotics (VAs) in the environment’, *Chemosphere*, 65(5), pp. 725–759. doi: 10.1016/j.chemosphere.2006.03.026.
- [14] Skoog, Holler, C. (2007) *Αρχές Ενόργανης Ανάλυσης*. 6η Έκδοση. Αθήνα: Κωσταράκη Εκδόσεις.
- [15] Stubbings, W. *et al.* (2006) ‘Mechanisms of the post-antibiotic effects induced by rifampicin and gentamicin in *Escherichia coli*’, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 58(2), pp. 444–448. doi: 10.1093/jac/dkl225.
- [16] Tacic, A. *et al.* (2017) ‘Antimicrobial sulfonamide drugs’, *Advanced technologies*, 6(1), pp. 58–71. doi: 10.5937/savteh1701058t.
- [17] Tyrpenou, A. E. (2008) ‘Drugs and Enviroment’, *Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society*, 60(2), pp. 161–178.
- [18] Wilson, D. N. (2014) ‘Ribosome-targeting antibiotics and mechanisms of bacterial resistance’, *Nature Reviews Microbiology*. Nature Publishing Group, 12(1), pp. 35–48. doi: 10.1038/nrmicro3155.
- [19] Κωνσταντίνος Κοτροκόης, Ε. Π. (2009) *Διατροφή & Χημεία Τροφίμων στη Δημόσια Υγεία*. Αθήνα: Π.Χ. ΠΑΣΧΑΛΙΔΗΣ.
- [20] Μουζούρας, Σ. Γ. (1996) *Κτηνιατρική Φαρμακολογία*. Edited by Σ. Γ. Μουζούρας. Αθήνα.

Παράρτημα

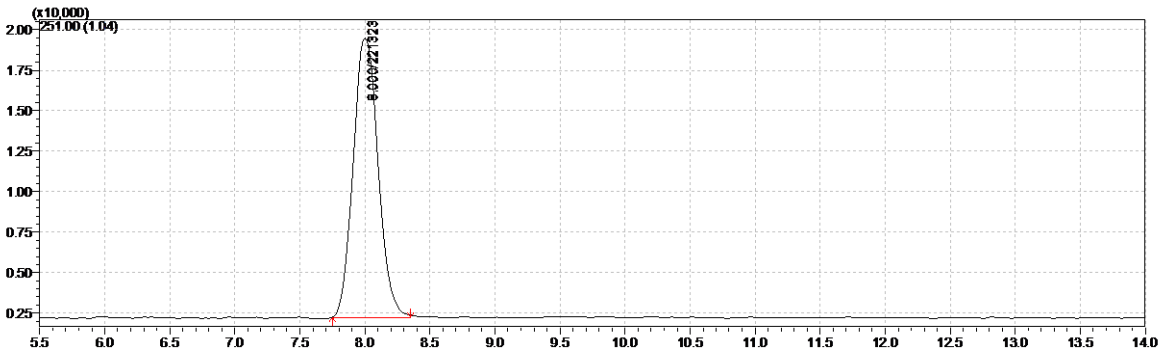
I. Χρωματογραφήματα



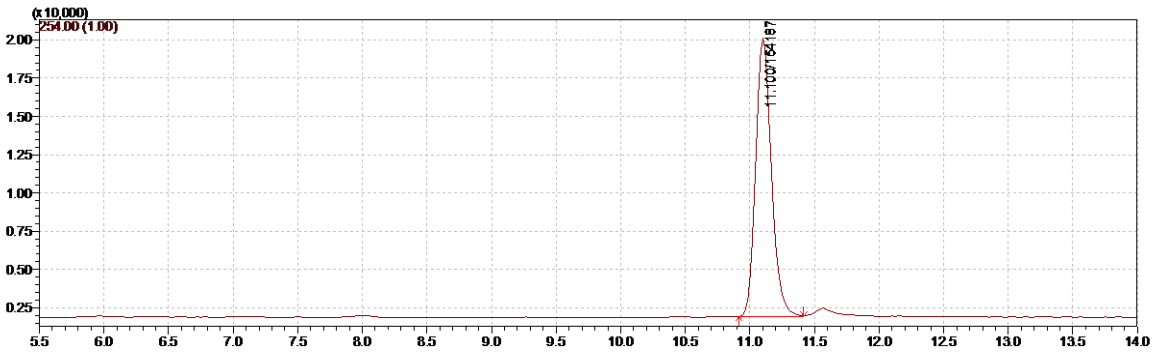
Σχήμα I.1: Χρωματογράφημα spiked δείγματος συγκέντρωσης 100 µg/kg. Rt: 8,0 - Sulfadiazine



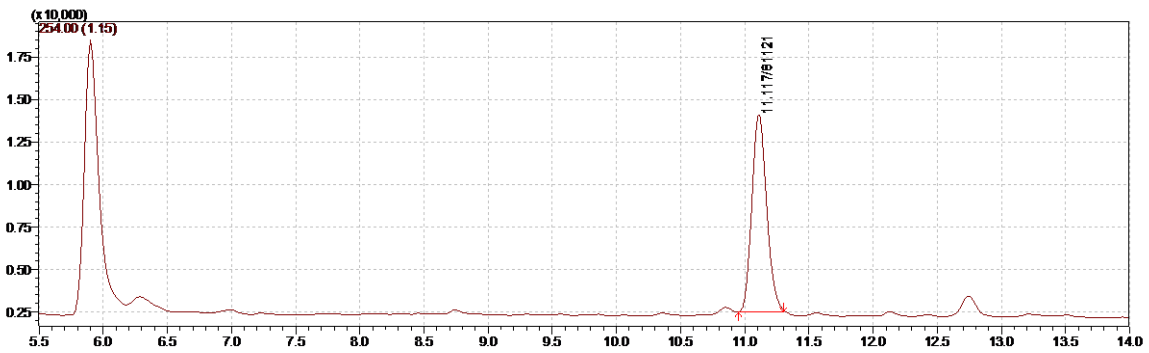
Σχήμα I.2: Χρωματογράφημα spiked δείγματος συγκέντρωσης 100 µg/kg. Rt: 11,1 - Sulfamethoxazole



Σχήμα1.3: Χρωματογράφημα πρότυπου διαλύματος συγκέντρωσης 100 ng/ml. Rt: 8,0 - Sulfadiazine



Σχήμα1.4: Χρωματογράφημα πρότυπου διαλύματος συγκέντρωσης 100 ng/ml. Rt: 11,1 - Sulfamethoxazole



Σχήμα1.5: Χρωματογράφημα θετικού δείγματος (24BM) σε Sulfamethoxazole