ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ

ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΤΟΞΙΚΟΛΟΓΙΑΣ & ΕΓΚΛΗΜΑΤΟΛΟΓΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ, ΤΟΜΕΑΣ ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑΣ, ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ, ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΙΠΕΔΩΝ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΩΝ ΣΕ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΝΩΠΟΥ ΚΡΕΑΤΟΣ ΜΕ ΑΝΟΣΟΧΗΜΙΚΕΣ ΚΑΙ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΥΣ

ΑΘΗΝΑ Γ. ΣΤΑΥΡΟΥΛΑΚΗ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: ΑΠΟΣΤΟΛΟΣ Κ. ΡΙΖΟΣ

ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2019

UNIVERSITY OF CRETE

DEPARTMENT OF CHEMISTRY

GENERAL POSTGRADUATE PROGRAMME

LABORATORY OF TOXICOLOGY AND FORENSIC SCIENCES, MEDICAL SCHOOL, HERAKLION, UNIVERSITY OF CRETE

MASTER THESIS

DETERMINATION OF ANTIBIOTICS LEVELS IN MEAT SAMPLES WITH IMMUNOCHEMICAL AND CHROMATOGRAPHIC METHODS

ATHINA G. STAVROULAKI

MASTER THESIS SUPERVISOR: Prof. APOSTOLOS K. RIZOS

HERAKLION 2019

«Κάλλιον του θεραπεύειν το προλαμβάνειν»

Ιπποκράτης, 460-370 π.Χ. , Πατέρας της Ιατρικής

Εξεταστική Επιτροπή

Απόστολος Κ. Ρίζος

Καθηγητής Φυσικοχημείας, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης (Επιβλέπων)

Αριστείδης Μ. Τσατσάκης

Καθηγητής Τοξικολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Κρήτης

Εμμανουήλ Ν. Τζατζαράκης

Επίκουρος Καθηγητής Τοξικολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Κρήτης

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Καθηγητή κ. Αριστείδη Τσατσάκη, διευθυντή του Εργαστηρίου Τοξικολογίας και Εγκληματολογικής Χημείας για την παραχώρηση των χώρων και των εξοπλισμών των εργαστηρίων του, για την διεξαγωγή των πειραμάτων μου.

Επιπρόσθετα, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Μανώλη Τζατζαράκη για τις πολύτιμες συμβουλές και γνώσεις που παρείχε καθώς επίσης και την υπομονή του. Ακόμα, ευχαριστώ το ανθρώπινο δυναμικό του εργαστηρίου για την βοήθεια, την άριστη συνεργασία και τη συμπαράσταση καθ' όλη τη διάρκεια της μεταπτυχιακής έρευνας.

Επίσης, θέλω να ευχαριστήσω τον Καθηγητή κ. Καρδάση και τον Καθηγητή κ. Τζανακάκη για την παραχώρηση εξοπλισμού των εργαστηρίων τους. Ευχαριστώ τον Καθηγητή κ. Απόστολο Ρίζο για τις συμβουλές του και για τη δυνατότητα που μου έδωσε να ασχοληθώ με ένα θέμα μείζονος σημασίας για την ανθρώπινη υγεία. Πάνω από όλα ευχαριστώ την οικογένειά μου, για την υπομονή, τη στήριξη και την κατανόηση που έδειξαν, και τους φίλους μου για την υποστήριξή τους.

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

Η μεταπτυχιακή φοιτήτρια Σταυρουλάκη Αθηνά γεννήθηκε στο Ηράκλειο Κρήτης, Ελλάδα, στις 29 Νοεμβρίου 1995. Το Νοέμβριο του 2017 αποφοίτησε από το Τμήμα Χημείας του Πανεπιστημίου Κρήτης. Τον Ιούνιο του 2017 ολοκλήρωσε την πτυχιακή εργασία της, στο Εργαστήριο Τοξικολογίας & Εγκληματολογικής Χημείας, της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Κρήτης με τίτλο «Προσδιορισμός των επιπέδων ενδοκρινικών διαταρακτών σε δείγματα τριχών από έγκυες γυναίκες.». Την περίοδο Ιούλιος-Σεπτέμβριος του 2017 εκπόνησε την πρακτική άσκησή της στο Εργαστήριο Κλινικής Χημείας-Βιοχημείας του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Ηρακλείου (ΠΑ.Γ.Ν.Η). Σκοπός της πρακτικής άσκησης ήταν η εξοικείωση και εφαρμογή βιοχημικών και αναλυτικών μεθόδων σε δείγματα (αίμα, ούρα και εγκεφαλονωτιαίο υγρό) για εξακρίβωση βιολογικών δεικτών που σχετίζονται με παραμέτρους υγείας. Από τον Οκτώβριο του 2017 είναι μεταπτυχιακή φοιτήτρια του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Κρήτης σε συνεργασία με το Εργαστήριο Τοξικολογίας και Εγκληματολογικής Χημείας, της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Κρήτης.

Η έρευνά της επικεντρώνεται στην ανάπτυξη και στην εφαρμογή χρωματογραφικών και ανοσοχημικών μεθόδων για την ανάλυση τροφίμων, αλλά και βιολογικών δειγμάτων. Σκοπός της μεταπτυχιακής της έρευνας είναι ο προσδιορισμός των επιπέδων συγκεντρώσεων αντιβιοτικών σε δείγματα νωπών κρεάτων, καθώς η ανεξέλεγκτη κατανάλωση αντιβιοτικών άμεσα ή και έμμεσα, βλάπτει την υγεία του ανθρώπου και μπορεί να οδηγήσει σε ανθεκτικότητα σε αυτά.

<u>Ανακοινώσεις σε Συνέδρια</u>

- Katsikantami I, Karzi V, Tzatzarakis MN, Vakonaki E, **Stavroulaki A**, Xezonaki P, Sifakis S, Tsatsakis AM, Rizos A. Phenolic endocrine disruptors' concentration levels in hair of Greek pregnant women. 53rd Congress of the European Societies of Toxicology (EUROTOX). 10-13 September 2017. Bratislava, Slovakia.
- Karzi V, Katsikantami I,Tzatzarakis MN, Vakonaki E, Iatrou E, **Stavroulaki A**, Xezonaki P, Sifakis S, Rizos A, Tsatsakis AM. Prenatal exposure to parabens and triclosan and assessment of possible health impacts.55th Congress of the European Societies of Toxicology (EUROTOX). 8-11 September 2019. Helsinki, Finland.

Δημοσιεύσεις

- Katsikantami I, Karzi V, Tzatzarakis MN, Vakonaki E, **Stavroulaki A**, Xezonaki P, Sifakis S, Tsatsakis AM, Rizos A. Phenolic endocrine disruptors' concentration levels in hair of Greek pregnant women. 53rd Congress of the European Societies of Toxicology (EUROTOX). 10-13 September 2017. Bratislava, Slovakia, *Toxicology Letters*. 2017; 280:S248.
- Karzi V, Katsikantami I,Tzatzarakis MN, Vakonaki E, Iatrou E, **Stavroulaki A**, Xezonaki P, Sifakis S, Rizos A, Tsatsakis AM. Prenatal exposure to parabens and triclosan and assessment of possible health impacts.55th Congress of the European Societies of Toxicology (EUROTOX). 8-11 September 2019. Helsinki, Finland, *Toxicology Letters*, 2019; 314:S81.
- Karzi V, Tzatzarakis M, Katsikantami I, **Stavroulaki A**, Alegakis A, Vakonaki E, Xezonaki P., Sifakis S., Rizos A., Tsatsakis AM. Investigating exposure to endocrine disruptors via hair analysis of pregnant women. *Environmental Research*. 2019;178:108692
- Katsikantami I., Tzatzarakis MN, Karzi V, **Stavroulaki A**, Xezonaki P, Vakonaki E, Alegakis AK, Sifakis S, Rizos A, Tsatsakis AM. Biomonitoring of bisphenols A and S and phthalate metabolites in hair from pregnant women in Crete (Προς δημοσίευση, υπό αναθεώρηση).

CURRICULUM VITAE

Athina Stavroulaki was born in Heraklion, Crete, Greece on November 29, 1995. In November 2017 she graduated from the Department of Chemistry, University of Crete. In June 2017 she accomplished her thesis in the Laboratory of Toxicology & Forensic Sciences, Medical School, University of Crete, entitled "Determination of endocrine disruption levels in hair samples from pregnant women". During the period July-September 2017 she completed her internship at the Clinical Chemistry-Biochemistry Laboratory of the University Hospital of Heraklion (PAGNH). The purpose of this internship was to get familiar and apply biochemical and analytical methods in samples (blood, urine and cerebrospinal fluid) to verify biological markers related to health parameters. Since October 2017 she is a postgraduate student at the Department of Chemistry, University of Crete in collaboration with the Laboratory of Toxicology and Forensic Sciences, Medical School, University of Crete.

Her research interests focus on the development and application of chromatographic and immunochemical methods for analysis of food and biological samples. The aim of the postgraduate research is to determine levels of antibiotics in meat samples, because uncontrolled consumption of antibiotics, directly or indirectly, damages human health and can lead to antibiotic resistance.

Abstracts in Congresses

- Katsikantami I, Karzi V, Tzatzarakis MN, Vakonaki E, **Stavroulaki A**, Xezonaki P, Sifakis S, Tsatsakis AM, Rizos A. Phenolic endocrine disruptors' concentration levels in hair of Greek pregnant women. 53rd Congress of the European Societies of Toxicology (EUROTOX). 10-13 September 2017. Bratislava, Slovakia.
- Karzi V, Katsikantami I,Tzatzarakis MN, Vakonaki E, Iatrou E, **Stavroulaki A**, Xezonaki P, Sifakis S, Rizos A, Tsatsakis AM. Prenatal exposure to parabens and triclosan and assessment of possible health impacts.55th Congress of the European Societies of Toxicology (EUROTOX). 8-11 September 2019. Helsinki, Finland.

Publications

- Katsikantami I, Karzi V, Tzatzarakis MN, Vakonaki E, **Stavroulaki A**, Xezonaki P, Sifakis S, Tsatsakis AM, Rizos A. Phenolic endocrine disruptors' concentration levels in hair of Greek pregnant women. 53rd Congress of the European Societies of Toxicology (EUROTOX). 10-13 September 2017. Bratislava, Slovakia, *Toxicology Letters*. 2017; 280:S248.
- Karzi V, Katsikantami I,Tzatzarakis MN, Vakonaki E, Iatrou E, **Stavroulaki A**, Xezonaki P, Sifakis S, Rizos A, Tsatsakis AM. Prenatal exposure to parabens and triclosan and assessment of possible health impacts.55th Congress of the European Societies of Toxicology (EUROTOX). 8-11 September 2019. Helsinki, Finland, *Toxicology Letters*, 2019; 314:S81.
- Karzi V, Tzatzarakis M, Katsikantami I, **Stavroulaki A**, Alegakis A, Vakonaki E, Xezonaki P., Sifakis S., Rizos A., Tsatsakis AM. Investigating exposure to endocrine disruptors via hair analysis of pregnant women. *Environmental Research*. 2019;178:108692
- Katsikantami I., Tzatzarakis MN, Karzi V, **Stavroulaki A**, Xezonaki P, Vakonaki E, Alegakis AK, Sifakis S, Rizos A, Tsatsakis AM. Biomonitoring of bisphenols A and S and phthalate metabolites in hair from pregnant women in Crete (In press, under revision).

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα αντιβιοτικά χρησιμοποιούνται ευρέως για την καταπολέμηση ασθενειών που οφείλονται κυρίως σε βακτήρια. Στις περιπτώσεις που δεν χρησιμοποιούνται με ορθό τρόπο, στην κτηνοτροφία, τα υπολείμματα αυτών στους εδώδιμους ιστούς αποτελούν σοβαρό κίνδυνο για τους καταναλωτές. Στόχος της συγκεκριμένης έρευνας ήταν ο προσδιορισμός των επιπέδων, των αντιβιοτικών σουλφοναμίδες, τετρακυκλίνες, αμινογλυκοσίδες και φθοροκινολόνες σε δείγματα βοδινού, κοτόπουλου και χοιρινού κρέατος (μυς, ήπαρ, νεφρό). Τα 54 δείγματα συγκεντρώθηκαν από κρεοπωλεία του Ηρακλείου και του Ρεθύμνου Κρήτης.

Η ανάλυση των δειγμάτων έγινε με Δοκιμασία Ενζυμο-Συζευγμένης Ανοσοπροσρόφησης (Enzyme-linked Immunosorbent Assay, ELISA) και με Υγρή χρωματογραφία υποβοηθούμενη με Ιοντισμό από Ηλεκτροψεκασμό και Συζευγμένη από Φασματομετρία Μαζών (Liquid Chromatography-Electrospray Ionization-Mass Spectrometry, LC-ESI-MS). Με τη μέθοδο ELISA ανιχνεύθηκε η ύπαρξη σουλφοναμίδων σε όλα τα δείγματα βοδινού ήπατος (2,10-77,51 μg/kg), χοιρινού μυ (2,84-18,90 μg/kg) και ήπατος (8,41-86,03 μg/kg), ήπατος (2,54-7,18 μg/kg) και νεφρού κοτόπουλου (4,35-5,60 μg/kg), στο 90% βοδινών μυών (2,52-30,04 μg/kg), στο 83% χοιρινών νεφρών (2,51-31,89 μg/kg) και στο 89% μυών κοτόπουλου (1,78-157,32 μg/kg). Το μεγαλύτερο ποσοστό τετρακυκλινών (50%) ανιχνεύθηκε σε χοιρινούς νεφρούς (3,88-6,99 μg/kg) και ακολούθως σε μυ (11%) και ήπαρ κοτόπουλου (11%). Οι αμινογλυκοσίδες ανιχνεύθηκαν στο 50% νεφρού κοτόπουλου (53,44 μg/kg), στο 30% βοδινού μυ (135,62-239,47 μg/kg), στο 17% χοιρινού νεφρού (151,71 μg/kg) και στο 17% του βοδινού ήπατος (92,47 μg/kg). Οι φθοροκινολόνες ανιχνεύθηκαν σε όλα τα δείγματα νεφρού κοτόπουλου (11,96-14,92 μg/kg), στο 50% του χοιρινού νεφρού (91,74-255,35 μg/kg), στο 44% του μυ κοτόπουλου (12,76-327,60 μg/kg), στο 33% του ήπατος κοτόπουλου (10,42-31,20 μg/kg) και στο 20% του βοδινού μυ (22,36-79,20 μg/kg).

Με τη μέθοδο LC-ESI-MS, ανιχνεύθηκε σουλφαμεθοξαζόλη, μία ουσία που ανήκει στην οικογένεια των σουλφοναμίδων, σε ποσοστό 89% των δειγμάτων μυών κοτόπουλου και στο 40% των δειγμάτων μυών βοδινού με μέσο όρο συγκέντρωσης 8,23 μg/kg (4,51-22,60 μg/kg) και 22,42 μg/kg (4,40-66,95 μg/kg), αντίστοιχα. Όσον αφορά τις τετρακυκλίνες, θετικά σε οξυτετρακυκλίνη, βρέθηκαν όλα τα δείγματα χοιρινού ήπατος καθώς και νεφρού και ήπατος κοτόπουλου, αλλά και στο 83% των δειγμάτων βοδινού ήπατος. Αντιστοίχως, ο μέσος όρος συγκέντρωσης ήταν 34,80 μg/kg (24,10-45,50 μg/kg), 10,38 μg/kg (5,46-16,69 μg/kg), 59,21 μg/kg (18,59-149,69 μg/kg και 84,31 μg/kg (66,60-110,63 μg/kg).

Επιπρόσθετα, η δοξυκυκλίνη βρέθηκε στο 50% των δειγμάτων χοιρινού ήπατος και νεφρού και στο 30% των δειγμάτων χοιρινού μυ, με μέσο όρο συγκέντρωσης 26,98 μg/kg, 169,57 μg/kg (12,39-314,60 μg/kg) και 28,47 μg/kg (12,84-44,10 μg/kg), αντίστοιχα. Από τις φθοροκινολόνες η ενροφλοξασίνη ανιχνεύθηκε σε όλα τα δείγματα νεφρού κοτόπουλου με μέσο όρο συγκέντρωσης 2,10 μg/kg (1,43-2,77 μg/kg) και η μαρβοφλοξασίνη σε όλα τα δείγματα χοιρινού νεφρού με μέσο όρο συγκέντρωσης 0,86 μg/kg (0,72-1,33 μg/kg).

Με την ELISA, διαπιστώθηκε ότι ένα δείγμα μυ κοτόπουλου (157,32 μg/kg) ξεπέρασε τα αποδεκτά ευρωπαϊκά όρια για τις σουλφοναμίδες [Maximum Residue Levels, MRLs-Commission Regulation (EU) No 37/2010]. Σχετικά με τις φθοροκινολόνες, ανιχνεύθηκε ένα δείγμα χοιρινού νεφρού (255,35 μg/kg) και ένα μυ κοτόπουλου (327,60 μg/kg), των οποίων οι συγκεντρώσεις ήταν πάνω από τα MRL's.

Με το LC-ESI-MS παρατηρήθηκαν υψηλά ποσοστά θετικών δειγμάτων σε οξυτετρακυκλίνη. Ωστόσο, υψηλότερες ήταν οι συγκεντρώσεις της δοξυκυκλίνης. Η παρούσα έρευνα είναι η πρώτη που ασχολείται με τον προσδιορισμό των σουλφοναμίδων, τετρακυκλινών, αμινογλυκοσίδων και φθοροκινολόνων στα συγκεκριμένα είδη κρέατος με συνδυασμό μίας ανοσοχημικής και μίας χρωματογραφικής μεθόδου.

Λέξεις κλειδιά: *τετρακυκλίνες, σουλφοναμίδες, φθοροκινολόνες, αμινογλυκοσίδες, κρέας, αντιβιοτικά, ELISA, LC-ESI-MS*

ABSTRACT

Antibiotics are widely used to cure diseases caused, mainly, by bacteria. In cases of livestock farming that they are used irrationally, residues of these substances present in edible tissues constitute a serious risk for consumers. The aim of the current research was the determination of the levels of sulfonamides, tetracyclines, aminoglycosides, and fluoroquinolones in samples of beef, chicken and pork (muscle, liver, and kidney). The 54 samples were collected from butcheries of Heraklion and Rethymnon, Crete, Greece.

The samples were analysed with Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) and Liquid Chromatography-Electrospray Ionization-Mass Spectrometry (LC-ESI-MS). ELISA detected the presence of sulphonamides in all samples of bovine liver (2.10-77.51 μg/kg), pork muscle (2.84-18.90 μg/kg) and liver (8.41-86.03 μg/kg), chicken liver (2.54-7.18 μg/kg) and kidney (4.35-5.60 μg/kg), 90% bovine muscle (2.52-30.04 μg/kg), 83% pork kidney (2.51-31.89 μg/kg) and 89% chicken muscle (1.78-157.32 μg/kg). The majority of tetracyclines (50%) was detected in pork kidneys (3.88-6.99 μg/kg) and subsequently in chicken muscle (11%) and liver (11%). Aminoglycosides were detected in 50% of chicken kidney (53.44 μg/kg), in 30% of bovine muscle (135.62-239.47 μg/kg), in 17% of pork kidney (151.71 μg/kg) and in 17% of bovine liver (92.47 μg/kg). Fluoroquinolones were detected in all chicken kidney samples (11.96-14.92 μg/kg), 50% of the pork kidney (91.74-255.35 μg/kg), 44% of the chicken muscle (12.76-327.60 μg/kg), 33% of the chicken liver (10.42-31.20 μg/kg) and 20% of the bovine muscle (22.36-79.20 μg/kg).

Using LC-ESI-MS, sulfamethoxazole, an antibiotic belonging to sulfonamides family, was detected in 89% of chicken muscle samples and in 40% of bovine muscle samples with average concentration 8.23 μg/kg (4.51-22.60 μg/kg) and 22.42 μg/kg (4.40-66.95 μg/kg), respectively. Positive for oxytetracycline (tetracyclines antibiotics family), were all pork liver, chicken kidney and liver samples and also in 83% of bovine liver samples. Respectively, the average concentration was 34.80 μg/kg (24.10-45.50 μg/kg), 10.38 μg/kg (5.46-16.69 μg/kg), 59.21 μg/kg (18.59-149.69 μg/kg and 84.31 μg/kg (66.60-110.63 μg/kg). In addition, doxycycline (tetracyclines antibiotics family) was found in 50% of pork liver and kidney samples and 30% of pork muscle samples, with average concentration 26.98 μg/kg, 169.57 μg/kg (12.39-314.60 μg/kg) and 28.47 μg/kg (12.84-44.10 μg/kg), respectively. In regard with fluoroquinolones, enrofloxacin was detected in all chicken kidney samples with average

concentration 2.10 μg/kg (1.43-2.77 μg/kg) and marbofloxacin in all pork kidney samples with average concentration 0.86 μg/kg (0.72-1.33 μg/kg).

Using ELISA, it was observed that a sample of chicken muscle (157.32 μg/kg) exceeded acceptable European Residue Limits for sulfonamides (Maximum Residue Levels, MRL's-Commission Regulation (EU) no 37/2010). For fluoroquinolones, one sample of pork kidney (255.35 μg/kg) and one of chicken muscle (327.60 μg/kg) presented concentrations above the MRLs.

High frequency of positive samples was observed for oxytetracycline by LC-ESI-MS. However, the concentrations of doxycycline were higher. The present research is the first to address the determination of sulphonamides, tetracyclines, aminoglycosides and fluoroquinolones in these meat species by one immunochemical and one chromatographic method.

Keywords: *tetracyclines, sulphonamides, fluoroquinolones, aminoglycosides, meat, antibiotics, ELISA, LC-ESI-MS*

Περιεχόμενα

Εισαγωγή 16
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1^{ο} : ΠΡΟΪΟΝΤΑ ΖΩΙΚΗΣ ΠΡΟΕΛΕΥΣΗΣ 16
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2^{ο}: ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ 18
2.1. Τα Αντιβιοτικά στην Κτηνοτροφία 18
2.2. Κανονισμοί της Ευρωπαϊκής Ένωσης 21
2.3. Ανώτατα Επιτρεπτά Όρια 22
2.4. Κατηγορίες Αντιβιοτικών 23
2.4.1 Φθοροκινολόνες (FQNL's) 25
2.4.2. Σουλφοναμίδες (SA's) 38
2.4.3 Τετρακυκλίνες (TC's) 46
2.4.4 Αμινογλυκοσίδες (AG's) 54
2.5. Μέθοδοι Ανίχνευσης των Αντιβιοτικών 63
2.5.1. Μέθοδος ELISA 63
2.5.2. Χρωματογραφία 66
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3^{ο}: ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ 68
3.1. Υλικά και Μέθοδοι 68
3.2. Δείγματα Νωπού Κρέατος 71
3.3. Προσδιορισμός των Αντιβιοτικών 73
Κεφάλαιο 4^{ο}: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ 79
Κεφάλαιο 5^{ο}: ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ 95
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ 99
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 106

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

FQNL's: Fluoroquinolones (Φθοροκινολόνες)

AG's: Aminoglycosides (Αμινογλυκοσίδες)

SA's: Sulfonamides (Σουλφοναμίδες)

TC's: Tetracyclines (Τετρακυκλίνες)

STR: Streptomycin (Στρεπτομυκίνη)

PCN: Penicillin (Πενικιλλίνη)

GEN: Gentamicin (Γενταμικίνη)

SMX: Sulfamethoxazole (Σουλφαμεθοξαζόλη)

SDZ: Sulfadiazine (Σουλφαδιαζίνη)

TMP: Trimethoprim (Τριμεθοπρίμη)

MBX: Marbofloxacin (Μαρβοφλοξασίνη)

ENR: Enrofloxacin (Ενροφλοξασίνη)

DOX: Doxycycline (Δοξυκυκλίνη)

OTC: Oxytetracycline (Οξυτετρακυκλίνη)

ADI: Acceptable Daily Intake (Ημερήσια Αποδεκτή Πρόσληψη)

RTIs: Respiratory Tract Infections (Λοιμώξεις της Αναπνευστικής οδού)

ΚΝΣ: Κεντρικό Νευρικό Σύστημα

HIV: Human Immunodeficiency Virus (Ιός Ανοσοανεπάρκειας του Ανθρώπου)

HPLC: High Performance Liquid Chromatography (Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης)

UV-Vis: Ultraviolet–Visible spectroscopy (Φασματοσκοπία Υπεριώδους-Ορατού)

ELISA: Enzyme-linked ImmunosorbentAssay (Δοκιμασία Ενζυμο-Συζευγμένης Ανοσοπροσρόφησης)

MRL's: Maximum Residue Limits (Ανώτατα Όρια Καταλοίπων)

Εισαγωγή

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1ο : ΠΡΟΪΟΝΤΑ ΖΩΙΚΗΣ ΠΡΟΕΛΕΥΣΗΣ

Η εκτροφή παραγωγικών ζώων αποτελεί εδώ και χιλιετίες μια πλούσια πηγή παραγωγής πολύτιμων και υψηλής βιολογικής αξίας τροφίμων για τον άνθρωπο. Γενικά σαν πλέον επωφελή ζώα χαρακτηρίζονται τα βοοειδή, οι χοίροι, τα αιγοπρόβατα καθώς και διάφορα είδη πτηνών.

Η περιεκτικότητα του ζωικού ιστού σε πρωτεΐνες είναι περίπου 20% και έχει καθιερωθεί να υπονοεί τον μυϊκό ιστό των κτηνοτροφικών ζώων. Η ποικιλία των πρωτεϊνών του κρέατος είναι πολύ μεγάλη και διακρίνονται συνήθως σε τρεις κατηγορίες, σε αυτές που συμμετέχουν στη μυϊκή συστολή, σε διαλυτές και αδιάλυτες πρωτεΐνες. Γενικά όλες οι πρωτεΐνες εκπληρώνουν σημαντικούς ρόλους στον ζωικό οργανισμό στον οποίο ανήκουν.

Η παραγωγή ζωικών προϊόντων έχει εντατικοποιηθεί τα τελευταία πενήντα χρόνια, ενώ ταυτόχρονα έχει γίνει περισσότερο αποδοτική αφού μεγαλύτερη ποσότητα προϊόντων παράγεται από μικρότερο αριθμό ζώων. Αυτή η αύξηση της παραγωγικότητας είναι αποτέλεσμα πολλών παραγόντων όπως, της γενετικής επιλογής, της βελτίωσης της διατροφής, της βελτίωσης της διαχείρισης και της προληπτικής ιατρικής. Η κτηνιατρική κλινική πράξη στα παραγωγικά ζώα περιλαμβάνει τη χρήση εμβολίων και προληπτικής φαρμακευτικής αγωγής για την πρόληψη ή ελαχιστοποίηση των λοιμώξεων, τη χρήση αντιμικροβιακών και αντιπαρασιτικών φαρμάκων για τη θεραπεία μικροβιακών και παρασιτικών παθήσεων αντίστοιχα, και τη χρήση αντιμικροβιακών φαρμάκων και ορμονών ως αυξητικών παραγόντων.

Τα αντιμικροβιακά φάρμακα ως αυξητικοί παράγοντες δεν χρησιμοποιούνται πλέον στις χώρες της Ευρωπαϊκής Ένωσης αφού υπάρχει νομοθετική απαγόρευση από 1/1/2006 (Κανονισμός 1831/2003 Ε.Κ), αλλά εξακολουθούν να χρησιμοποιούνται στην εκτροφή των παραγωγικών ζώων σε άλλες χώρες όπως για παράδειγμα στις Η.Π.Α.

Η διατροφή των ζώων που βασίζεται στους βοσκοτόπους βελτιώνει τη διατροφική ποιότητα του κρέατος αλλά και των γαλακτοκομικών προϊόντων, συμβάλλοντας έτσι στην καλύτερη υγεία των καταναλωτών (Daley CA et al., 2010).

Το ενδιαφέρον των καταναλωτών για την υγεία και την ασφάλεια των τροφίμων συνεχώς αυξάνεται και δημιουργεί ένα υψηλό επίπεδο ζήτησης στην αγορά για τρόφιμα που είναι ελεύθερα από πιθανή έκθεση σε φυτοφάρμακα, ορμόνες και αντιβιοτικά. Η βιολογική γεωργία είναι η παλαιότερη μορφή γεωργίας στη γη, τα δε βοοειδή, πρόβατα και οι αίγες αποτελούν ένα σημαντικό ζωικό κεφάλαιο στις βιολογικές εκμεταλλεύσεις.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2ο: ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ

2.1. Τα Αντιβιοτικά στην Κτηνοτροφία

Τα κτηνιατρικά φάρμακα και ειδικότερα τα αντιμικροβιακά αποτελούν ένα σημαντικό στοιχείο της παραγωγής κρέατος, αυγών και γάλακτος από τα ζώα που εκτρέφονται για αυτό ακριβώς το σκοπό.

Πουλερικά

Τα αντιβιοτικά χρησιμοποιούνται στην παραγωγή πουλερικών όχι αποκλειστικά για θεραπευτικούς σκοπούς. Ορισμένοι παραγωγοί χορηγούν ποσότητες αντιβιοτικών για να βελτιωθεί η παραγωγή κρέατος με αύξηση του ρυθμού ανάπτυξης των ζώων και παράλληλα προλαμβάνοντας την εμφάνιση ασθενειών (Diaz-Sanchez, 2015).

Κατά τη διάρκεια του φυσιολογικού κύκλου ζωής τους, όλα τα πουλιά εκτίθενται σε αμέτρητες ουσίες που είναι φυσικά παρούσες στο περιβάλλον ή που είναι αποτέλεσμα ανθρωπογενών διεργασιών. Ορισμένες από αυτές τις ουσίες μπορούν να απορροφηθούν και να κατατεθούν σε διαφορετικούς ιστούς και σε μερικές περιπτώσεις σε βρώσιμους ιστούς. Τα περισσότερα από αυτά τα υπολείμματα είναι προσωρινά, περιορίζονται σε συγκεκριμένους ιστούς και τείνουν να αποθηκεύονται και να συντηρούνται με τέτοιο τρόπο που τα καθιστά αβλαβή για τον ξενιστή (VICH-FDA, 2011). Ωστόσο, όταν αυτά τα υπολείμματα σχηματίζονται σε βρώσιμους ιστούς των πτηνών και των παράγωγων τροφίμων τους, οι καταναλωτές αυτών των τροφών μπορούν να εκτίθενται, εν αγνοία τους, σε αυτές τις ενώσεις. Αυτό έχει ιδιαίτερη σημασία λόγω των ενώσεων που έχουν τη δυνατότητα να προκαλέσουν προβλήματα υγείας στους καταναλωτές.

Τα προϊόντα πουλερικών (κρέας και αυγά) αντιπροσωπεύουν το ένα τρίτο περίπου των πρωτεϊνούχων τροφίμων που καταναλώνονται στον κόσμο (FAS, 2010). Ωστόσο, οι κίνδυνοι που συνδέονται με την υγεία από την κατανάλωση αυτών των προϊόντων προκαλούν ανησυχία στους καταναλωτές. Η παγκόσμια παραγωγή κρέατος πουλερικών υπερέβη τα 109 εκατομμύρια τόνους, ενώ η παγκόσμια παραγωγή αυγών το 2013 εκτιμήθηκε σε πάνω από 73 εκατομμύρια τόνους (σε σύγκριση με 112 εκατομμύρια τόνους χοιρινού κρέατος και λιγότερο από 70 εκατομμύρια τόνους βοδινού το 2013, το FAOSTAT το 2015).

Εικόνα 2.1: Τα φάρμακα που χορηγούνται στα πουλερικά επηρεάζουν και τους καταναλωτές (Πηγή: https://decoration.gr/trofima-kai-antiviotika/).

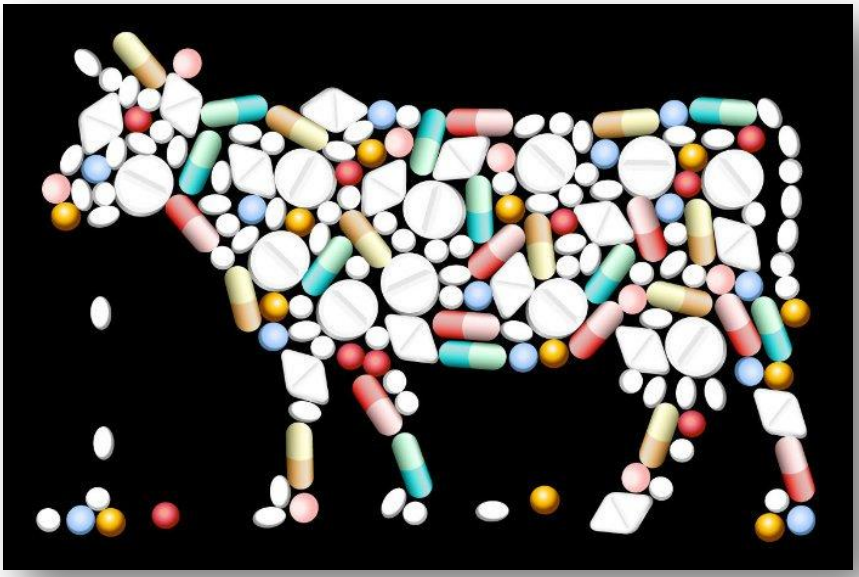
Η ανακάλυψη ότι τα αντιβιοτικά προάγουν την ανάπτυξη στα πουλερικά έγινε το 1946 από τον Moore και τους συναδέλφους του. Η ομάδα μελέτησε τη θρεπτική επίδραση των SA's σε σμήνη. Συγκεκριμένα, ανησυχούσαν ότι η διαθεσιμότητα βιταμινών θα μπορούσε να μειωθεί με την χρήση των αντιβιοτικών ορισμένων βακτηριακών ομάδων, με επακόλουθη μείωση της ανάπτυξης του πουλιού. Προς έκπληξή τους, παρατηρήθηκε αύξηση του ρυθμού ανάπτυξης για νεοσσούς που έλαβαν συνδυασμό ή απλές δόσεις σουλφασουξαδίνης ή STR μαζί με φολικό οξύ. Υπολόγισαν ότι τα αντιβιοτικά αναστέλλουν βακτήρια που παρήγαγαν τοξίνες, έτσι ώστε η αναστολή αυτών των βακτηρίων να οδηγεί σε αυξημένο ρυθμό ανάπτυξης (Moore, P.A et al., 1946).

Ορισμένα αντιβιοτικά έχουν χαρακτηριστικά που τείνουν να αυξάνουν το δυναμικό τους για σχηματισμό καταλοίπων στα εκτεθειμένα ζώα. Για παράδειγμα, οι SA's και οι περισσότερες β-λακτάμες μπορούν να εξαλειφθούν αμετάβλητα από το σώμα και έτσι να οδηγήσουν στη διάδοση της δραστικής μορφής του φαρμάκου σε ζώα που δεν υποβάλλονται σε αγωγή μέσω της τροφής, του νερού ή/και της μόλυνσης του περιβάλλοντος. Επιπλέον, καθώς αυτά τα φάρμακα τείνουν να παραμένουν για μεγάλο χρονικό διάστημα στο περιβάλλον, αυτό μπορεί να οδηγήσει σε υποεκτίμηση του κινδύνου έκθεσης. Ακόμη και στην περίπτωση των μεταβολιζόμενων αντιβιοτικών, μερικοί από τους μεταβολίτες που προκύπτουν μπορεί να διατηρήσουν την αλλεργιογόνο δράση και έτσι εξακολουθούν να αποτελούν κίνδυνο για τους καταναλωτές (Gerber & Pichler, 2006).

Εξίσου σημαντικές είναι οι διαφορές στην ενσωμάτωση και έκκριση που αυτές οι ενώσεις μπορούν να έχουν σε διαφορετικούς ιστούς στα ζώα. Παραδείγματος χάριν, οι TC's απομακρύνονται ταχέως από τους εδώδιμους ιστούς πουλερικών, οπότε στις περισσότερες περιπτώσεις η περίοδος αναμονής μόνο 24 ωρών είναι γενικά αρκετή ώστε τα επίπεδα να πέσουν κάτω από το επίπεδο ανοχής (Lynas et al., 1998).

Βοδινό και Χοιρινό Κρέας

Το 2014, η παγκόσμια παραγωγή βοδινού και χοιρινού κρέατος υπολογίστηκε σε περίπου 170 εκατομμύρια τόνους (USDA, 2015). Λόγω της ενοποίησης των γεωργικών πρακτικών στις περισσότερες ανεπτυγμένες χώρες, πολλά από αυτά τα ζώα εκτρέφονται υπό συνθήκες εντατικής παραγωγής όπου η ταχεία ανάπτυξη, η αποτελεσματική χρήση ζωοτροφών και τα χαμηλά ποσοστά ασθένειας, είναι κρίσιμα σημεία παραγωγής για την οικονομική βιωσιμότητα. Κάτω από τέτοιες συνθήκες, ίσως δεν προκαλεί έκπληξη το γεγονός ότι χημικά φάρμακα, ενισχυτικά της ανάπτυξης ή/και αντιβιοτικά χρησιμοποιούνται συνήθως για τη μεγιστοποίηση των επιδόσεων στην παραγωγή.



Εικόνα 2.2:Χημικά υπολείμματα στο κρέας αποτελούν αναπόσπαστο κίνδυνο για την υγεία των καταναλωτών (Πηγή: https://decoration.gr/trofima-kai-antiviotika/).

Τα βοοειδή ξεκινούν τη ζωή τους σε βοσκότοπους αλλά μετακινούνται σε μονάδες παραγωγής, περιορισμένου χώρου (εντατικές συνθήκες) όπου η διατροφή περιλαμβάνει καλαμπόκι και σιτηρά μετά από περίπου 6 μήνες, διαμονής σε αυτές τις μονάδες. Το λίπος από χορτοφάγα ζώα έχει υψηλότερα επίπεδα συζευγμένου λινολεϊκού οξέος και προσεγγίζει τη λιπαρή σύνθεση των ψαριών. Αυτή η δίαιτα αλλάζει τα πεπτικά συστήματα των ζώων, τους επιτρέπει να αναπτύσσονται ταχύτερα και αλλάζει την ποιότητα και την ποσότητα του λίπους. Επιπρόσθετα, με τη συγκέντρωση αυτών των ζώων σε μονάδες παραγωγής, αναγκάζονται να ζουν πάνω από τα περιττώματά τους με δυσμενείς για την υγεία τους συνέπειες (Smit et al., 2010).

2.2. Κανονισμοί της Ευρωπαϊκής Ένωσης

Ευρωπαϊκή Ένωση:

Ο κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 854/2004 του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και Συμβουλίου, της 29ης Απριλίου 2004, θεσπίζει ειδικούς κανόνες για την οργάνωση των επίσημων ελέγχων στα προϊόντα ζωικής προέλευσης που προορίζονται για ανθρώπινη κατανάλωση.

Η χρήση κτηνιατρικών φαρμάκων στην Ευρωπαϊκή Ένωση διέπεται από τον κανονισμό (ΕΟΚ) αριθ. 2377/90 του Συμβουλίου σχετικά με τη διαδικασία καθορισμού ανώτατων ορίων καταλοίπων (ΑΟΚ) για κτηνιατρικά φάρμακα σε τρόφιμα ζωικής προέλευσης, σε ψάρια, σε αυγά και στο μέλι. Τα παραρτήματά του παρουσιάζουν ουσίες για τις οποίες έχουν καθοριστεί ΑΟΚ (παράρτημα Ι), ουσίες για τις οποίες δεν κρίνεται αναγκαίο να καθοριστούν τα ΑΟΚ (παράρτημα ΙΙ), ουσίες με προσωρινά ΑΟΚ (παράρτημα ΙΙΙ) και ουσίες που δεν επιτρέπεται να χρησιμοποιούνται για είδη παραγωγής τροφίμων (παράρτημα IV).

Ενώ η οδηγία 96/23 / ΕΚ του Συμβουλίου ορίζει μέτρα παρακολούθησης ορισμένων ουσιών και των καταλοίπων τους σε ζώα και ζωικά προϊόντα, κατανέμει τα κτηνιατρικά φάρμακα σε δύο ομάδες: την ομάδα Α που καλύπτει τις απαγορευμένες ουσίες σύμφωνα με το παράρτημα IV του κανονισμού) Αριθ. 2377/90 και των παραγόντων της ομάδας Β, σύμφωνα με τα παραρτήματα Ι και ΙΙΙ του κανονισμού (ΕΟΚ) αριθ. 2377/90 του Συμβουλίου. Από την 1η Ιανουαρίου 2006, σύμφωνα με τον κανονισμό (ΕΚ) αριθ. 1831/2003, τα αντιβιοτικά δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως πρόσθετα ζωοτροφών (Federal Research Centre for Nutrition and Food).

2.3. Ανώτατα Επιτρεπτά Όρια

Πίνακας 1: MRLs-Commission Regulation (EU) No 37/2010.

μg/kg	*MRL's*	Οξυτετρακυκλίνη	Δοξυκυκλίνη	Ενροφλοξασίνη	Μαρβοφλοξασίνη	Σουλφαμεθοξαζόλη	Γενταμικίνη	Στρεπτομυκίνη
Βοοειδή	**Μυς**	100	100	100	150	100	50	500
	Ήπαρ	300	300	300	150	100	200	500
	Νεφρό	600	600	200	150	100	750	1000
Πουλερικά	**Μυς**	100	100	100	-	100	-	500
	Ήπαρ	300	300	200	-	100	-	500
	Νεφρό	600	600	300	-	100	-	1000
Χοιρινά	**Μυς**	100	100	100	150	100	50	500
	Ήπαρ	300	300	200	150	100	200	500
	Νεφρό	600	600	300	150	100	750	1000

Σημαντικά σημεία:

- Ο αιτών άδεια κυκλοφορίας για ένα κτηνιατρικό φαρμακευτικό προϊόν, στο οποίο χρησιμοποιείται οποιαδήποτε φαρμακολογικά δραστική ουσία, πρέπει να υποβάλει αίτηση στον Ευρωπαϊκό Οργανισμό Φαρμάκων. Ο Οργανισμός πρέπει να παρέχει γνωμοδότηση που συνίσταται από **επιστημονική εκτίμηση του κινδύνου** και **συστάσεις για τη διαχείριση του κινδύνου.**
- Ο Οργανισμός αποφασίζει σχετικά με το κατά πόσο πρέπει να εφαρμόζονται τα θεσπισμένα ανώτατα όρια κατάλοιπων για ένα συγκεκριμένο τρόφιμο ή είδος. Η Ευρωπαϊκή Επιτροπή ορίζει κανόνες σχετικά με τους όρους του εν λόγω **υπολογισμού** των ορίων καταλοίπων.
- Η εκτίμηση κινδύνου πρέπει να σταθμίζει εάν το είδος και η ποσότητα των εξεταζόμενων καταλοίπων προκαλούν **ανησυχία ασφάλειας όσον αφορά την ανθρώπινη υγεία.**
- Οι συστάσεις για τη διαχείριση κινδύνου πρέπει να αξιολογούν μια σειρά παραγόντων, συμπεριλαμβανομένης της **διαθεσιμότητας εναλλακτικών ουσιών**, για την αγωγή των σχετικών ειδών.
- Η Επιτροπή ταξινομεί τις φαρμακολογικά δραστικές ουσίες για τις οποίες ο Οργανισμός έχει ήδη γνωμοδοτήσει. Η Επιτροπή μπορεί να καθορίσει **σημεία αναφοράς για δράση** για τα κατάλοιπα φαρμακολογικά δραστικών ουσιών που **δεν έχουν ταξινομηθεί.**
- Σε ορισμένες περιπτώσεις, η Επιτροπή ή μια χώρα της ΕΕ μπορεί να υποβάλουν στον Οργανισμό ένα αίτημα γνωμοδότησης σχετικά με τα ανώτατα όρια καταλοίπων.

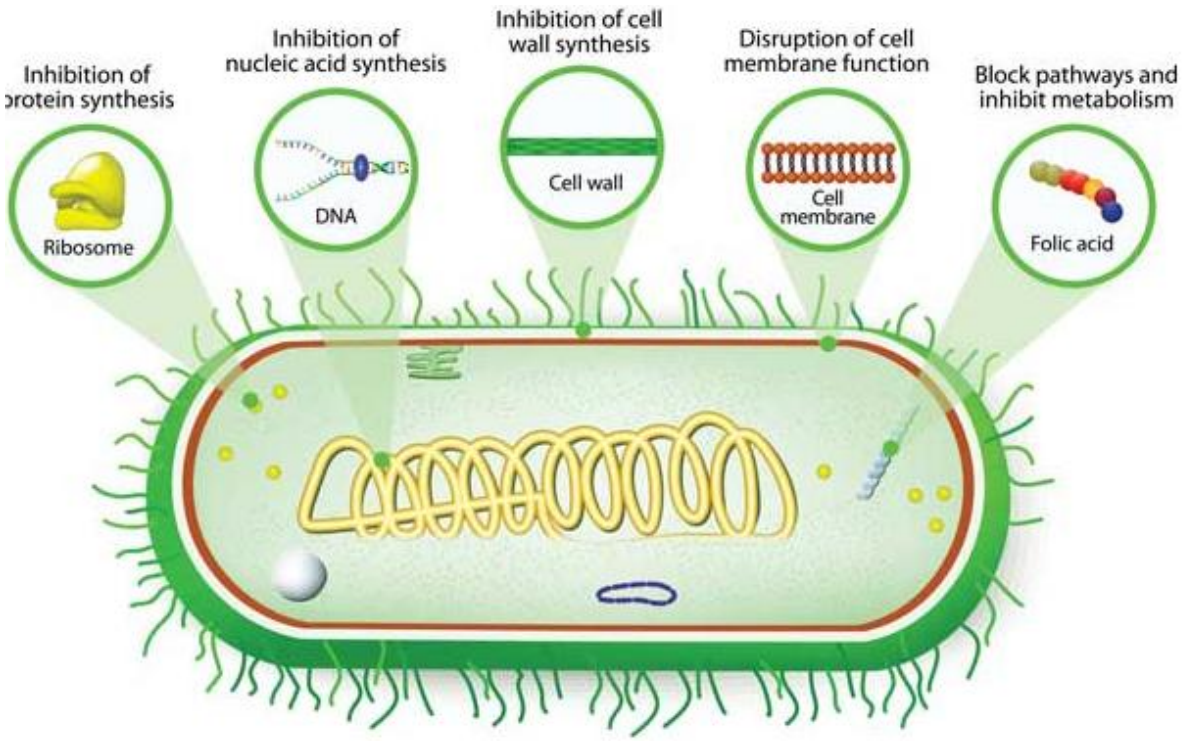
Τέτοιες περιπτώσεις περιλαμβάνουν καταστάσεις στις οποίες η εν λόγω ουσία είναι εγκεκριμένη για χρήση σε μια τρίτη χώρα.

- Μια σειρά από ουσίες εξαιρούνται από το πεδίο εφαρμογής του παρόντος κανονισμού, συμπεριλαμβανομένων των ουσιών που καλύπτονται από τον κανονισμό (ΕΟΚ) αριθ. 315/93 της ΕΕ για τις προσμείξεις των τροφίμων.
- Τον Ιανουάριο του 2017, η Επιτροπή ενέκρινε τον εκτελεστικό κανονισμό (ΕΕ) 2017/12. Αυτός ο κανονισμός καθορίζει τη **μορφή και το περιεχόμενο** των αιτήσεων και αιτημάτων προς τον Οργανισμό για τον καθορισμό ανώτατων ορίων καταλοίπων.
- Τον Ιούνιο του 2017, η Επιτροπή ενέκρινε τον κανονισμό (ΕΕ) 2017/880. Ο κανονισμός αυτός θεσπίζει κανόνες σχετικά με **τη χρήση ανώτατου ορίου καταλοίπων** που έχει καθοριστεί για μια φαρμακολογικά δραστική ουσία σε ένα συγκεκριμένο τρόφιμο, για **άλλο τρόφιμο που παράγεται από το ίδιο είδος**, και ανώτατου ορίου καταλοίπων που έχει καθοριστεί για μια φαρμακολογικά δραστική ουσία σε ένα ή περισσότερα είδη, για άλλα είδη (δηλ. παρέκταση των ανώτατων ορίων καταλοίπων).

(https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EL/ALL/?uri=LEGISSUM:mi0026)

2.4. Κατηγορίες Αντιβιοτικών

Αντιβιοτικά είναι οι χημικές ενώσεις που παράγονται από μια ποικιλία μικροοργανισμών (βακτήρια, μύκητες κ.λπ.) ή συντίθενται σε εργαστήρια. Τα αντιβιοτικά διαφέρουν στις φυσικές, χημικές και φαρμακολογικές ιδιότητες, καθώς και στον μηχανισμό δράσης και το αντιμικροβιακό φάσμα. Οι βακτηριοκτόνοι μηχανισμοί περιλαμβάνουν αναστολή (1) της πρωτεϊνικής σύνθεσης, (2) της σύνθεσης του κυτταρικού τοιχώματος, (3) του μεταβολισμού (4) της σύνθεσης DNA, ή (5) της σύνθεσης κυτταροπλασματικής μεμβράνης (Baynes et al.,2016).



Εικόνα 2.3: Βακτηριοκτόνοι μηχανισμοί. Αναστολή πρωτεϊνοσύνθεσης, σύνθεσης DNA, σύνθεσης κυτταρικού τοιχώματος, σύνθεσης κυτταρικής μεμβράνης και μεταβολισμού (Πηγή: https://www.studyread.com/antibiotics-definition-function-mechanism/).

Τα αντιβιοτικά, χρησιμοποιούνται εκτός από την ιατρική, και σε άλλους τομείς, όπως είναι η κτηνοτροφία και η γεωργία, με σκοπό να εξασφαλιστεί η βιωσιμότητα, αλλά και η αύξηση της παραγωγικότητας των ζώων και των φυτών. Η ευρεία και παρατεταμένη χρήση τους έχει οδηγήσει σε ανησυχητική αύξηση των αντιβιοανθεκτικών στελεχών των μικροβίων, τα οποία απομονώνονται από τρόφιμα που προορίζονται για ανθρώπινη κατανάλωση. Μερικά από τα προβλήματα που δημιουργούν τα ανθεκτικά στα αντιβιοτικά τροφιμογενή παθογόνα μικρόβια είναι η αναποτελεσματικότητα του αντιβιοτικού, οδηγώντας στην ανάγκη για αύξηση της δόσης του, τη χρήση άλλου πιο ισχυρού αντιβιοτικού, την παράταση του χρόνου χορήγησης ή/και τη δημιουργία παραγόντων αντοχής που μπορούν να μεταφερθούν σε άλλα παθογόνα μικρόβια του ανθρώπινου οργανισμού (Baynes et al.,2016).

Στην κτηνοτροφία, σε περιπτώσεις στις οποίες οι αντιμικροβιακοί παράγοντες δεν χρησιμοποιούνται με ορθό τρόπο και οι νομοθετημένοι χρόνοι απομάκρυνσης δεν τηρούνται, τότε τα υπολείμματα στους εδώδιμους ιστούς αποτελούν σοβαρό κίνδυνο για τους καταναλωτές. Συγκεκριμένα, ο κίνδυνος αυξάνεται σε υπερευαίσθητα άτομα, με αποτέλεσμα την εκδήλωση αλλεργικών αντιδράσεων και άλλων τοξικών φαινομένων. Ωστόσο, θα πρέπει να λάβουμε υπόψη μας ότι ο κίνδυνος, στον οποίο εκτίθενται οι καταναλωτές εξαιτίας των κατάλοιπων, δεν είναι ο ίδιος με εκείνον που οφείλεται στη μητρική ουσία του φαρμάκου,

καθώς εκείνη ενδέχεται να έχει υποστεί εκτενή μεταβολισμό στον οργανισμό του ζώου στο οποίο χορηγήθηκε. Έτσι, για την προστασία της δημόσιας υγείας, μετά την ολοκλήρωση των φαρμακολογικών, τοξικολογικών και λοιπών ελέγχων ασφαλείας ενός φαρμακευτικού προϊόντος, το στάδιο που ακολουθεί είναι ο ορισμός της Ημερήσιας Αποδεκτής Πρόσληψης (ADI) (Reig & Toldra , 2007).

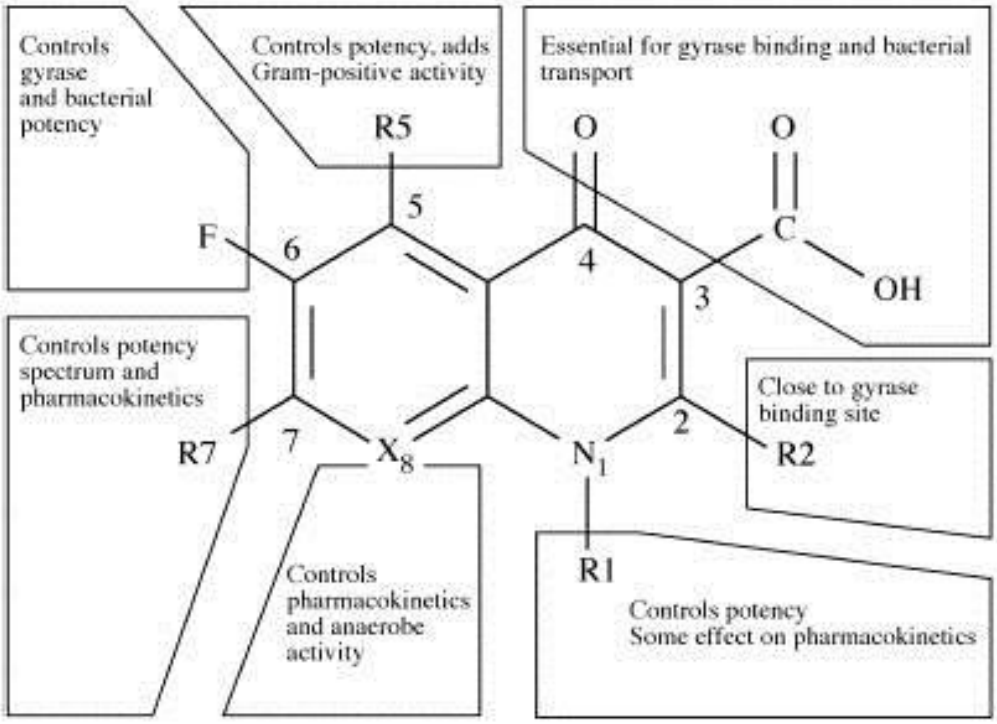
Πίνακας 2: Τάξεις αντιβιοτικών, μηχανισμοί δράσης και φάσμα δράσης.

Τάξη Αντιβιοτικών	Σύνθεση	Μηχανισμός Αντιβακτηριακής Δράσης	Φάσμα Δράσης
AG's	Streptomyces spp.	Πρωτεϊνοσύνθεση	Gram-Αρνητικά
FQNL's	Συντίθεται χημικά	Συστροφή DNA	Gram-Θετικά, Gram-Αρνητικά
SA's	Συντίθεται χημικά	Σύνθεση DNA και RNA	Gram-Θετικά, Gram-Αρνητικά
TC's	Streptomyces spp.	Πρωτεϊνοσύνθεση	Gram-Θετικά, Gram-Αρνητικά

2.4.1 Φθοροκινολόνες (FQNL's)

Χρήση

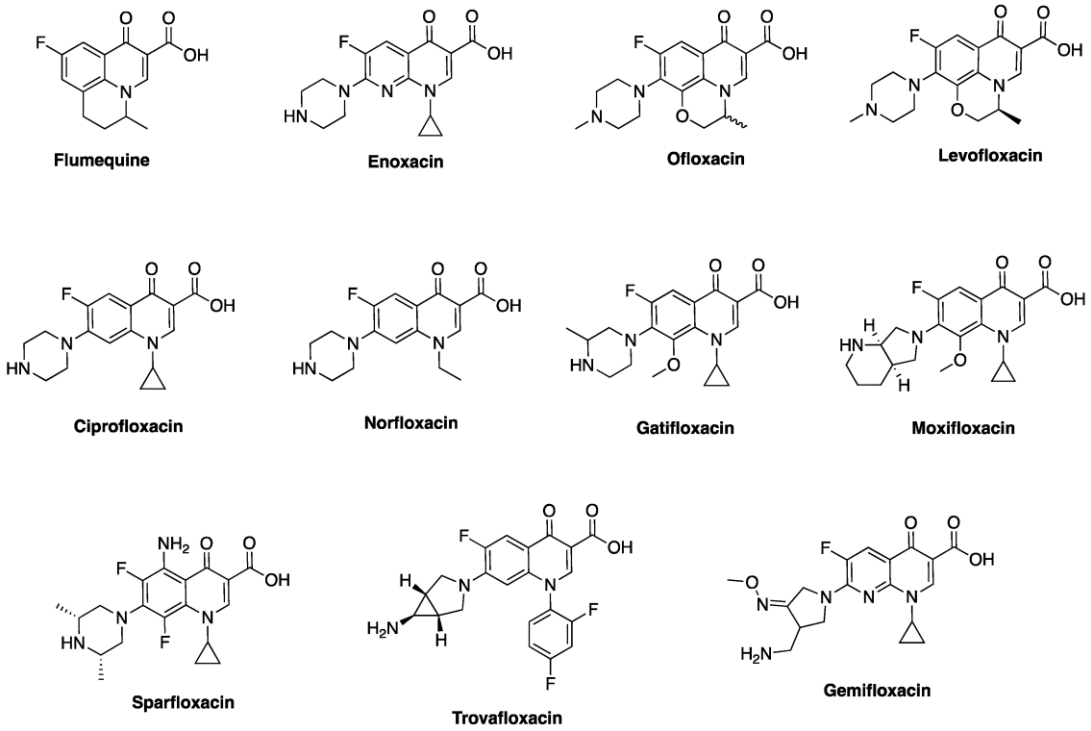
Οι φθοροκινολόνες (fluoroquinolones, FQNL's) είναι αντιμικροβιακοί παράγοντες που εμφανίζουν δραστικότητα ευρέος φάσματος, συμπεριλαμβανομένης της δράσης κατά του *Pseudomonas spp*. Σε αυτή την κατηγορία ανήκουν η ενροφλοξασίνη (ENR), μαρβοφλοξασίνη (MBX), σιπροφλοξασίνη, δανοφλοξασίνη, σαραφλοξασίνη.



Εικόνα 2.4: Συσχέτιση Χημικής Δομής και Δραστικότητας Φθοροκινολόνων (Πηγή: http://www.antimicrobe.org/d17.asp).

Αυτοί οι βακτηριοκτόνοι παράγοντες δρουν με αναστολή της DNA γυράσης σε βακτηριακά κύτταρα. Μελέτες έχουν δείξει μεγαλύτερο χρόνο ημιζωής στα πουλερικά απ'ό,τι στα θηλαστικά. Τόσο για την ENR όσο και τη σαραφλοξασίνη αναφέρεται ιστορικά η χρήση τους σε κοτόπουλα και γαλοπούλες. Μετά από αποδεδειγμένη συμμετοχή στην αύξηση των λοιμώξεων, που σχετίζονται με το βακτήριο *Campylobacter spp*., ο Οργανισμός Τροφίμων και Φαρμάκων (Food & Drug Administration, FDA) απέσυρε τη χρήση FQNL's στα πουλερικά (Cornejo et al., 2011). Η σαραφλοξασίνη, η πρώτη FQNL που εγκρίθηκε για χρήση σε πουλερικά στις Ηνωμένες Πολιτείες, αποσύρθηκε το 2001 από την FDA (Federal Register, 2001) ενώ η ENR αποσύρθηκε, για τα πουλερικά, από τη FDA το 2005 (Federal Register, 2005).

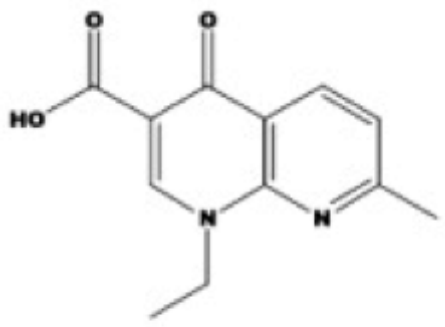
Η ENR μεταβολίζεται σε σιπροφλοξασίνη, έναν φαρμακολογικά δραστικό μεταβολίτη. Τόσο η μητρική ένωση, όσο και οι μεταβολίτες της, μπορούν να βρεθούν σε μυ κοτόπουλου μετά από χορήγηση της δραστικής ουσίας ENR ως θεραπεία (Shim, Shen, Kim, Lee, & Kim, 2003). Μερικές μελέτες έχουν βρει σημαντικές συγκεντρώσεις του μεταβολίτη σιπροφλοξασίνη αρκετές ημέρες μετά τον τερματισμό της θεραπείας με ENR (Anadón et al., 1995).



Εικόνα 2.5: Παραδείγματα Φθοροκινολόνων (Πηγή: https://www.mdpi.com/2079-6382/6/4/26).

Ιστορικά στοιχεία

Η ανάπτυξη των FQNL's προέκυψε από το ναλιδιξικό οξύ (NA), το οποίο ανακαλύφθηκε το 1962. Επιπρόσθετα, η πρόοδος στο σχεδιασμό φαρμάκων, η χρήση ικριωμάτων και η ανάγκη για εύρεση των κατάλληλων πλευρικών αλυσίδων για να γίνουν πιο αποτελεσματικά τα φάρμακα, επέτρεψε τη βελτίωση της πρώτης κινολόνης, της νορφλοξασίνης (NFLX), κατοχυρωμένης με δίπλωμα ευρεσιτεχνίας το 1978. Παρόλο που πλέον έχουν συντεθεί πάνω από 10.000 αντιβιοτικές ενώσεις στον κόσμο, μόνο το 2% αυτών δοκιμάστηκε σε κλινικές μελέτες. Επιπλέον, από όλες αυτές τις ενώσεις, μόνο είκοσι έχουν εισέλθει επιτυχώς στην αγορά.



Nalidixic acid

Εικόνα 2.6: Ναλιδιξικό Οξύ (Πηγή: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/).

Το NA έχει μέτρια δραστικότητα έναντι Gram-αρνητικών βακτηριδίων και χαμηλή από του στόματος απορρόφηση, επομένως απαιτήθηκε μία καταλληλότερη χημική ένωση για τη θεραπεία συστηματικών λοιμώξεων. Με αφετηρία το NA, αναπτύχθηκε μια σειρά από κινολόνες, καθ 'όλη τη δεκαετία του '70, οι οποίες αναφέρονται ως «παλιές» κινολόνες, οδηγώντας στην πρώτη «νέα» κινολόνη, το NFLX, με μέτριες βελτιώσεις σε όλες τις ιδιότητες. Ειδικότερα, ο σχεδιασμός φαρμάκου με πιπεριμιδικό οξύ αποτέλεσε μία από τις σημαντικές επιτεύξεις που οδήγησαν στο NFLX. Η εισαγωγή μίας ομάδας πιπεραζινυλίου, η οποία παίρνει ένα βασικό τμήμα στην θέση C7 της δομής της κινολόνης, βελτίωσε τη δράση έναντι Gram-αρνητικών μικροοργανισμών, διευρύνοντας με αυτό τον τρόπο το φάσμα δράσης ώστε να συμπεριλαμβάνει την αντιμετώπιση του *Pseudomonas aeruginosa*.

Το πιπεριμιδικό οξύ είναι επίσης δραστικό κατά Gram θετικών βακτηρίων. Ο βασικός δακτύλιος πιπεραζίνης, ο οποίος μπορεί να σχηματίσει το αμφοτερικό άλας με το καρβοξυλικό οξύ στη θέση C3, αυξάνει την ικανότητα των φαρμάκων να διεισδύουν στα βακτηριακά κύτταρα έχοντας ως αποτέλεσμα αυξημένη δραστικότητα. Η προσθήκη ενός ατόμου φθορίου στη θέση C6 της δομής της κινολόνης (φλουμεκίνη) ήταν σημαντική για την αναστολή των ενζύμων-στόχων.

Τα μέχρι τώρα αποτελέσματα δείχνουν την πιθανή αντιβακτηριακή δράση και τη διείσδυση του μορίου της κινολόνης στα βακτηριακά κύτταρα και τον ανθρώπινο ιστό. Η πραγματική εξέλιξη ήρθε με το συνδυασμό αυτών των δύο χαρακτηριστικών και την ανάπτυξη του NFLX, μίας 6-φθοριωμένη κινολόνης που έχει μία ομάδα πιπεραζινυλίου στη θέση C7. Το NFLX παρουσιάζει σημαντικές διαφορές από τις παλιές FQNL's στις δραστικότητες και τη φαρμακοκινητική στον ανθρώπινο οργανισμό, με αποτέλεσμα υψηλή κλινική αποτελεσματικότητα στη θεραπεία πολλών ειδών λοιμώξεων, συμπεριλαμβανομένων εκείνων

της αναπνευστικής οδού.Το NFLX ήταν μόνο η αρχή μιας εξαιρετικά επιτυχημένης περιόδου έρευνας για τις τροποποιήσεις των νέων αντιβιοτικών της κατηγορίας των FQNL's.

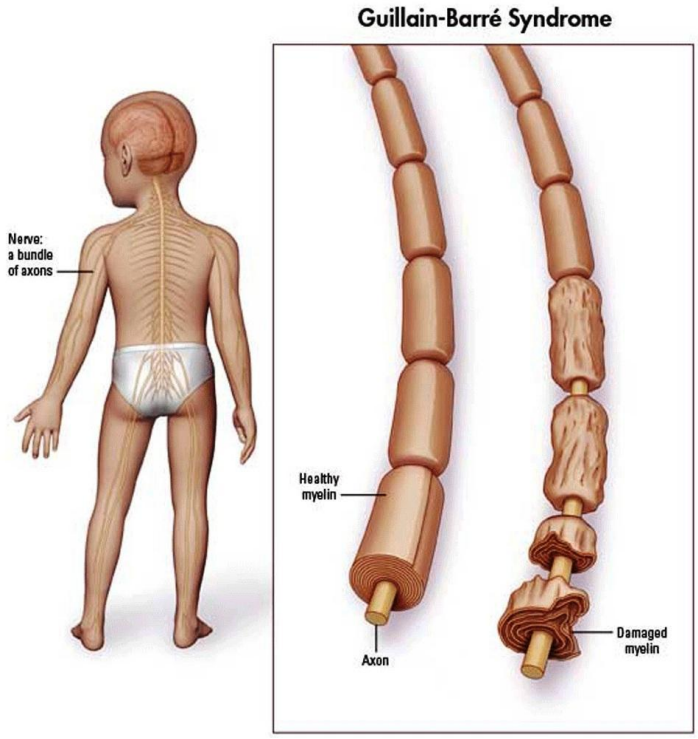
Μεταξύ των φαρμάκων που παρασκευάστηκαν, η οφλοξασίνη (OFLX) και η σιπροφλοξασίνη (CPFX) αναγνωρίζονται ως ανώτερα και χρησιμοποιούνται στα στοματικά αντιβιοτικά β-λακτάμης ως αντιβακτηριακοί παράγοντες. Με επίκεντρο το OFLX και το CPFX, πολυάριθμες ερευνητικές ομάδες εισήλθαν στον αντιβακτηριακό θεραπευτικό τομέα, προκαλώντας έντονο ανταγωνισμό στην αναζήτηση νέων και πιο αποτελεσματικών FQNL's. Μετά την εισαγωγή του NFLX στην αγορά ένδεκα είδη νέων FQNL's ξεκίνησαν να προωθούνται στην Ιαπωνία. Αυτές είναι η ενοξασίνη (ENX), OFLX, CPFX, λομεφλοξασίνη (LFLX), φλεροξασίνη (FRLX), τοσουφλοξασίνη (TFLX), λεβοφλοξασίνη (LVFX), σπαρφλοξασίνη (SPFX), γατιφλοξασίνη (GFLX), προυλιφλοξασίνη (PULX) και τέλος η παζουφλοξασίνη (PZFX). Τα πλεονεκτήματα αυτών των ενώσεων, π.χ. LVFX, SPFX και GFLX, είναι ότι το φάσμα δράσης τους περιλαμβάνει θετικά κατά Gram βακτηρίδια καθώς και Gram-αρνητικά βακτηρίδια. Ακόμα, βελτιώνεται η η βιοδιαθεσιμότητα όταν χορηγείται μια ημερήσια δόση για συστηματικές λοιμώξεις συμπεριλαμβανομένων των Λοιμώξεων της Αναπνευστικής οδού (Respiratory Tract Infections, RTIs).

Ωστόσο, στις κλινικές μελέτες ή στην παρακολούθηση αρκετών νέων FQNL's μετά την κυκλοφορία του φαρμάκου αναφέρθηκαν απροσδόκητες ανεπιθύμητες αντιδράσεις, όπως συνέπειες στο Κεντρικό Νευρικό Σύστημα(ΚΝΣ),η ηπατοτοξικότητα και η καρδιοτοξικότητα. Οι νεώτερες FQNL's αναπτύχθηκαν και συνεχίζουν να αναπτύσσονται για να μειώσουν αυτές τις ανεπιθύμητες αντιδράσεις. Από την άλλη πλευρά, θετικά κατά Gram βακτηρίδια, συμπεριλαμβανομένων των ανθεκτικών σε μεθικιλλίνη *Staphylococcus aureus* (MRSA), ανθεκτικών στη μεθικιλλίνη αρνητικών σταφυλόκοκκων (MRCNS), ανθεκτικών σε PCN, *Streptococcus pneumoniae* (PRSP) και εντεροκόκκων ανθεκτικών στη βανκομυκίνη (VRE) υπήρξαν σοβαρό πρόβλημα στην ιατρική κοινότητα. Στις μέρες μας, τα νέα αντιβακτηριακά σκευάσματα FQNL είναι εξαιρετικά επιτυχημένα, όσον αφορά το αντιβακτηριακό θεραπευτικό πεδίο. Ωστόσο εξαιτίας της αυξημένης έκθεσης στα σκευάσματα FQNL, τα βακτήρια απέκτησαν ανοχή σε αυτά οδηγώντας στη μη αποτελεσματική τους δράση. Αυτά τα προβλήματα της ανοχής σε πολλά φάρμακα ήταν η κινητήρια δύναμη για την ανάπτυξη νεώτερων FQNL's (Takahashi et al, 2003).

Παρενέργειες

Περιφερικό νευρικό σύστημα

Η περιφερική νευροπάθεια που προκαλείται από φάρμακα είναι μια πολύ γνωστή ασθένεια. Η πρώτη αναφορά σχετικά με την τοξικότητα που σχετίζεται με FQNL δημοσιεύθηκε το 1988 και αφορούσε έναν ασθενή με οστεομυελίτιδα (οφείλεται σε Gram αρνητικό βακτήριο) που εμφάνιζε περιφερική παραισθησία υπό τη χρήση της σιπροφλοξασίνης (Report from a Swedish Study Group, 1988). Ακολούθησαν αρκετές άλλες έρευνες που υπέδειξαν περαιτέρω συμπτώματα, όπως υπερεαισθησία, υποαισθησία, αλλοδυνία ή ακόμα και περιφερική φαγούρα. Η επίπτωση των παραπάνω παρενεργειών είναι πιθανώς <1%, αλλά με σχεδόν 30 εκατομμύρια ανθρώπους να υποβάλλονται ετησίως σε θεραπεία με FQNL's μόνο στις ΗΠΑ, ο πραγματικός αριθμός των αντίστοιχων περιπτώσεων θα είναι σημαντικός. Πρόσφατα, μια μελέτη φαρμακοεπαγρύπνησης βρήκε πιθανή συσχέτιση μεταξύ των FQNL's και της τοξικότητας του περιφερικού νευρικού συστήματος, συμπεριλαμβανομένου του συνδρόμου Guillain - Barré (GBS), μιας δυνητικά σοβαρής μορφής οξείας περιφερικής πολυνευροπάθειας (Ali, 2014).



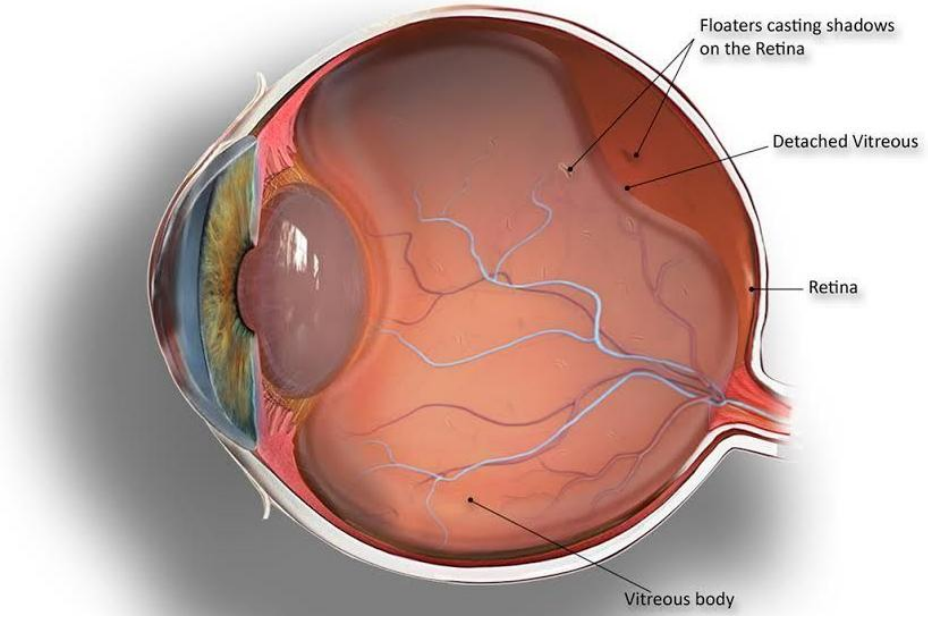
Εικόνα 2.7: Σύνδρομο Guillain – Barré (Πηγή: https://pedclerk.bsd.uchicago.edu/page/guillain-barr%C3%A9-syndrome-gbs).

Κεντρικό Νευρικό Σύστημα (ΚΝΣ)

Σε αντίθεση με την περιφερική νευροπάθεια, η επαγόμενη από την FQNL τοξικότητα του ΚΝΣ είναι καλά καθορισμένη και έχει μελετηθεί διεξοδικά. Οι πιο συχνές ανεπιθύμητες ενέργειες του ΚΝΣ είναι το άγχος, η ανησυχία, η νευρικότητα και η ζάλη που έχουν πιθανότητα εμφάνισης έως 2% (Ciprofloxacin-Summary of product characteristics, 2013). Οι πιο σοβαρές μορφές όπως τα ψυχιατρικά προβλήματα (ψύχωση, ντελίριο και μανία) είναι σπάνιες (Grill et al., 2011). Μια πρόσφατη μελέτη που διεξήχθη σε ποντίκια έδειξε ότι οι επιληπτικές κρίσεις που προκλήθηκαν μετά από χορήγηση σιπροφλοξασίνης συσχετίστηκαν με σημαντική αύξηση των επιπέδων γλουταμικού στον εγκέφαλο. Εκτός από επιληπτικές κρίσεις, άλλες σοβαρές αντιδράσεις στο ΚΝΣ περιλαμβάνουν παραλήρημα, ψευδαισθήσεις, ψύχωση, μανία, εγκεφαλοπάθεια, αταξία, δυσαρθρία (Grill et al., 2011).

Όραση

Μια μελέτη που διεξήχθη το 2012 από μια καναδική ερευνητική ομάδα έδειξε αυξημένο κίνδυνο αποκόλλησης του αμφιβληστροειδούς (RD) που σχετίζεται με την από του στόματος χορήγηση FQNL's. Περαιτέρω φαρμακοεπιδημιολογική έρευνα ξεκίνησε μετά από αυτή τη δημοσίευση, επιβεβαιώνοντας τα προαναφερθέντα ανησυχητικά ευρήματα (Etminan et al., 2012).



Εικόνα 2.8:Αποκόλληση του Αμφιβληστροειδούς (Πηγή: https://www.healthinfi.com/the-symptoms-of-retinal-detachment/).

Δέρμα

Οι δερματικές παθήσεις που προκαλούνται από τις FQNL's είναι σπάνιες, αλλά μπορούν να περιλαμβάνουν ένα ευρύ φάσμα κλινικών εκδηλώσεων όπως ήπιο ερεθισμό σε περιοχές που εκτίθενται στον ήλιο, διάφορους χρωματισμούς του δέρματος ή/και εκρήξεις πορφύρας (Lorente et al., 2013). Οι σχετιζόμενες με την FQNL ανεπιθύμητες αντιδράσεις και ιδίως η φωτοευαισθησία έχουν μελετηθεί αρκετές φορές στο παρελθόν (de Guidi et al., 2011). Γνωρίζουμε ότι ο ρυθμός φωτοευαισθησίας διαφέρει μεταξύ των FQNL's και ότι επηρεάζεται έντονα από ειδικά χαρακτηριστικά της μοριακής δομής αυτών. Οι FQNL's με ένα επιπρόσθετο άτομο αλογόνου ως υποκαταστάτη στη θέση 8 όπως η κλιναφλοξακίνη, η φλεροξασίνη, η λομεφλοξασίνη ή η σπαρφλοξασίνη παρουσιάζουν σημαντικά αυξημένη επικινδυνότητα, αλλά ο ρόλος τους στην κλινική πρακτική είναι εν τω μεταξύ ασήμαντος (Ferguson et al., 2003). Αντιθέτως, φάρμακα με μεθοξυ υποκαταστάτη στη θέση 8 όπως η μοξιφλοξασίνη εμφανίζουν πιο χαμηλή επικινδυνότητα.

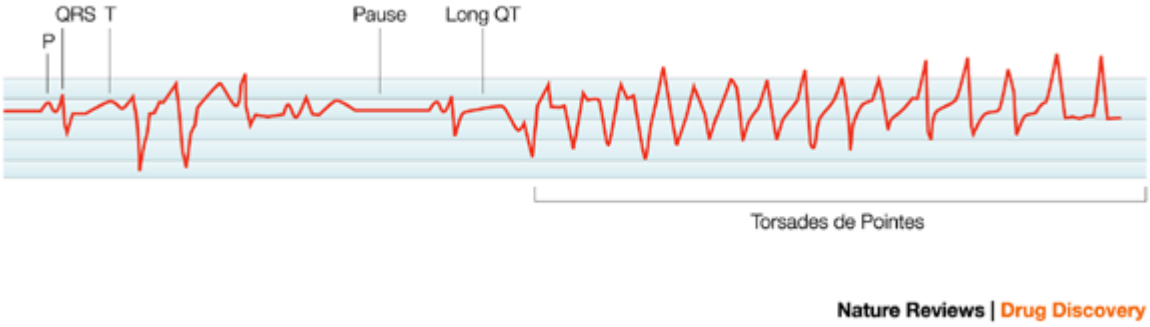
Πεπτικό σύστημα

Γαστρεντερικά συμπτώματα όπως η δυσπεψία, η ναυτία, ο έμετος ή η διάρροια είναι πιθανώς η πιο συχνή ανεπιθύμητη ενέργεια που σχετίζεται με την κατανάλωση FQNL's με ποσοστό έως και 20% (Grill et al., 2011). Αξιοσημείωτο είναι ότι η ναυτία και ο εμετός μπορούν επίσης να είναι συνέπειες της τοξικότητας του ΚΝΣ. Η περιοχή postrema του εγκεφάλου δεν περιβάλλεται από τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό και είναι επομένως επιρρεπής σε δυνητικά νευροτοξικές ενώσεις όπως οι FQNL's. Όσον αφορά τις ηπατικές ανεπιθύμητες ενέργειες, οι παροδικές αυξήσεις των τρανσαμινασών δεν είναι ασυνήθιστες, αλλά η σοβαρή ηπατική βλάβη είναι πολύ σπάνια (Paterson et al., 2012).

Καρδιαγγειακό σύστημα

Το διάστημα QT αντιπροσωπεύει το χρόνο από την έναρξη της κοιλιακής αποπόλωσης (αρχή του κύματος Q) έως την ολοκλήρωση της επαναπόλωσης (τέλος του κύματος T). Λόγω της εξάρτησης από τον καρδιακό ρυθμό, χρησιμοποιείται μια διορθωμένη μορφή καρδιακού ρυθμού (QTc). Η παράταση του QTc σημαίνει παρατεταμένη επαναπόλωση και συνεπώς αυξημένο κίνδυνο καρδιακών επεισοδίων, συμπεριλαμβανομένων κοιλιακών αρρυθμιών, ή

καρδιακής ανακοπής (Haverkamp et al., 2012). Το 2011, η υπεύθυνη ομάδα για τη φαρμακοεπαγρύπνηση του Ευρωπαϊκού Οργανισμού Φαρμάκων δημοσίευσε έκθεση σχετικά με τον κίνδυνο παράτασης του QTc από διάφορες FQNL's. Δύο από αυτές είναι η μοξιφλοξασίνη και η λεβοφλοξασίνη. Η σιπροφλοξασίνη προτάθηκε ως η FQNL με τον χαμηλότερο κίνδυνο για γενικές καρδιακές αρρυθμίες (Pharmacovigilance Working Party of the European Medicines Agency, 2011).



Εικόνα 2.9: Παράταση QT (Πηγή: https://www.nature.com/articles/nrd1108).

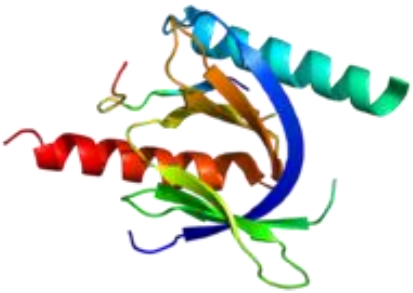
Ομοιόσταση γλυκόζης

Τα τελευταία χρόνια, αρκετές αναφορές και επίσημες επιδημιολογικές μελέτες έχουν αξιολογήσει την ικανότητα των FQNL's να επηρεάζουν την ομοιόσταση της γλυκόζης, προκαλώντας είτε υπογλυκαιμία είτε υπεργλυκαιμία (Schelleman et al., 2010). Ένας προτεινόμενος μηχανισμός παθολογίας σχετικά με την υπογλυκαιμία που σχετίζεται με την FQNL περιλαμβάνει αυξημένη απελευθέρωση ινσουλίνης. Η υπεργλυκαιμία μπορεί να οφείλεται σε κενοτοπία των παγκρεατικών β-λεμφοκυττάρων, οδηγώντας σε μειωμένη έκκριση ινσουλίνης ή σε έκκριση επινεφρίνης, που είναι ένας πολύ γνωστός ρυθμιστής της συγκέντρωσης της γλυκόζης στον ορό (Ishiwata et al., 2006). Σημειώνεται ότι, ο υπογλυκαιμικός κίνδυνος της μοξιφλοξασίνης θεωρείται σημαντικά υψηλότερος από την σιπροφλοξασίνη.

Σκελετικό σύστημα

Οι δομές των συνδετικών ιστών, όπως ο αρθρικός χόνδρος ή οι τένοντες, είναι δυνητικοί στόχοι της τοξικότητας της FQNL. Η μειωμένη λειτουργία των b1-ιντεγκρινών σε αυτούς

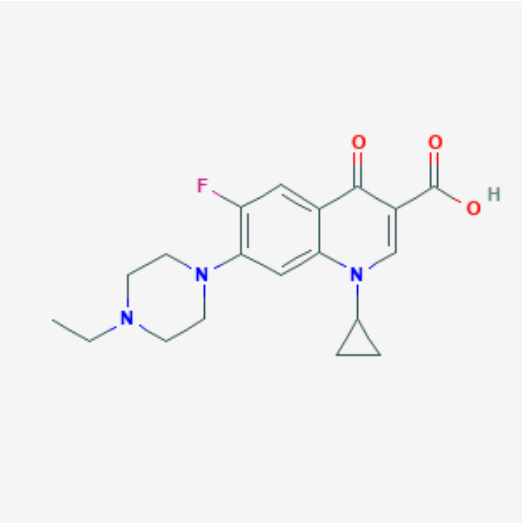
τους ιστούς, που έχουν ελάχιστη ποσότητα αίματος, έχει θεωρηθεί ως ένας πιθανός μηχανισμός. Οι b1-ιντεγκρίνες είναι διαμεμβρανικές γλυκοπρωτεΐνες υπεύθυνες για αλληλεπιδράσεις κυττάρου-κυττάρου και η λειτουργία τους εξαρτάται καθοριστικά από το μαγνήσιο. Καθώς οι περισσότερες FQNL's είναι χηλικές ενώσεις που σχηματίζουν σύμπλοκα με αυτό το κατιόν, μπορεί να υπάρξει έλλειψη λειτουργικά διαθέσιμου μαγνησίου και έτσι η λειτουργία της ιντεγκρίνης μπορεί να διαταραχθεί. Σε μια σειρά πειραμάτων με αρουραίους, αποδείχθηκε ότι η έλλειψη μαγνησίου προκαλεί βλάβη του χόνδρου που δεν διαφέρει από τις επαγόμενες από FQNL αλλοιώσεις (Sendzik et al., 2009).



Εικόνα 2.10: B1-Ιντεγκρίνη (Πηγή: www.wikipedia.org).

Ενροφλοξασίνη (ENR)

Η ENR είναι μέλος της οικογένειας των 6-φθορο-7-πιπεραζινυλ-4-κινολονών και έχει μοριακό τύπο $C_{19}H_{22}FN_3O_3$ (Hooper et al., 1985).

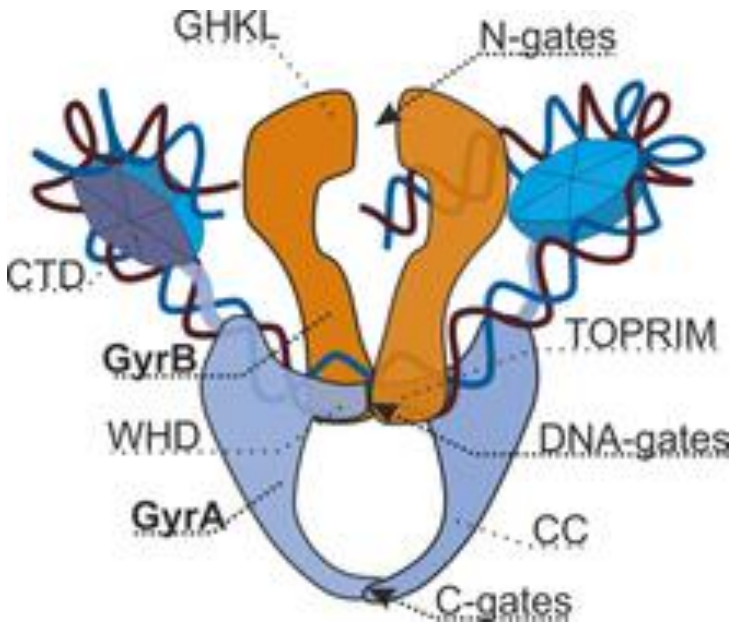


Εικόνα 2.11: Χημική Δομή ENR (Πηγή: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/).

Αυτό το αντιβιοτικό είναι ιδιαίτερα λιπόφιλο και η παρουσία ενός καρβοξυλικού οξέος και μιας τριτοταγούς αμίνης συμβάλλει στις αμφοτερικές ιδιότητες του (Vancutsem et al., 1990). Η ENR είναι βακτηριοκτόνος ουσία και έχει εξαιρετική δραστικότητα τόσο έναντι Gram θετικών όσο και Gram αρνητικών βακτηρίων (Scheer, 1987).

Αυτό το αντιβιοτικό έχει επίσης χρησιμοποιηθεί για τον έλεγχο ορισμένων ενδοκυτταρικών παθογόνων βακτηρίων. Η τροποποίηση του δακτυλίου 4-κινολόνης ενισχύει την αντιμικροβιακή δραστικότητα αυτής της ένωσης. Στην κτηνιατρική χορηγείται με υποδόρια ένεση σε βοοειδή, ενδομυϊκή ένεση σε χοίρους και από το στόμα σε βοοειδή, χοίρους και κατοικίδια, με σκοπό τη θεραπεία λοιμώξεων της αναπνευστικής και της πεπτικής οδού. Οι συνιστώμενες δόσεις, σύμφωνα με τον Ευρωπαϊκό Οργανισμό Φαρμάκων (European Medicines Agency, EMA), είναι 2,5 έως 5 mg ENR / kg σωματικού βάρους / ημέρα για 3 έως 5 ημέρες (βοοειδή και χοίροι). Η βιοδιαθεσιμότητα της ENR, μετά από χορήγηση από το στόμα, είναι υψηλή για τα μονογαστρικά θηλαστικά και τα μοσχάρια, με το 80% της απορροφούμενης δόσης να απορροφάται στη κυκλοφορία του αίματος. Η στοματική απορρόφηση της ENR είναι, επίσης, ταχεία, με τις μέγιστες συγκεντρώσεις στον ορό να λαμβάνουν χώρα 1 έως 2 ώρες μετά . Η ENR δεν συμπλοκοποιείται άμεσα με τις πρωτεΐνες του πλάσματος, γεγονός που επιτρέπει στους μεταβολίτες να διασχίζουν εύκολα τις κυτταρικές μεμβράνες. Ως ομάδα, οι FQNL’s κατανέμονται ευρέως σε όλο το σώμα, συμπεριλαμβανομένων των νεφρών, του ήπατος, της χολής, του προστάτη, της μήτρας και των σαλπίγγων και των οστών. Η απέκκριση των FQNL’s γίνεται κυρίως μέσω των νεφρών, με δευτερεύουσα απέκκριση μέσω του ήπατος (Montay et al., 1984).

Η ENR μεταβάλλει τη δράση της βακτηριακής DNA γυράσης, μιας τοποϊσομεράσης τύπου ΙΙ. Αυτό το ένζυμο εμπλέκεται στην εκτύλιξη, κοπή και επανασφράγιση του DNA. Η αναστολή της γυράσης οδηγεί σε ταχύ κυτταρικό θάνατο στα βακτήρια (Oomori et al., 1988).



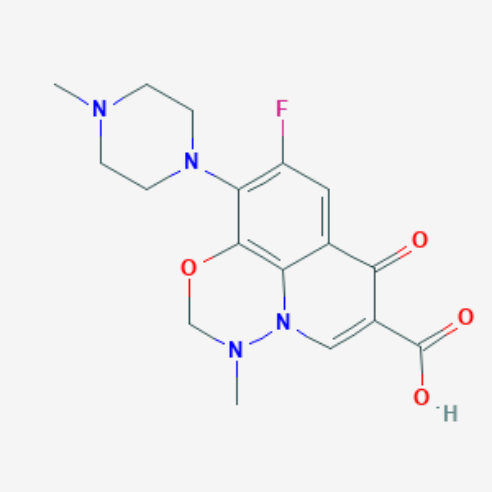
Εικόνα 2.12: DNA γυράση (Πηγή: www.wikipedia.org).

Ο μεταβολισμός της ENR ποικίλλει μεταξύ των ειδών. Παρόλο που η ENR είναι δραστικό αντιβιοτικό, μπορεί να βιομετασχηματιστεί σε σιπροφλοξασίνη σε ορισμένα είδη. Ο βιομετασχηματισμός της ENR περιλαμβάνει την N-αποαλκυλίωση, τη σύζευξη γλυκουρονιδίου στο άζωτο στην θέση πάρα- του δακτυλίου πιπεραζινυλίου, την οξείδωση στην όρθο- θέση σε υποκατεστημένη αμίνη και το άνοιγμα του δακτυλίου πιπεραζινυλίου (Vancutsem et al., 1990).

Ο χρόνος ημιζωής απέκκρισης της ENR ποικίλλει, επίσης, μεταξύ των ειδών. Στα κοτόπουλα έχει παρατεταμένη ημιζωή (7,3 ώρες) σε σύγκριση με τα θηλαστικά, συμπεριλαμβανομένων των μοσχαριών (1,2 ώρες) (Vancutsem et al., 1990).

Οι ανεπιθύμητες ενέργειες που σχετίζονται με την ENR, σχετίζονται κυρίως με την ανώμαλη ανάπτυξη χόνδρων, των ουροφόρων και αεροσωληνολογικών οδών και του κεντρικού νευρικού συστήματος. Αρθροπάθειες έχουν παρατηρηθεί σε αρουραίους, ινδικά χοιρίδια και πουλάρια (Bendele et al., 1990).

Μαρβοφλοξασίνη (MBX)



Εικόνα 2.13: Χημική Δομή MBX (Πηγή: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/).

Η MBX είναι FQNL τρίτης γενιάς που χρησιμοποιείται ευρέως στην κτηνιατρική. Έχει μοριακό τύπο $C_{17}H_{19}FN_4O_4$. Αποτελεί νεότερη FQNL που έχει ένα ευρύ φάσμα δραστικότητας έναντι πολλών βακτηρίων και μυκοπλασμάτων. Είναι βακτηριοκτόνο και η επίδρασή του εξαρτάται από τη συγκέντρωση. Η χρήση του θα πρέπει να περιορίζεται σε εκείνες τις λοιμώξεις όπου υπάρχει επιβεβαιωμένη ευαισθησία και άλλα αντιβιοτικά είναι απίθανο να είναι αποτελεσματικά.

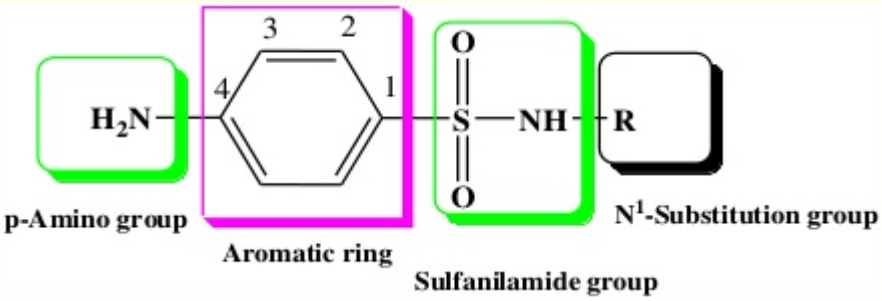
Οι ιδιότητες της ταχείας απορρόφησης, της καλής κατανομής και του ευρέος φάσματος έναντι των περισσοτέρων παθογόνων μικροοργανισμών, υπεύθυνων για αναπνευστικές παθήσεις των χοίρων, όπως το *Haemophilus parasuis* (Hp) και το *Actinobacillus pleuropneumoniae* (App), το καθιστούν καλό υποψήφιο για να αντιμετωπίσει επαγόμενα αναπνευστικά προβλήματα. Λοιμώξεις του δέρματος και των μαλακών μορίων, λοιμώξεις των οστών, λοιμώξεις του ουροποιητικού συστήματος, πνευμονία και λοιμώξεις που προκαλούνται από ενδοκυτταρικούς οργανισμούς αντιμετωπίζονται με χρήση MBX. Η MBX αποδείχθηκε αποτελεσματική για ορισμένα παθογόνα που μεταδίδονται στο αίμα, όπως το *Mycoplasma haemofelis* σε γάτες σε δόση 2,75 mg / kg για 14 ημέρες. Η MBX έχει επίσης χρησιμοποιηθεί σε ίππους για τη θεραπεία λοιμώξεων που προκαλούνται από βακτήρια. Σε σκύλους, ο χρόνος ημίσειας ζωής της MBX είναι 7-9 ώρες, στα βοοειδή 5-9 ώρες και στα μηρυκαστικά 4-7 ώρες (Frazier et al., 2000).

Μετά από χορήγηση από το στόμα ή παρεντερική χορήγηση, η βιοδιαθεσιμότητα κυμαίνεται από 62 έως 100% για τη MBX (βιβλίο αναφοράς Marbofloxacin, 1999) και 53% για την

ENR. Περίπου το 40% της ENR μεταβολίζεται περαιτέρω στην σιπροφλοξασίνη και αυτός ο ενεργός μεταβολίτης στη συνέχεια βιομετασχηματίζεται σε τέσσερις ή περισσότερες επιπλέον ενώσεις. Η MBX εξαλείφεται ουσιαστικά στη φυσική μορφή (Frazier et al., 2000) και οι μεταβολίτες σχηματίζονται σε περιορισμένες ποσότητες, λιγότερο από 5% της χορηγούμενης δόσης (βιβλίο αναφοράς Marbofloxacin, 1999). Και τα δύο φάρμακα (ENR και MBX) απεκκρίνονται στα ούρα και από τη χολή.

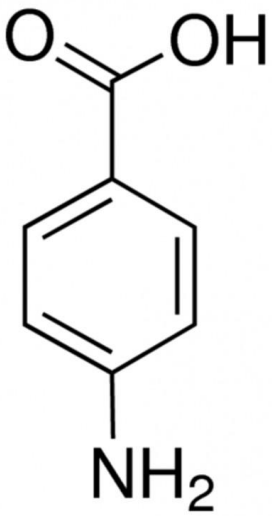
2.4.2. Σουλφοναμίδες (SA's)

Χρήση



Εικόνα 2.14: Χημική Δομή Σουλφοναμιδίων (Πηγή: www.slideshare.net).

Οι SA's και τα δομικά συγγενή παράγωγά τους, όπως τα σουλφαμικά και τα σουλφαμίδια, έχουν τον γενικό τύπο A-SO_2NHR (Brackett et al., 2004).



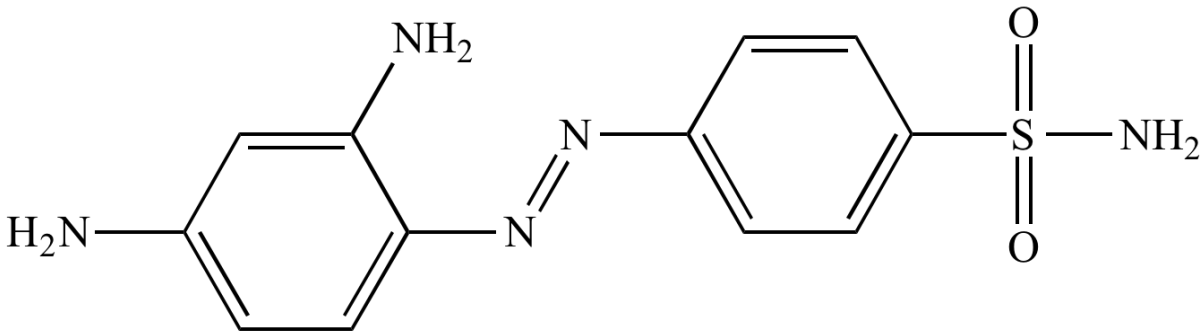
Εικόνα 2.15: πάρα-αμινοβενζοϊκό οξύ (PABA) (Πηγή: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/).

Οι SA's (SMX, SDZ, σουλφαδιμεθοξίνη, σουλφακινοξαλίνη, σουλφαχλωροπυραζίνη) είναι βακτηριοστατικοί αντιβακτηριακοί παράγοντες που είναι δραστικοί έναντι Gram-αρνητικών και Gram-θετικών μικροργανισμών, καθώς και σε πρωτόζωα. Παρεμβαίνουν στη σύνθεση του φολικού οξέος ανταγωνίζονται με το πάρα-αμινοβενζοϊκό οξύ (PABA) και εμποδίζουν την κυτταρική αναπαραγωγή σε βακτήρια (Lebkowska-Wieruszewska & Kowalski, 2010). Αυτοί οι παράγοντες είναι εγκεκριμένοι για χρήση σε ζώα από τα οποία παράγονται τρόφιμα, αλλά η κατανάλωση προϊόντων, που έχουν μολυνθεί από SA's, μπορεί να προκαλέσει ανεπιθύμητες ενέργειες στο κεντρικό νευρικό σύστημα, γαστρεντερικές διαταραχές και αντιδράσεις υπερευαισθησίας (Lebkowska-Wieruszewska & Kowalski, 2010). Οι SA's παρουσιάζουν υψηλή πρόσδεση πρωτεϊνών στους ιστούς και το αίμα και ορισμένες SA's είναι γνωστό ότι έχουν ενεργούς μεταβολίτες. Η σουλφαδιμεθοξίνη μεταβολίζεται με ακετυλίωση και υδροξυλίωση. Η υδροξυλίωση έχει προταθεί ως η κύρια μεταβολική οδός, ενώ οι υδροξυλιωμένοι μεταβολίτες συνεχίζουν να έχουν αντιβακτηριακές ιδιότητες (Nagata & Fukuda, 1994).

<u>Ιστορικά στοιχεία</u>

Στα τέλη της δεκαετίας του 1920 και στις αρχές της δεκαετίας του 1930, η γερμανική χημική βιομηχανία παρουσίασε δραματική αύξηση στον αριθμό των νεοσυντιθέμενων ενώσεων που ήταν διαθέσιμες για δοκιμές, ιδίως χρωστικές ουσίες, λόγω μιας κοινής παραδοχής ότι οι χρωστικές ουσίες που δεσμεύονται ειδικά στα βακτήρια και στα παράσιτα, θα μπορούσαν τότε να έχουν θανατηφόρες επιπτώσεις σε αυτά.

Στα εργαστήρια της Bayer AG, εκατοντάδες ενώσεις συντέθηκαν και δοκιμάστηκαν προτού παρασκευαστεί η ένωση που ονομάζεται σουλφοναμιδοχρυσοϊδίνη (KI-730, εμπορική ονομασία Prontosil). Συντάχθηκε από τους χημικούς της Bayer, Josef Klarer και Fritz Mietzsch και δοκιμάστηκε από τον Gerhard Domagk για αντιβακτηριακή δράση σε διάφορα μοντέλα ζωικών ασθενειών (Domagk et al., 1935). Φαινόταν ιδιαίτερα αποτελεσματική έναντι των στρεπτοκοκκικών λοιμώξεων, ενώ ήταν λιγότερο αποτελεσματική έναντι άλλων κοκκίων.



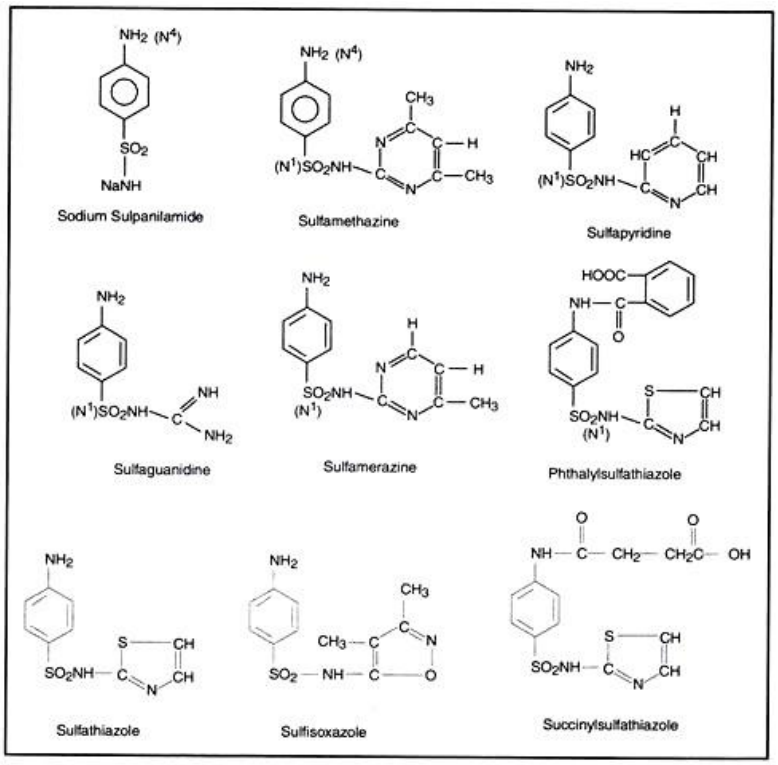
Εικόνα 2.16: Prontosil (Πηγή: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/).

Ωστόσο, το Prontosil φαίνεται να αποτελεί πρόδρομο για το πιο αποτελεσματικό φάρμακο καθώς μόνο το ενεργό μέρος του, η σουλφανιλαμίδη, ήταν στην πραγματικότητα υπεύθυνη για την αντιβακτηριακή του δράση (Tréfouël et al., 1935). Δεν ήταν δυνατό να κατοχυρωθεί με δίπλωμα ευρεσιτεχνίας, δεδομένου ότι το δίπλωμα ευρεσιτεχνίας σουλφανιλαμίδης είχε ήδη λήξει και αυτές οι ενώσεις είχαν χρησιμοποιηθεί στη βιομηχανία βαφής για μερικά χρόνια. Επειδή η σουλφανιλαμίδη ήταν φθηνή χημική ένωση και εφόσον είχε λήξει το δίπλωμα ευρεσιτεχνίας, πολλές εταιρείες ξεκίνησαν στη συνέχεια μαζική παραγωγή, παραγώγων σουλφοναμιδίου. Ορισμένες από τις προετοιμασίες ωστόσο περιελάμβαναν γλυκόλη διαιθυλενίου, με αποτέλεσμα τον θάνατο περισσότερων από 100 ασθενών. Για αυτό, επιβλήθηκε στην Αμερική η θέσπιση ενός νομοθετικού πλαισίου, το 1938, με ένα σύνολο νόμων που ονομάζεται Ομοσπονδιακός νόμος για τα τρόφιμα, τα φάρμακα και τα καλλυντικά.

(http://www.fda.gov/RegulatoryInformation/Legislation/FederalFoodDrugandCosmeticActFDCAct / default.htm).

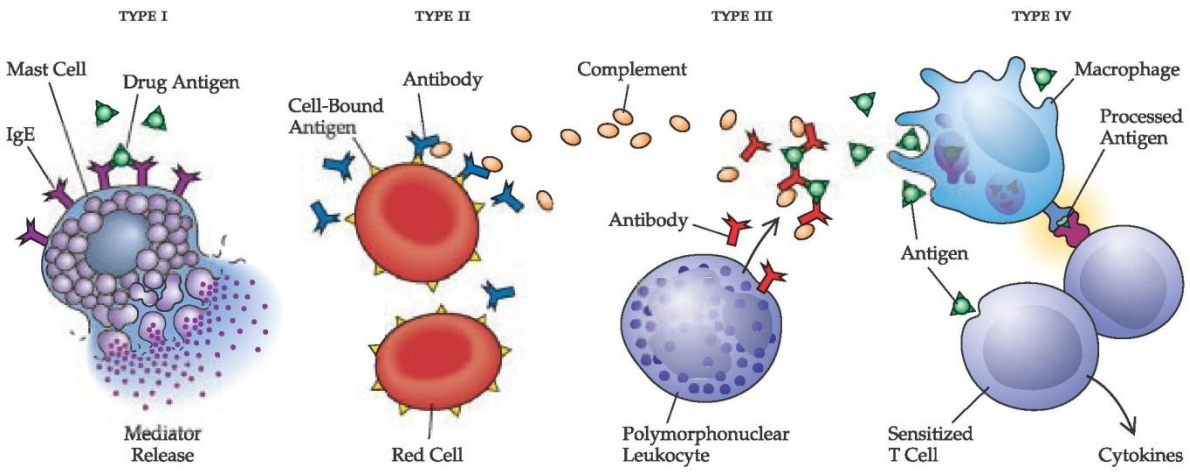
<u>Παρενέργειες</u>

Περίπου το 3-6% του γενικού πληθυσμού πιστεύεται ότι είναι αλλεργικό σε SA's, τα οποία είναι συνθετικά παράγωγα του p-αμινοβενζολοσουλφοναμιδίου (σουλφανιλαμίδιο). Τα αντιβακτηριακά σουλφοναμίδια είναι το σουλφαταμίδιο, SDZ, σουλφαμεραζίνη, SMX, σουλφανιλαμίδιο, σουλφαπυριδίνη, σουλφασαλαζίνη, σουλφαθειαζόλη και σουλφισοξαζόλη.



Εικόνα 2.17: Παραδείγματα Σουλφοναμιδίων (Πηγή: http://www.biologydiscussion.com/veterinary-pharmacology/sulfonamides-chemistry-classification-and-adverse-reactions-animals/74478).

Οι αλλεργικές αντιδράσεις που σχετίζονται με SA's περιλαμβάνουν ολόκληρο το φάσμα Gell-Coombs αντιδράσεων υπερευαισθησίας (Brackett, 2007). Οι αντιδράσεις τύπου 1 είναι αντιδράσεις που σχετίζοται με την ανοσοσφαιρίνη Ε (IgE) όπως κνίδωση, αγγειοοίδημα και αναφυλαξία. Οι ασθενείς που είχαν αντίδραση τύπου 1 σε αντιβακτηριακό σουλφοναμίδιο έχουν βρεθεί ότι έχουν IgE αντισώματα έναντι του μητρικού φαρμάκου, με τον N1 ετεροκυκλικό δακτύλιο που βρέθηκε να είναι το ανοσογόνο που αναγνωρίζεται από την IgE (Tornero et al., 2004).

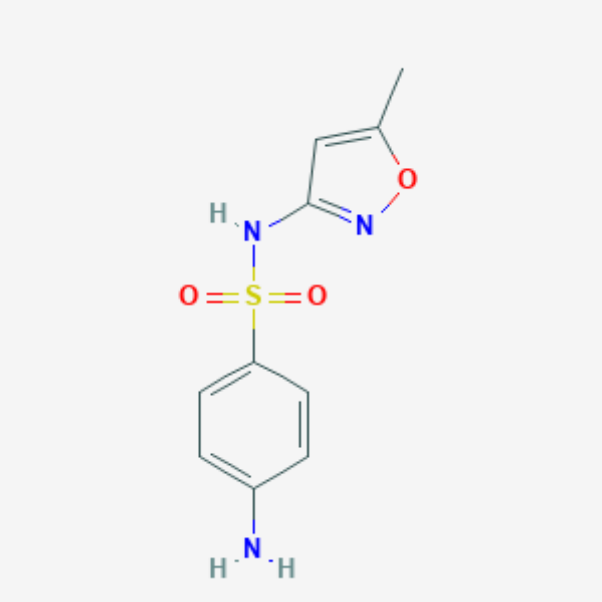


Εικόνα 2.18: Φάσμα Gell-Coombs (Πηγή:www.researchgate.net).

Οι αντιδράσεις υπερευαισθησίας μη τύπου 1 σε αντιμικροβιακές SA's πιστεύεται ότι προκαλούνται από μεταβολίτες των αντιβιοτικών (Brackett, 2007).

Τα άτομα με φαινότυπο βραδείας ακετυλίωσης ή ανεπάρκεια γλουταθειόνης μπορεί να διατρέχουν αυξημένο κίνδυνο αντιβακτηριακής υπερευαισθησίας σε σουλφοναμίδιο (Choquet-Kastylevsky et al., 2002).

<u>Σουλφαμεθοξαζόλη (SMX)</u>



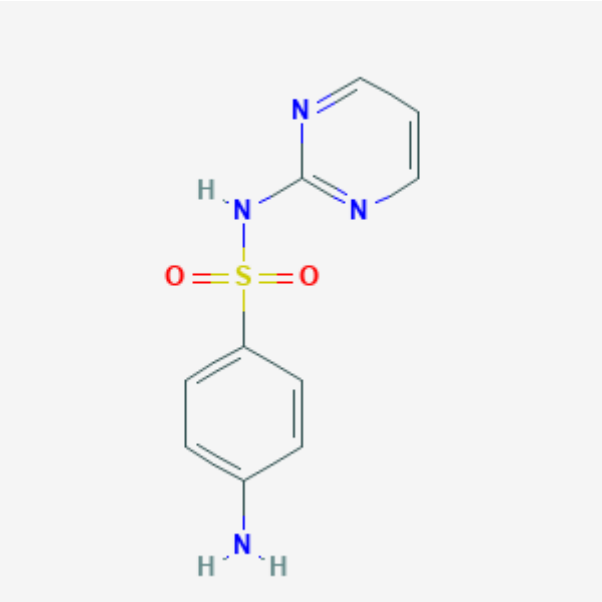
Εικόνα 2.19: Χημική Δομή SMX (Πηγή: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/).

Η SMX είναι ένα αντιβακτηριακό φάρμακο το οποίο έχει χρησιμοποιηθεί από τη δεκαετία του 1960 για τη θεραπεία διαφόρων συστηματικών λοιμώξεων σε ανθρώπους και ζώα. Έχει μοριακό τύπο $C_{10}H_{11}N_3O_3S$. Η κύρια χρήση ήταν στη θεραπεία οξείων λοιμώξεων του ουροποιητικού συστήματος. Έχει χρησιμοποιηθεί επίσης κατά της γονορυγείας, της μηνιγγίτιδας και των σοβαρών λοιμώξεων της αναπνευστικής οδού (*Pneumocystis carinii*) και για λόγους προφύλαξης έναντι ευαίσθητων μηνιγγιτιδόκοκκων. Είναι το σουλφοναμίδιο εκείνο που χρησιμοποιείται πιο συχνά σε όλο τον κόσμο σε συνδυασμό με TMP ή πυριμεθαμίνη για τη θεραπεία διαφόρων συστηματικών λοιμώξεων. Ο συνδυασμός με TMP χρησιμοποιείται κυρίως για τη θεραπεία λοιμώξεων του ουροποιητικού συστήματος. Με πυριμεθαμίνη, χρησιμοποιείται στη θεραπεία του ανθεκτικού στη χλωροκίνη, *Plasmodium falciparum* (IARC, 1980).

Η SMX συσχετίζεται με μια ποικιλία τοξικών επιδράσεων, συμπεριλαμβανομένης της ηπατοτοξικότητας και των συστηματικών αντιδράσεων υπερευαισθησίας. Από τους νοσηλευόμενους ασθενείς που παρακολουθήθηκαν κατά τη διάρκεια 359 κύκλων θεραπείας με SMX, το 3,0% εμφάνισε αλλεργικές αντιδράσεις. Τα δερματικά εξανθήματα, η ηωσινοφιλία και ο πυρετός ήταν οι συνηθέστερες εκδηλώσεις και οι σοβαρές αντιδράσεις ήταν σπάνιες (Koch-Weser et al., 1971).

Παρόλο που η SMX μπορεί να χρησιμοποιηθεί μόνη της, χορηγείται συνήθως με τη μορφή συν-τριμοξαζόλης, ενός συνδυασμού με τον ανταγωνιστή φολικού οξέος, TMP. Η SMX διασχίζει τον ανθρώπινο πλακούντα και φτάνει σε μέγιστη συγκέντρωση στις 10 ώρες (Reid et al., 1975).

<u>Σουλφαδιαζίνη (SDZ)</u>



Εικόνα 2.20: Χημική Δομή SDZ (Πηγή: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/).

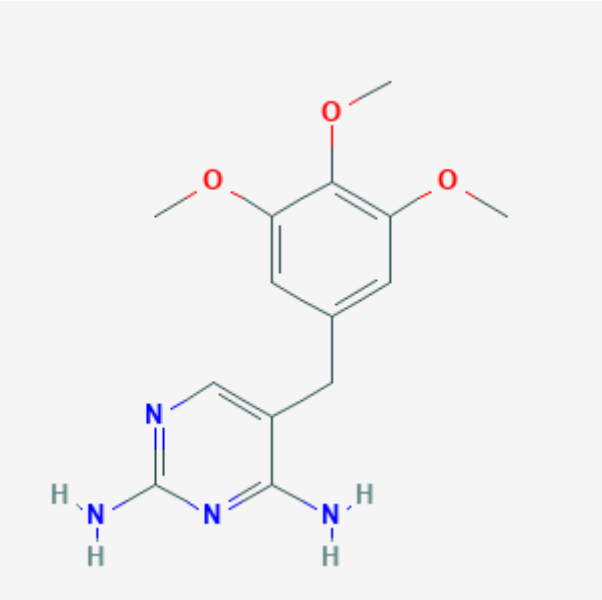
Η SDZ είναι ένα αντιβιοτικό που ανήκει στις SA's και έχει μοριακό τύπο $C_{10}H_{10}N_4O_2S$. Αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό των βακτηρίων, λειτουργώντας ως ανταγωνιστικός αναστολέας του π-αμινοβενζοϊκού οξέος στον κύκλο μεταβολισμού του φολικού οξέος. Η SDZ συνιστάται ως το προτεινόμενο φάρμακο για τη θεραπεία διαφόρων μορφών τοξοπλάσμωσης, μιας μόλυνσης από πρωτόζωα (Goodman et al., 2006).

Περίπου 70% έως 100% μιας από του στόματος δόσης απορροφάται ταχέως από το έντερο. Τα μέγιστα επίπεδα στο πλάσμα επιτυγχάνονται σε 3 έως 6 ώρες. Μετά από μία δόση των 3

g, η μέγιστη συγκέντρωση είναι περίπου 50 μg/ml. Σε μια ομάδα βρεφών που έλαβαν 50-100mg/ημέρα SDZ για συγγενή τοξοπλάσμωση, οι συγκεντρώσεις στο πλάσμα κυμαίνονταν από 60-86 μg/ml (Schmidt et al., 2006). Συγκεντρώσεις 50-150 μg/ml θεωρούνται θεραπευτικές για τις περισσότερες μολύνσεις και 120-150 μg/ml βέλτιστες για σοβαρές λοιμώξεις. Οι συγκεντρώσεις στο αίμα δεν πρέπει γενικά να υπερβαίνουν τα 200 μg/ml. Περίπου το 50% του φαρμάκου δεσμεύεται με πρωτεΐνες πλάσματος. Η SDZ απεκκρίνεται κυρίως στα ούρα, εν μέρει αμετάβλητη. Ο χρόνος ημίσειας ζωής αποβολής είναι περίπου 17. Διαχέεται καλά στους ιστούς και τα σωματικά υγρά, του υπεζωκότα, του περιτονίου, των αρθρικών και οφθαλμικών υγρών (Haddad et al., 2007).

Η SDZ εμφανίζει in vitro ανασταλτική δραστικότητα έναντι αρκετών αερόβιων θετικών κατά Gram και αρνητικών κατά Gram βακτηριδίων, *Nocardia sp.*, *Actinomyces sp.*,*Chlamydia trachomatis* και πρωτόζωα *Plasmodium falciparum* και *Toxoplasma gondii*. Η SDZ είναι επίσης δραστική έναντι του *Paracoccidioides brasiliensis*. Ωστόσο, η ανθεκτικότητα σε SA's είναι ευρέως διαδεδομένη και αυξάνεται μεταξύ βακτηρίων όπως οι στρεπτόκοκκοι, οι σταφυλόκοκκοι, τα *Enterobacteriaceae* και το *Neisseria sp*. (Bonfioli et al., 2005).

<u>Συνεργιστική δράση σουλφοναμίδων-τριμεθοπρίμης</u>



Εικόνα 2.21: Χημική Δομή TMP (Πηγή: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/).

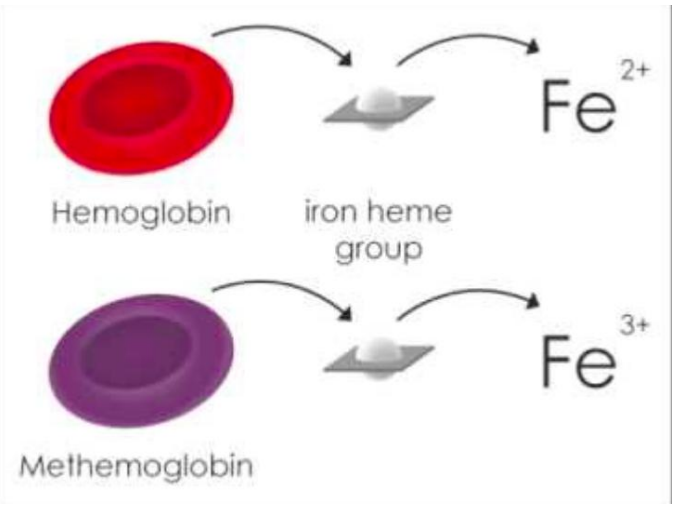
Η TMP έχει μοριακό τύπο $C_{14}H_{18}N_4O_3$. Είναι ένα αντιβιοτικό που αναστέλλει τη σύνθεση του φυλλικού οξέος στα μικροβιακά κύτταρα, παρεμποδίζοντας τη σύνθεση του τετραϋδροφυλλικού οξέος και αναστέλλοντας την αναγωγάση του διυδροφυλλικού οξέος. Με

αυτό τον τρόπο, δυσκολεύεται η σύνθεση του ριβονουκλεϊκού οξέος των μικροοργανισμών (McIsaac et al., 2008).

Η TMP-SMX εισήχθη στην αγορά το 1968 και παραμένει ένα δημοφιλές αντιβιοτικό λόγω του χαμηλού κόστους και της αποτελεσματικότητας της. Στον Καναδά, είναι το πιο συχνά χρησιμοποιούμενο αντιβιοτικό για τη θεραπεία λοιμώξεων του ουροποιητικού συστήματος (McIsaac et al., 2008). Άλλες ενδείξεις περιλαμβάνουν τη θεραπεία λοιμώξεων που προκαλούνται από *Pneumocystis jiroveci*, *Toxoplasma gondii*, *Stenotrophomonas maltophilia* και *Staphylococcus aureus*.

Έχουν αναφερθεί πολυάριθμες περιπτώσεις άσηπτης μηνιγγίτιδας (που περιλαμβάνουν υψηλές δόσεις μόνο TMP ή TMP-SMX), πολλές από τις οποίες αφορούν ασθενείς με προϋπάρχουσα αυτοάνοση ασθένεια ή λοίμωξη από HIV. Άλλες σπάνιες ανεπιθύμητες νευρολογικές συνέπειες περιλαμβάνουν παραλήρημα και ήπια συμπτώματα όπως τρόμο και διαταραχές στο βάδισμα (Dakin, 2009). Γενικά, τα νευρολογικά συμπτώματα εμφανίζονται κατά τη διάρκεια συνεχούς θεραπείας και μειώνονται μετά τη διακοπή της θεραπείας με TMP- SMX.

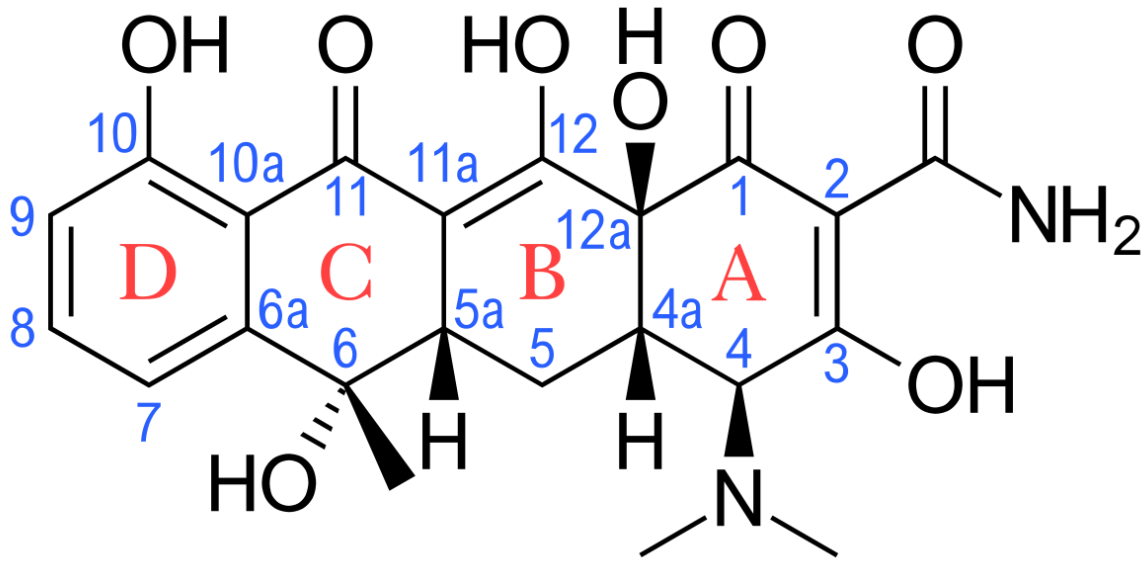
Αρκετές αναφορές περιγράφουν μεθαιμοσφαιριναιμία σε ασθενείς που λαμβάνουν TMP-SMX (Koirala, 2004). Αν και αυτή η ανεπιθύμητη ενέργεια είναι σπάνια, έχει ως αποτέλεσμα πάνω από το 1% του σιδήρου της αίμης, να υπάρχει στην οξειδοαναγωγική κατάσταση του σιδήρου (Fe^{3+}), σε σχέση με τη συνηθισμένη κατάσταση σιδήρου (Fe^{2+}). Η μεθαιμοσφαιρίνη δεν μπορεί να δεσμεύσει το οξυγόνο, με αποτέλεσμα την αναιμία και τον μπλε-καφέ αποχρωματισμό του δέρματος.



Εικόνα 2.22: Μεθαιμοσφαιριναιμία (Πηγή: https://coreem.net/core/methemoglobinemia/).

2.4.3 Τετρακυκλίνες (TC's)

Χρήση



Εικόνα 2.23: Χημική Δομή Τετρακυκλίνων (Πηγή: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/).

Οι TC's (OTC, χλωροτετρακυκλίνη, DOX, τετρακυκλίνη) είναι αντιβακτηριακοί παράγοντες ευρέος φάσματος που δρουν αναστέλλοντας τις 30 βακτηριακές ριβοσωμικές υπομονάδες και αναστέλλοντας τη σύνθεση πρωτεϊνών. Αυτή η κατηγορία αντιβακτηριακών ουσιών χρησιμοποιείται συχνά στη θεραπεία μολυσματικών νόσων των πτηνών, ιδιαίτερα σε βακτηριακές ασθένειες του αναπνευστικού συστήματος (Croubels et al., 1998).

Οι TC's μπορούν να χορηγηθούν διά του στόματος (τροφή ή νερό) ή με ένεση. Η DOX είναι ιδιαίτερα λιπόφιλη και διαχέεται ευρέως στον οργανισμό των κοτόπουλων. Πολλές μελέτες έχουν δείξει ότι τα κατάλοιπα φαρμάκων από την κατηγορία των τετρακυκλινών εξαλείφονται, σε κάποιο βαθμό, κατά το μαγείρεμα του κρέατος (Yoshida, Yonezawa et al., 1971).

Η αύξηση της τετρακυκλίνης στις ζωοτροφές πουλερικών επιτυγχάνεται συνήθως με τη μείωση της συγκέντρωσης ασβεστίου στη ζωοτροφή για την πρόληψη της χηλικοποίησης της τετρακυκλίνης και τη βελτίωση της απορρόφησης του φαρμάκου. Οι TC's χρησιμοποιούνται συχνά στα πουλερικά στην πρώιμη φάση της ζωής τους, επομένως τροφές με μειωμένη

συγκέντρωση ασβεστίου θα πρέπει να χρησιμοποιούνται μόνο για σύντομες περιόδους, αφού το ασβέστιο είναι απαραίτητο για την ανάπτυξη (Patel et al, 2018).

Ιστορικά στοιχεία

Ενώ οι μελέτες σχετικά με την αντίσταση σε αντιβιοτικά και ειδικότερα σε TC's επεκτάθηκαν ταχέως κατά τη διάρκεια της δεκαετίας του 1980, αυτή η χρονική περίοδος έφερε επίσης μία άλλη ενδιαφέρουσα ανακάλυψη για τις TC's, που φαίνεται να ξαναγράφει την ιστορία τους, αλλάζοντας την ημερομηνία της ανακάλυψής τους σχεδόν 2000 χρόνια. Συγκεκριμένα, ο βιοαρχαιολόγος George Armelagos και οι συνεργάτες του, στο Πανεπιστήμιο του Amherst της Μασαχουσέτης, βρήκαν τετρακυκλίνη σε φθορίζουσες ζώνες στα οστά των σκελετικών υπολειμμάτων μιας φυλής από το αρχαίο Σουδάν που χρονολογείται στην Ύστερη Αρχαιότητα, 350 μ.Χ., από μια περιοχή που ήταν κάποτε γνωστή ως Νουβία (Bassett et al., 1980).

Η ομάδα υπέθεσε ότι οι κάτοικοι από τη Νουβία συνήθιζαν να έχουν βρασμένα σιτηρά ως μέρος της διατροφής τους και ότι μύκητες θα μπορούσαν να έχουν μολύνει τυχαία τις δεξαμενές τους. Έπειτα μόλις το ανακάλυψαν οι κάτοικοι είναι πιθανό να τους χρησιμοποιούσαν επίτηδες για την παραγωγή ενός είδους μπύρας.

Εικόνα 2.24: Η χρήση μυκήτων στα σιτηρά, οδήγησε σε αυξημένες συγκεντρώσεις Τετρακυκλίνων στα οστά των Αρχαίων Νούβων (Πηγή: https://face2faceafrica.com/article/for-ancient-nubians-beer-was-more-than-just-a-drink-it-was-medicine).

Πιο πρόσφατα, η χημική ταυτότητα των οστικών φθοριζουσών ταινιών περιγράφηκε από τον Mark Nelson, όπου η φθορίζουσα ζώνη του οστού εκχυλίστηκε και χαρακτηρίστηκε με φασματομετρία μάζας HPLC και βρέθηκε να περιέχει σημαντικές ποσότητες τετρακυκλίνης (Nelson et al., 2010). Αυτές οι διαπιστώσεις δείχνουν ότι οι TC's παρήχθησαν από τους αρχαίους Νούβες και θα μπορούσαν να ήταν ένα από τα πρώτα αντιβιοτικά που παράγονται μέσω ζύμωσης, σχεδόν 2000 χρόνια πριν από την ανακάλυψη της πενικιλίνης . Ήταν επίσης προφανές ότι η ζύμωση των TC's δεν ήταν ένα απομονωμένο γεγονός, εφόσον βρέθηκαν φθορίζουσες ζώνες και σε οστά από άλλες τοπικές γεωγραφικές περιοχές αλλά και σε άλλες απομακρυσμένες περιοχές (Cook et al., 1989).

Η ανακάλυψη των τετρακυκλινών

Στις αρχές της δεκαετίας του 1940, η ανακάλυψη των αντιβιοτικών άρχισε να εξελίσσεται ταχέως. Σημαντική ήταν η συμβολή, μέσω του έργου και των μεθόδων, του μικροβιολόγου René Dubos (Dubos et al., 1941) και της χημικής ποικιλότητας που προέρχεται από τους ακτινομύκητες του εδάφους όπως υπέδειξε ο Selman Waksman και οι συνεργάτες του (Waksman et al., 1946).

Αν και υπήρχε πλούτος φυσικών προϊόντων και αντιβιοτικών ενώσεων που μπορούσαν να καταπολεμήσουν τις μικροβιακές ασθένειες, το χρηματοοικονομικό δυναμικό οδήγησε στην επέκταση πολλών φαρμακευτικών εταιρειών στις Ηνωμένες Πολιτείες, με την αμερικανική Cyanamid ως μία από τις πρώτες που αφοσιώθηκε στην έρευνα και την ανάπτυξη αντιβιοτικών. Η Cyanamid δημιούργησε νέα εργαστήρια στον ποταμό Pearl, υπό τη διεύθυνση του γενικού διευθυντή Wilbur Malcolm και του επικεφαλή της έρευνας, Yellapragada Subbarow. Στη συνέχεια, άρχισαν να ψάχνουν για ένα αντιβιοτικό που θα μπορούσε να ανταγωνιστεί τη STR του Waksman, θέτοντας ως σύμβουλο τον 71χρονο Benjamin Minge Duggar, συνταξιούχο καθηγητή φυσιολογίας φυτών και οικονομικής βοτανικής από το Πανεπιστήμιο του Wisconsin. Ο Duggar ήταν παγκοσμίως γνωστός για τις εκτεταμένες γνώσεις και τη μελέτη των μυκήτων του εδάφους. Συγκέντρωσε δείγματα εδάφους από όλο τον κόσμο, από τοποθεσίες που παρήγαγαν ακτινομύκητα. Σε αυτές τις τοποθεσίες οι επιφάνειες του εδάφους παρέμεναν αδιατάρακτες και φυσικές (Duggar, 1948).
Τα δείγματα υποβλήθηκαν σε δοκιμασίες καλλιέργειας. Οι μικροοργανισμοί που αναπτύχθηκαν, δοκιμάστηκαν για αντιβιοτική δραστηριότητα εναντίον Gram-θετικών και

Gram-αρνητικών βακτηρίων. Αν και πολλοί οργανισμοί του εδάφους ήταν γνωστοί για την παραγωγή αντιβιοτικών, τα περισσότερα ήταν τοξικά ή είχαν ανεπιθύμητες ιδιότητες και η ομάδα αντιμετώπισε πολλά ψευδή αποτελέσματα. Ένα δείγμα, ωστόσο, επέστησε την προσοχή τους. Ονομάστηκε A-377 και είχε αποσταλεί στους ερευνητές από τον William Albrecht, που είχε πάρει το δείγμα από το Sanborn Field, μία περιοχή του Πανεπιστημίου Missouri, έξω από την Κολομβία του Μιζούρι. Παρήγαγε μια ασυνήθιστη αποικία κίτρινου χρώματος που ανέστειλε την ανάπτυξη όλων των στελεχών της σε μια αρχική ομάδα βακτηρίων και παρήγαγε αξιοσημείωτα μεγάλες ζώνες αναστολής ανάπτυξης σε άγαρ. Βρήκαν επίσης ότι ακόμη και τα ακατέργαστα εκχυλίσματα της αποικίας διατηρούσαν αξιοσημείωτη αντιβακτηριακή δράση εναντίον του θανατηφόρου τύφου και των ρικεττίδων, όπως ο πυρετός Rocky Mountain, μια λοίμωξη για την οποία δεν υπήρξε καμία θεραπεία. Σύντομα ο ενθουσιασμός για το ευρύ φάσμα δραστικότητας και ισχύος του, για τα θανατηφόρα παθογόνα οδήγησαν στην επισήμανση της άγνωστης ουσίας ως αντιβιοτικού "ευρέως φάσματος", καθιστώντας το ένα από τα πρώτα στο ιατρικό ιστορικό που είχε επιτύχει αυτόν τον τίτλο. Ο Duggar ονόμασε την ένωση aureomycin (ορεομυκίνη) αναφορικά με το κίτρινο χρώμα και το στέλεχος *Streptomyces* χρυσού χρώματος από το οποίο εξήχθη (Duggar, 1948).

Οι προσπάθειες της Cyanamid επεκτάθηκαν, φέρνοντας τον R.D. McCormick για την παραγωγή της ένωσης χρησιμοποιώντας προηγμένες μεθόδους ζύμωσης. Σύντομα η εταιρεία παρήγαγε ορεομυκίνη σε εμπορικές ποσότητες. Μέχρι την 1η Δεκεμβρίου 1948 το φάρμακο εγκρίθηκε από την FDA για κλινική χρήση η οποία στέφθηκε με απόλυτη επιτυχία, δημιουργώντας φήμη και κέρδη για την εταιρεία. Σε σύντομο χρονικό διάστημα, άλλες χημικές εταιρείες ανακοίνωσαν τις ανακαλύψεις τους για νέα αντιβιοτικά.

Ο Alexander Finlay και οι συνεργάτες του στην Charles PfizerCo., Groton, CT, συγκέντρωσαν χιλιάδες δείγματα εδάφους από όλο τον κόσμο και απομόνωσαν το βακτηρίδιο του εδάφους *Streptomyces rimosus* (Finlay et al., 1950). Ο μύκητας που χρησιμοποίησαν παρήγαγε μια ένωση με παρόμοιο χρώμα με την ορεομυκίνη, αλλά ήταν ελαφρώς πιο υδατοδιαλυτή και είχε καλύτερη βιοδραστικότητα, δίνοντάς της ιατρική και ανταγωνιστική θέση έναντι στην ορεομυκίνη για τη θεραπεία μολυσματικών ασθενειών. Η ένωση ονομάστηκε Terramycin (τεραμυκίνη) από τη λέξη terra, λατινική μετάφραση της λέξης έδαφος. Εγκρίθηκε από την FDA το 1950, και ομοίως με την ορεομυκίνη επιτύγχανε την θεραπεία ευρέος φάσματος μολυσματικών ασθενειών (King et al., 1950). Ωστόσο, οι χημικές δομές τόσο της ορεομυκίνης όσο και της τεραμυκίνης ήταν δύσκολο να προσδιοριστούν και

παρέμειναν ασαφείς και για τις δύο εταιρείες. Εκείνη την εποχή ο χημικός χαρακτηρισμός των φυσικών προϊόντων, περιοριζόταν στην φασματοσκοπία υπεριώδους (UV-Vis) και υπέρυθρης φασματοσκοπίας και οι δομικοί χαρακτηρισμοί βασίζονταν σε χημικές τροποποιήσεις και μελέτες που λίγα εργαστήρια στον κόσμο ήταν εξοπλισμένα για να εκτελέσουν. Ο επιστήμονας Karl Brunings σε συνεργασία με τον θρυλικό χημικό του Πανεπιστημίου του Χάρβαρντ, Robert Woodward, αγωνίστηκαν να αποδείξουν τις χημικές δομές και των δύο ενώσεων.

Μέχρι το 1952 βρέθηκαν οι πρόδρομες χημικές δομές τόσο της ορεομυκίνης όσο και της τεραμυκίνης και διαπιστώθηκε ότι η τεραμυκίνη διαθέτει μια επιπλέον ομάδα υδροξυλίου στον C5 και στερείται ενός ατόμου χλωρίου στον C7, σε σύγκριση με την ορεομυκίνη (King et al., 1950).

Δεύτερης γενιάς ημισυνθετικές TC's

Τροποποιήσεις της βασικής δομής της τετρακυκλίνης είχαν στόχο την παραγωγή ισχυρότερων και δραστικών αντιβιοτικών. Χημικοί με επικεφαλή τον Robert Blackwood, επέλεξαν να τροποποιήσουν τον δακτύλιο άνθρακα της OTC για να επιτευχθεί χημική σταθερότητα (Blackwood et al., 1961). Ενώ αυτή η νέα κατηγορία είχε επιθυμητές φαρμακολογικές ιδιότητες σε σύγκριση με την πρόδρομη ένωση, δεν εγκρίθηκε ποτέ από την FDA στις Ηνωμένες Πολιτείες. Ωστόσο, χρησιμοποιήθηκε ως αντιδρών από τον Charlie Stephens για να παράγει ένα ανάλογο με αξιοσημείωτη δραστικότητα, σταθερότητα και φαρμακολογική αποτελεσματικότητα, την DOX. Η DOX εγκρίθηκε για χρήση από την FDA το 1967 (Stephens et al., 1963).

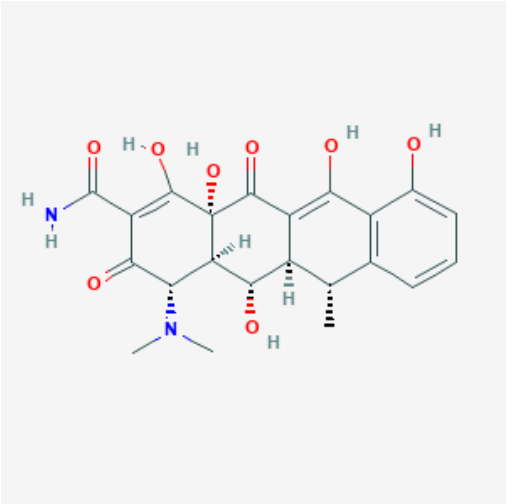
Η DOX εξακολουθεί να χρησιμοποιείται ευρέως σήμερα ως αντιβιοτικό με δράση εναντίον ευρέος φάσματος βακτηριακών ασθενειών και μολύνσεων, *Bacillus anthracis*, ακόμα και ενάντια στην ελονοσία που προκαλείται από το *Plasmodium falciparum* (Dahl et al., 2007). Ένα στέλεχος από τους επιστήμονες της Lederle παρήγαγε μια νέα τετρακυκλίνη που ονόμασαν δεμεκλοκυκλίνη (McCormick et al., 1957). Μια τετρακυκλίνη που διαθέτει μοναδικές C6 και C7 λειτουργικές ομάδες. Ενώ ήταν ελάχιστα βιοδραστική, η δεμεκλοκυκλίνη τροποποιήθηκε χημικώς για να αποδώσει ένα ενδιάμεσο που διατηρεί τη δραστικότητα, ενώ φιλοξενεί την ελάχιστη δομή που απαιτείται για αντιβακτηριακή δραστηριότητα. Αυτό το νέο ενδιάμεσο έγινε γνωστό ως σανκυκλίνη (sancycline).

Οι περισσότερες TC's λειτουργούν ως βακτηριοστατικοί παράγοντες ή ως αναστολείς πρωτεϊνικής σύνθεσης των βακτηρίων. Ωστόσο, διαπιστώθηκε ότι οι περισσότερες λιποφιλικές TC's έχουν βακτηριοκτόνο μηχανισμό που στηρίζεται σε διαταραχή της μεμβράνης, επηρεάζοντας πολλαπλές οδούς στα κύτταρα, οδηγώντας σε κυτταρική δυσλειτουργία (Oliva et al., 1992). Σε υδατικό διάλυμα οι TC's υιοθετούν πολλαπλές διαμορφώσεις, με κυρίαρχες τόσο τις υδρόφιλες όσο και τις αμφι-ιονικές μορφές, ενώ στα περιβάλλοντα των λιπιδίων επικρατεί μια μη φορτισμένη και χημικά ουδέτερη μορφή.

Παρενέργειες

Οι TC's έχουν γαστρεντερικές παρενέργειες, ναυτία, έμετο και διάρροια. Οι TC's τροποποιούν την φυσιολογική εντερική χλωρίδα, επιτρέποντας την υπερπαραγωγή των *Pseudomonas*, *Proteus* και *Clostridium*. Η κολπική καντιντίαση συνδέεται με τη λήψη TC's. Επίσης, βρίσκονται στη δομή των νεοδιαμορφωμένων δοντιών, αν λαμβάνεται κατά τη διάρκεια ορισμένων περιόδων εγκυμοσύνης, όπως στο στάδιο της εμβρυϊκής ανάπτυξης. Η ηπατοτοξικότητα συμβαίνει στις περιπτώσεις που οι ασθενείς είχαν προηγουμένως ηπατική ανεπάρκεια ή έπειτα από ενδοφλέβια χορήγηση TC's. Η νεφροτοξικότητα εμφανίζεται όταν χορηγούνται μαζί με διουρητικά. Φλεβική θρόμβωση και ευαισθησία στο φως αποτελούν επίσης παρενέργειες. Η ναυτία και η ζάλη εμφανίζονται στο 35-70% των περιπτώσεων χορήγησης (Bricker et al., 2002).

Δοξυκυκλίνη (DOX)



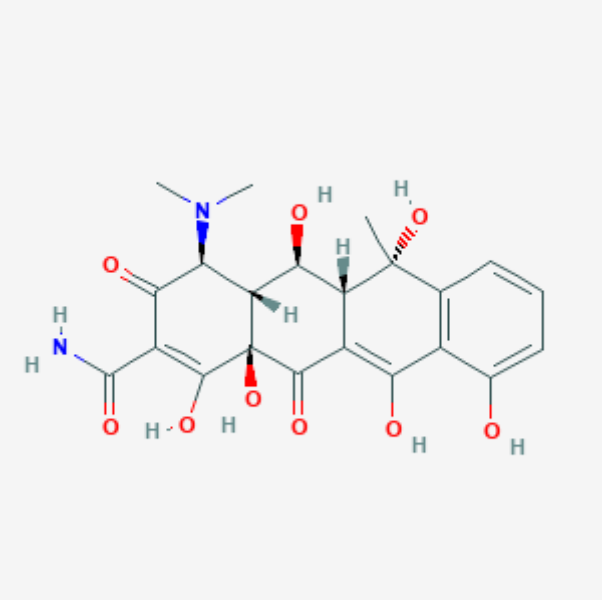
Εικόνα 2.25: Χημική Δομή DOX (Πηγή: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/).

Σε παγκόσμια κλίμακα, η DOX παρέμεινε ένα από τα πιο συνηθισμένα ευρέως φάσματος αντιβιοτικά φάρμακα (Holmes et al., 2009). Έχει μοριακό τύπο $C_{22}H_{24}N_2O_8$. Στην Αυστραλία, κατά την περίοδο 2002-2005, καταγράφηκαν πάνω από 800.000 συνταγές DOX 100 mg ετησίως. Η ανάπτυξη της DOX το 1967 ακολούθησε την ανάπτυξη της κατηγορίας των ενώσεων τετρακυκλίνης και την κλινική εφαρμογή τους το 1953 (Smith et al., 2005).

Η DOX έχει σημαντική εφαρμογή στη θεραπεία κοινών χρόνιων παθήσεων, όπως η ακμή. Ωστόσο, η χρήση της σε μια σειρά ασυνήθιστων μολυσματικών ασθενειών, συμπεριλαμβανομένων αυτών που περιγράφουν ο Holmes και οι συνεργάτες ως «άτυπα βακτηρίδια», έδωσε στη DOX κάποια φήμη ως «φάρμακο θαύμα» ή το «μυστικό όπλο του ιατρού λοιμωδών νοσημάτων» (Holmes et al., 2009). Εκτός από τη θεραπεία των κοινών αιτιών των λοιμώξεων του αναπνευστικού και του ουροποιητικού συστήματος, μερικές από τις ευρύτερες εφαρμογές της είναι ασθένειες όπως οι μολύνσεις από ρικέτσια (Terheggan et al., 2007), λεπτοσπείρωση (Guidugli et al., 2000), ελονοσία (Jong et al., 2001), βρουκέλωση (Sauret et al. 2002) και αρκετές σεξουαλικά μεταδιδόμενες ασθένειες (Holmes et al., 2009). Έχει επίσης μια ποικιλία εφαρμογών στην οδοντιατρική (Mohommadi, 2009). Αξίζει να σημειωθεί ότι σημειώθηκε αύξηση κατά 30% του αριθμού των συνταγών για DOX μετά από τις ανησυχίες για τη βιοτρομοκρατία του άνθρακα, το 2000-2001 (Shaffer et al., 2003).

Η DOX είναι ένα βακτηριοστατικό φάρμακο που αναστέλλει τη σύνθεση πρωτεϊνών, όπως περιγράφεται από τον Holmes και τους συνεργάτες του (Holmes et al., 2009). Μπορεί να χορηγηθεί από το στόμα (συνήθως 200 mg ως αρχική δόση και στη συνέχεια 100-200 mg ημερησίως ανάλογα με τη σοβαρότητα της λοίμωξης) ή παρεντερικά. Το φάρμακο απορροφάται σχεδόν πλήρως από τη γαστρεντερική οδό και δεσμεύεται σε μεγάλο βαθμό από τις πρωτεΐνες του πλάσματος (93%). Αποβάλλεται από τα νεφρά και έχει χρόνο ημιζωής 18 ώρες, επιτρέποντας τη χορήγηση μιας δόσης ημερησίως. Τα αντιόξινα σκευάσματα που περιέχουν αλουμίνιο, ασβέστιο, μαγνήσιο ή σίδηρο ενδέχεται να επηρεάσουν την απορρόφηση της DOX. Η DOX μπορεί να καταστήσει τα από του στόματος αντισυλληπτικά λιγότερο αποτελεσματικά. Επιπλέον, επειδή τα αντισπασμωδικά όπως η φαινυτοΐνη, τα βαρβιτουρικά και η καρβαμαζεπίνη προκαλούν ηπατική μικροσωμική ενζυμική δραστηριότητα, τα επίπεδα DOX και ο χρόνος ημιζωής της μπορεί να μειωθούν (Beallor et al., 2001).

Οξυτετρακυκλίνη (OTC)



Εικόνα 2.26: Χημική Δομή OTC (Πηγή: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/).

Η OTC έχει μοριακό τύπο $C_{22}H_{24}N_2O_9$. Αναστέλλει την κυτταρική ανάπτυξη, αναστέλλοντας την μετάφραση. Συγκεκριμένα, προσδένεται στην υποομάδα 30S του ριβοσώματος και προλαμβάνει την πρόσδεση του αμινο-άκυλ tRNA στη πλευρά A του ριβοσώματος (US Pharmacopeial Convention, 1992).

Ορισμένες μελέτες έχουν δηλώσει ότι η OTC αντενδείκνυνται κατά τη διάρκεια του θηλασμού εξαιτίας της πιθανής χρώσης του οδοντικού σμάλτου των βρεφών ή της εναπόθεσης τετρακυκλινών στα οστά. Επίσης, μπορεί να παρατηρηθεί μείωση των γραμμικών ρυθμών σκελετικής ανάπτυξης σε πρόωρα βρέφη. Επομένως, οι TC's δεν συνιστώνται σε παιδιά κάτω των 8 ετών, εκτός εάν είναι απίθανο να είναι αποτελεσματικά ή αντενδείκνυται άλλα φάρμακα. Επιπρόσθετα είναι πιθανή η επίπτωση στη γαστρεντερική χλωρίδα, με συμπτώματα όπως διάρροια ή καντιντίαση (US Pharmacopeial Convention, 1992).

Διάφορες δερματικές αντιδράσεις, όπως εξανθήματα, κνίδωση και γενικευμένη απολεπιστική δερματίτιδα, μπορεί να ακολουθήσουν μετά τη χρήση OTC, αλλά είναι σπάνιες. Μεταξύ των πιο σοβαρών αλλεργικών αντιδράσεων είναι το αγγειοοίδημα και η αναφυλαξία. Οι αναφυλακτοειδείς αντιδράσεις μπορεί να εμφανιστούν ακόμη και μετά από τη στοματική χρήση αυτών των παραγόντων. Άλλες επιδράσεις που οφείλονται στην υπερευαισθησία είναι η αίσθηση υπερθέρμανσης των οφθαλμών, η ατροφική ή υπερτροφική γλωσσίτιδα, ο κνησμός, η αιμορραγία και η κολπίτιδα. Αυτές οι παρενέργειες συχνά παραμένουν για

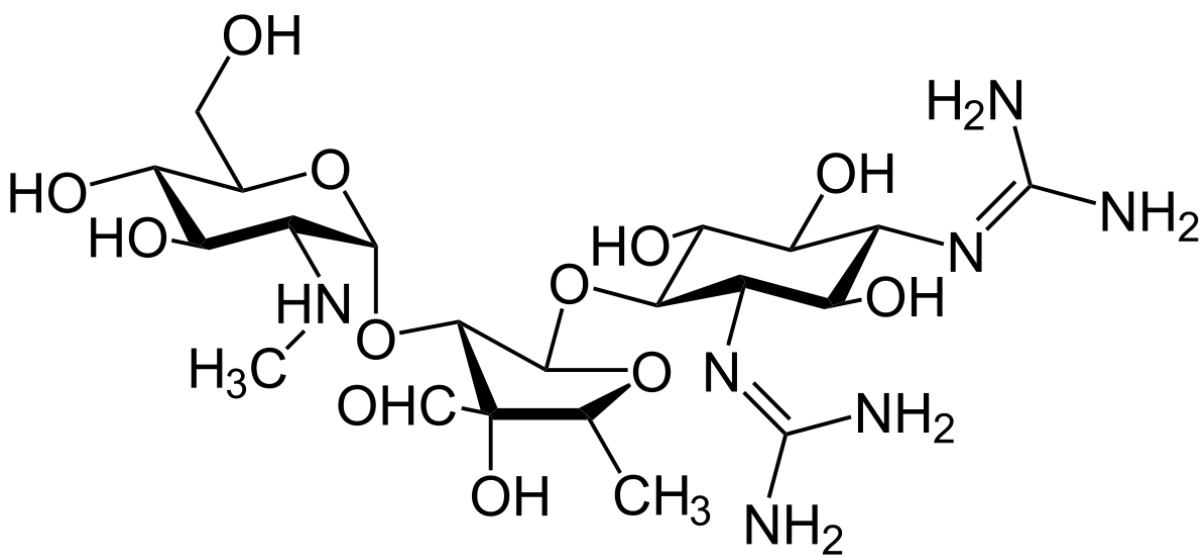
εβδομάδες ή μήνες μετά τη διακοπή της θεραπείας με οξυτετρακυκλίνη. Η ακριβής αιτία αυτών των αντιδράσεων είναι άγνωστη. Ύστερα από την κατανάλωσή τους μπορεί να εμφανιστεί πυρετός και ηωσινοφιλία. Το άσθμα έχει επίσης παρατηρηθεί (Hardman et al., 2001).

Η OTC, λόγω της υδατοδιαλυτότητάς της, παρουσιάζει κακή απορρόφηση, μετά τη χορήγηση από το στόμα (~ 58%), κυρίως μετά την πρόσληψη τροφής. Η πλειοψηφία της απορρόφησης φαρμάκου λαμβάνει χώρα στο στομάχι και στο άνω λεπτό έντερο και το ποσοστό του φαρμάκου που δεν απορροφάται αυξάνει μαζί με την αύξηση της δόσης. Η OTC έχει σχετικά αργή κατανομή και το 27-35% του φαρμάκου δεσμεύεται με τις πρωτεΐνες του πλάσματος (Agwuh, 2006). Ο χρόνος ημιζωής στον οργανισμό είναι 9,2 ώρες. Η OTC χαρακτηρίζεται ως τετρακυκλίνη βραχείας δράσης.

Η OTC αλληλεπιδρά ασθενώς με το ριβόσωμα 80S των ευκαρυωτικών κυττάρων, δημιουργώντας μια σχετικά ασθενή αναστολή της πρωτεϊνικής σύνθεσης, η οποία τίθεται ως ένας από τους λόγους για τον οποίο οι TC's έχουν παρενέργειες στον άνθρωπο (Roberts, 2003).

2.4.4 Αμινογλυκοσίδες (AG's)

Χρήση



Εικόνα 2.17: Χημική Δομή Αμινογλυκοσίδων (Πηγή: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/).

Οι AG's είναι ισχυρά αντιβιοτικά ευρέως φάσματος που δρουν μέσω της αναστολής της πρωτεϊνικής σύνθεσης. Η τάξη αυτή έγινε ευρέως γνωστή όταν η STR απομονώθηκε από το *Streptomyces griseus* και χρησιμοποιήθηκε για κλινική χρήση το 1944. Ακολούθως, αρκετές άλλες ενώσεις της ίδιας κατηγορίας απομονώθηκαν : νεομυκίνη (1949, *S. fradiae*), καναμυκίνη (1957, *S. kanamyceticus*), γενταμικίνη (1963, *Micromonosporapurpurea*), νετιλμισίνη (1967, από τη σισομισίνη), τομπραμυκίνη (1967, *S. tenebrarius*), και αμικασίνη (1972, από την καναμυκίνη). Μείωση της συστηματικής χρήσης αυτής της κατηγορίας αντιβιωτικών σημειώθηκε τη δεκαετία του 1980 εξαιτίας της διαθεσιμότητας των κεφαλοσπορινών τρίτης γενιάς, των καρβαπενεμών και των FQNL's, τα οποία θεωρήθηκαν λιγότερο τοξικά ή/και παρείχαν ευρύτερη κάλυψη σε σύγκριση με τις AG's. Ωστόσο, η αύξηση της ανθεκτικότητας σε αυτές τις κατηγορίες φαρμάκων (κεφαλοσπορίνες, κ.ά.), σε συνδυασμό με την βαθύτερη γνώση της βάσης της αντοχής των AG's, οδήγησε στην ανάπτυξη νέων AG's όπως η αρβεκασίνη και η πλαζομικίνη. Αυτοί οι τελευταίοι παράγοντες σχεδιάστηκαν για να ξεπεράσουν τους κοινούς μηχανισμούς αντίστασης στις AG's, διατηρώντας έτσι τη δραστικότητα έναντι παθογόνων βακτηρίων ανθεκτικών σε πολλαπλά φάρμακα (Multiple Drug Resistance, MDR).

Οι AG's είναι ιδιαίτερα ισχυρές έναντι των μελών της οικογένειας *Enterobacteriaceae*, συμπεριλαμβανομένων *Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae, K. Oxytoca, Enterobactercloacae, E. Aerogenes, Providencia spp., Proteus spp., Morganella spp*. και *Serratia spp*. Επιπλέον, οι AG's είναι δραστικές έναντι του *Yersinia pestis* (Heine, 2015) και του *Francisella tularensis*, των παραγόντων της πανώλης και της τυρορεμίας, αντίστοιχα. Επίσης παρουσιάζουν καλή αποτελεσματικότητα εναντίον του *Staphylococcus aureus*, και των ανθεκτικών στην μεθικιλλίνη και την βανκομυκίνη παραγόντων, *P. aeruginosa* και σε μικρότερο βαθμό στο *Acinetobacter baumannii*. Πολλά βακτήρια της οικογένειας του *Mycobacterium spp*. είναι επίσης ευαίσθητα σε AG's, συμπεριλαμβανομένων των *Mycobacterium tuberculosis, M. fortuitum, M. chelonae* και *M. avium* (Ho et al, 1997).

Η μεταφορά ηλεκτρονίων είναι απαραίτητη για την πρόσληψη AG's στα κύτταρα, οπότε η κατηγορία αυτή έχει εγγενώς έλλειψη δραστικότητας έναντι αναερόβιων βακτηριδίων. Οι AG's είναι επίσης μη δραστικές έναντι των περισσότερων στελεχών *Burkholderia spp*. και *Stenotrophomonas spp*. καθώς και *Streptococcus spp*. και *Enterococcus spp*. (Podnecky et al., 2015).

Η δραστικότητα ευρέως φάσματος των AG's αυξάνεται in vitro μέσω συνέργιας με άλλες κατηγορίες αντιμικροβιακών ουσιών. Αυτό το φαινόμενο, στο οποίο το συνδυασμένο αποτέλεσμα δύο αντιμικροβιακών παραγόντων είναι μεγαλύτερο από το άθροισμα των επιμέρους αποτελεσμάτων τους, παρατηρείται ιδιαίτερα μεταξύ των AG's και των β-λακταμών. Η in vitro συνέργια μεταξύ των AG's και β-λακταμών παρατηρήθηκε τόσο σε αρνητικούς κατά Gram όσο και σε θετικούς κατά Gram μικροοργανισμούς (Eliopoulos 1988).

Οι AG's αναστέλλουν την πρωτεϊνική σύνθεση με δέσμευση στην Α-θέση 16S στο ριβοσωματικό RNA, του ριβοσώματος 30S. Ως αποτέλεσμα αυτής της αλληλεπίδρασης, το αντιβιοτικό προάγει την λάθος μετάφραση προκαλώντας εσφαλμένη ανάγνωση κωδικωνίων και κατ' επέκταση σφάλματα στην πρωτεϊνική σύνθεση. Μερικές AG's μπορούν επίσης να επηρεάσουν την πρωτεϊνική σύνθεση με άμεση αναστολή της έναρξης ή παρεμποδίζοντας την επιμήκυνση της πρωτεΐνης .

Οι AG's χαρακτηρίζονται από μια δομή πυρήνα αμινοσάκχαρων που συνδέονται μέσω γλυκοσιδικών δεσμών με μια διβασική αμινοκυκλιτόλη, η οποία είναι συνηθέστερα η 2-δεοξυστρεπταμίνη. Οι AG's ταξινομούνται ευρέως σε τέσσερις υποκατηγορίες με βάση την ταυτότητα της χαρακτηριστικής ομάδας αμινοκυκλιτόλης: (1) καμία δεοξυστρεπταμίνη (π.χ., STR, η οποία έχει δακτύλιο στρεπτιδίνης), (2) ένα μονο-υποκατεστημένο δακτύλιο δεοξυστρεπταμίνης (π.χ., απραμυκίνη), (3) έναν δακτύλιο 4,5-διυποκατεστημένης δεοξυστρεπταμίνης (π.χ., νεομυκίνη, ριβοσταμυκίνη), ή (4) έναν δακτύλιο 4,6-διυποκατεστημένης δεοξυστρεπταμίνης (π.χ., GEN, αμικακίνη, τομπραμυκίνη και πλαζομικίνη) (Wachino & Arakawa 2012).

Οι AG's απορροφούνται ελάχιστα μέσω της γαστρεντερικής (GI) οδού και έτσι χορηγούνται ενδοφλέβια ή ενδομυϊκά. Οι AG's κατανέμονται και στους πνεύμονες. Αυτό το χαρακτηριστικό έχει οδηγήσει σε εκτεταμένη χρήση των AG's ως μέσο συνδυαστικών θεραπευτικών αγωγών για τη θεραπεία της πνευμονίας. Οι AG's απομακρύνονται ταχέως μέσω του ουροποιητικού συστήματος, κάτι το οποίο καθιστά αυτά τα φάρμακα ιδανικά για τη θεραπεία λοιμώξεων του ουροποιητικού συστήματος (Craig 2011).

<u>Ιστορικά στοιχεία</u>

Η ανακάλυψη της συνηθέστερης AG, της STR, οφείλεται στον Shelman Waksman και τους συνεργάτες του. Από το 1914 είχαν αρχίσει μελέτες σχετικά με τους ακτινομύκητες του

χώματος, οι οποίοι το 1943 μετονομάσθηκαν σε στρεπτομύκητες (Waksman et al., 1946). Ο Waksman μαζί με τους φοιτητές του και τους συνεργάτες του απομόνωσε ένα σημαντικό αριθμό νέων αντιβιοτικών, όπως η ακτινομυκίνη (1940, δραστική σε Gram-θετικά βακτήρια), η κλαβακίνη (1942), η στρεπτοτριχίνη (1942, δραστική σε Gram-αρνητικά βακτήρια), η STR (1943, δραστική σε Gram-θετικά και Gram-αρνητικά βακτήρια), η γκρισεΐνη (1946), η νεομυκίνη (1948), η φραδικίνη, η κανδιδίνη κ.ά. Δύο από αυτά, η STR και η νεομυκίνη έχουν εκτεταμένη εφαρμογή στη θεραπεία πολλών λοιμωδών νόσων ανθρώπων, ζώων και φυτών. Ο Waksman για την ουσιαστική συμβολή του στην ανακάλυψη αυτή έλαβε το Nobel Φυσιολογίας - Ιατρικής το 1952.

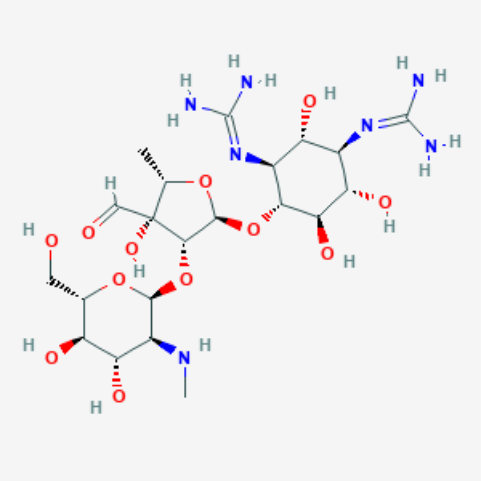
Οι AG's χρησιμοποιήθηκαν εκτενώς στην αρχή της αντιμικροβιακής χημειοθεραπείας αλλά αντικαταστάθηκαν σε μεγάλο βαθμό, τη δεκαετία του 1980, με πιο αποτελεσματικά αντιμικροβιακά, με μικρότερες παρενέργειες, όπως οι κεφαλοσπορίνες, οι καρβαπενέμες και οι FQNL's. Η γενταμικίνη (GEN) εξακολουθεί να χρησιμοποιείται ευρέως σε νοσοκομειακά ιδρύματα για τη θεραπεία σοβαρών λοιμώξεων. Η αμικασίνη χρησιμοποιείται συνήθως σε μονάδες εντατικής θεραπείας για τη θεραπεία ασθενών με απειλητικές για τη ζωή Gram-αρνητικές λοιμώξεις (Craig 2011).

<u>Παρενέργειες</u>

Οι AG's είναι τυπικοί υδρόφιλοι παράγοντες. Μετά από συστηματική χορήγηση, η κατανομή περιορίζεται στο εξωκυτταρικό περιβάλλον στους περισσότερους ιστούς. Αυτό οφείλεται στην ανικανότητα των AG's να διασχίζουν την πλασματική μεμβράνη των ευκαρυωτικών κυττάρων με παθητική διάχυση.

Παρά το γεγονός αυτό και τη χαμηλή κατανομή σε ιστούς, είναι γνωστό ότι περίπου το 5-10% των ασθενών που λαμβάνουν AG's μπορεί να παρουσιάσουν αναστρέψιμη νεφροτοξικότητα. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι οι AG's μπορούν να εισέλθουν στα εγγύς εσπειραμένα σωληνάρια μέσω της μεγαλίνης, υποδοχέα πολλαπλών υποκαταστατών. Έχει υπολογιστεί ότι μέχρι 5% της χορηγούμενης δόσης μπορεί να συσσωρευτεί μέσα στα νεφρικά εσπειραμένα σωληνάρια. Δυστυχώς, η απέκκριση των AG's από αυτό το ενδοκυτταρικό διαμέρισμα συμβαίνει πολύ αργά και μπορεί να διαρκέσει αρκετές ημέρες (Nagai et al., 2014).

Στρεπτομυκίνη (STR)



Εικόνα 2.28: Χημική Δομή STR (Πηγή: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/).

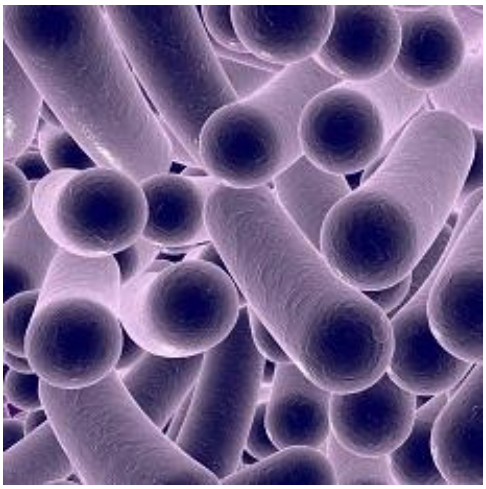
Η STR είναι υδατοδιαλυτή αμινογλυκοσίδη που παράγεται από τον *Streptomyces griseus* και κυκλοφορεί με τη μορφή του θειικού άλατος. Ακόμα, μπορεί να λάβει χώρα η βιοσύνθεσή της (στον οργανισμό) από τη διυδροστρεπτομυκίνη (dihydrostreptomycin). Έχει μοριακό τύπο $C_{21}H_{39}N_7O_{12}$.

Η STR ανακαλύφθηκε σύντομα μετά την εισαγωγή της πενικιλίνης στην ιατρική, αποτελώντας το δεύτερο μείζον θεραπευτικά χρήσιμο αντιβιοτικό. Παρείχε την πρώτη αποτελεσματική θεραπεία για τη φυματίωση, τη φυματιώδη μηνιγγίτιδα και μια σειρά άλλων λοιμώξεων που προκαλούνται από παθογόνα Gram αρνητικά βακτήρια (Keefer, 1949).

Οι παρενέργειες περιλαμβάνουν διαταραχές της αιθουσαίας και κοχλιακής μοίρας του στατικοακουστικού νεύρου, δυσλειτουργία του οπτικού νεύρου, περιφερική νευρίτιδα, αραχνοειδίτιδα και εγκεφαλοπάθεια. Η νεφρική λειτουργία θα πρέπει να παρακολουθείται προσεκτικά. Οι ασθενείς με νεφρική δυσλειτουργία ή/και κατακράτηση αζώτου πρέπει να λαμβάνουν μειωμένες δόσεις. Η μέγιστη συγκέντρωση στον ορό σε άτομα με νεφρική βλάβη δεν πρέπει να υπερβαίνει τα 20 έως 25 μg/mL. Πρέπει να αποφεύγεται η ταυτόχρονη ή διαδοχική χρήση άλλων νευροτοξικών ή/και νεφροτοξικών φαρμάκων με θειϊκή STR, συμπεριλαμβανομένων νεομυκίνης, καναμυκίνης, GEN, κεφαλοριδίνης, παρομομυκίνης, βιομυκίνης, πολυμυξίνης B, κολιστίνης, τομπραμυκίνης και κυκλοσπορίνης. Η νευροτοξικότητα της STR μπορεί να οδηγήσει σε αναπνευστική παράλυση από νευρομυϊκή απόφραξη, ειδικά όταν το φάρμακο χορηγείται σύντομα μετά τη χρήση αναισθησίας ή μυοχαλαρωτικών (Dailymed).

Η STR μπορεί να προκαλέσει βλάβη στο έμβρυο όταν χορηγείται σε έγκυο γυναίκα. Επειδή η STR διασχίζει εύκολα τον φραγμό του πλακούντα, η προσοχή κατά τη χρήση του φαρμάκου είναι σημαντική για την πρόληψη της ωτοτοξικότητας στο έμβρυο. Εάν το φάρμακο αυτό χρησιμοποιείται κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης ή αν η ασθενής μείνει έγκυος κατά τη λήψη αυτού του φαρμάκου, τότε θα πρέπει να ενημερώνεται για τον πιθανό κίνδυνο για το έμβρυο (American Society of Health-System Pharmacists 2016).

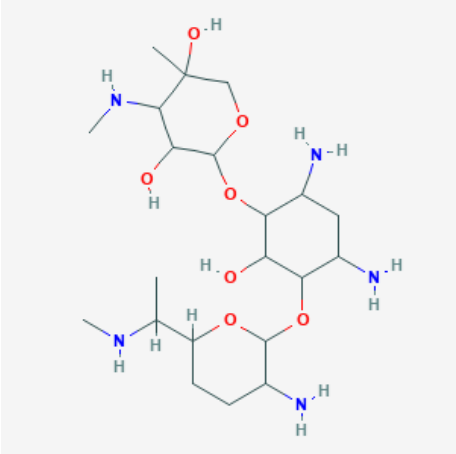
Έχει αναφερθεί ως παρενέργεια, διάρροια σχετιζόμενη με το βακτήριο *Clostridium difficile* (CDAD), με τη χρήση ενέσιμης STR αλλά και άλλων αντιβακτηριακών φαρμάκων, και όσον αφορά στη σοβαρότητα των συμπτωμάτων μπορεί να κυμαίνονται από ήπια διάρροια έως μοιραία κολίτιδα. Γενικά, η θεραπεία με αντιβακτηριακούς παράγοντες μεταβάλλει τη φυσιολογική χλωρίδα του παχέος εντέρου και οδηγεί σε υπερανάπτυξη του *C. difficile.* Το *C. difficile* παράγει τις τοξίνες Α και Β οι οποίες συμβάλλουν στην ανάπτυξη του CDAD. Τα στελέχη που παράγουν υπερτοξίνη του *C. difficile* προκαλούν αυξημένη νοσηρότητα και θνησιμότητα, καθώς αυτές οι μολύνσεις μπορεί να είναι ανθεκτικές στην αντιμικροβιακή θεραπεία και μπορεί να απαιτούν συλλεκτομία (American Society of Health-System Pharmacists 2016).



Εικόνα 2.29: Clostridium difficile (Πηγή: https://medlineplus.gov/clostridiumdifficileinfections.html).

Έχει αναφερθεί αρνητική επίδραση και στο κεντρικό νευρικό σύστημα, που χαρακτηρίζεται από δυσφορία και ευαισθησία, περιστασιακά κώμα και βαθιά αναπνευστική καταστολή σε πολύ μικρά βρέφη στα οποία η δόση STR είχε υπερβεί τα συνιστώμενα όρια. (American Society of Health-System Pharmacists 2016)

Γενταμικίνη (GEN)



Εικόνα 2.30: Χημική Δομή GEN (Πηγή: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/).

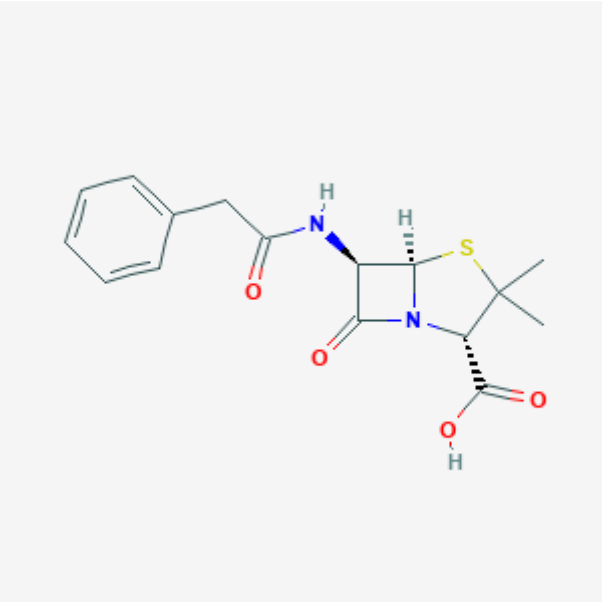
Η GEN είναι ένα αντιβιοτικό της κατηγορίας των AG's και έχει μοριακό τύπο $C_{21}H_{43}N_5O_7$. Καταστρέφει τα βακτηρίδια αναστέλλοντας τη σύνθεση πρωτεϊνών και σε κάποιο βαθμό λύοντας το κυτταρικό περίβλημα. Η GEN είναι συχνά το πρώτο φάρμακο επιλογής. Σε συνδυασμό με αντιβιοτικά β-λακτάμης συνιστάται για τη θεραπεία της σήψης ή της πνευμονίας και είναι δραστική έναντι των *P. aeruginosa*, *Enterobacter*, *Klebsiella* και *Serratia*. Ωστόσο, η GEN είναι ωτοτοξική και νεφροτοξική (Dupont et al., 2001).

Η GEN είναι μια φυσική ουσία που παράγεται από τα θετικά κατά Gram βακτήρια *Micromonospora* και απομονώθηκε για πρώτη φορά το 1963. Η απορρόφηση από το έντερο είναι πολύ περιορισμένη για να αποκλειστεί η χρήση της κατά τη γαλουχία. Σε υγιή βρέφη ο χρόνος ημίσειας ζωής μειώνεται κατά περισσότερο από 50% στις πρώτες 7 έως 10 ημέρες μετά τη γέννηση. Η νεφρική βλάβη είναι προοδευτική με το χρόνο και μπορεί ακόμη και να προκαλέσει σύνδρομο τύπου Bartter. Η κοχλιακή βλάβη είναι ασυνήθιστη στα μικρά παιδιά, αλλά η GEN μπορεί να προκαλέσει κώφωση υψηλού τόνου και αυτά μπορούν να γίνουν μόνιμα εάν τα πρόωρα συμπτώματα δεν αναγνωριστούν (Cooper et al., 2011).

Η GEN ανήκει σε μια κατηγορία φαρμάκων που απεκκρίνονται μέσω του νεφρικού συστήματος, πράγμα που σημαίνει ότι τα νεφρά ενός ατόμου πρέπει να είναι σε καλή κατάσταση για να εξαλείψουν το φάρμακο από το σύστημά τους. Συνήθως, ένας ενήλικας δεν πρέπει να πάρει περισσότερο από 5-7mg / kg / ημέρα. Τα άτομα με κακή νεφρική λειτουργία δεν πρέπει να λαμβάνουν GEN (Begg et al., 1995).

Συνεργιστική δράση αμινογλυκοσίδων-πενικιλλίνης(PCN)

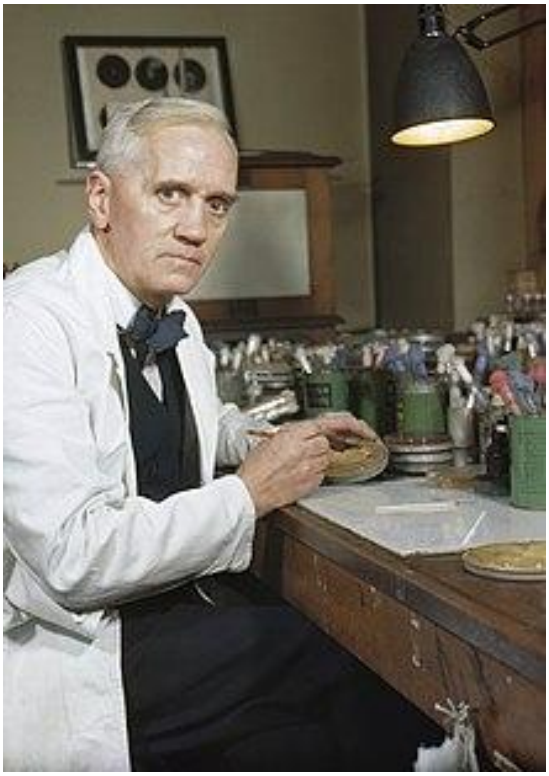
Η PCN είναι μια ομάδα αντιβιοτικών που περιλαμβάνει την PCNG (με μοριακό τύπο $C_{16}H_{18}N_2O_4S$, ενδοφλέβια χρήση), την PCNV (μοριακός τύπος $C_{16}H_{18}N_2O_5S$, χρήση από το στόμα)και και την προκαϊνική πενικιλίνη G (μοριακός τύπος $C_{29}H_{38}N_4O_6S$, ενδομυϊκή χρήση). Συνήθως χρησιμοποιείται μαζί με AG's, με σκοπό την πιο αποτελεσματική δράση των φαρμάκων.



Εικόνα 2.31: Χημική Δομή PCN (Πηγή: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/).

Το 1929 ο Άγγλος μικροβιολόγος Alexander Fleming δημοσίευσε ότι καλλιέργειες *Penicillium* (*Penicillium notatum*) έχουν αντιβακτηριακή δράση και από τότε άρχισε η έρευνα για τα αντιβιοτικά. Η ανακάλυψη της PCN από τον Fleming οφείλεται σε τυχαία συμβάντα. Έκανε πειράματα για τις βακτηριολυτικές ιδιότητες της λυσοζύμης (ένζυμο φαγοκυττάρωσης, που απομόνωσε το 1922) σε καλλιέργειες σταφυλόκοκκων. Μια καλλιέργεια επιμολύνθηκε από μούχλα, γεγονός αρκετά κοινό σε βιολογικό εργαστήριο, αλλά εκείνο, που τράβηξε την προσοχή του Fleming, ήταν ότι οι κίτρινες αποικίες των σταφυλόκοκκων είχαν εξαφανισθεί, εκεί, όπου υπήρχε η μούχλα. Στη συνέχεια απομόνωσε το μύκητα και τον καλλιέργησε σε τρυβλία, όπου εμβολίασε παθογόνα μικρόβια. Παρατήρησε αναστολή ορισμένων μικροβίων. Ο Fleming απέδειξε την απουσία τοξικότητας της PCN για τα λεμφοκύτταρα. Όμως μεγάλες δυσκολίες υπήρχαν στο πλήρη καθαρισμό της δραστικής ουσίας και στην γρήγορη

καλλιέργεια για μεγάλη απόδοση. Επίσης, η ουσία ήταν ευαίσθητη, καταστρέφονταν με οξείδωση, με αλλαγή του pH, με θερμοκρασίες υψηλότερες του περιβάλλοντος. Ο Fleming τιμήθηκε με το Nobel Φυσιολογίας ή Ιατρικής το 1945.



Εικόνα 2.32: Alexander Fleming (Πηγή: https://en.wikipedia.org/wiki/Alexander_Fleming).

Τα αντιβιοτικά της PCN ήταν μεταξύ των πρώτων φαρμάκων που ήταν αποτελεσματικά έναντι πολλών βακτηριακών λοιμώξεων που προκαλούνται από σταφυλόκοκκους και στρεπτόκοκκους. Αυτά εξακολουθούν να χρησιμοποιούνται ευρέως σήμερα, αν και πολλοί τύποι βακτηρίων έχουν αναπτύξει ανθεκτικότητα μετά από εκτεταμένη χρήση (Arroliga et al., 2003).

Η PCNG είναι γνωστό ότι προκαλεί ευρύ φάσμα αλλεργικών αντιδράσεων, από δερματικά εξανθήματα μέχρι αναφυλακτικό σοκ και θάνατο. Η θεραπεία της PCNG προκαλεί αναφυλαξία σε περίπου 1 στους 5000 ασθενείς, γεγονός που αντιστοιχεί σε σχετικά υψηλή νοσηρότητα. Το 75% όλων των αναφυλακτικών θανάτων, περίπου 500 έως 1000 ετησίως, αποδίδεται στην PCNG (Gruchalla et al., 2006).

2.5. Μέθοδοι Ανίχνευσης των Αντιβιοτικών

2.5.1. Μέθοδος ELISA

Οι ανοσοχημικές μέθοδοι ανάλυσης χρησιμοποιούν αντισώματα (antibody, Ab) ως αντιδραστήρια μοριακής αναγνώρισης για να επιτύχουν βιοειδική δέσμευση και ανίχνευση των αντιγόνων (antigen, Ag). Ως αντιγόνο θεωρείται κάθε ξένη ουσία που όταν εισέρχεται σε έναν οργανισμό (π.χ. θηλαστικά) αναγνωρίζεται από τα Β-λεμφοκύτταρα ή/και Τ-λεμφοκύτταρα και μπορεί να προκαλέσει την ανάπτυξη της ειδικής ή επίκτητης ανοσίας (adaptive ή specific immunity). Τα αντισώματα είναι πρωτεΐνες του αμυντικού μηχανισμού των θηλαστικών, καλούνται ανοσοσφαιρίνες (immunoglobulins) και συμβολίζονται ως Ig.

Ανοσοχημικές Τεχνικές Ανάλυσης

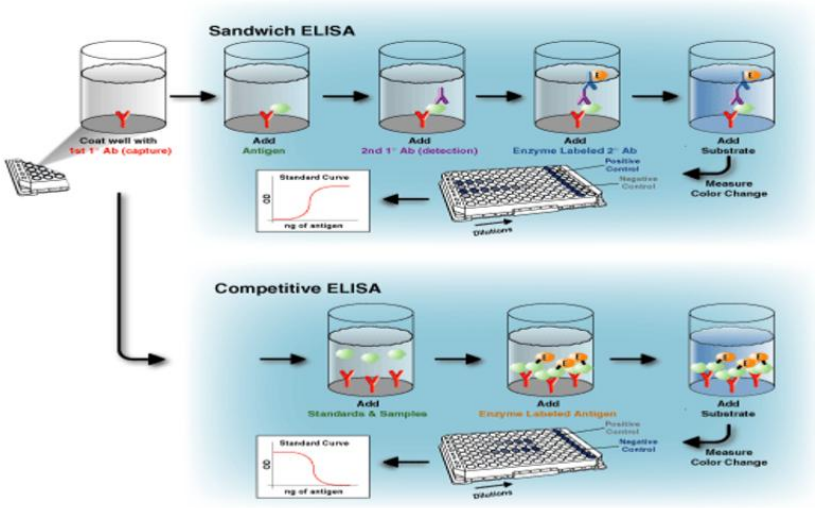
Οι ανοσοχημικές τεχνικές ανάλυσης βασίζονται στην επιλεκτική αντίδραση ενός αναλύτη (αντιγόνο (Ag)) με το αντίσωμα (Ab), για να δώσει ένα προϊόν (Ag-Ab) το οποίο μπορεί να μετρηθεί. Η αντίδραση δέσμευσης γίνεται αντιληπτή με τη χρήση ιχνηθέτη, ο οποίος μπορεί να είναι φθορίζουσα ή φωσφορίζουσα ένωση, ραδιενεργός ένωση, ή ένζυμο που καταλύει κάποια αντίδραση η οποία παράγει ακτινοβολία ή φωταύγεια. Οι αναλυτικές μέθοδοι που βασίζονται σε ανοσοχημικές δράσεις, ταξινομούνται ανάλογα με το μηχανισμό και τη διάταξη της αλληλεπίδρασης Ag-Ab. Οι ανοσοχημικές αναλυτικές μέθοδοι χωρίζονται, επίσης, σε ομογενείς και ετερογενείς. Στις ετερογενείς δράσεις λαμβάνει χώρα διαχωρισμός του δεσμευμένου και μη δεσμευμένου αντιδραστηρίου (αντίσωμα ή αντιγόνο) κατά τη διάρκεια της ανάλυσης. Για το λόγο αυτό το ένα από τα δύο συστατικά ακινητοποιείται σε στερεή επιφάνεια. Ο διαχωρισμός επιτυγχάνεται εύκολα με πλύση της στερεάς φάσης με κατάλληλο διάλυμα και απομάκρυνση του μη δεσμευμένου αντιδραστηρίου. Στις ομογενείς δοκιμές δεν απαιτείται βήμα διαχωρισμού ή πλύσης και ο ιχνηθέτης πρέπει να λειτουργεί ικανοποιητικά στο υπόστρωμα του αναλυόμενου δείγματος. Ως αποτέλεσμα, υπάρχει κίνδυνος παρεμβολής/παρεμπόδισης από τα συστατικά άγνωστων δειγμάτων (Crowther, 2009).

Ενζυμική ανοσοπροσρόφηση (ELISA)

Η τεχνική ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) είναι ο κυριότερος εκπρόσωπος γενικά των ανοσοχημικών τεχνικών, γιατί χρησιμοποιείται, ευρέως ,σε διάφορες παραλλαγές. Η γενική αρχή της πορείας είναι: γίνεται προσρόφηση (sorption) των αντισωμάτων ή αντιγόνων σε τοιχώματα πλαστικών σωλήνων, πλακών θέσεων ή σφαιριδίων. Μετά την αναγνώριση του αντιγόνου και σύνδεση Ag-Ab, ακολουθεί διαχωρισμός φάσεων. Στη συνέχεια ανάλογα με τις παραλλαγές προστίθεται δεύτερο αντίσωμα και ακολουθεί ενζυμική αντίδραση για τη μέτρηση. Μεταξύ των διάφορων σταδίων, το υγρό το οποίο βρίσκεται στην πλάκα θέσεων ή στο σωλήνα, απορρίπτεται και ο σωλήνας πλένεται, ώστε να απομακρυνθούν τα αντιδραστήρια που δεν είναι δεσμευμένα με δεσμό Ag-Ab. Στη συνέχεια το ειδικό αντίσωμα αναγνωρίζει την ένωση-στόχο, οπότε και δεσμεύεται πάνω της. Το υγρό αφαιρείται και μετά από πλύσεις προστίθεται δεύτερο αντίσωμα, ειδικό εναντίον του πρώτου αντισώματος (Crowther, 2009).

Ανταγωνιστική ELISA

Στην Ανταγωνιστική ELISA αρχικά ακινητοποιείται το 1° 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-δεσμευμένων αντιδραστηρίων μετράται φθορισμός ή απορρόφηση. Στην ανάλυση δειγμάτων όσο πιο μεγάλη είναι η συγκέντρωση της ένωσης στο δείγμα τόσο πιο μικρή είναι η δέσμευση του ιχνηθέτη στο αντίσωμα και άρα τόσο μικρότερο το τελικό σήμα (Crowther, 2009).

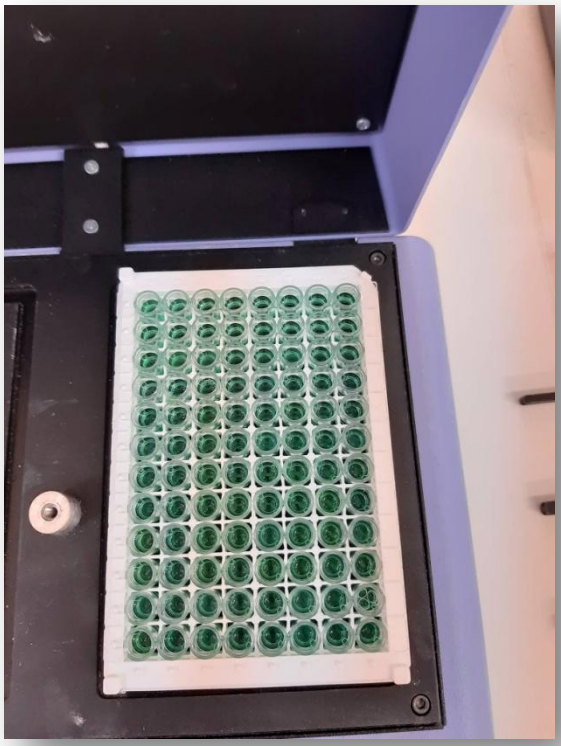


Εικόνα 2.33: Μέθοδοι Sandwich Elisa και Ανταγωνιστικής Elisa (Πηγή: www.researchgate.net).

Γενική αρχή:

Μία σταθερή ποσότητα πρωτεΐνης δεσμεύεται στην επιφάνεια των θέσεων/φρεατίων/πηγαδιών της πλάκας με παθητική προσρόφηση. Μετά από προκαθορισμένο χρόνο επώασης, η πλάκα πλένεται για να απομακρυνθεί η δεσμευμένη πρωτεΐνη. Γενικά στα στάδια της ανάλυσης υπάρχει μεγάλη ανάγκη μείωσης της πιθανότητας εμφάνισης μη-εκλεκτικών δεσμών. Για να αποφευχθεί η μη-εκλεκτική δέσμευση αντισωμάτων ή άλλων πρωτεϊνών στην πλάκα, προστίθεται πρωτεΐνη μπλοκαρίσματος της πλάκας μετά την ακινητοποίηση των αντισωμάτων.

Με τον τρόπο αυτό καλύπτονται τυχόν ελεύθερα κέντρα δέσμευσης των πλαστικών τοιχωμάτων με χρήση οικονομικών και διαδεδομένων πρωτεϊνών, όπως η πρωτεΐνη του ορού αίματος βοδινού (BSA), πρωτεΐνη αυγού (OVA) κ.ά. Επιπλέον, συχνά προστίθεται τασενεργός ένωση στα ρυθμιστικά διαλύματα τα οποία χρησιμοποιούνται στα διάφορα βήματα. Για παράδειγμα χρησιμοποιείται τασενεργό Tween και το ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (Phosphate buffer saline, PBS) μετατρέπεται σε Phosphate buffer saline Tween (PBST) (Chiu et al., 2012).



Εικόνα 2.34: Elisa microplate.

2.5.2. Χρωματογραφία

Η χρωματογραφία είναι μέθοδος διαχωρισμού χημικών ουσιών, η οποία στηρίζεται στην διαφορετική κατανομή των συστατικών ενός μίγματος μεταξύ μιας κινούμενης και μια στατικής φάσης. Ανάλογα με τη φύση της κινούμενης και της στατικής φάσης, η χρωματογραφία χαρακτηρίζεται ως αέρια ή υγρή. Ανάλογα με την αρχή στην οποία στηρίζεται ο διαχωρισμός, η χρωματογραφία χαρακτηρίζεται σαν κατανομής, προσρόφησης ή ιονανταλλαγής. Τέλος ανάλογα με την τεχνική συγκράτησης της στατικής φάσης, έχουμε χρωματογραφία στήλης, λεπτής στιβάδας και χαρτοχρωματογραφία.

Στην χρωματογραφία κατανομής η στατική φάση αποτελείται από ένα λεπτό σώμα υγρού προσροφημένου στην επιφάνεια ενός αδρανούς υλικού. Ο διαχωρισμός στηρίζεται στον διαφορετικό συντελεστή κατανομής των συστατικών ενός μίγματος σε ορισμένο σύστημα διαλυτών.

Στην χρωματογραφία προσρόφησης, η κινούμενη φάση είναι υγρή και η στατική ένα λεπτοτριμμένο στερεό υλικό με προσροφητικές ιδιότητες. Ο διαχωρισμός στηρίζεται στην εκλεκτική προσρόφηση των συστατικών του μίγματος πάνω στην επιφάνεια του στερεού

Στην χρωματογραφία ιονανταλλαγής διαχωρίζουμε μίγμα ουσιών διαφορετικής ιοντικής ισχύος. Οι δυνάμεις συγκράτησης μεταξύ των συστατικών του μίγματος και της στερεής φάσης είναι ηλεκτροστατικής φύσης (Daniel C. Harris, 2011).

Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης – High Performance Liquid Chromatography

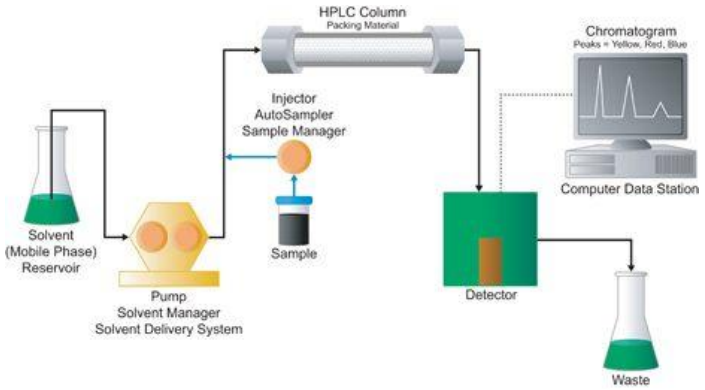
Η χρωματογραφία HPLC (High Pressure Liquid Chromatography ή High Performance Liquid Chromatography – Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Πίεσης ή Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης) αποτελεί σημαντικά εξελιγμένη μορφή της χρωματογραφίας στήλης, καθώς η κινητή φάση πλέον δεν ρέει υπό την επίδραση της βαρύτητας, αλλά με τη βοήθεια αντλίας. Αυτό επιταχύνει την ανάλυση και επιτρέπει τη χρήση χρωματογραφικών στηλών με μικρό μέγεθος σωματιδίων υλικού πλήρωσης. Η χρήση μικρού μεγέθους σωματιδίων υλικού πλήρωσης αυξάνει το εμβαδόν της επιφάνειας της στατικής φάσης, που είναι διαθέσιμο να αλληλεπιδράσει με τα μόρια που μεταφέρονται μέσω της κινητής φάσης. Κατά συνέπεια, βελτιώνεται ο διαχωρισμός των αναλυόμενων μορίων και μειώνεται σημαντικά το μέγεθος

της στήλης που απαιτείται για έναν διαχωρισμό. Τα δείγματα που αναλύονται με HPLC βρίσκονται αποκλειστικά σε υγρή μορφή (Daniel C. Harris, 2011).

HPLC Κανονικής Φάσης

Στην HPLC κανονικής φάσης ως πληρωτικό υλικό χρησιμοποιείται κάποιο πολικό υλικό, όπως οξείδιο του πυριτίου (SiO_2) ή οξείδιο του αργιλίου (Al_2O_3). Η πολικότητα των υλικών αυτών οφείλεται στις υδροξυλομάδες που περιέχουν. Αντίθετα, η κινητή φάση είναι μειωμένης πολικότητας. Κοινώς χρησιμοποιούνται μη πολικοί διαλύτες. Έτσι, οι πολικές ενώσεις στο διαχωριζόμενο μίγμα αλληλεπιδρούν ισχυρότερα με την πολική στατική φάση, σε σύγκριση με τις άπολες ενώσεις. Συνεπώς, οι λιγότερο πολικές ενώσεις διασχίζουν τη στήλη ταχύτερα και εκλούονται από αυτήν νωρίτερα. Η κατακράτηση ενός πολικού μορίου από τη στατική φάση οφείλεται στη προσρόφηση αυτού. Η έκλουση των πολικών μορίων από τη χρωματογραφική στήλη επιτυγχάνεται με την αύξηση της πολικότητας της κινητής φάσης κατά την πορεία της ανάλυσης. Με την αύξηση της πολικότητας της, περισσότερα μόρια διαλύτη αλληλεπιδρούν με τη στατική φάση ανταγωνιζόμενα τις προσροφημένες ουσίες για θέσεις πρόσδεσης. Ως αποτέλεσμα επιτυγχάνεται η εκλεκτική (με προγραμματισμένη μεταβολή της πολικότητας της κινητής φάσης) έκλουση των προσροφημένων πολικών μορίων.

Η HPLC κανονικής φάσης χρησιμοποιείται για τον διαχωρισμό χημικών ενώσεων που δεν διαλύονται στο νερό ή που υδρολύονται (και συνεπώς δε συνιστάται η παραμονή τους σε υδατικό περιβάλλον). Επίσης, βρίσκει μεγάλη εφαρμογή στον διαχωρισμό ισομερών ουσιών. Ένας απλός κανόνας που ισχύει είναι: Σε οποιοδήποτε διαχωρισμό προπορεύονται τα μόρια ουσιών με πολικότητα αντίστοιχης της κινητής φάσης, ενώ καθυστερούν αυτά με πολικότητα αντίστοιχης της στατικής φάσης (Daniel C. Harris, 2011).



Εικόνα 2.35: Τυπική διάταξη HPLC (Πηγή: https://www.waters.com/waters/en_US/How-Does-High-Performance-Liquid-Chromatography-Work%3F/nav.htm?locale=en_US&cid=10049055).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3ο: ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

3.1. Υλικά και Μέθοδοι

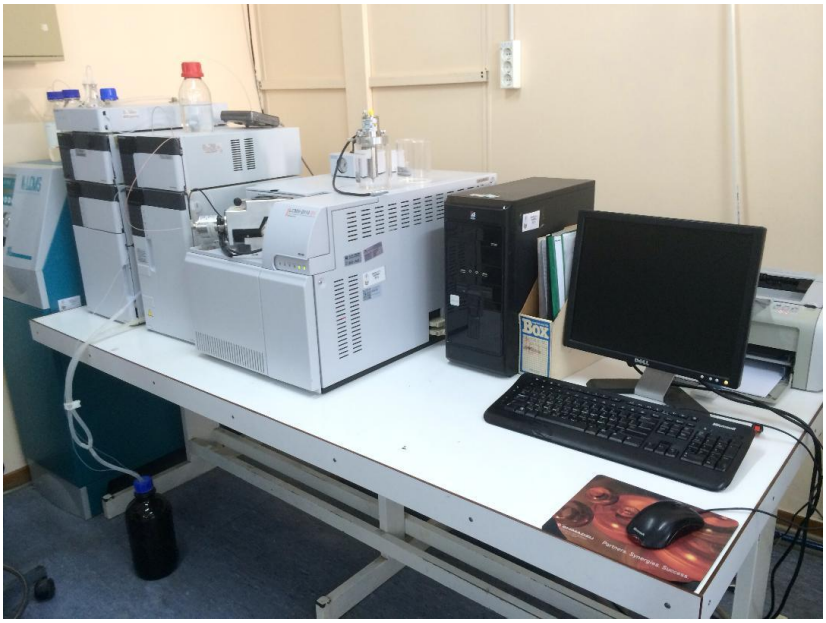
Σχεδιασμός και υλοποίηση πειράματος

Σκοπός της εργασίας αυτής, είναι ο προσδιορισμός των επιπέδων των χημικών ενώσεων SA's, TC's, AG's και FQNL's σε δείγματα νωπού κρέατος (μυς, ήπαρ, νεφρό). Για την υλοποίηση τους πειράματος συλλέχθηκαν δείγματα νωπού κρέατος από κρεοπωλεία και σφαγεία των νομών Ηρακλείου και Ρεθύμνου Κρήτης.

Οργανολογία

Υγρή Χρωματογραφία-Φασματομετρία Μαζών (LC-MS)

Στην συγκεκριμένη έρευνα, το όργανο ανάλυσης που χρησιμοποιήθηκε ήταν ένα σύστημα υγρής χρωματογραφίας άμεσα συζευγμένο με ένα φασματόμετρο μαζών της εταιρίας Shimadzu (μοντέλο LC-MS 2010 EV), εξοπλισμένο με αυτόματο δειγματολήπτη. Επίσης, χρησιμοποιήθηκε πηγή ιονισμού ESI (ιονισμός με ηλεκτροψεκασμό) και ως αναλυτής μαζών χρησιμοποιήθηκε αναλυτής με τετράπολο φίλτρου μάζας (quadropole mass filter).



Εικόνα 3.1: LC-MS

Εξοπλισμός

Για τη ζύγιση των αντιδραστηρίων (σε στερεή μορφή), αλλά και του κρέατος, χρησιμοποιήθηκε ένας αναλυτικός ζυγός ακριβείας 4^{ου} δεκαδικού ψηφίου, της εταιρείας A&D, Ιαπωνία (μοντέλο ER-120A), με δυνατότητα μέγιστου βάρους ζύγισης 120 gr. Για την ανακίνηση των μιγμάτων χρησιμοποιήθηκε σύστημα vortex της εταιρείας Velp scientific, Ιταλία (μοντέλο Zx^3). Για την εξάτμιση-ξήρανση των διαλυμάτων, χρησιμοποιήθηκε σύστημα εξάτμισης υπό ροή αζώτου, της εταιρείας Techne, Ηνωμένο Βασίλειο (μοντέλο dri-blockDB-3A). Έγινε χρήση συστήματος εκχύλισης της εταιρίας GFL, Γερμανία. Επιπρόσθετα, χρησιμοποιήθηκε φυγόκεντρος της εταιρίας Heraeus, Γερμανία (μοντέλο Biofuge Primo R), της εταιρίας Kubota, Ιαπωνία (μοντέλο 3740) και της εταιρίας Hettich, Ηνωμένες Πολιτείες Αμερικής (μοντέλο EBA 12). Ακόμα χρησιμοποιήθηκε ομογενοποιητής δειγμάτων της εταιρίας Janke & Kunkel, Γερμανία (μοντέλο Ultraturrax T25), σύστημα επώασης Randox, Ηνωμένο Βασίλειο (evidence investigator) για τα Elisa kit και Elisa kit reader της εταιρίας Tecan, Ελβετία (μοντέλο Infinite M 200 Pro).

Εικόνα 3.2: 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 και 10)Elisa kit Reader.

Αντιδραστήρια

Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για την επεξεργασία των δειγμάτων ήταν τα εξής:

- Μεθανόλη (MeOH), 99,9% [Honeywell, North Carolina, US]
- Απιονισμένο νερό [Direct-Q 3UV, Merck, Kenilworth, U.S.A]
- Φορμικό οξύ, ≥95% [Honeywell, North Carolina, US]
- Ακετονιτρίλιο (ACN), ≥99,9% [Honeywell, North Carolina, US]
- n-hexane, 99% [Sigma Aldrich, Missouri, U.S.A]
- NaCl, 99,9% [Penta, Prague, Czech republic]
- Ethylacetate, 99,8% [Sigma Aldrich, Missouri, USA]
- $NaH_2PO_4xH_2O$, ≥98% [Roth, Hamburg/Karlsruhe, Germany]
- $Na_2HPO_4x2H_2O$, 99,5% [Merck, Kenilworth, U.S.A]
- NaOH, 99% [Merck, Kenilworth, U.S.A]

Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν στα πρότυπα διαλύματα, στην χρωματογραφία ήταν τα εξής:

- Ενροφλοξασίνη, Baytril®, 50 mg/ml [Bayer, Leverkusen, Germany]
- Μαρβοφλοξασίνη, Marbocyl® FD, 10 mg/ml [Vetoquinol SA, Lure Cedex, France]
- Οξυτετρακυκλίνη, Oxtra® Long Acting, 200 mg/ml [FATRO, Bologna, Italy]
- Δοξυκυκλίνη, Vibramycin®, 100 mg [Pfizer, New York, U.S.A]
- Σουλφαμεθοξαζόλη, Bactrimel®, 800 mg [Roche, Basel, Switzerland]
- Σουλφαδιαζίνη, Norodin®, 200 mg/ml [Norbrook, Newry, N. Ireland]

Τα Elisa kits ήταν της εταιρίας R-Biopharm, Γερμανία:

- R3505 RIDASCREEN® Tetracyclin
- R3004 RIDASCREEN® Sulfonamide
- R3104 RIDASCREEN® Streptomycin
- R3113 RIDASCREEN® Quinolones

3.2. Δείγματα Νωπού Κρέατος

Πίνακας 3: Κωδικός και πληροφορίες εκάστοτε δείγματος

Κωδικός Δείγματος	Κρέας Ζώου	Τμήμα Ζώου	Ηλικία Ζώου	Ημερομηνία Σφαγής	Εγχώριο/Εισαγωγής	Προέλευση, Εισαγωγής
1ΒΜ	Βοοειδές	Μυς	18 μηνών	1/11/2018	Εγχώριο	-
2ΧΜ	Χοιρινό	Μυς	7 μηνών	31/10/2018	Εγχώριο	-
3ΚΜ	Κοτόπουλου	Μυς	70-90 ημερών	1/11/2018	Εγχώριο	-
4ΚΗ	Κοτόπουλου	Ήπαρ	70-90 ημερών	1/11/2018	Εγχώριο	-
5ΚΗ	Κοτόπουλου	Ήπαρ	60 ημερών	30/10/2018	Εισαγωγής	Ιταλία/Ολλανδία
6ΒΜ	Βοοειδές	Μυς	12-14 μηνών	30/10/2018	Εισαγωγής	Ιταλία/Ολλανδία
7ΧΜ	Χοιρινό	Μυς	6 μηνών	30/10/2018	Εισαγωγής	Ιταλία/Ολλανδία
8ΚΗ	Κοτόπουλου	Ήπαρ	2 μηνών	4/11/2018	Εγχώριο	-
9ΒΗ	Βοοειδές	Ήπαρ	2 ετών	30/10/2018	Εγχώριο	-
10ΧΗ	Χοιρινό	Ήπαρ	4 μηνών	30/10/2018	Εγχώριο	-
11ΒΜ	Βοοειδές	Μυς	18 μηνών	31/10/2018	Εισαγωγής	Γαλλία
12ΧΜ	Χοιρινό	Μυς	5 μηνών	30/10/2018	Εισαγωγής	Γαλλία
13ΚΜ	Κοτόπουλου	Μυς	50 ημερών	2/11/2018	Εγχώριο	-
14ΚΗ	Κοτόπουλου	Ήπαρ	50 ημερών	2/11/2018	Εγχώριο	-
15ΒΗ	Βοοειδές	Ήπαρ	18 μηνών	31/10/2018	Εισαγωγής	Γαλλία
16ΧΜ	Χοιρινό	Μυς	5-6 μηνών	29/10/2018	Εισαγωγής	Ολλανδία
17ΒΜ	Βοοειδές	Μυς	10-14 μηνών	29/10/2018	Εισαγωγής	Πολωνία
18ΚΜ	Κοτόπουλου	Μυς	2 μηνών	5/11/2018	Εγχώριο	-
19ΒΗ	Βοοειδές	Ήπαρ	10-14 μηνών	29/10/2018	Εισαγωγής	Πολωνία
20ΒΜ	Βοοειδές	Μυς	8-12 μηνών	1/11/2018	Εγχώριο	-
21ΧΜ	Χοιρινό	Μυς	3 μηνών	2/11/2018	Εγχώριο	-
22ΚΜ	Κοτόπουλου	Μυς	2 μηνών	5/11/2018	Εγχώριο	-
23ΧΜ	Χοιρινό	Μυς	8 μηνών	6/11/2018	Εγχώριο	-
24ΒΜ	Βοοειδές	Μυς	12 μηνών	5/11/2018	Εγχώριο	-
25ΚΜ	Κοτόπουλου	Μυς	3-4 μηνών	7/11/2018	Εγχώριο	-
26ΒΜ	Βοοειδές	Μυς	15 μηνών	6/11/2018	Εγχώριο	-

27BH	Βοοειδές	Ήπαρ	15 μηνών	6/11/2018	Εγχώριο	-
28XM	Χοιρινό	Μυς	5-6 μηνών	6/11/2018	Εγχώριο	-
29KM	Κοτόπουλου	Μυς	2 μηνών	6/11/2018	Εγχώριο	-
30KH	Κοτόπουλου	Ήπαρ	2 μηνών	6/11/2018	Εγχώριο	-
31XM	Χοιρινό	Μυς	3 μηνών	11/11/2018	Εγχώριο	-
32BM	Βοοειδές	Μυς	12 μηνών	11/11/2018	Εγχώριο	-
33KM	Κοτόπουλου	Μυς	3 μηνών	11/11/2018	Εγχώριο	-
34KH	Κοτόπουλου	Ήπαρ	3 μηνών	11/11/2018	Εγχώριο	-
35XM	Χοιρινό	Μυς	6 μηνών	6/11/2018	Εγχώριο	-
36BM	Βοοειδές	Μυς	14 μηνών	6/11/2018	Εγχώριο	-
37KH	Κοτόπουλου	Ήπαρ	4 μηνών	6/11/2018	Εγχώριο	-
38BM	Βοοειδές	Μυς	18 μηνών	14/11/2018	Εγχώριο	-
39XM	Χοιρινό	Μυς	8 μηνών	14/11/2018	Εγχώριο	-
40KM	Κοτόπουλου	Μυς	40 ημερών	14/11/2018	Εγχώριο	-
41KH	Κοτόπουλου	Ήπαρ	40 ημερών	14/11/2018	Εγχώριο	-
42XH	Χοιρινό	Ήπαρ	8 μηνών	14/11/2018	Εγχώριο	-
43BH	Βοοειδές	Ήπαρ	18 μηνών	14/11/2018	Εγχώριο	-
44BH	Βοοειδές	Ήπαρ	12 μηνών	12/11/2018	Εισαγωγής	Γαλλία
45KH	Κοτόπουλου	Ήπαρ	1,5-2 μηνών	12/11/2018	Εγχώριο	-
46KM	Κοτόπουλου	Μυς	1,5-2 μηνών	12/11/2018	Εγχώριο	-
47XN	Χοιρινό	Νεφρό	2-2,5 μηνών	19/11/2018	Εγχώριο	-
48XN	Χοιρινό	Νεφρό	2-2,5 μηνών	19/11/2018	Εγχώριο	-
49XN	Χοιρινό	Νεφρό	2 μηνών	20/11/2018	Εγχώριο	-
50XN	Χοιρινό	Νεφρό	3 μηνών	20/11/2018	Εγχώριο	-
51XN	Χοιρινό	Νεφρό	3-4 μηνών	22/11/2018	Εγχώριο	-
52XN	Χοιρινό	Νεφρό	3-4 μηνών	22/11/2018	Εγχώριο	-
53KN	Κοτόπουλου	Νεφρό	45 ημερών	20/11/2018	Εγχώριο	-
54KN	Κοτόπουλου	Νεφρό	45 ημερών	20/11/2018	Εγχώριο	-

3.3. Προσδιορισμός των Αντιβιοτικών

Μέθοδος Elisa

Σουλφοναμίδες

Επεξεργασία χοιρινού και βοδινού

Αρχικά, ζυγίστηκε 1 gr από κάθε ομογενοποιημένο δείγμα και τοποθετήθηκε σε σωληνάριο τύπου Falcon. Έπειτα, προστέθηκαν 2 ml μεθανόλης και έγινε ανακίνηση με σύστημα vortex για 30 δευτερόλεπτα, το κάθε δείγμα. Τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν για 10 λεπτά, στα 4000 g, σε θερμοκρασία 20-25 ^{o}C. Μεταφέρθηκαν 1,5 ml από το μεθανολικό διάλυμα, σε νέο φιαλίδιο και εξατμίστηκαν μέχρι ξηρού. Έγινε επαναδιαλυτοποίηση με 0,5 ml sample buffer και προστέθηκε 1 ml n-εξάνιο για απολίπανση. Έπειτα έγινε ανακίνηση με vortex για 10 δευτερόλεπτα και φυγοκέντρηση για 10 λεπτά, στα 4000 g και σε 20-25°C. Τέλος, χρησιμοποιήθηκαν για τη μέθοδο 50 μl από την υδατική (κάτω) φάση κάθε δείγματος.

Επεξεργασία κοτόπουλου

Ζυγίστηκαν 2 gr από κάθε ομογενοποιημένο δείγμα και τοποθετήθηκαν σε φιαλίδια τύπου Falcon. Μετά, προστέθηκαν 6 ml ακετονιτριλίου/νερού (84:16, v/v) και έγινε ανακίνηση για 10 λεπτά. Έπειτα, τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν για 10 λεπτά, στα 3000g και σε 15°C. Μεταφέρθηκαν 4 ml από την υπερκείμενη φάση, σε καινούργιο φιαλίδιο και προστέθηκαν 2 ml NaCl 2 M και 7 ml ethyl acetate. Έγινε ανακίνηση για 10 λεπτά και φυγοκέντρηση για 10 λεπτά, στα 3000g και σε 15°C. Ύστερα, μεταφέρθηκε όλη η υπερκείμενη στοιβάδα σε γυάλινο φιαλίδιο και έγινε εξάτμιση έως ξηρού. Έπειτα έγινε επαναδιαλυτοποίηση με 1 ml sample buffer και ανακινήθηκε το περιεχόμενο με σύστημα vortex για 1 λεπτό. Έπειτα, προστέθηκε 1ml n-εξάνιο και το περιεχόμενο ανακινήθηκε ξανά για 2 λεπτά. Τέλος, έγινε φυγοκέντρηση για 10 λεπτά, στα 3000g και σε 15°C και χρησιμοποιήθηκαν για τη μέθοδο 50 μl από την υδατική (κάτω) φάση κάθε δείγματος.

Μέθοδος για Σουλφοναμίδες

Αρχικά, προστέθηκαν 50 μl κάθε πρότυπου διαλύματος και δείγματος σε χωριστές κοιλότητες. Έπειτα, προστέθηκαν 50 μl διαλύματος συζευγμένου ενζύμου στον πυθμένα κάθε κοιλότητας. Εισήχθησαν 50 μl διαλύματος αντισωμάτων σε κάθε κοιλότητα, αναμίχθηκε το

περιεχόμενο των κοιλοτήτων απαλά ανακινώντας την πλάκα χειροκίνητα και έγινε επώαση για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου (20 - 25 °C). Έπειτα, αφαιρέθηκε το υγρό από τις κοιλότητες. Μετά, γέμισαν όλες οι κοιλότητες με 250 μl ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης και αφαιρέθηκε ξανά το υγρό. Η πλύση έλαβε χώρα άλλες δύο φορές. Προστέθηκαν 100 μL υποστρώματος / χρωμογόνου σε κάθε κοιλότητα. Έγινε ανάμιξη ανακινώντας απαλά την πλάκα χειροκίνητα και το περιεχόμενο επωάστηκε 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. Ανακινήθηκε χειροκίνητα η πλάκα και έγινε η μέτρηση της απορρόφησης στα 450 nm και μέσα σε 30 λεπτά μετά την προσθήκη του διαλύματος διακοπής.

Στρεπτομυκίνη

Επεξεργασία κρέατος

Αρχικά, αναμίχθηκαν 5 g ομογενοποιημένου δείγματος με 20 ml ρυθμιστικού διαλύματος πλύσης. Ανακινήθηκαν, με σύστημα vortex, για 10 δευτερόλεπτα και μετά για 30 λεπτά, με σύστημα εκχύλισης. Έπειτα έγινε φυγοκέντρηση για 10 λεπτά, στα 4000 g, σε θερμοκρασία δωματίου (20-25 ^{o}C). Αραιώθηκε μια ποσότητα του υπερκείμενου υγρού 1:10 (1+9) με ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης (συγκεκριμένα 50 μl υπερκείμενου υγρού με 450 μl ρυθμιστικού διαλύματος πλύσης). Στη μέθοδο χρησιμοποιήθηκαν 50 μl ανά κοιλότητα.

Μέθοδος για Στρεπτομυκίνη

Προστέθηκαν 50 μl κάθε πρότυπου διαλύματος και δείγματος σε χωριστές κοιλότητες. Έπειτα, προστέθηκαν 50 μl διαλύματος σύζευξης σε κάθε κοιλότητα. Έγινε ανάμιξη ανακινώντας απαλά την πλάκα χειροκίνητα και μετά, έγινε επώαση επί 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου (20 - 25 °C). Μετά, αφαιρέθηκε το υγρό από τις κοιλότητες και προστέθηκαν σε όλες τις κοιλότητες 250 μl ρυθμιστικού διαλύματος πλύσης και αφαιρέθηκε ξανά το υγρό. Η πλύση επαναλήφθηκε άλλες δύο φορές. Έπειτα, προστέθηκαν 100 μL υποστρώματος / χρωμογόνου σε κάθε κοιλότητα. Έγινε ανάμιξη ανακινώντας απαλά την πλάκα χειροκίνητα και το περιεχόμενο επωάστηκε για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου (20-25 °C) στο σκοτάδι. Μετά, προστέθηκαν 100 μL του διαλύματος διακοπής(stop solution) σε κάθε κοιλότητα. Έγινε ανάμιξη ανακινώντας απαλά και χειροκίνητα την πλάκα. Τέλος, μετρήθηκε η απορρόφηση στα 450 nm μέσα σε 15 λεπτά μετά την προσθήκη του διαλύματος διακοπής.

Τετρακυκλίνες

Επεξεργασία κρεάτων

Μεταφέρθηκε 1 g του ομογενοποιημένου δείγματος σε ένα φιαλίδιο φυγοκέντρησης και προστέθηκαν 9 ml ρυθμιστικού διαλύματος 20 mM PBS pH 7,4. Έγινε ανακίνηση με σύστημα vortex για 10 δευτερόλεπτα και με σύστημα εκχύλισης για 10 λεπτά. Μετά, έγινε φυγοκέντρηση για 10 λεπτά, στα 4.000 g και θερμοκρασία δωματίου (20 - 25 °C). Μεταφέρθηκε 1 ml υπερκείμενου υγρού σε ένα νέο φιαλίδιο. Προστέθηκαν 2 ml εξανίου. Μετά, έγινε ανακίνηση με vortex για 10 δευτερόλεπτα και φυγοκέντρηση για 10 λεπτά, στα 4.000 g και θερμοκρασία δωματίου (20 - 25 °C). Στη μέθοδο χρησιμοποιήθηκαν 50 μl της κατώτερης υδατικής φάσης ανά κοιλότητα.

Μέθοδος για Τετρακυκλίνες

Παρασκευάστηκαν τα standard διαλύματα μετά από αραιώσεις:

Standard 1:	50 μl standard concentrate (0 μg/l) + 450 μl buffer	0 (μg/l)
Standard 2:	50 μl standard concentrate (0.5 μg/l) + 450 μl buffer	0.05 (μg/l)
Standard 3:	50 μl standard concentrate (1.5 μg/l) + 450 μl buffer	0.15 (μg/l)
Standard 4:	50 μl standard concentrate (3 μg/l) + 450 μl buffer	0.3 (μg/l)
Standard 5:	50 μl standard concentrate (6 μg/l) + 450 μl buffer	0.6 (μg/l)
Standard 6:	50 μl standard concentrate (18 μg/l) + 450 μl buffer	1.8 (μg/l)

Έπειτα, προστέθηκαν 50 μl κάθε πρότυπου διαλύματος και δείγματος σε ξεχωριστές κοιλότητες. Προστέθηκαν 50 μl αντισώματος αντι-τετρακυκλίνης σε κάθε κοιλότητα. Έγινε ανάμιξη ανακινώντας απαλά την πλάκα χειροκίνητα και το περιεχόμενο επωάστηκε για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου (20 - 25 °C). Αφαιρέθηκε το υγρό από τις κοιλότητες και μετά γέμισαν όλες οι κοιλότητες με 250 μl ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης και αφαιρέθηκε ξανά το υγρό. Η πλύση επαναλήφθηκε άλλες δύο φορές. Προστέθηκαν 100 μL διαλύματος σύζευξης σε κάθε κοιλότητα. Αναμίχθηκε ελαφρά το περιεχόμενο ανακινώντας την πλάκα χειροκίνητα

και έγινε επώαση για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου (20 - 25 °C). Αφαιρέθηκε το υγρό από τις κοιλότητες και έπειτα γέμισαν όλες οι κοιλότητες με 250 μl ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης και αφαιρέθηκε ξανά το υγρό. Επαναλήφθηκε η πλύση άλλες δύο φορές. Προστέθηκαν 100 μL υποστρώματος / χρωμογόνου σε κάθε κοιλότητα. Έγινε ανάμιξη ανακινώντας την πλάκα απαλά και χειροκίνητα και επωάστηκε το περιεχόμενο για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου (20-25 °C) στο σκοτάδι. Προστέθηκαν 100 μL του διαλύματος διακοπής (stop solution) σε κάθε κοιλότητα. Έγινε ανάμιξη ανακινώντας χειροκίνητα την πλάκα. Τέλος, μετρήθηκε η απορρόφηση στα 450 nm και μέσα σε 30 λεπτά μετά την προσθήκη του διαλύματος διακοπής.

Φθοροκινολόνες

Επεξεργασία κρέατος

Αρχικά, έγινε χρήση 1 g από το ομογενοποιημένο δείγμα και προστέθηκαν 4 ml μεθανόλης/νερού (70/30 v/v). Το περιεχόμενο αναμίχθηκε έντονα για 10 λεπτά με το σύστημα εκχύλισης. Έγινε φυγοκέντρηση για 10 λεπτά, στα 4000 g και θερμοκρασία δωματίου (20 - 25 °C). Έπειτα, αραιώθηκε το υπερκείμενο 1:2 (1+1) με ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης. Στη μέθοδο χρησιμοποιήθηκαν 50 μl ανά κοιλότητα.

Μέθοδος για Φθοροκινολόνες

Αρχικά, προστέθηκαν 50 μl κάθε πρότυπου διαλύματος και δείγματος σε χωριστές κοιλότητες. Προστέθηκαν 50 μl του συζευγμένου διαλύματος ενζύμου στο κάτω μέρος κάθε κοιλότητας. Έπειτα, προστέθηκαν 50 μl του διαλύματος αντισωμάτων σε κάθε κοιλότητα, αναμίχθηκαν ήπια ανακινώντας την πλάκα χειροκίνητα και επωάστηκαν για 1 ώρα σε ψυγείο (2 - 8 °C). Αφαιρέθηκε το υγρό από τις κοιλότητες και μετά γέμισαν όλες οι κοιλότητες με 250 μl ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης και αφαιρέθηκε ξανά το υγρό. Επαναλήφθηκε η πλύση άλλες δύο φορές. Προστέθηκαν 100 μL υποστρώματος / χρωμογόνου σε κάθε κοιλότητα. Αναμίχθηκε το περιεχόμενο ανακινώντας την πλάκα χειροκίνητα και επωάστηκε για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου (20-25 °C) στο σκοτάδι. Προστέθηκαν 100 μL του διαλύματος διακοπής (stop solution) σε κάθε κοιλότητα. Έγινε ανάμιξη ανακινώντας χειροκίνητα την πλάκα. Τέλος, μετρήθηκε η απορρόφηση στα 450 nm και μέσα σε 30 λεπτά μετά την προσθήκη του διαλύματος διακοπής.

Μέθοδος LC-ESI-MS

Παρασκευή πρότυπων διαλυμάτων

Αρχικά, παρασκευάστηκαν πρότυπα διαλύματα των SMX, SDZ, OTC, DOX, MBX, ENR σε συγκέντρωση 10 ppm και έπειτα από αραίωση παρασκευάστηκε διάλυμα συγκέντρωσης 1 ppm. Χρησιμοποιώντας τα παραπάνω διαλύματα παρασκευάστηκαν τελικά 5 πρότυπα διαλύματα συγκεντρώσεων 0, 50, 100, 250, 500 ng/ml. Τα διαλύματα αποθηκεύτηκαν στο ψυγείο.

Παρασκευή «φορτισμένων» δειγμάτων κρέατος

Για την παρασκευή των «φορτισμένων» δειγμάτων (spiked) χρησιμοποιήθηκαν δείγματα νωπού κρέατος τα οποία ήταν αρνητικά στις προς ανάλυση ενώσεις και εμβολιάσθηκαν με διάλυμα σε συγκεντρώσεις 0, 10, 25, 50, 100 ng/gr.

Μέθοδος επεξεργασίας δειγμάτων κρέατος

Αρχικά, ζυγίστηκαν στον αναλυτικό ζυγό περίπου 5 gr κρέατος από κάθε δείγμα και τοποθετήθηκαν σε φιαλίδια φυγοκέντρου τύπου Falcon. Έπειτα, προστέθηκαν στα δείγματα 500 μl EDTA 150 mM, για την αποφυγή του σχηματισμού χηλικού συμπλόκου μεταξύ των TC's με το σίδηρο του ήπατος, και έγινε ανακίνηση των δειγμάτων με σύστημα vortex. Μετά από 10 λεπτά, προστέθηκαν 5 ml από οξινισμένο ακετονιτρίλιο (0,1% φορμικό οξύ). Ακολούθησε εκχύλιση των δειγμάτων, μέσω ανακίνησης, για 10 λεπτά. Ύστερα, τα φιαλίδια με τα δείγματα, τοποθετήθηκαν στην κατάψυξη (−20°C) για 30 λεπτά. Στη συνέχεια τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν για 10 λεπτά στα 4000 rpm. Έπειτα, 3 ml από την υπερκείμενη φάση, κάθε δείγματος, τοποθετήθηκαν σε γυάλινα φιαλίδια και πραγματοποιήθηκε η διαδικασία εκχύλισης για δεύτερη φορά, με τα αρχικά δείγματα. Μετά, τα γυάλινα φιαλίδια τοποθετήθηκαν στην κατάψυξη για 30 λεπτά, με σκοπό να διαχωριστεί ο πάγος από το εκάστοτε δείγμα. Το κάθε δείγμα, χωρίς το νερό πλέον εξατμίστηκε μέχρι ξηρού. Στη συνέχεια, έγινε επαναδιαλυτοποίηση με 500 μl από την κινητή φάση (98% νερό με 0,1% φορμικό οξύ και 2% ακετονιτρίλιο με 0,1% φορμικό οξύ). Τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε μικροφιαλίδια eppendorf και 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)

Στο σύστημα της υγρής χρωματογραφίας χρησιμοποιήθηκε κολώνα τύπου Discovery C18 (25cm) της εταιρίας Supelco, η οποία λειτουργούσε σε φούρνο θερμοκρασίας 30°C, με ρυθμό ροής 0,6 ml/min. Για την ανάλυση των ενώσεων στο LC-MS χρησιμοποιήθηκε ως διαλύτης νερό με 0,1 % φορμικό οξύ και ακετονιτρίλιο με 0,1% φορμικό οξύ.

Πίνακας 4: Χρόνος ανάκτησης, κύριο ιόν, δευτερεύον ιόν, μοριακό βάρος των MBX, OTC, ENR, DOX, SDZ και SMX.

Ενώσεις	Χρόνος Ανάκτησης (min)	Κύριο Ιόν	Δευτερεύον Ιόν	Μοριακό Βάρος
MBX	8,66	363,1	-	362,35
OTC	8,9	461,15	-	460,43
ENR	9,21	360,1	-	359,4
DOX	10,48	445,05	-	444,43
SDZ	8,016	251	272,95	250,28
SMX	11,11	254	275,95	253,27

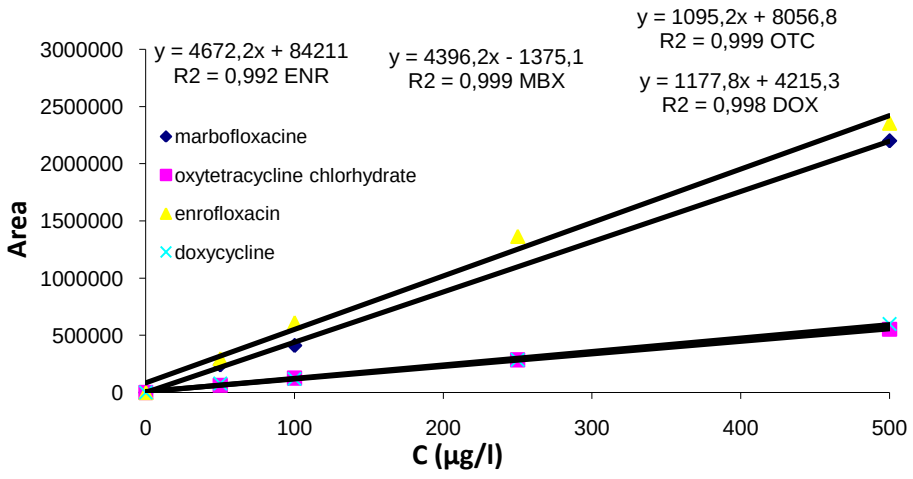
Συνθήκες λειτουργίας φασματομέτρου μαζών (MS)

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

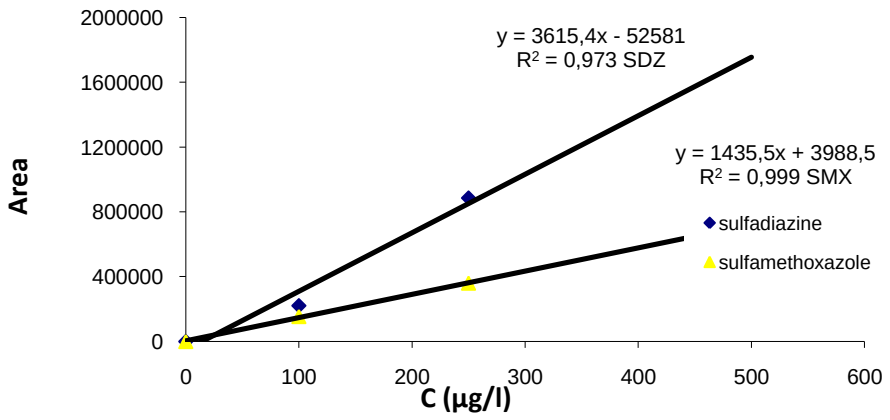
Κεφάλαιο 4ο: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Γραμμικότητα - Πρότυπα Διαλύματα, LC-ESI-MS

Το τετράγωνο του συντελεστή συσχέτισης (R^2), που χρησιμοποιήθηκε ως μέτρο γραμμικότητας για τα πρότυπα διαλύματα βρέθηκε 0,992 για την ENR, 0,999 για τη MBX, 0,999 για την OTC, 0,998 για τη DOX, 0,973 για τη SDZ και 0,999 για τη SMX.



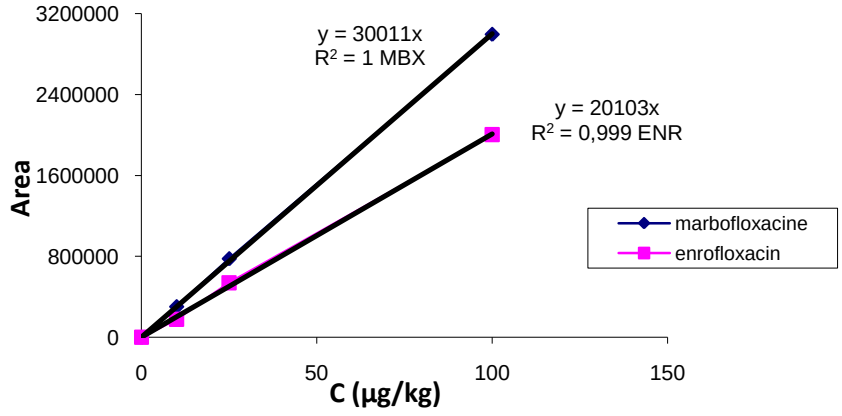
Καμπύλη 1: Πρότυπα διαλύματα FQNL's και TC's.



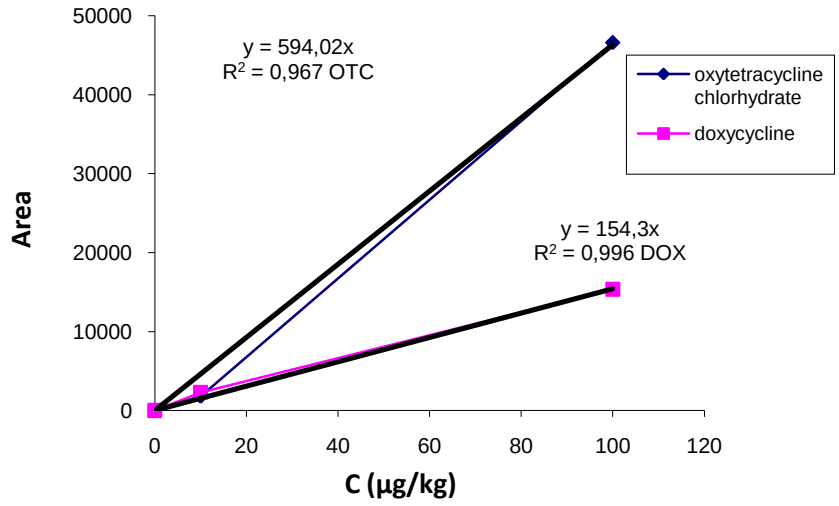
Καμπύλη 2: Πρότυπα διαλύματα SA's.

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

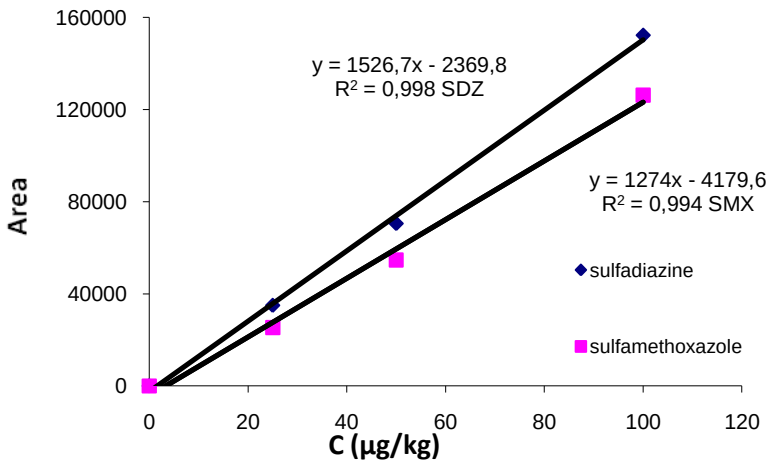
Το τετράγωνο του συντελεστή συσχέτισης (R^2), που χρησιμοποιήθηκε ως μέτρο γραμμικότητας για τα spiked διαλύματα βρέθηκε 0,999 για την ENR, 1 για τη MBX, 0,967 για την OTC, 0,996 για τη DOX, 0,998 για τη SDZ και 0,994 για τη SMX.



Καμπύλη 3: Spiked διαλύματα για FQNL's στο ήπαρ.

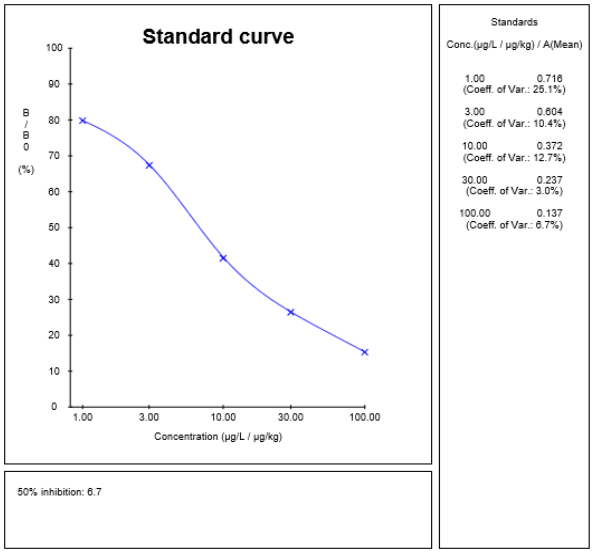


Καμπύλη 4: Spiked διαλύματα για TC's στο ήπαρ.

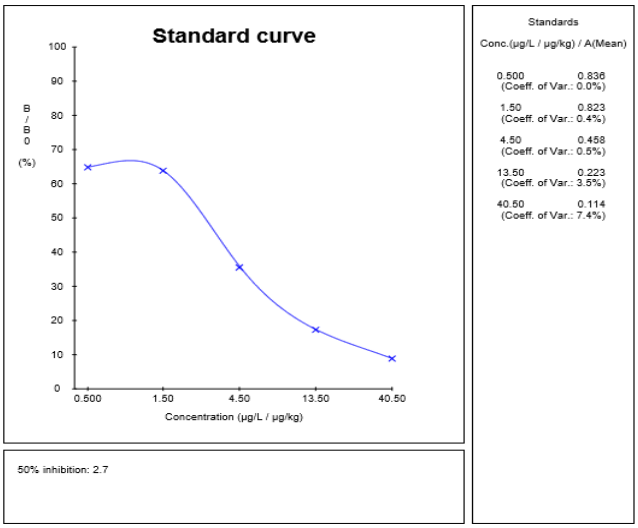


Καμπύλη 5: Spiked διαλύματα για SA's στο μυ.

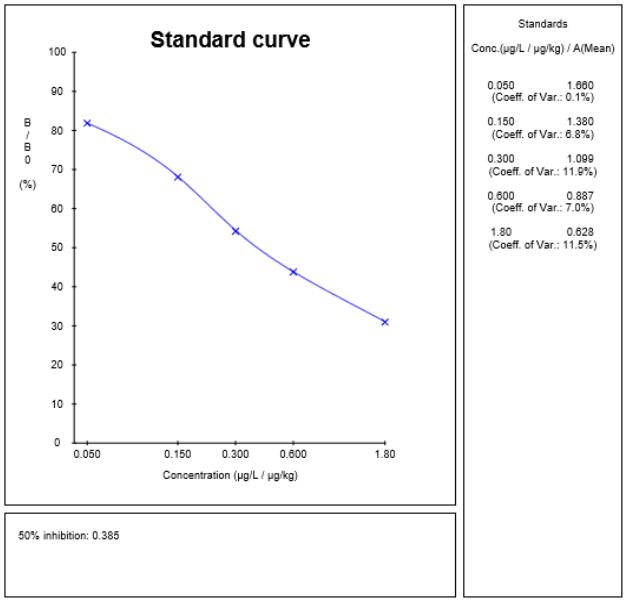
Καμπύλες πρότυπων διαλυμάτων στην ELISA



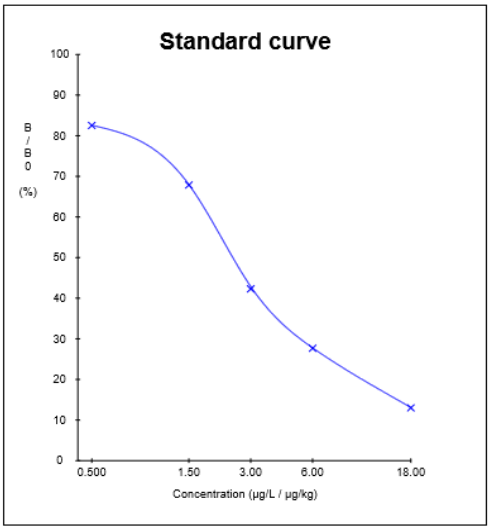
Καμπύλη 6: Πρότυπα διαλύματα SA's σε συγκεντρώσεις 1, 3, 10, 30 και 100 μg/l.



Καμπύλη 7: Πρότυπα διαλύματα STR σε συγκεντρώσεις 0,5 , 1,5 , 4,5 , 13,5 και 40,5 μg/l.



Καμπύλη 8: Πρότυπα διαλύματα TC's σε συγκεντρώσεις 0,05 , 0,15 , 0,30 , 0,60 και 1,80 μg/l.



50% inhibition: 2.4

Standards

Conc.(µg/L / µg/kg) / A(Mean)

0.500	1.906
(Coeff. of Var.: 16.2%)	
1.50	1.567
(Coeff. of Var.: 13.1%)	
3.00	0.977
(Coeff. of Var.: 3.6%)	
6.00	0.639
(Coeff. of Var.: 8.6%)	
18.00	0.300
(Coeff. of Var.: 7.3%)	

Καμπύλη 9: Πρότυπα διαλύματα FQNL's σε συγκεντρώσεις 0,5 , 1,5 , 3,0 , 6,0 και 18,0 μg/l.

Πίνακας 5: Συγκεντρωτικά αποτελέσματα για την Elisa.

		Σουλφοναμίδες			*Στρεπτομυκίνη*			*Τετρακυκλίνες*			*Φθοροκινολόνες*		
	Ν (Αριθμός Δειγμάτων)	**Θετικά(%)**	**Μέσος Όρος Συγκέντρωσης (μg/kg)**	**Εύρος (μg/kg)**	**Θετικά (%)**	**Μέσος Όρος Συγκέντρωσης (μg/kg)**	**Εύρος (μg/kg)**	**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	188,88	135,62-239,47	-	-	-	20	50,78	22,36-79,20
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	-	50	5,92	3,88-6,99	50	146,82	91,74-255,35
Κοτόπουλα (μυς)	9	89	22,87	1,78-157,32	-	-	-	11	1,97	-	44	107,87	12,76-327,60
Κοτόπουλα (ήπαρ)	9	100	4,82	2,54-7,18	-	-	-	11	4,05	-	33	20,82	10,42-31,20
Κοτόπουλα (νεφρό)	2	100	4,97	4,35-5,60	50	53,44	-	-	-	-	100	13,44	11,96-14,92

Πίνακας 6: Συγκεντρωτικά αποτελέσματα για το LC-ESI-MS.

		Σουλφοναμίδες					
		Σουλφαμεθοξαζόλη			*Σουλφαδιαζίνη*		
	Ν (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	-	-

		Τετρακυκλίνες					
		Οξυτετρακυκλίνη			*Δοξυκυκλίνη*		
	Ν (Αριθμός Δειγμάτων)	**Θετικά (%)**	**Μέσος Όρος Συγκέντρωσης (μg/kg)**	**Εύρος (μg/kg)**	**Θετικά (%)**	**Μέσος Όρος Συγκέντρωσης (μg/kg)**	**Εύρος (μg/kg)**
Βοοειδή (μυς)	10	30	10,10	4,31-17,17	20	13,28	5,15-21,41
Βοοειδή (ήπαρ)	6	83	84,31	66,60-110,63	0	-	-
Χοιρινά (μυς)	10	60	4,75	2,32-8,54	30	28,47	12,84-44,10
Χοιρινά (ήπαρ)	2	100	34,8	24,10-45,50	50	26,98	-
Χοιρινά (νεφρό)	6	100	10,38	5,46-16,69	50	169,57	12,39-314,60
Κοτόπουλα (μυς)	9	22	6,39	5,20-7,57	11	12,17	-
Κοτόπουλα (ήπαρ)	9	100	59,21	18,59-149,69	11	31,72	-
Κοτόπουλα (νεφρό)	2	0	-	-	0	-	-

		Φθοροκινολόνες					
		Ενροφλοξασίνη			*Μαρβοφλοξασίνη*		
	Ν (Αριθμός Δειγμάτων)	**Θετικά (%)**	**Μέσος Όρος Συγκέντρωσης (μg/kg)**	**Εύρος (μg/kg)**	**Θετικά (%)**	**Μέσος Όρος Συγκέντρωσης (μg/kg)**	**Εύρος (μg/kg)**
Βοοειδή (μυς)	10	20	3,41	0,41-6,41	20	14,71	0,27-29,15
Βοοειδή (ήπαρ)	6	83	2,66	0,86-4,69	17	-	-
Χοιρινά (μυς)	10	30	0,56	0,37-0,74	20	0,36	-
Χοιρινά (ήπαρ)	2	50	1,89	-	0	-	-
Χοιρινά (νεφρό)	6	50	15,63	1,12-24,63	100	0,86	0,72-1,33
Κοτόπουλα (μυς)	9	44	3,38	0,42-9,34	33	1,29	-
Κοτόπουλα (ήπαρ)	9	33	7,82	6,35-9,50	22	9,12	-
Κοτόπουλα (νεφρό)	2	100	2,10	1,43-2,77	0	-	-

Στατιστικές μέθοδοι

Τα επίπεδα των φαρμάκων που ανιχνεύτηκαν στα δείγματα κρέατος που ελήφθησαν από την αγορά εκφράστηκαν με τη μορφή μέσης τιμής και τυπικής απόκλισης αλλά και με τη χρήση ελάχιστης και μέγιστης τιμής. Οι διακριτές μεταβλητές εκφράστηκαν με τη μορφή συχνότητας και της %συχνότητας.

Για την εύρεση των διαφορών μεταξύ συνεχών μεταβλητών ανάμεσα σε δύο ομάδες, χρησιμοποιήθηκε ο έλεγχος ανεξαρτήτων δειγμάτων t (independent samples t-test) ενώ για διαφορές σε περισσότερες από δύο ομάδες στις μέσες τιμές συνεχών μεταβλητών εφαρμόστηκε ανάλυση διασποράς κατά ένα παράγοντα (one-way Analysis of Variance-ANOVA).

Η γραφική αναπαράσταση των αποτελεσμάτων έγινε με θηκογράμματα (Box and Whisker plots).

Η καταχώριση έγινε σε υπολογιστικό φύλο EXCEL for WINDOWS 2010 ενώ η ανάλυση των δεδομένων στο στατιστικό πρόγραμμα IBM SPSS Statistics 24.0 και ως όριο αποδοχής των υποθέσεων τέθηκε το α=0,05.

Αποτελέσματα

Τα δείγματα που συλλέχθηκαν ήταν 16 (29,6%) δείγματα από βοοειδές, 20 (37,0%) κοτόπουλο και 18 (33,3%) χοιρινό από την τοπική αγορά. Όσον αφορά το τμήμα ζώου που ανιχνεύθηκαν τα φάρμακα αποτελούνταν από μυς 29 (53,7%), ήπαρ 17 (31,5%) και ένα μικρότερο ποσοστό 14,8% (8) από νεφρό ενώ η προέλευση των ζώων ήταν το μεγαλύτερο ποσοστό 81,5% (44) εγχώρια και 18,5% (10) εισαγωγής. Η μέση ηλικία των βοοειδών ήταν 15,5 ± 3,3 μήνες, για το χοιρινό 4,9 ± 2,0 ενώ η μέση ηλικία για το κοτόπουλο ήταν οι 2,3 ± 0,8 μήνες (Πίνακας 7).

Πίνακας 7: Περιγραφικά χαρακτηριστικά του δείγματος

		N (πλήθος δειγμάτων)	Ποσοστό δειγμάτων (%)
Είδος ζώου	**Βοοειδές**	16	29,6
	Κοτόπουλο	20	37,0
	Χοιρινό	18	33,3
Τμήμα Ζώου	**Ήπαρ**	17	31,5
	Μυς	29	53,7
	Νεφρό	8	14,8
Προέλευση	**Εγχώριο**	44	81,5
	Εισαγωγής	10	18,5

		Μέση τιμή	Τυπική Απόκλιση	Ελάχιστο-Μέγιστο
Ηλικία ζώου (μήνες)	**Βοοειδές**	15,5	3,3	12 - 24
	Κοτόπουλο	2,3	0,8	1 - 4
	Χοιρινό	4,9	2,0	2 - 8

Στον Πίνακα 8 παρουσιάζονται τα περιγραφικά στατιστικά των αντιβιοτικών (θετικές συγκεντρώσεις) που ανιχνεύθηκαν στα είδη των ζώων από τις δυο μεθόδους που χρησιμοποιήθηκαν. Από την LC-MS μέθοδο, παρατηρήθηκε μεγαλύτερη μέση τιμή για το αντιβιοτικό Δοξυκυκλίνη με 61,5 ± 97,6 μg/kg, ακολουθούμενη από την Οξυτετρακυκλίνη με μέση τιμή 36,0 ± 38,7 μg/kg και μικρότερες μέσες τιμές για τις Σουλφαμεθοξαζόλη, Ενροφλοξασίνη και Μαρβοφλοξασίνη. Από την μέθοδο ELISA, μεγαλύτερη μέση τιμή παρατηρήθηκε για τη Στρεπτομυκίνη με 144,0 ± 66,9 μg/kg και για τις Φθοροκινολόνες με 75,9 ± 97,5 μg/kg.

Πίνακας 8: Περιγραφικά στατιστικά των αντιβιοτικών (θετικές συγκεντρώσεις)

	N	Ποσοστό θετικών δειγμάτων (%)	Μέση τιμή Συγκέντρωσης (μg/kg)	SD	Μέγιστο - Ελάχιστο
LC-MS					
Σουλφαμεθοξαζόλη	23	42,3	11,4	13,2	3,96 - 66,95
Οξυτετρακυκλίνη	32	59,3	36,0	38,7	2,32 - 149,69
Δοξυκυκλίνη	11	20,4	61,5	97,6	5,15 – 314,60
Ενροφλοξασίνη	22	40,7	5,1	6,5	0,37 - 24,63
Μαρβοφλοξασίνη	11	20,4	4,1	8,7	0,27 - 29,15
ELISA					
Σουλφοναμίδες	51	94,4	13,2	26,6	1,78 - 157,32
Στρεπτομυκίνη	6	11,1	144,0	66,9	53,44 - 239,47
Τετρακυκλίνες	5	9,3	4,8	2,2	1,97 - 6,99
Φθοροκινολόνες	14	25,9	75,9	97,5	10,42 - 327,60

Στον Πίνακα 9 παρουσιάζονται τα περιγραφικά χαρακτηριστικά των φαρμάκων (εμφυτευμένες συγκεντρώσεις-imputation LOD/2) που ανιχνεύθηκαν στα ζώα από τις δύο μεθόδους. Όπως και προηγουμένως, στην μέθοδο LC-MS μεγαλύτερες μέσες τιμές παρουσιάστηκαν στα φάρμακα Δοξυκυκλίνη και Οξυτετρακυκλίνη με 13,1 ± 49,1 μg/kg και 21,5 ± 34,4 μg/kg αντίστοιχα. Ενώ στην μέθοδο ELISA τα αντιβιοτικά Στρεπτομυκίνη και Φθοροκινολόνες είχαν τις μεγαλύτερες μέσες τιμές με 26,2 ± 46,8 μg/kg και 23,4 ± 57,6 μg/kg αντίστοιχα.

Πίνακας 9: Περιγραφικά στατιστικά των αντιβιοτικών (εμφυτευμένες συγκεντρώσεις, imputation LOD/2).

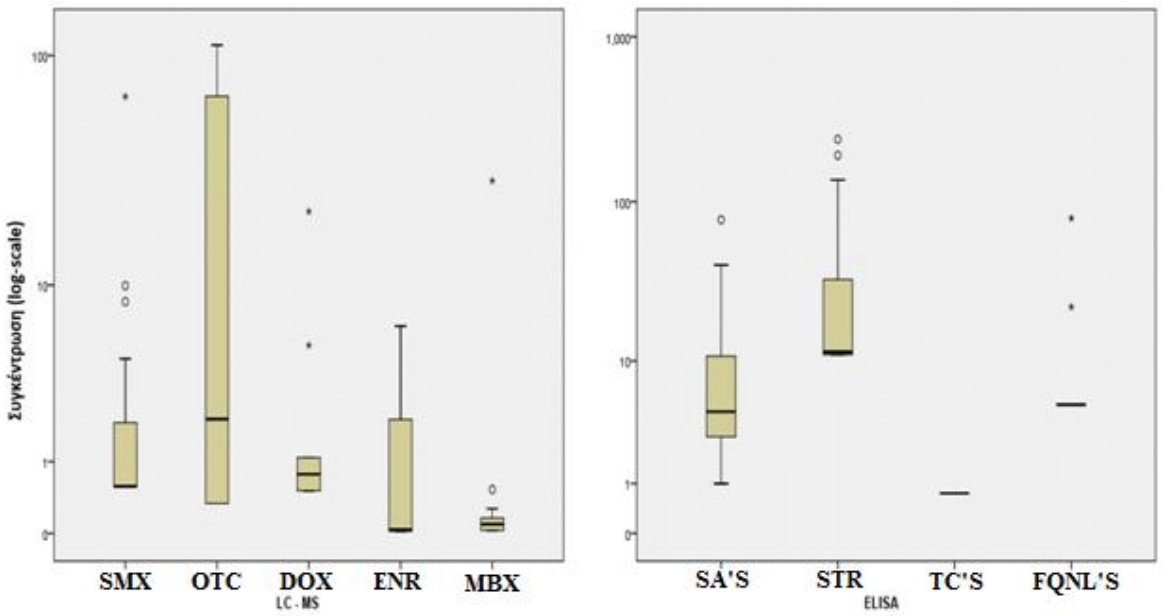
	Μέση τιμή Συγκέντρωσης (μg/kg)	SD	Τεταρτημόρια		
			25	Διάμεσος	75
LC-MS					
Σουλφαμεθοξαζόλη	5,2	10,1	0,58	0,58	5,76
Οξυτετρακυκλίνη	21,5	34,4	0,34	5,06	24,3
Δοξυκυκλίνη	13,1	49,1	0,51	0,61	1,08
Ενροφλοξασίνη	2,1	4,8	0,02	0,06	1,57
Μαρβοφλοξασίνη	0,9	4,1	0,03	0,13	0,19
ELISA					
Σουλφοναμίδες	12,5	25,9	3,07	4,35	7,23
Στρεπτομυκίνη	26,2	46,8	11	11,5	14
Τετρακυκλίνες	1,1	1,3	0,75	0,75	0,75
Φθοροκινολόνες	23,4	57,6	5	5	10,81

Στον Πίνακα 10, Διάγραμμα 1 παρουσιάζονται οι μέσες τιμές και τυπικές αποκλίσεις καθώς και η διαφοροποίηση των αντιβιοτικών ανά τμήμα του βοοειδούς. Η μέση τιμή της Οξυτετρακυκλίνης στο ήπαρ ήταν 70,4 ± 38,8 μg/kg σε σχέση με τους μύες που ήταν 3,3 ± 5,6 μg/kg με στατιστικά σημαντική διαφορά (p=0,003). Επίσης διαφοροποίηση ανάμεσα στο ήπαρ και τους μύες παρουσιάστηκε και για τη Δοξυκυκλίνη με μέσες τιμές 1,1 και 3,1 ± 6,6 μg/kg αντίστοιχα (p=0,032). Η Ενροφλοξασίνη ανιχνεύθηκε περισσότερο στο ήπαρ του βοοειδούς με μέση τιμή 2,2 ± 1,8 μg/kg σε σχέση με τους μύες που ήταν 0,7 ± 2,0 μg/kg με στατιστικά σημαντική διαφορά (p=0,008). Τέλος, η μέση τιμή της Μαρβοφλοξασίνης στους μύες ήταν μεγαλύτερη με 3,0 ± 9,2 μg/kg με στατιστικά σημαντική διαφορά (p=0,025).

Πίνακας 10: Περιγραφικά στατιστικά και συγκρίσεις των αντιβιοτικών ανά τμήμα ζώου στο βοοειδές (εμφυτευμένες συγκεντρώσεις, imputation LOD/2).

	Βοοειδές				
	Ήπαρ (6)		**Μυς (10)**		
	Μέση τιμή Συγκέντρωσης (μg/kg)	**SD**	**Μέση τιμή Συγκέντρωσης (μg/kg)**	**SD**	**MW**
Σουλφαμεθοξαζόλη	0,6	ND	9,3	20,6	0,087
Οξυτετρακυκλίνη	70,4	38,8	3,3	5,6	**0,003**
Δοξυκυκλίνη	1,1	ND	3,1	6,6	**0,032**
Ενροφλοξασίνη	2,2	1,8	0,7	2,0	**0,008**
Μαρβοφλοξασίνη	0,2	0,2	3,0	9,2	**0,025**
Σουλφοναμίδες	23,8	30,1	6,7	8,4	0,386
Στρεπτομυκίνη	25	33,1	64,4	89,3	0,167
Τετρακυκλίνες	0,8	ND	0,8	ND	-
Φθοροκινολόνες	5,0	ND	14,2	23,5	0,258

MW: Mann-Whitney



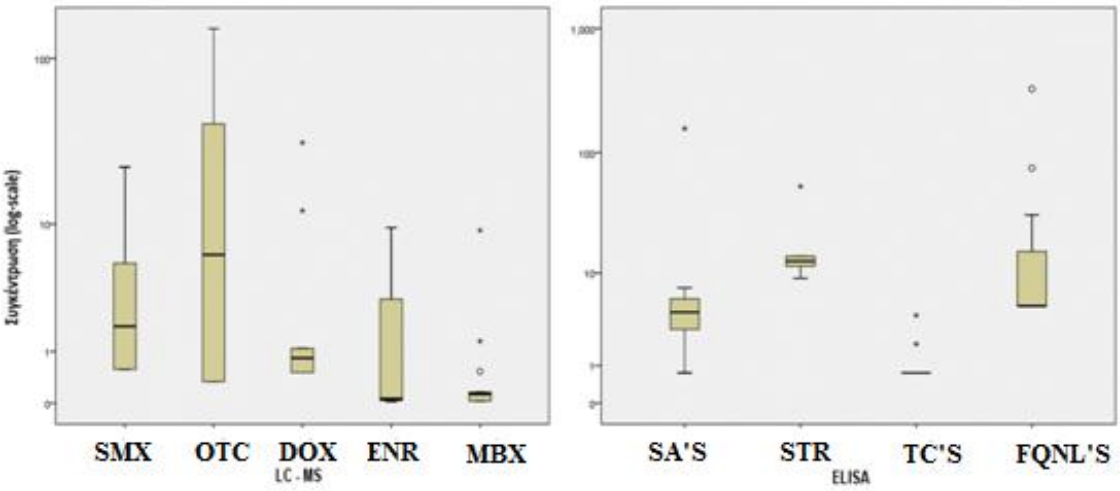
Διάγραμμα 1: Θηκογράμματα συγκεντρώσεων των αντιβιοτικών ανά μέθοδο μέτρησης στο βοοειδές

Στον Πίνακα 11, Διάγραμμα 2 παρουσιάζονται τα περιγραφικά χαρακτηριστικά καθώς και η διαφοροποίηση των αντιβιοτικών ανά τμήμα του κοτόπουλου. Η μέση τιμή της Σουλφαμεθοξαζόλης στους μύες ήταν 7,4 ± 6,4 μg/kg σε σχέση με το ήπαρ/νεφρό που ήταν 1,3 ± 1,7 μg/kg με στατιστικά σημαντική διαφορά (p=0,002). Διαφοροποίηση ανάμεσα στο ήπαρ/νεφρό και τους μύες παρουσιάστηκε και για τη Οξυτετρακυκλίνη με μεγαλύτερη μέση τιμή στο ήπαρ/νεφρό, 48,6 ± 45,5 μg/kg και 1,7 ± 2,7 μg/kg στους μύες (p<0,001). Η Δοξυκυκλίνη παρουσίασε παρόμοια συμπεριφορά με την μεγαλύτερη μέση τιμή να παρατηρείται στο ήπαρ/νεφρό με 3,8 ± 9,3 μg/kg σε σχέση με τους μύες με 1,8 ± 3,9 μg/kg (p<0,001). Η μέση τιμή της Μαρβοφλοξασίνης στο ήπαρ/νεφρό ήταν 1,0 ± 2,7 μg/kg σε σύγκριση με τους μύες όπου ήταν 0,2 ± 0,4 μg/kg με στατιστικά σημαντική διαφορά (p=0,018) και τέλος το αντιβιοτικό Στρεπτομυκίνη είχε μεγαλύτερη μέση τιμή 15,1 ± 12,7 μg/kg στο ήπαρ/νεφρό με στατιστικά σημαντική διαφορά (p=0,001).

Πίνακας 11: Περιγραφικά στατιστικά και συγκρίσεις των αντιβιοτικών ανά τμήμα ζώου στο κοτόπουλο (εμφυτευμένες συγκεντρώσεις, imputation LOD/2).

	Κοτόπουλο				
	Ήπαρ/Νεφρό (11)		**Μυς (9)**		
	Μέση τιμή Συγκέντρωσης (μg/kg)	**SD**	**Μέση τιμή Συγκέντρωσης (μg/kg)**	**SD**	**MW**
Σουλφαμεθοξαζόλη	1,3	1,7	7,4	6,4	**0,002**
Οξυτετρακυκλίνη	48,6	45,5	1,7	2,7	**<0,001**
Δοξυκυκλίνη	3,8	9,3	1,8	3,9	**0,001**
Ενροφλοξασίνη	2,5	3,6	1,5	3,1	0,133
Μαρβοφλοξασίνη	1,0	2,7	0,2	0,4	**0,018**
Σουλφοναμίδες	4,8	1,4	20,4	51,4	0,21
Στρεπτομυκίνη	15,1	12,7	14,0	ND	**0,001**
Τετρακυκλίνες	1,1	1,0	0,9	0,4	0,942
Φθοροκινολόνες	10,8	8,6	50,7	106,3	0,708

MW: Mann-Whitney



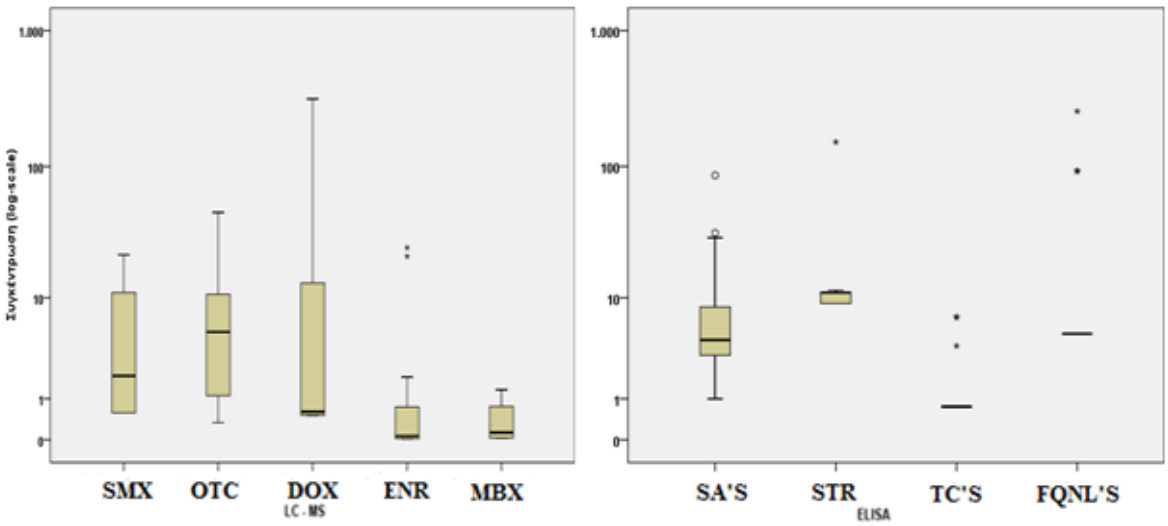
Διάγραμμα 2: Θηκογράμματα συγκεντρώσεων των αντιβιοτικών ανά μέθοδο μέτρησης στο κοτόπουλο

Στον Πίνακα 12, Διάγραμμα 3 παρουσιάζονται τα περιγραφικά στατιστικά και οι διαφοροποιήσεις των αντιβιοτικών ανάμεσα στο ήπαρ/νεφρό και στους μύες του χοιρινού κρέατος. Διαφοροποιήσεις παρατηρούνται για τα αντιβιοτικά Οξυτετρακυκλίνη, Δοξυκυκλίνη, Ενροφλοξασίνη, Μαρβοφλοξασίνη και για τις κατηγορίες αντιβιοτικών Τετρακυκλίνες και Φθοροκινολόνες με μεγαλύτερες μέσες τιμές στο ήπαρ/νεφρό σε σύγκριση με τους μύες ($p<0,05$).

Πίνακας 12: Περιγραφικά στατιστικά και συγκρίσεις των αντιβιοτικών ανά τμήμα ζώου στο χοιρινό (εμφυτευμένες συγκεντρώσεις, imputation LOD/2).

	Χοιρινό				
	Ήπαρ/Νεφρό (8)		**Μυς (10)**		
	Μέση τιμή Συγκέντρωσης (μg/kg)	**SD**	**Μέση τιμή Συγκέντρωσης (μg/kg)**	**SD**	**MW**
Σουλφαμεθοξαζόλη	2,9	3,8	7,9	7,5	0,129
Οξυτετρακυκλίνη	16,5	13,4	2,6	2,7	**0,001**
Δοξυκυκλίνη	67,3	117,5	7,4	13,9	**0,034**
Ενροφλοξασίνη	6,1	10,4	0,1	0,2	**0,004**
Μαρβοφλοξασίνη	0,7	0,4	0,1	0,1	**<0,001**
Σουλφοναμίδες	20,7	29,2	6,3	4,7	0,929
Στρεπτομυκίνη	27,5	50,2	11	ND	0,323
Τετρακυκλίνες	2,7	2,8	0,8	ND	**0,04**
Φθοροκινολόνες	58,2	88,9	5,0	ND	**0,04**

MW: Mann-Whitney



Διάγραμμα 3: Θηκογράμματα συγκεντρώσεων των αντιβιοτικών ανά μέθοδο μέτρησης στο χοιρινό

Κεφάλαιο 5ο: ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

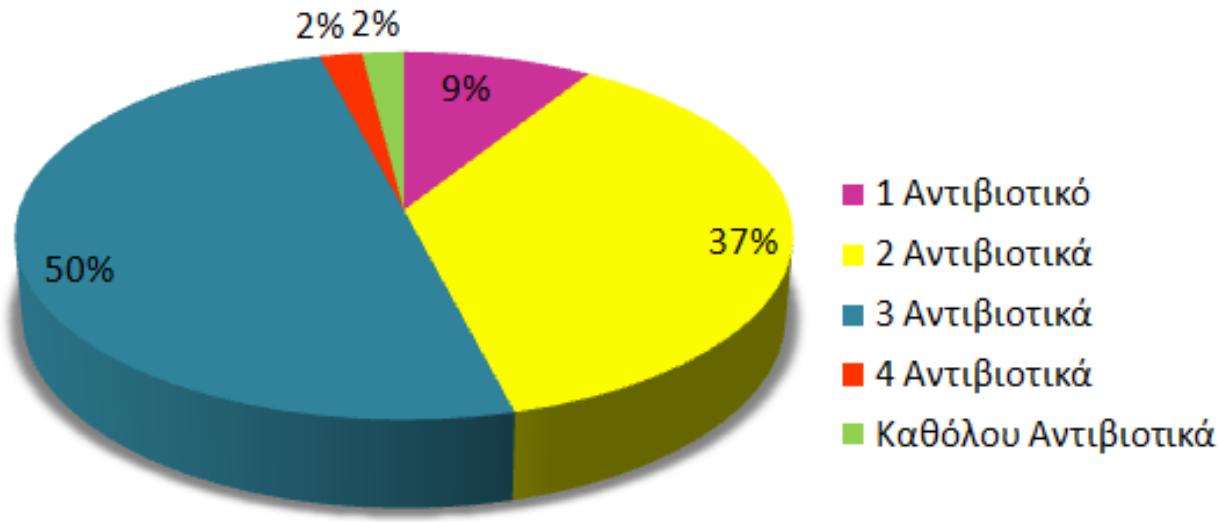
Σκοπός της παρούσας έρευνας ήταν ο προσδιορισμός των επιπέδων αντιβιοτικών και συγκεκριμένα των σουλφοναμίδων, τετρακυκλίνων, αμινογλυκοσίδων και φθοροκινολονών σε δείγματα βοδινού, κοτόπουλου και χοιρινού κρέατος (μυς, ήπαρ, νεφρό).

Σε όλα τα δείγματα που αναλύθηκαν, εκτός από ένα δείγμα βοδινού μυ, ανιχνεύθηκε η ύπαρξη τουλάχιστον μίας κατηγορίας αντιβιοτικών. Σύμφωνα με τη μέθοδο ELISA, τα δείγματα χοιρινών νεφρών φάνηκε να είναι περισσότερο επιβαρυμένα καθώς στα περισσότερα από αυτά ανιχνεύθηκαν και οι τέσσερις κατηγορίες αντιβιοτικών. Αντίθετα, σε όλα τα δείγματα χοιρινού μυ και ήπατος ανιχνεύθηκε μόνο η ύπαρξη σουλφοναμίδων. Οι σουλφοναμίδες αποτέλεσαν την πιο συχνά ανιχνεύσιμη κατηγορία αντιβιοτικών, καθώς ήταν παρούσες σε όλους τους τύπους δειγμάτων σε ποσοστά που ξεπερνούσαν το 83%. Αξίζει να σημειωθεί ότι ένα δείγμα μυ κοτόπουλου (157,32 μg/kg) ξεπέρασε τα αποδεκτά ευρωπαϊκά όρια [MRLs-Commission Regulation (EU) No 37/2010] για τη συγκέντρωση σουλφοναμίδων στο κρέας. Λιγότερο ανιχνεύσιμες ήταν οι τετρακυκλίνες με ποσοστά θετικότητας 11 % για τα δείγματα ήπατος και μυ κοτόπουλου και 50% για τα δείγματα χοιρινών νεφρών.

Μεγαλύτερη επιβάρυνση σε σουλφοναμίδες παρατηρήθηκε για τα δείγματα χοιρινού ήπατος με μέση συγκέντρωση 47,2 μg/kg. Η μέση συγκέντρωση για το βοδινό ήπαρ ήταν 23,8 μg/kg, 22,9 μg/kg για το μυ κοτόπουλου ενώ πολύ μικρότερες συγκεντρώσεις εμφάνισαν όλα τα υπόλοιπα είδη νωπού κρέατος (<15 μg/kg). Οι τετρακυκλίνες εμφάνισαν τις μικρότερες συγκεντρώσεις αφού η μέση συγκέντρωση στα θετικά δείγματα δεν ξεπερνούσε τα 6 μg/kg. Οι αμινογλυκοσίδες παρουσίασαν μεγάλες συγκεντρώσεις και στις τέσσερις κατηγορίες δειγμάτων που ανιχνεύθηκαν. Συγκεκριμένα, η μέση συγκέντρωση για τα δείγματα βοδινού μυ ήταν 188,9 μg/kg, για τα δείγματα βοδινού ήπατος 92,5 μg/kg, για τα δείγματα χοιρινών νεφρών 151,7 μg/kg και για τα δείγματα νεφρού κοτόπουλου 53,4 μg/kg. Τέλος, οι χοιρινοί νεφροί ήταν τα πιο επιβαρυμένα σε φθοροκινολόνες δείγματα με μέση τιμή συγκέντρωσης 146,8 μg/kg. Τα δείγματα μυ κοτόπουλου και βοδινού (107,8 και 50,8 μg/kg αντίστοιχα) παρουσίασαν μεγάλες συγκεντρώσεις ενώ τα δείγματα ήπατος και νεφρού κοτόπουλου πολύ μικρότερες (<21 μg/kg). Ένα δείγμα χοιρινού νεφρού (255,4 μg/kg) και ένα δείγμα μυ κοτόπουλου (327,6 μg/kg) βρέθηκαν να ξεπερνούν τα θεσπισμένα από την Ε.Ε. MRLs για τις φθοροκινολόνες.

Με τη μέθοδο LC-ESI-MS ανιχνεύθηκε ενροφλοξασίνη σε δείγματα μυ κοτόπουλου (44%) με μέσο όρο συγκέντρωσης 3,38 μg/kg (0,42-9,34 μg/kg), σε ήπαρ κοτόπουλου (33%) με μέσο όρο συγκέντρωσης 7,82 μg/kg (6,35-9,50 μg/kg) και σε όλα τα δείγματα νεφρού κοτόπουλου με μέσο όρο συγκέντρωσης 2,10 μg/kg (1,43-2,77 μg/kg). Αξίζει να αναφερθεί, σε αυτό το σημείο, ότι η χρήση ενροφλοξασίνης στα πουλερικά έχει απαγορευτεί από τη FDA, από το 2005 (Federal Register, 2005).

Ακόμα, διαπιστώθηκε ότι το 89% των δειγμάτων περιείχε συνδυασμό αντιβιοτικών (από 2 έως 4), κάτι το οποίο είναι ανησυχητικό για την υγεία των καταναλωτών (Διάγραμμα 4).



Διάγραμμα 4: Ανίχνευση αντιβιοτικών στα δείγματα.

Μία έρευνα που έλαβε χώρα στη Νότια Ιταλία προσδιόρισε τα επίπεδα OTC σε δείγματα βοδινού μυ και ήπατος, με LC-MS (Cammilleri et al., 2019). Διαπιστώθηκε ότι υπήρχαν περισσότερα θετικά δείγματα ήπατος (6,7%) σε σύγκριση με το βοδινό μυ (2,5%) και μεγαλύτερες συγκεντρώσεις στο ήπαρ 31,5 μg/kg (23,9-40,2 μg/kg) σε σχέση με το μυ 15,9 μg/kg (15,0-28,6 μg/kg). Παρόμοια τάση παρατηρήθηκε και στην παρούσα έρευνα. Από τα δείγματα βοδινού μυ, το 30% ήταν θετικά ενώ από τα δείγματα βοδινού ήπατος, το 83%. Όσον αφορά τις συγκεντρώσεις, η μέση τιμή συγκέντρωσης στα δείγματα βοδινού μυ ήταν 10,10 μg/kg (4,31-17,17 μg/kg) και στα δείγματα βοδινού ήπατος ήταν 84,31 μg/kg (66,60-110,63 μg/kg).

Σε μελέτη που έγινε στη Βραζιλία το 2016, ο Panzenhagen και οι συνεργάτες του διερεύνησαν την επιμόλυνση δειγμάτων κοτόπουλου(μυς, ήπαρ, νεφρό) από το αντιβιοτικό ENR, με υγρή χρωματογραφία (Panzenhagen et al., 2016). Με βάση τα αποτελέσματά τους, το 23,3% των δειγμάτων μυ κοτόπουλου, το 16,7% ήπατος κοτόπουλου και το 16,7% νεφρού κοτόπουλου ήταν θετικά σε ENR. Η μέση τιμή συγκέντρωσης ήταν 12,25 μg/kg (0,96-35,8 μg/kg) για τα δείγματα μυ κοτόπουλου, 45,4 μg/kg για τα δείγματα ήπατος κοτόπουλου και 17,4 μg/kg για τα δείγματα νεφρού κοτόπουλου. Παρόμοια τάση θετικών δειγμάτων και μέσης τιμής συγκέντρωσης παρατηρήθηκε και στην παρούσα έρευνα για τα δείγματα μυ και ήπατος κοτόπουλου, ωστόσο υπάρχει διαφοροποίηση στα δείγματα νεφρού κοτόπουλου. Συγκεκριμένα, βρέθηκε θετικό το 44% των δειγμάτων μυ κοτόπουλου, το 33% των δειγμάτων ήπατος κοτόπουλου και το 100% των δειγμάτων νεφρού κοτόπουλου. Η μέση τιμή συγκέντρωσης για το μυ κοτόπουλου ήταν 3,38 μg/kg (0,42-9,34 μg/kg), για το ήπαρ κοτόπουλου 7,82 μg/kg (6,35-9,50 μg/kg) και για το νεφρό κοτόπουλου 2,10 μg/kg (1,43-2,77 μg/kg). Αυτή η διαφοροποίηση πιθανόν να οφείλεται στον μικρό αριθμό δειγμάτων νεφρού κοτόπουλου που μελετήθηκαν και στις δύο περιπτώσεις (N=6 στη βιβλιογραφία και N=2 στην παρούσα έρευνα).

Στη Νότια Αφρική, ο Ramatla και οι συνεργάτες του ανίχνευσαν τα υπολείμματα σουλφοναμίδων σε χοιρινά δείγματα (μυ, ήπαρ, νεφρό) με τη μέθοδο της ELISA (Ramatla et al., 2017). Παρατηρήθηκε απουσία σουλφοναμίδων στο χοιρινό μυ. Το 9% του χοιρινού ήπατος και το 36% του χοιρινού νεφρού ήταν θετικά. Η μέση τιμή συγκέντρωσης ήταν 58,50 μg/kg (48,2-69,9 μg/kg) και 72,70 μg/kg (52,8-92,8 μg/kg) αντίστοιχα. Ομοίως στην παρούσα έρευνα βρέθηκε αυξημένη συγκέντρωση στο χοιρινό ήπαρ 47,22 μg/kg (8,41-86,03 μg/kg) και νεφρό 14,00 μg/kg (2,51-31,89 μg/kg) σε σύγκριση με το χοιρινό μυ 6,31 μg/kg (2,84-18,90 μg/kg). Ωστόσο, αντίθετα με τη βιβλιογραφία όλα τα δείγματα χοιρινού μυ ήταν θετικά. Η διαφοροποίηση αυτή μπορεί να οφείλεται στον τρόπο χορήγησης του αντιβιοτικού. Είναι πιθανή η ανίχνευση αντιβιοτικού στο μυ, όταν αυτό χορηγείται ενδομυϊκά ή υποδόρια εν αντιθέσει με την ενδοφλέβια χορήγηση και ειδικά με τη χορήγηση μέσω της τροφής και του πόσιμου νερού.

Σε μελέτη που έγινε στο Ιράκ, προσδιορίστηκαν τα επίπεδα STR σε δείγματα βοδινού μυ, με τη μέθοδο ELISA (Abdullah et al., 2012). Το 61% βρέθηκε θετικό με μέση συγκέντρωση 59,60 μg/kg (26,0-282,2 μg/kg). Ωστόσο, δεν παρατηρείται ταύτιση αποτελεσμάτων με τη δική μας μελέτη καθώς το 30% των δειγμάτων βρέθηκε θετικό με μέση συγκέντρωση 188,88 μg/kg (135,62-239,47 μg/kg). Η διαφοροποίηση στα ποσοστά θετικότητας μπορεί να

οφείλεται στην εποχή, την οποία έλαβε χώρα η δειγματοληψία. Η δειγματοληψία για την παρούσα μελέτη έγινε φθινόπωρο, ενώ στη βιβλιογραφία αναφέρεται ότι η δειγματοληψία έγινε χειμώνα και άνοιξη. Κατά τη διάρκεια του χειμώνα και της άνοιξης γίνεται παρατεταμένη χορήγηση αντιβιοτικών για την αντιμετώπιση ασθενειών και αλλεργιών.

Η παρούσα μελέτη είναι η πρώτη που ασχολείται με τον προσδιορισμό των σουλφοναμίδων, τετρακυκλινών, αμινογλυκοσίδων και φθοροκινολόνων στα συγκεκριμένα είδη κρέατος με χρήση ανοσοχημικής και χρωματογραφικής μεθόδου.

Η αντοχή στα αντιβιοτικά αποτελεί μείζον ευρωπαϊκό και παγκόσμιο κοινωνικό πρόβλημα. Η ανίχνευση αντιβιοτικών σε δείγματα νωπού κρέατος δημιουργεί ερωτήματα για την επιβάρυνση και τις πιθανές επιπτώσεις στην υγεία του καταναλωτή. Περαιτέρω έρευνες πρέπει να διεξαχθούν για να δοθούν απαντήσεις στα παραπάνω ερωτήματα. Απαιτείται ουσιαστική ενίσχυση των θεσπισθέντων μέτρων αλλά και δημιουργία νέων αυστηρότερων μέτρων ώστε να μειωθεί η χρήση αντιμικροβιακών φαρμάκων, όταν δεν υπάρχει ανάγκη, και κατ’επέκταση να προληφθεί η περαιτέρω διάδοση της ανθεκτικότητας και να διαφυλαχθεί η ικανότητα καταπολέμησης μικροβιακών λοιμώξεων.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Abdullah, O. A., Shareef, A. M., & Sheet, O. H.. Detection of streptomycin residues in local meat of bovine and ovine. *Iraqi Journal of Veterinary Sciences*, **(2012)**, 26(1), 43–46.

2. Agwuh, K. N. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of the tetracyclines including glycylcyclines. *J Antimicrob Chemother*,**(2006)**. *58*(2), 256-265.

3. Ali AK. Peripheral neuropathy and Guillain-Barre syndrome risks associated with exposure to systemic fluoroquinolones: a pharmacovigilance analysis. *Ann Epidemiol*, **(2014)**;24:279-85 .

4. American Society of Health-System Pharmacists 2016; Drug Information 2016. *Bethesda, MD*. **(2016)**, p. 27

5. Anadón, A., Martıńez-Larrañaga, M. R., Díaz, M. J., Bringas, P.,Fernandez, M. C., Fernandez-Cruz, M. L., Martínez, M. A. Pharmacokinetics of doxycycline in broiler chickens. *Avian Pathology*, **(1994)**. 23(1), 79–90.

6. Anadón, A., Martıńez-Larrañaga, M. R., Díaz, M. J., Bringas, P.,Martínez, M. A., Fernandez-Cruz, M. L., Fernandez, R. Pharmacokinetics and residues of enrofloxacin in chickens. *American Journal of Veterinary Research*, **(1995)**. 56(4), 501–506.

7. Andrée S.; Stirtzel S.; Schwägele F.; Federal Research Centre for Nutrition and Food; Location Kulmbach; Institute for Chemistry and Physics; E. - C. - Baumannstr. 20; 95 326 Kulmbach; Germany

8. Arroliga ME, Pien L. Penicillin allergy: Consider trying penicillin again. *Cleve Clin J Med*., **(2003)**;70:313-4, 317-8, 320-1 passim.

9. Bassett, E.J., M.S. Keith, G. Armelagos, et al. Tetracycline-labeled human bone from ancient Sudanese Nubia (A. D. 350). *Science***(1980)**. 209: 1532–1534.

10. Baynes, R. E., Dedonder, K., Kissell, L., Mzyk, D., Marmulak, T., Smith, G., Riviere, J. E. Health concerns and management of select veterinary drug residues. *Food and Chem Toxicol*,**(2016)**. *88*, 112-122.

11. Beallor C, Kain KC. Doxycycline. In: Schlagenhauf P, ed. Travelers' Malaria. *Hamilton*, Canada: BC Decker, **(2001)**:210–18.
12. Bendele AM, Hulman JF, Harvey AK, et al: Passive role of articular chondrocytes in quinolone induced arthropathy in guinea pigs. *Toxicol Pathol* , **(1990)**, 18:304- 312

13. Blackwood, R.K., J.J. Beereboom, H.H. Rennhard, et al. 6-Methylenetetracyclines. I. A new class of antibiotics. *J. Am. Chem. Soc.***(1961)**. 83: 2773–2774.

14. Bonfioli, A.A. and F. Orefice, Toxoplasmosis. *Semin Ophthalmol*, **(2005)**. 20(3): p. 129-41.

15. Brackett CC, Singh H, Block JH. Likelihood and mechanisms of cross-allergenicity between sulfonamide antibiotics and other drugs containing a sulfonamide functional group. *Pharmacotherapy*. **(2004)**; 24:856-70.

16. Brackett CC. Sulfonamide allergy and cross-reactivity. *Curr Allergy Asthma Rep.***(2007)**; 7:41-8.

17. Bricker,S.L.,Langlais,R.P.,Miller,C.S.,Oral Diagnosis,*Oral Med and Treat Plan*, 2nd edition Hamilton, Ont.: London, UK, **(2002)**, p. 854.

18. Cammilleri, G., Pulvirenti, A., Vella, A., Macaluso, A., Dico, G. L., Giaccone, V., Ferrantelli, V.. Tetracycline Residues in Bovine Muscle and Liver Samples from Sicily (Southern Italy) by LC-MS/MS Method: A Six-Year Study. *Molecules*, **(2019)** 24(4), 695.

19. Chiu N.H.L., Christopoulos T.K. Advances in Immunoassay Technology, *InTech*, **(2012)**.
20. Chopra, I. & S.J. Eccles. Diffusion of tetracycline across the outer membrane of Eschericia coli K-12:involvement of protein Ia. *Biochem. Biophys. Res. Comm.***(1977)**. 83: 550– 557.

21. Choquet-Kastylevsky G, Vial T, Descotes J. Allergic adverse reactions to sulfonamides. *Curr Allergy Asthma Rep*. **(2002)**; 2:16-25.

22. Cook, M., E.L. Molto & C. Andersen. Fluorochrome labeling in Roman period skeletons from Dakleh Oaisis, Egypt. *Am. J. Phys. Anthropol*. **(1989)**. 80: 137–143.

23. Cooper AC, Commers AR, Finkelstein M, Lipnik PG, Tollefson LM, Wilcox RA, Hoff DS. Otoacoustic emission screen results in critically ill neonates who received gentamicin in the first week of life. *Pharmacotherapy*., **(2011)**;31(7):649-57.

24. Cornejo, J., Lapierre, L., Iragüen, D., Pizarro, N., Hidalgo, H., & Martín, B. S. Depletion study of three formulations of flumequine in edible tissues and drug transfer into chicken feathers. *J Vet Pharm and Ther*,**(2011)**. *34*(2), 168-175.

25. Craig WA. Optimizing aminoglycoside use. *Crit Care Clin***(2011)**. 27: 107–121.

26. Croubels, S., Vermeersch, H., De Backer, P., Santos, M. D.,Remon, J.P., & Van Peteghem, C. Liquid chromatographic separation of doxycycline and 4- epidoxycycline in a tissue depletion study of doxycycline in turkeys. *J Chrom B Biomed Sci and Appl*, **(1998)**. 708(1–2), 145–152.

27. Crowther J R. The ELISA Guidebook Second Edition, *Springer*.**(2009)**.

28. CVM GFI #205 (VICH GL46) Studies to Evaluate the Metabolism and Residue Kinetics of Veterinary Drugs in Food-Producing Animals: Metabolism Study to Determine the Quantity and Identify the Nature of Residues (MRK), September **(2011)**.

29. Dahl, E.L. & P.J. Rosenthal. Multiple antibiotics exert delayed effects against the Plasmodium falciparum apicoplast. *Antimicrob. Agents Chemother*. **(2007)**. 51: 3485–3490.

30. Dakin LE. Probable trimethoprim/sulfamethoxazole-induced higher-level gait disorder and nocturnal delirium in an elderly man.*Ann Pharmacother*., **(2009)**;43:129-33.

31. Daley CA, Abbott A, Doyle PS, Nader GA, Larson S. A review of fatty acid profiles and antioxidant content in grass-fed and grain-fed beef, *Nutr J*. **(2010)** , 10;9:10.

32. de Guidi G, Bracchitta G, Catalfo A. Photosensitization reactions of fluoroquinolones and their biological consequences. *Photochem Photobiol* **(2011)**;87:1214-29

33. Domagk G., Ein Beitrag zur Chemotherapie der bakteriellen Infektionen, Deutsch. *Med. Wschr*. 61 **(1935)** 250

34. Dubos, R.J. & R.D. Hotchkiss. The production of bacteriocidal substances by aerobic sporulating bacilli. *J. Exp. Med.***(1941)**. 78: 629–640.

35. Duggar, B.M. Aureomycin: a product of the continuing search for new antibiotics. *Ann. N.Y. Acad. Sci.***(1948)**. 51: 177–181.

36. Dupont H, Mentec H, Sollet JP, Bleichner G. Impact of appropriateness of initial antibiotic therapy on the outcome of ventilator-associated pneumonia. *Intensive Care Med*., **(2001)**;27(2):355-62.

37. Eliopoulos GM, Eliopoulos CT. Antibiotic combinations: Should they be tested? *Clin Microbiol Rev* **(1988)**. 1: 139– 156.

38. EMEA, European Medicines Agency, Committee for medicinal products for veterinary use, 18 January **(2006)**, London.

39. Etminan M, Forooghian F, Brophy JM, et al. Oral fluoroquinolones and the risk of retinal detachment. *JAMA***(2012)**;307:1414-19.

40. Evan J Begg and Murray L Barclay, 'Aminoglycosides – 50 Years On' **(1995)** 39(6).

41. FDA Drug Safety Communication: FDA requires label changes to warn of risk for possibly permanent nerve damage from antibacterial fluoroquinolone drugs taken by mouth or by injection. **(2013)**. Available from: http://www.fda. gov/downloads/Drugs/DrugSafety/ UCM365078.pdf [προβολή των δεδομένων 10/7/19]

42. Federal Register 66 FR 21282 - Animal Drugs, Feeds, and Related Products; Sarafloxacin for Poultry; Withdrawal of Approval of NADAs, April 30 **(2001)**,Volume 66, Issue 83

43. Federal Register 70 FR 44105 - Enrofloxacin for Poultry; Final Decision on Withdrawal of New Animal Drug Application Following Formal Evidentiary Public Hearing; Availability, August 1 **(2005)**,Volume 70, Issue 146

44. Ferguson J. Phototoxicity due to fluoroquinolones. In: Hooper DC, Rubinstein E, editors. Quinolone antimicrobial agents. 3rd edition. *ASM press* (American Society for Microbiology); Washington, DC: **(2003)**. p. 451-60

45. Finlay, A.C., G.L. Hobby, S.Y. Pan, et al. Terramycin, a new antibiotic. *Science***(1950)**. 111: 85.

46. Food and Drug Administration. Drugs@ FDA. www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/drugsatfda/ (προβολή των δεδομένων 4/7/19).

47. Frazier D. L., Thompson L., Trettien A., Evans E. I.:Comparison of fluoroquinolone pharmacokinetic parameters after treatment with marbofloxacin, enrofloxacin, and difloxacin in dogs. *J. Vet. Pharmacol. Therap*., **(2000)**, 23: 293–302.

48. Frost, H.M., A. Villanueva, H. Roth & S. Stanislavecic. Experimental multiband tetracycline measurements of lamellar osteosblastic activity. Henry Ford Hosp. *Med. Bull.***(1961)**. 9: 312–319.

49. Gerber, B. O., & Pichler, W. J. Non covalent interactions of drugs with immune receptors may mediate drug-induced hypersensitivity reactions. *The AAPS Journal*,**(2006)**. *8*(1).

50. Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 11th Edition, ed. *L.L. Brunton, et al*. **(2006)**.

51. Grill MF, Maganti RK. Neurotoxic effects associated with antibiotic use: management considerations. *Br J Clin Pharmacol*, **(2011)**;72:381-93

52. Gruchalla RS, Pirmohamed M. Antibiotic allergy. *N Engl J Med*., **(2006)**;354:601-9

53. Guidugli F, Castro AA, Atallah AN. Antibiotics for preventing leptospirosis. *Cochrane Database of System Rev*. **(2000)**;4:CD001305.

54. Haddad, M.A., et al., Causes of visual impairment in children: a study of 3,210 cases. *J Pediatr Ophthalmol Strabismus*, **(2007)**. 44(4): p. 232-40.

55. Hardman, J.G., L.E. Limbird, P.B., A.G. Gilman. Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics. 10th ed. New York, NY: *McGraw-Hill*, **(2001)**., p. 1246

56. HarrisD.C., Ποσοτική χημική ανάλυση ,Τόμος 2, *Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης,* (2011).

57. Haverkamp W, Kruesmann F, Fritsch A, et al. Update on the cardiac safety of moxifloxacin. *Curr Drug Saf* **(2012)**;7:149-63

58. Ho YI, Chan CY, Cheng AF. In-vitro activities of aminoglycoside-aminocyclitols against mycobacteria. *J Antimicrob Chemother***(1997)**. 40: 27–32.

59. Holmes NE, Charles PGP. Safety and efficacy review of doxycycline. *Clin Med Ther*., **(2009)**;1:471–82.

60. Hooper D, Wolfson J: The fluoroquinolones: struc- tures, mechanisms of action and resistance and spectra of activity in vitro. *Antimicrob Agents Chemotherap*,**(1985)**, 28:581-586

61. http://www.fda.gov/RegulatoryInformation/Legislation/FederalFoodDrugandCosmeticActFDCAct / default.htm (Προβολή των δεδομένων στις 25/6/2019)

62. https://www.studyread.com/antibiotics-definition-function-mechanism/ (Προβολή δεδομένων στις 5/7/2019).

63. http://www.antimicrobe.org/d17.asp (Προβολή δεδομένων στις 5/7/2019).

64. https://pedclerk.bsd.uchicago.edu/page/guillain-barr%C3%A9-syndrome-gbs (Προβολή δεδομένων στις 5/7/2019).

65. https://www.healthinfi.com/the-symptoms-of-retinal-detachment/ (Προβολή δεδομένων στις 5/7/2019).

66. www.researchgate.net (Προβολή δεδομένων στις 5/7/2019).

67. https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EL/ALL/?uri=LEGISSUM:mi0026 (Προβολή δεδομένων στις 5/7/2019).

68. https://www.nature.com/articles/nrd1108 (Προβολή δεδομένων στις 5/7/2019).

69. https://www.mdpi.com/2079-6382/6/4/26 (Προβολή δεδομένων στις 14/10/2019).

70. https://www.waters.com/waters/en_US/How-Does-High-Performance-Liquid-Chromatography-Work%3F/nav.htm?locale=en_US&cid=10049055 (Προβολή δεδομένων στις 14/10/2019).

71. https://decoration.gr/trofima-kai-antiviotika/ (Προβολή δεδομένων στις 14/10/2019).

72. https://en.wikipedia.org/wiki/ (Προβολή δεδομένων στις 14/10/2019).

73. https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/ (Προβολή δεδομένων στις 14/10/2019).

74. https://medlineplus.gov/clostridiumdifficileinfections.html (Προβολή δεδομένων στις 14/10/2019).

75. www.slideshare.net (Προβολή δεδομένων στις 14/10/2019).

76. http://www.biologydiscussion.com/veterinary-pharmacology/sulfonamides-chemistry-classification-and-adverse-reactions-animals/74478 (Προβολή δεδομένων στις 14/10/2019).

77. https://coreem.net/core/methemoglobinemia/ (Προβολή δεδομένων στις 14/10/2019).

78. https://face2faceafrica.com/article/for-ancient-nubians-beer-was-more-than-just-a-drink-it-was-medicine (Προβολή δεδομένων στις 14/10/2019).

79. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Suppl. 7, Overall Evaluations of Carcinogenicity: An Updating of IARC Monographs, Lyon, *IARCPress*, **(1987)** p. 348,Volumes 1-42

80. IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Man, Some Miscellaneous Pharmaceutical Substances , *IARCPress*, **(1977)**, pp. 233–242 , Vol. 13

81. IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Man, Some Pharmaceutical Drugs, Lyon, *IARCPress* , **(1980)**, pp. 285–295 , Vol. 24

82. Ishiwata Y, Sanada Y, Yasuhara M. Effects of gatifloxacin on serum glucose concentration in normal and diabetic rats. *Biol Pharm Bull***(2006)**;29:527-31

83. Jolles S, Sewell WAC, Leighton C. Drug-induced aseptic meningitis: diagnosis and management. *Drug Saf.*,**(2000)**;22:215-26.

84. Jong EC, Nothdurft HD. Current drugs for antimalarial chemoprophylaxis: A review of efficacy and safety. *J Travel Med*., **(2001)**;8(Suppl 3):S48–S56.

85. Katz, S. E., Fassbender, C. A., & Dowling, J.J. Jr Oxytetracycline residues in tissue, organs, and eggs of poultry fed supplemented rations. *J Asso of Official Ana Chem*, **(1973)**. 56(1), 77–81.

86. Keefer C. S., 'Clinical Indications for Streptomycin Therapy' in *Streptomycin Nature and Practical Applications*, edited by S. A. Waksman, Baltimore, Williams and Wilkins, **(1949)**, pp. 279-281.

87. King, E.Q., C.N. Lewis, H. Welch, et al. Clinical observations on the use of Terramycin hydrochloride. *J. Am. Med. Assoc*. **(1950)**. 143: 1–4.

88. Koch-Weser, J., Sidel, V.W., Dexter, M., Parish C., Finer, D.C. & Kanarek, P. Adverse reactions to sulfisoxazole, sulfamethoxazole, and nitrofurantoin. *Arch. intern. Med*., **(1971)**, 128, 399–404

89. Koirala J. Trimethoprim-sulfamethoxazole–induced methemoglobinemia in an HIV-infected patient. *Mayo Clin Proc*., **(2004)**; 79: 829-30.

90. Łebkowska-Wieruszewska, B., & Kowalski, C. J. Sulfachlorpyrazine residues depletion in turkey edible tissues. *J Vet Pharm and Ther*. **(2010)**.

91. Lorente M, Ballano A, Juanes A, et al. Blue-gray pigmentation in trunk and extremities in a 71-year-old man. *JAMA Dermatol*, **(2013)**;149:1111-12

92. Lynas, L., Currie, D., Elliott, C. T., Mcevoy, J. D., & Hewitt, S. A. Screening for chloramphenicol residues in the tissues and fluids of treated cattle by the four plate test, Charm II radioimmunoassay and Ridascreen CAP-Glucuronid enzyme immunoassay. *The Analyst*,**(1998)**. *123*(12), 2773-2777.

93. McCormick, J.R.D., N.O. Sjolander, U. Hirsch, et al. A new family of antibiotics: the demethyltetracyclines. *J. Am. Chem. Soc*. **(1957)**. 79: 4561–4563.

94. McIsaac WJ, Prakash P, Ross S. The management of acute uncomplicated cystitis in adult women by family physicians in Canada. *Can J Infect Dis Med Microbiol*, **(2008)**;19:287-93.

95. Mohommadi Z. Local applications of tetracyclines in endodontics and dental trauma: a review. *Dent Today*. **(2009)**;28:95–6, 98, 100–1, quiz 101.

96. Montay G, Goueffon Y, Roquet F: Absorption, distri bution, metabolic fate, and elimination of pefloxacin mesylate in mice, rats, dogs, monkeys, and humans. *Antimicrob Agents Chemotherp*, **(1984)**, 25:463-472

97. Moore, P. A., A. Evenson, T. D. Luickey, E. McCoy, C. A. Elvehjm and E. B. Hart. Use of sulfasuxadine, streptothricin, and streptomycin in nutritional studies with the chick. *J. Biol. Chem*. **(1946)**. 165:437–441

98. Nagai, J., & Takano, M. Entry of aminoglycosides into renal tubular epithelial cells via endocytosis-dependent and endocytosis-independent pathways. *Biochem Pharmacol*,**(2014)**. *90*(4), 331-337.

99. Nagata, T., & Fukuda, Y. Distribution and Elimination of Sulphadimethoxine and Its Metabolites in Treated Chicken. *J Pharm and Pharmacol*,**(1994)**. *46*(12), 1004-1012.

100. Nelson, M.L., A. Dinardo, J. Hochberg & G. Armelagos. Mass spectroscopic characterization of tetracycline in the skeletal remains of an ancient population from Sudanese Nubia, 350–550 CE. *Am. J. Phys. Anthropol.***(2010)**. 143: 151–154.

101. NIH; DailyMed. Current Medication Information for Streptomycin (Streptomycin Injection, Powder, Lyophilized, For Solution) https://dailymed.nlm.nih.gov/dailymed/drugInfo.cfm?setid=abd1f64e-4283-4370-aae8-3666316aa36e, προβολή των δεδομένων 4/7/2019

102. Oliva, B., G. Gordon, P. McNicholas, et al. Evidence that tetracycline analogs whose primary target is not the bacterial ribosome cause lysis of Eschericia coli. Antimicrob. Agents Chemother. **(1992)**. 36: 913–919.

103. Oomori Y, Yasue T, Aoyama H, et al: Effects of fleroxacin on HeLa cell functions and topoisomerase II.*J Antimicrob Chemotherap*, **(1988)**, 22:91-97 (suppl D)

104. Panzenhagen, P. H. N., Aguiar, W. S., Gouvêa, R., Oliveira, A. M. G. D., Barreto, F., Pereira, V. L. A., & Aquino, M. H. C.. Investigation of enrofloxacin residues in broiler tissues using ELISA and LC-MS/MS. *Food Additives & Contaminants: Part A*, **(2016)**, 1–5.

105. Patel, T., Marmulak, T., Gehring, R., Pitesky, M., Clapham, M. O., & Tell, L. A. Drug residues in poultry meat: A literature review of commonly used veterinary antibacterials and anthelmintics used in poultry. *J Vet Pharmacol and Thers*,**(2018)**. *41*(6), 761-789.

106. Paterson JM, Mamdani MM, Manno M, Juurlink DN. Fluoroquinolone therapy and idiosyncratic acute liver injury: a population-based study. *CMAJ***(2012)**;184:1565-70

107. Pharmacovigilance Working Party of the European Medicines Agency. Fluoroquinolones - risk of QT interval prolongation. **(2011)**. Available from: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/ document_library/Report/2011/01/ WC500100459 pdf

108. Podnecky NL, Rhodes KA, Schweizer HP. Efflux pump-mediated drug resistance in Burkholderia. *Front Microbiol***(2015)**. 6: 305.

109. Ramatla, T., Ngoma, L., Adetunji, M., & Mwanza, M.. Evaluation of Antibiotic Residues in Raw Meat Using Different Analytical Methods. *Antibiotics*, 6(4), **(2017)**, 34.

110. Ramirez MS, Tolmasky ME. Aminoglycoside modifying enzymes. *Drug Resist Updat***(2010)**. 13: 151–171.

111. Reid, D.W.J., Caillé, G. & Kaufmann, N.R. Maternal and transplacental kinetics of trimethoprim and sulfamethoxazole, separately and in combination. *Can. med. Assoc. J.*, **(1975)**, 112, 67S–72S

112. Reig M, Toldrá F, Chemical origin toxic compounds. In: Toldrá F, Hui YH, Astiasarán I, Nip WK, Sebranek JG, Silveira ETF, Stahnke LH, Talon R (eds) *Handbook of fermented meat and poultry*, Blackwell, Ames, IA, **(2007)**, pp 469–475

113. Roberts, M. C. Tetracycline Therapy: Update. *Clinical Infectious Diseases*,**(2003)**. 36(4), 462-467.

114. S. Diaz-Sanchez, S. Moscoso, F. Solís de los Santos, A. Andino, I. Hanning, Antibiotic use in poultry; A driving force for organic poultry production. *Food Protection Trends*. **(2015)**, 35. 440-447

115. Sauret JM, Vilissova N. Human brucellosis. *J Am Board Fam Pract*., **(2002)**; 15:401–6.

116. Scheer M: Studies on the antibacterial activity of Baytril®. *Vet Med Review* , **(1987)**, 2:90-98

117. Schelleman H, Bilker WB, Brensinger CM, et al. Anti-infectives and the risk of severe hypoglycemia in users of glipizide or glyburide. *Clin Pharmacol Ther***(2010)**;88:214-22

118. Schmidt, D.R., et al., Treatment of infants with congenital toxoplasmosis: tolerability and plasma concentrations of sulfadiazine and pyrimethamine. *Eur J Pediatr*, **(2006)**. 165(1): p. 19-25.

119. Scholl TO, Johnson WG. Folic acid: influence on the outcome of pregnancy. *Am J Clin Nutr*., **(2000)**;71:1295S.

120. Sendzik J, Lode H, Stahlmann R. Quinolone-induced arthropathy: an update focusing on new mechanistic and clinical data. *Int J Antimicrob Agents***(2009)**;33:194-2002

121. Shaffer D, Armstrong G, Higgins K, et al. Increased US prescription trends associated with the CDC Bacillus anthracis antimicrobial post exposure prophylaxis campaign. *Pharmacoepidemiol Drug Saf.*,**(2003)**;12: 177–82.

122. Shim, J. H., Shen, J. Y., Kim, M. R., Lee, C. J., & Kim, I. S. Determination of the Fluoroquinolone Enrofloxacin in Edible Chicken Muscle by Supercritical Fluid Extraction and Liquid Chromatography with Fluorescence Detection. *J Agricul and Food Chem*,**(2003)**. *51*(26), 7528-7532.

123. Smit L A, Baylin A, Campos H. Conjugated linoleic acid in adipose tissue and risk of myocardial infarction. *Am J Clin Nutr*. **(2010)** Jul;92(1):34–40.

124. Smith K, Leyden JL. Safety of doxycycline and minocycline: A systemic review. *Clin Ther*., **(2005)**;27:1329–42.

125. Stephens, C.R., J.J. Beereboom, H.H. Rennhard, et al. 6-Deoxytetracyclines. IV. Preparation, C-6 stereochemistry,and reactions.*J.Am.Chem.Soc*. **(1963)**. 85:2643–2652.

126. Stubbings W, Bostock J, Ingham E, Chopra I. Mechanisms of the post-antibiotic effects induced by rifampicin and gentamicin in Escherichia coli. *J Antimicrob Chemother***(2006)**. 58: 444–448.

127. Takahashi, Y., Hashizume, M., Said, A. A., & Kido, Y. Pharmacokinetics of sulfadimethoxine in skin of broiler- chicken after single and multiple intravenous injections. *The J Vet Med Sci*, **(2003)**. 55(1), 81–85.

128. Terheggan U, Leggat PA. Clinical manifestations of Q fever in adults and children. *Travel Med Inf Dis*., **(2007)**;5:159–64.

129. Tornero P, De Barrio M, Baeza ML et al. Cross-reactivity among p-amino group compounds in sulfonamide fixed drug eruption: diagnostic value of patch testing. *Contact Dermatitis*. **(2004)**; 51:57-62.

130. Tréfouël J.,Tréfouël T.,Nitti F.,Bovet D.,Activitédup-aminophénylsulfamide sur l'infection streptococcique expérimentale de la souris et du lapin, *C. R. Soc. Biol.* 120 **(1935)**756.

131. Tsutsui, T. Viewing world crops from FAOSTAT. *J for the Integrat Study of Diet Hab*,**(2015)**. *26*(3), 111-114.

132. US Pharmacopeial Convention; US Pharmacopeia Dispensing Information (USP DI); *Drug Information for the Health Care Professional* 12th ed, V.I **(1992)**,p.2611

133. USDA-FAS, Citrus: World Markets and Trade, July **(2010)**, Citrus Update. Foreign Agriculture Service

- USDA

134. Vancutsem PM, Babish JG, Schwark WS: The fluoro- quinolone antimicrobials: structure, antimicrobial activity, pharmacokinetics, clinical use in domestic animals and toxicity. *Cornell Vet*, **(1990)**, 80:173-186

135. Verbeke, W., Sioen, I., Brunsø, K., Henauw, S. D., & Camp, J. V. Consumer perception versus scientific evidence of farmed and wild fish: Exploratory insights from Belgium. *Aquacul Inter*,**(2007)**. *15*(2), 121-136.

136. Wachino J, Arakawa Y. Exogenously acquired 16S rRNA methyltransferases found in aminoglycoside-resistant pathogenic Gram-negative bacteria: An update. *Drug Resist Updat***(2012)**. 15: 133–148.

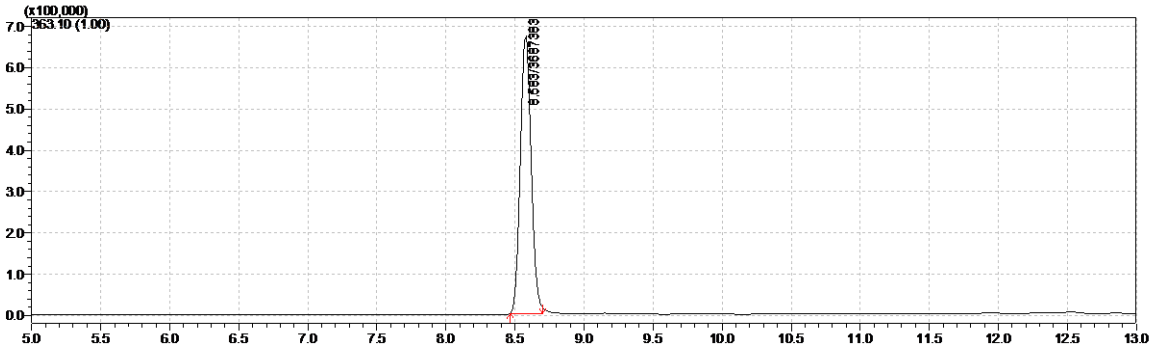
137. Waksman,S.A.,A.Schatz&D.M.Reynolds. Production of antibiotic substances by actinomycetes. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **(1946)**.48: 73–85.

138. World Health Organization. Guidelines for the programmatic management of drug-resistant tuberculosis: 2011 update. *World Health Organization*, Geneva. **(2011)**.

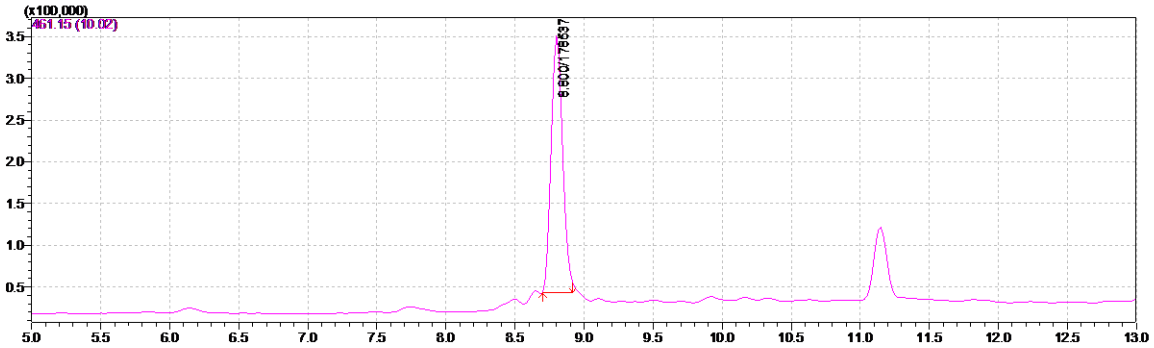
139. Yoshida, M., Hoshii, H., Yonezawa, S., Nogawa, H., Yoshimura, H., & Ito, O. Residue and disappearance of dietary oxytetracycline in the blood muscle, liver and bile of growing chicks. *Japan Poul Sci*, **(1975)**. 12(4), 181–187.

140. Yoshida, M., Yonezawa, S., Nakamura, H., Azechi, H., Terakado, N., & Horiuchi, T. Residue of dietary chlortetracycline and spiramycin in blood, muscles and liver of growing chicks.*Japan Poul Sci*,**(1971)**. 8(2), 94–102.

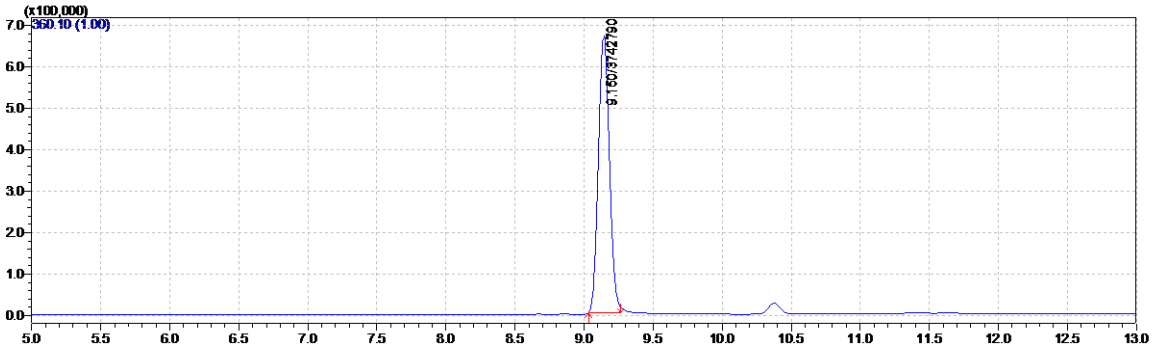
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ



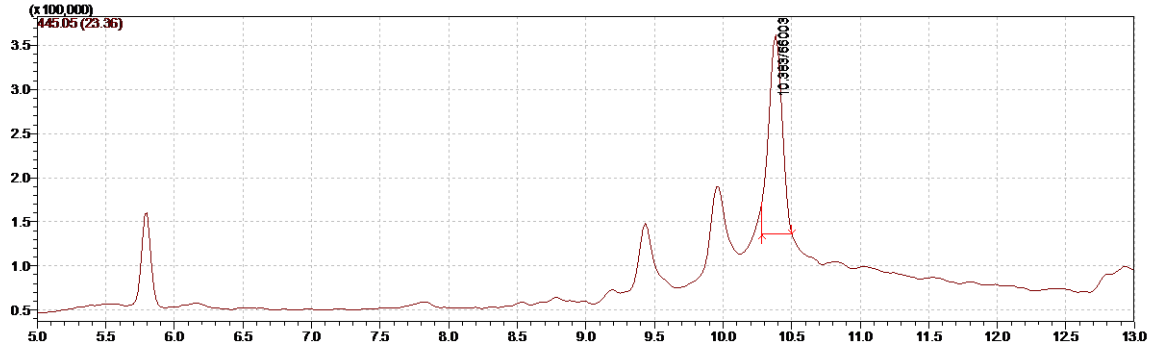
Χρωματογράφημα 1: Spiked διάλυμα MBX, συγκέντρωσης 100 μg/kg και χρόνο απόκρισης 8,583 min.



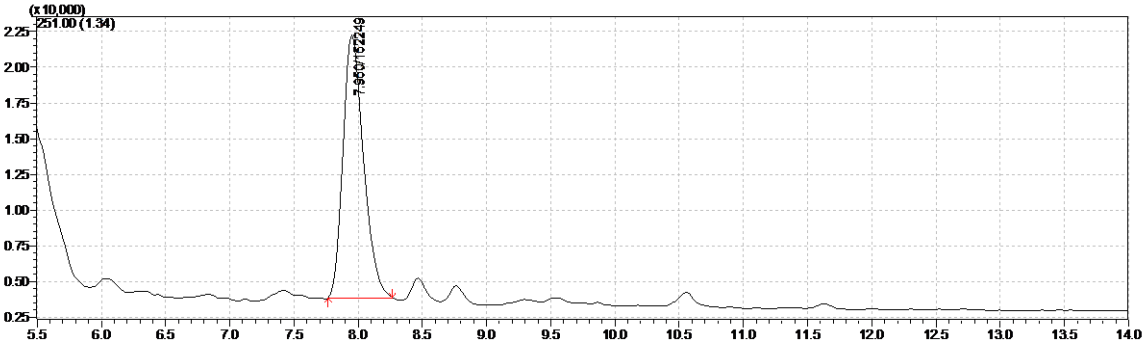
Χρωματογράφημα 2: Spiked διάλυμα OTC, συγκέντρωσης 100 μg/kg και χρόνο απόκρισης 8,800 min.



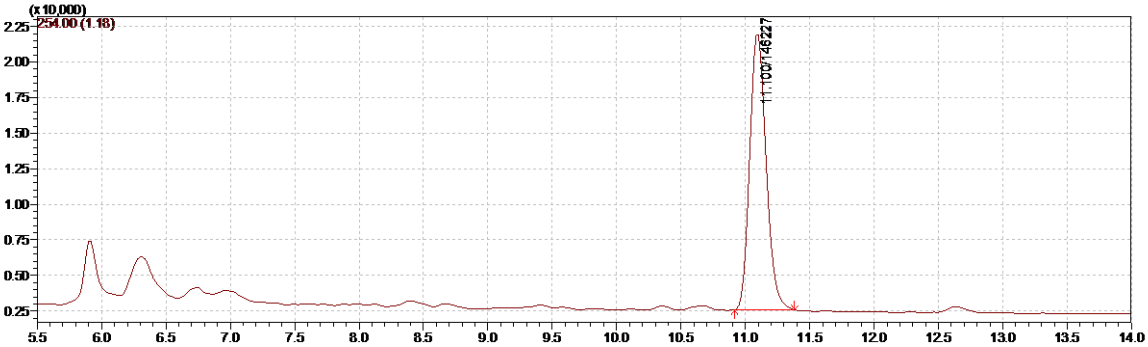
Χρωματογράφημα 3: Spiked διάλυμα ENR, συγκέντρωσης 100 μg/kg και χρόνο απόκρισης 9,150 min.



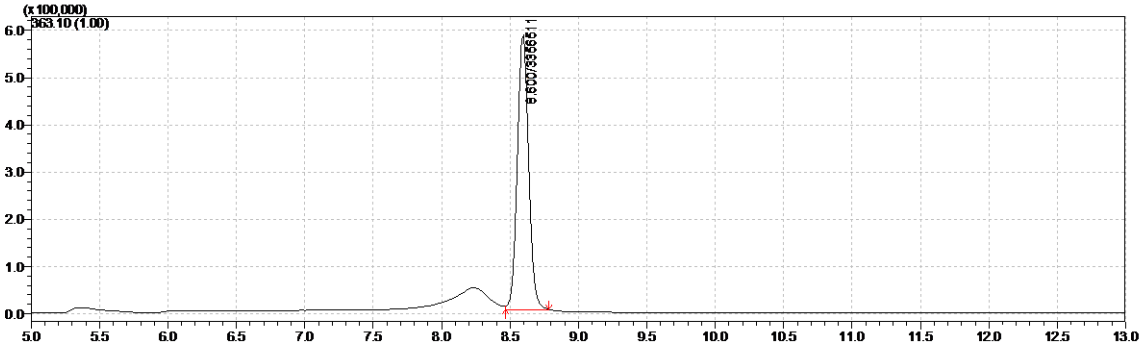
Χρωματογράφημα 4: Spiked διάλυμα DOX, συγκέντρωσης 100 μg/kg και χρόνο απόκρισης 10,383 min.



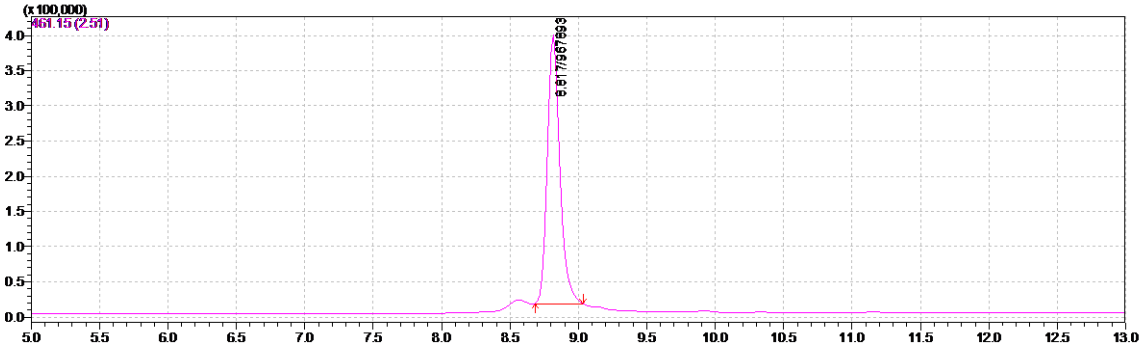
Χρωματογράφημα 5: Spiked διάλυμα SDZ, συγκέντρωσης 100 μg/kg και χρόνο απόκρισης 7,950 min.



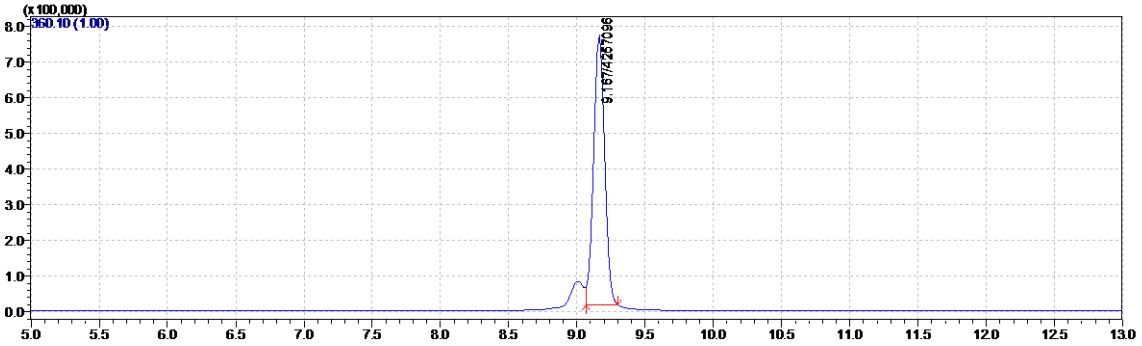
Χρωματογράφημα 6: Spiked διάλυμα SMX, συγκέντρωσης 100 μg/kg και χρόνο απόκρισης 11,100 min.



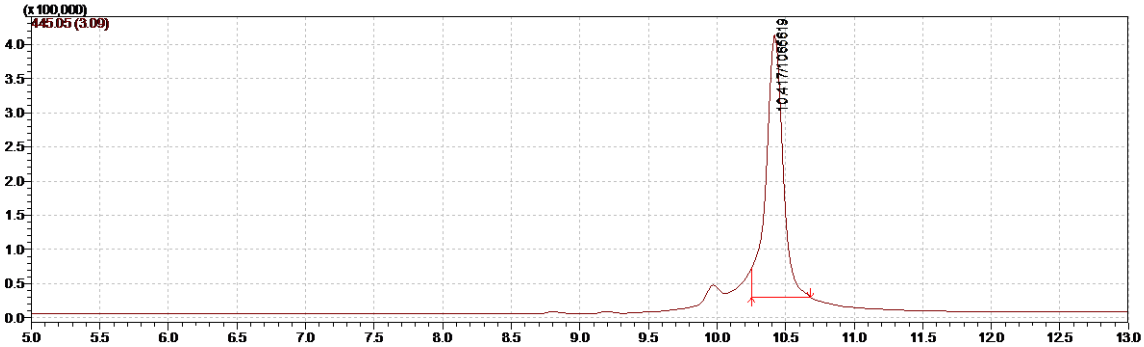
Χρωματογράφημα 7: Πρότυπο διάλυμα MBX, συγκέντρωσης 500 ng/ml και χρόνο απόκρισης 8,600 min.



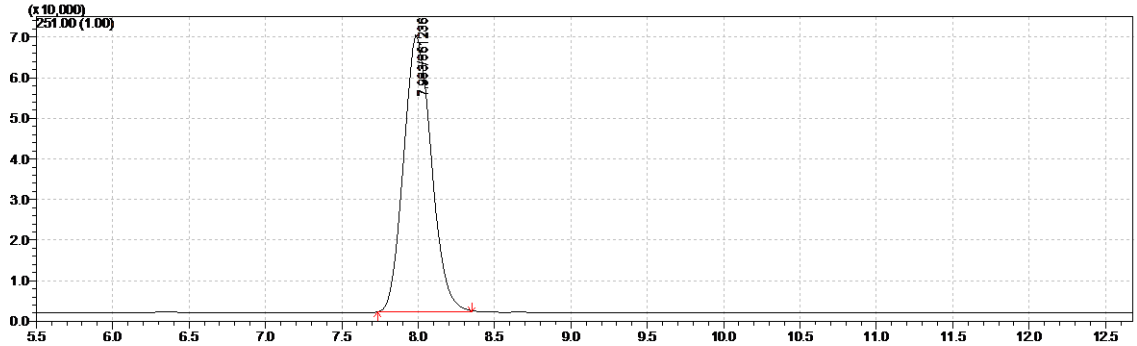
Χρωματογράφημα 8: Πρότυπο διάλυμα OTC, συγκέντρωσης 500 ng/ml και χρόνο απόκρισης 8,817 min.



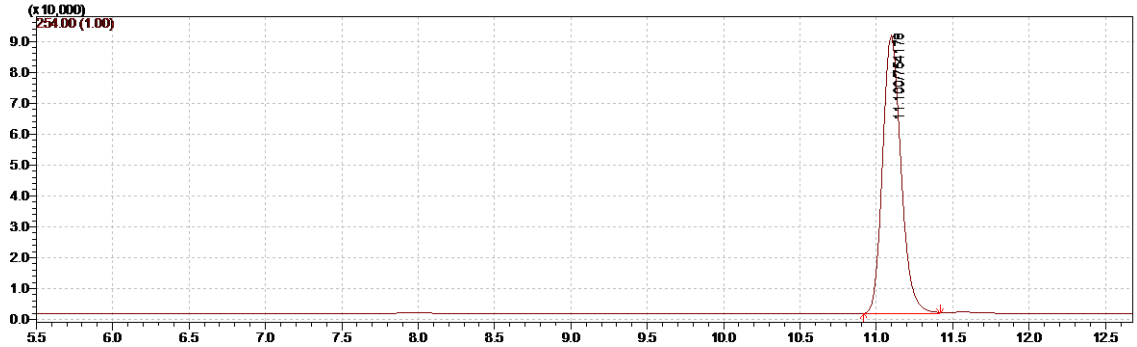
Χρωματογράφημα 9: Πρότυπο διάλυμα ENR, συγκέντρωσης 500 ng/ml και χρόνο απόκρισης 9,167 min.



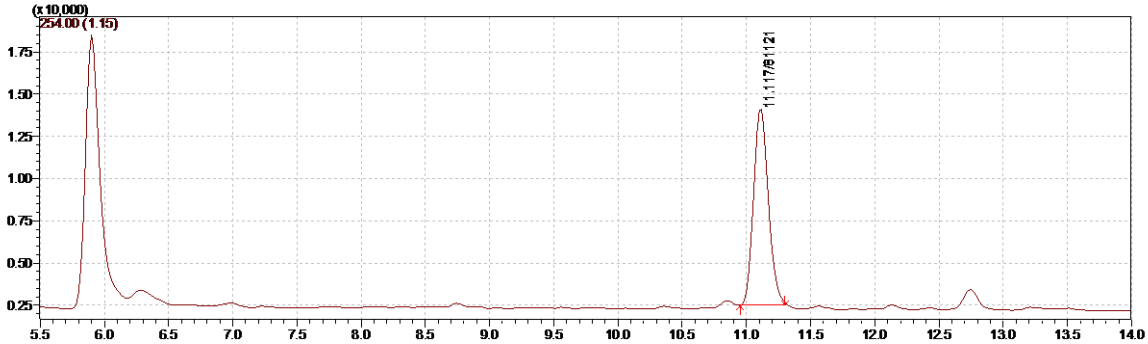
Χρωματογράφημα 10: Πρότυπο διάλυμα DOX, συγκέντρωσης 500 ng/ml και χρόνο απόκρισης 10,417 min.



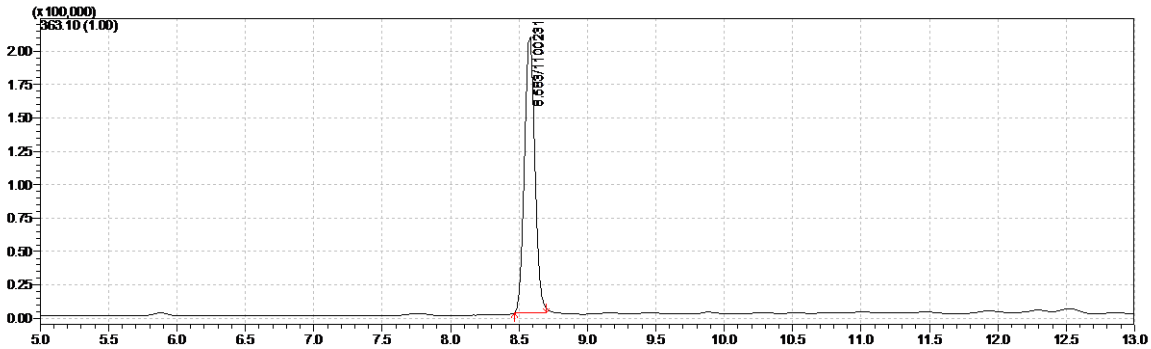
Χρωματογράφημα 11: Πρότυπο διάλυμα SDZ, συγκέντρωσης 500 ng/ml και χρόνο απόκρισης 7,983 min.



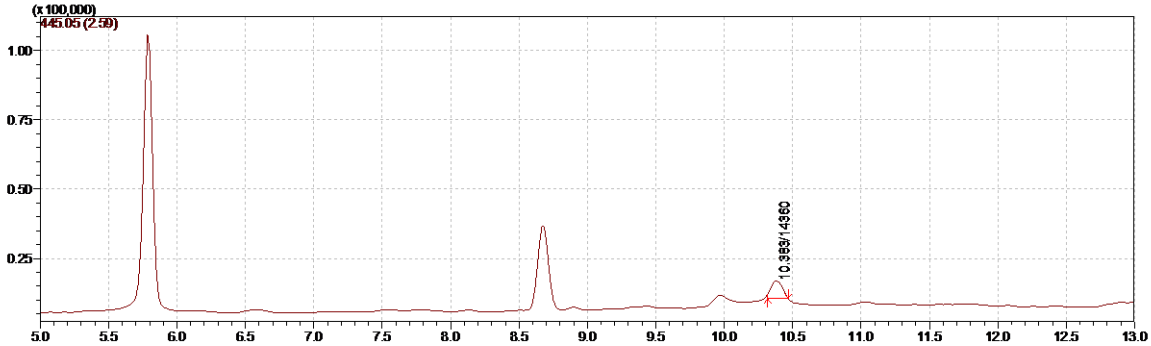
Χρωματογράφημα 12: Πρότυπο διάλυμα SMX, συγκέντρωσης 500 ng/ml και χρόνο απόκρισης 11,100 min.



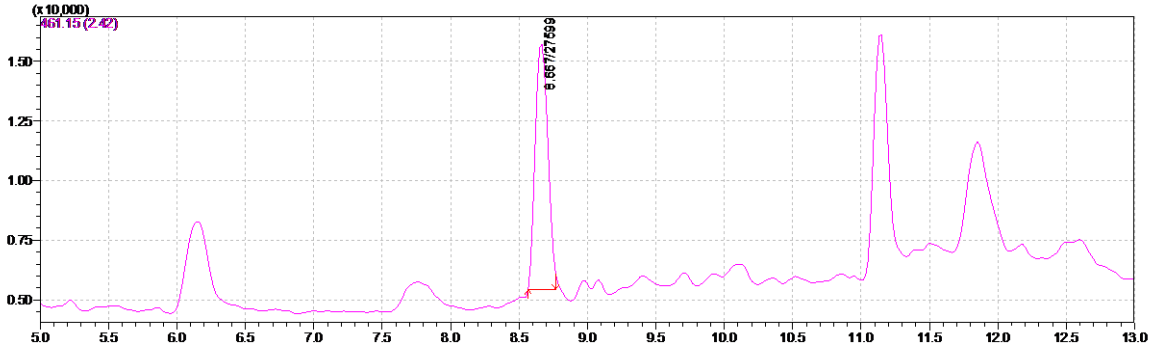
Χρωματογράφημα 13: Θετικό δείγμα (24BM) σε SMX με χρόνο απόκρισης 11,117 min.



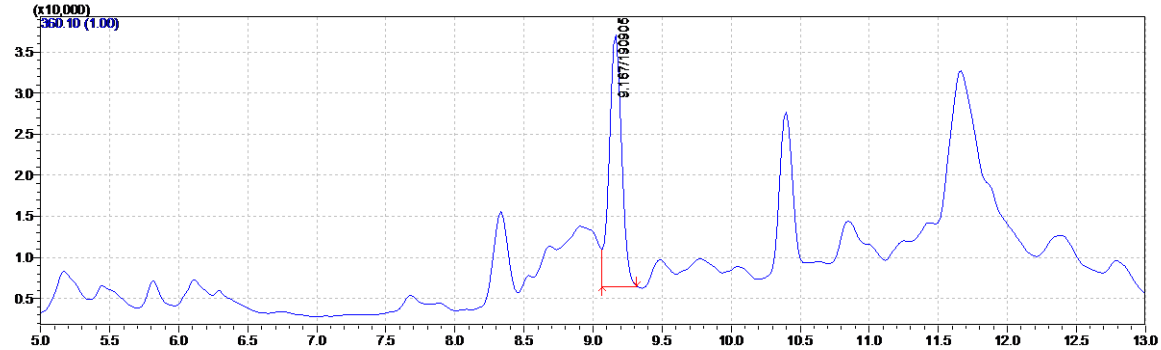
Χρωματογράφημα 14: Θετικό δείγμα (1BM) σε MBX με χρόνο απόκρισης 8,583 min.



Χρωματογράφημα 15: Θετικό δείγμα (35ΧΜ) σε DOX με χρόνο απόκρισης 10,383 min.



Χρωματογράφημα 16: Θετικό δείγμα (50ΧΝ) σε OTC με χρόνο απόκρισης 8,667 min.



Χρωματογράφημα 17: Θετικό δείγμα (4ΚΗ) σε ENR με χρόνο απόκρισης 9,167 min.