



ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
AGRICULTURAL UNIVERSITY OF ATHENS

ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΤΩΝ ΤΜΗΜΑΤΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ
ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ & ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΖΩΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΚΑΙ
ΥΔΑΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ: "ΟΛΟΚΛΗΡΩΜΕΝΗ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΓΑΛΑΚΤΟΣ
ΚΑΙ ΓΑΛΑΚΤΟΚΟΜΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ"

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΑΝΑΤΟΜΙΑΣ ΚΑΙ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ ΑΓΡΟΤΙΚΩΝ ΖΩΩΝ

Μεταπτυχιακή διατριβή με τίτλο:

**Μέθοδοι ανίχνευσης αντιβιοτικών ουσιών σε προϊόντα ζωικής
προέλευσης**

Πασχαλιά Ι. Κωτσάκη

Επιβλέπων καθηγητής: Μπόσσης Ιωάννης, Καθηγητής Γ.Π.Α.

ΑΘΗΝΑ, 2018

ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΤΩΝ ΤΜΗΜΑΤΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ & ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΖΩΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΚΑΙ ΥΔΑΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ: "ΟΛΟΚΛΗΡΩΜΕΝΗ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΓΑΛΑΚΤΟΣ ΚΑΙ ΓΑΛΑΚΤΟΚΟΜΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ"

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΑΝΑΤΟΜΙΑΣ ΚΑΙ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ ΑΓΡΟΤΙΚΩΝ ΖΩΩΝ

Μεταπτυχιακή διατριβή με τίτλο:

Μέθοδοι ανίχνευσης αντιβιοτικών ουσιών σε προϊόντα ζωικής προέλευσης

Πασχαλιά Ι. Κωτσάκη

Επιβλέπων καθηγητής: Μπόσης Ιωάννης, Καθηγητής Γ.Π.Α.

ΑΘΗΝΑ, 2018



ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
AGRICULTURAL UNIVERSITY OF ATHENS

ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ ΤΩΝ ΤΜΗΜΑΤΩΝ
ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ ΚΑΙ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ
ΖΩΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΚΑΙ ΥΔΑΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ: "ΟΛΟΚΛΗΡΩΜΕΝΗ
ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΓΑΛΑΚΤΟΣ ΚΑΙ ΓΑΛΑΚΤΟΚΟΜΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ"

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΑΝΑΤΟΜΙΑΣ ΚΑΙ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ ΑΓΡΟΤΙΚΩΝ ΖΩΩΝ

Μεταπτυχιακή διατριβή με τίτλο:

**Μέθοδοι ανίχνευσης αντιβιοτικών ουσιών σε προϊόντα ζωικής
προέλευσης**

Πασχαλιά Ι. Κωτσάκη

Εισηγητική και Εξεταστική Επιτροπή:

1. **Μπόσης Ιωάννης**, Καθηγητής Γ.Π.Α., Τμήμα Επιστήμης Ζωϊκής Παραγωγής & Υδατοκαλλιεργειών, Εργαστήριο Ανατομίας & Φυσιολογίας Αγροτικών Ζώων
2. **Χαρουτουιάν Σέρκο**, Καθηγητής Γ.Π.Α. Τμήμα Επιστήμης Ζωϊκής Παραγωγής & Υδατοκαλλιεργειών, Εργαστήριο Φυσιολογίας Θρέψεως και Διατροφής
3. **Γκολιομύτης Μιχάλης**, Επίκουρος καθηγητής Γ.Π.Α. Τμήμα Επιστήμης Ζωϊκής Παραγωγής & Υδατοκαλλιεργειών, Εργαστήριο Γενικής & Ειδικής Ζωοτεχνίας

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα κτηνιατρικά φάρμακα χρησιμοποιούνται ευρέως τόσο για θεραπευτικούς, προληπτικούς, και διαγνωστικούς σκοπούς όσο και για την τροποποίηση των φυσιολογικών λειτουργιών και της συμπεριφοράς στα ζώα εκτροφής. Όμως, τα τελευταία χρόνια η ασύνητη χρήση των αντιβιοτικών έχει ως αποτέλεσμα τη συχνή ανίχνευση υπολειμμάτων τους σε προϊόντα ζωικής προέλευσης, όπως το γάλα και τα αυγά. Προκειμένου να διασφαλιστεί η υγεία των καταναλωτών, πολλοί ελεγκτικοί οργανισμοί έχουν θεσπίσει μέγιστα επιτρεπόμενα όρια (Maximum Residue Limits, MRL) για την παρουσία των αντιβιοτικών στα τρόφιμα.

Με στόχο τον αποτελεσματικό προσδιορισμό των υπολειμμάτων των αντιβιοτικών στα τρόφιμα έχουν αναπτυχθεί πολυάριθμες αναλυτικές μέθοδοι. Στην παρούσα μεταπτυχιακή μελέτη χρησιμοποιήθηκε η υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης συζευγμένη με δίδυμη φασματομετρία μάζας (Liquid Chromatography tandem-Mass spectrometry, LC-MS/MS), η χρήση της οποίας επιτρέπει την ταυτόχρονη ανίχνευση 150-255 ενώσεων με πολύ χαμηλά όρια ανίχνευσης (Limit of Detection, LoD).

Στο πλαίσιο της διατριβής μελετήθηκαν δείγματα αυγών και γάλακτος, βιολογικής και συμβατικής ετικέτας, στα οποία προσδιορίστηκε η ενδεχόμενη υπολειμματική παρουσία των παρακάτω αντιβιοτικών: Τριμεθοπρίμη (Trimethoprim), Ενροφλοξασίνη (Enrofloxacin), Οξυτετρακυκλίνη (Oxytetracycline), Τιλμικοσίνη (Tilmicosin), Φλουμεκίνη (Flumequine), Κολιστίνη (Colistin), Χλωραμφενικόλη (Chloramphenicol), Τετρακυκλίνη (Tetracycline), Σουλφαμεθαζίνη (Sulfamethazine) και Κλαριθρομυκίνη (Clarithromycin).

Αναλυτικότερα, όλα τα δείγματα που μελετήθηκαν ήταν αυγά και γάλατα από καταστήματα λιανικής πώλησης με βιολογική και συμβατική ετικέτα. Τα αντίστοιχα δείγματα που προέρχονταν από εκτροφές - παραγωγή του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών (Γ.Π.Α.), λογίστηκαν ως τα δείγματα αναφοράς (blank). Το σύνολο των δειγμάτων που συλλέχθηκαν και αναλύθηκαν είναι οκτώ από πέντε διαφορετικές εταιρίες.

Σε δείγματα συμβατικών αυγών, ανιχνεύθηκε η παρουσία της Ενροφλοξασίνης (Enrofloxacin) σε $21,9 \pm 3,4$ (ng/g) και της Σουλφαμεθαζίνης (Sulfamethazine) σε $17,3 \pm 2,9$ (ng/g). Σε δείγματα βιολογικού γάλακτος, ανιχνεύθηκε η παρουσία της Κλαριθρομυκίνης (Clarithromycin) σε $20,9 \pm 6,8$ (ng/g) και Τριμεθοπρίμης (Trimethoprim) σε $18,1 \pm 1,8$ (ng/g). Τέλος, σε δείγματα συμβατικού γάλακτος, ανιχνεύθηκε η παρουσία της Κλαριθρομυκίνης (Clarithromycin) σε $25,6 \pm 5,5$ (ng/g).

Τα ανωτέρω υπολείμματα των αντιβιοτικών που ανιχνεύθηκαν στα δείγματα συμβατικών αυγών και σε δείγματα συμβατικού γάλακτος είναι κάτω από τα ανώτατα επιτρεπτά όρια για τρόφιμα ζωικής προέλευσης. Όμως, το δείγμα βιολογικού γάλακτος, στο οποίο ανιχνεύθηκε η παρουσία των αντιβιοτικών Κλαριθρομυκίνη και Τριμεθοπρίμη, θα έπρεπε να είναι απαλλαγμένο από κατάλοιπα αντιβιοτικών, αντιπαρασιτικών κτηνιατρικών φαρμάκων (αλλοπαθητικών).

Λέξεις κλειδιά: αντιβιοτικά, Ανώτατα όρια καταλοίπων (ΑΟΚ), προϊόντα ζωικής προέλευσης, Υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης συζευγμένη με δίδυμη Φασματομετρία μάζας.

ABSTRACT

Veterinary drugs are widely used for therapeutic, preventive, and diagnostic purposes, as well as for modifying and regulating the physiological functions and behavior of farm animals. However, over the past years, the excessive use of antibiotics in breeding animals has led to the presence of residues in products of animal origin. In order to ensure consumer's health, many authorities have established Maximum Residue Limits (MRLs) for the presence of antibiotics in products.

For the effective determination of antibiotic residues in foods, numerous analytical methods have been developed. In this study, the liquid chromatography tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS) was selected, as it allows simultaneous detection of 150-255 compounds with very low detection limits (Limit of Detection, LoD).

The following antibiotics were tested in both eggs and milk samples with both organic and conventional labels: Trimethoprim, Enrofloxacin, Oxytetracycline, Tilmicosin, Flumequine, Colistin, Chloramphenicol, Tetracycline, Sulfamethasine and Clarithromycin.

More specifically, for the detection of antibiotic residues in products of animal origin, egg and milk samples were collected from retail outlets with organic and conventional labels. Samples originated from the Agricultural University of Athens (AUA) farm were defined as blank samples. The total amount of samples collected and analyzed were eight and they derived from five different companies.

In conventional egg samples, Enrofloxacin was detected at 21.9 ± 3.4 (ng/g) and Sulfamethazine at 17.3 ± 2.9 (ng/g). In samples of biological milk, Clarithromycin was detected at 20.9 ± 6.8 (ng/g) and Trimethoprim at 18.1 ± 1.8 (ng/g). Lastly, in conventional milk samples, clarithromycin (Clarithromycin) was detected at 25.6 ± 5.5 (ng/g).

Residues of antibiotics detected in conventional egg samples and samples of conventional milk are below the maximum residue limits in food products of

animal origin. However biological milk, in which Clarithromycin and Trimethoprim was detected, should be free of residues of antibiotics, antiparasitic veterinary medicines (allopathic).

Keywords: antibiotics, Maximum Residue Limits (MRLs), products of animal origin, Liquid chromatography tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS).

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Ανατομίας και Φυσιολογίας Αγροτικών Ζώων του τμήματος Ζωικής Παραγωγής και Υδατοκαλλιεργιών του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών στα πλαίσια του μεταπτυχιακού προγράμματος «Ολοκληρωμένη Διαχείριση Παραγωγής Γάλακτος και Γαλακτοκομικών Προϊόντων».

Επιβλέπων καθηγητής κατά τη διάρκεια της μελέτης αυτής ήταν ο κ. Μπόσης Ιωάννης, Καθηγητής του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, στον οποίο θα ήθελα να εκφράσω τις ειλικρινείς ευχαριστίες μου για την δυνατότητα, το προσωπικό ενδιαφέρον και την εμπιστοσύνη που μου έδειξε να ερευνήσω ένα θέμα με εξαιρετική σημασία. Η πάντα «ανοιχτή πόρτα» του γραφείου του κ. Μπόση αποτέλεσε σημαντική ενθάρρυνση για τη διατύπωση αποριών και ουσιαστική καθοδήγηση για την εκπόνηση αυτής της μεταπτυχιακής μελέτης.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τον κ. Γκολιομύτη Μιχάλη, Επίκουρο καθηγητή του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, για τη συμβολή του στη παρούσα εργασία και για τις γνώσεις που μου μετέδωσε ως καθηγητής των προπτυχιακών και μεταπτυχιακών μου μαθημάτων.

Παράλληλα, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Χαρουτουιάν Σέρκο, Καθηγητή του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, για τις ουσιαστικές παρατηρήσεις του και τις πολύτιμες συμβουλές του κατά τη συγγραφή αυτής της διατριβής. Ακόμη, η επιστημονική καθοδήγηση, η υπομονή του και η άμεση ανταπόκριση κάθε φορά που χρειαζόμουν τη βοήθειά του αποτέλεσαν αναπόσπαστο κομμάτι της ολοκλήρωσης αυτής της διατριβής. Επίσης, και τον Δρ. Κασιώτη Κωνσταντίνο, Ερευνητή του Μπενάκειου Φυτοπαθολογικού Ινστιτούτου, του οποίου η βοήθεια κατά την πειραματική διαδικασία και τη συγγραφή ήταν καθοριστική και πολύτιμη.

Θα ήταν μεγάλη παράλειψη εκ μέρους μου να μην ευχαριστήσω θερμά τον κ. Βαγγελή Θεόδωρο, μέλος Ε.Τ.Ε.Π., που τόσο με τις εργαστηριακές του γνώσεις, όσο και με τον ευχάριστο χαρακτήρα του αποτέλεσαν μεγάλη βοήθεια για εμένα.

Δεν θα μπορούσα να μην ευχαριστήσω τους γονείς μου, Γιάννη και Ρένα, για την ολόψυχη αγάπη και υποστήριξή τους όλα αυτά τα χρόνια. Αποτελούν υπόδειγμα για εμένα, και μου δίνουν κουράγιο να προχωρώ και να υπερπηδώ κάθε εμπόδιο για να φτάσω στο στόχο μου.

Τέλος, ένα μεγάλο και εγκάρδιο ευχαριστώ στην πολυαγαπημένη μου αδερφή, Έλενα, στην οποία οφείλω ότι έχω καταφέρει μέχρι στιγμής. Είναι το στήριγμά μου και όσο μακριά κι αν βρίσκεται είναι πάντα δίπλα μου.

Κωτσάκη Πασχαλιά

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	VII
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ	IX
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ ΚΑΙ ΓΡΑΦΗΜΑΤΩΝ	XI
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ	XI
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	III
ABSTRACT	V
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	1
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΗ ΕΠΙΣΚΟΠΗΣΗ	3
2.1. ΠΡΟΪΟΝΤΑ ΖΩΙΚΗΣ ΠΡΟΕΛΕΥΣΗΣ.....	3
2.2. ΓΑΛΑ.....	3
2.2.1. ΙΣΤΟΡΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ	3
2.2.2. ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ ΤΟΥ ΓΑΛΑΚΤΟΣ	3
2.2.3. ΟΡΙΣΜΟΙ ΤΟΥ ΓΑΛΑΚΤΟΣ.....	4
2.2.4. ΕΙΔΗ ΤΟΥ ΓΑΛΑΚΤΟΣ.....	5
2.2.5. ΒΙΟΛΟΓΙΚΑ ΠΡΟΪΟΝΤΑ.....	5
2.2.5.1. ΤΟ ΠΑΡΑΔΕΙΓΜΑ «WEIDEMELK» ΤΗΣ ΟΛΛΑΝΔΙΑΣ.....	6
2.2.6. ΟΦΕΛΗ ΣΤΗΝ ΥΓΕΙΑ ΤΩΝ ΚΑΤΑΝΑΛΩΤΩΝ.....	7
2.3. ΑΥΓΟ.....	8
2.3.1. ΙΣΤΟΡΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ	8
2.3.2. ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ ΤΩΝ ΑΥΓΩΝ.....	9
2.3.3. ΚΑΝΟΝΙΣΜΟΙ ΓΙΑ ΤΑ ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ ΩΟΠΑΡΑΓΩΓΗΣ.....	10
2.3.4. ΒΙΟΛΟΓΙΚΑ ΑΥΓΑ	10
2.3.4.1. ΑΝΤΙΛΗΨΕΙΣ ΤΩΝ ΚΑΤΑΝΑΛΩΤΩΝ	11
2.3.4.2. ΘΡΕΠΤΙΚΗ ΣΥΝΘΕΣΗ ΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΑΥΓΩΝ	11
2.4. ΠΟΙΟΤΙΚΑ ΠΡΟΪΟΝΤΑ.....	13
2.5. ΤΑ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ	14
2.5.1. Η ΧΡΗΣΗ ΤΩΝ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΩΝ ΣΕ ΓΕΩΡΓΙΑ ΚΑΙ ΚΤΗΝΟΤΡΟΦΙΑ	14
2.5.2. ΤΑ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ ΣΤΗΝ ΚΤΗΝΟΤΡΟΦΙΑ.....	16
2.5.3. ΚΑΝΟΝΙΣΜΟΙ ΤΗΣ ΕΥΡΩΠΑΪΚΗΣ ΕΝΩΣΗΣ	18
2.5.4. ΜΕΓΙΣΤΑ ΕΠΙΤΡΕΠΤΑ ΟΡΙΑ ΣΤΟ ΓΑΛΑ & ΣΤΑ ΑΥΓΑ.....	19
2.6. ΑΝΩΤΑΤΑ ΕΠΙΤΡΕΠΤΑ ΟΡΙΑ (MAXIMUM RESIDUE LIMITS, MRL).....	21
2.7. ΗΘΙΚΗ ΚΑΙ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ.....	28
2.8. ΚΑΤΗΓΟΡΙΕΣ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΩΝ	30

2.8.1.	ΓΕΝΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΓΙΑ ΤΑ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ	30
2.9.	ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΤΩΝ ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΩΝ ΟΥΣΙΩΝ	31
2.10.	ΜΕΘΟΔΟΙ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ ΚΑΙ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΤΩΝ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΩΝ	36
2.11.	ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΗΣ ΥΓΡΗΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ	39
2.12.	ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ ΥΓΡΗΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ	40
2.13.	ΠΟΙΟΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΜΕ ΥΓΡΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ	41
2.14.	ΠΟΣΟΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΜΕ ΥΓΡΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ	42
2.15.	ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΗΣ ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑΣ ΜΑΖΑΣ	42
2.16.	ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ ΤΟΥ ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΟΥ ΜΑΖΩΝ	43
2.17.	ΥΓΡΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΣΥΖΕΥΓΜΕΝΗ ΜΕ ΔΙΔΥΜΗ ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΑΣ- ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΑΣ ΤΡΙΠΛΟΥ ΤΕΤΡΑΠΟΛΟΥ (LIQUID CHROMATOGRAPHY TANDEM-MASS SPECTROMETRY, LC-MS/MS)	45
2.18.	Η ΣΗΜΑΣΙΑ ΤΗΣ ΙΧΝΗΛΑΣΙΜΟΤΗΤΑΣ	46
2.19.	ΔΙΚΤΥΟ ΠΡΟΕΙΔΟΠΟΙΗΣΗΣ	50
2.20.	ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ	51
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ		56
3.1.	ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	56
3.2.	ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑ	57
3.3.	ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΥΠΟ ΜΕΛΕΤΗ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΩΝ	58
3.3.1.	ΑΥΓΑ	58
3.3.2.	ΓΑΛΑ	58
3.3.2.1.	ΦΟΡΤΙΣΕΙΣ ΤΥΦΛΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΜΗΤΡΑΣ	59
3.3.2.2.	ΓΡΑΜΜΙΚΟΤΗΤΑ ΤΗΣ ΑΝΑΛΥΤΙΚΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ-ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ	59
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΧΟΛΙΑΣΜΟΣ		62
4.1.	ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ ΤΗΣ ΑΝΑΛΥΤΙΚΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ-ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	62
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ		65
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ		68
6.1.	ΕΛΛΗΝΙΚΗ	68
6.2.	ΝΟΜΟΘΕΣΙΑ	85
6.3.	ΔΙΑΔΙΚΤΥΟ	86

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ ΚΑΙ ΓΡΑΦΗΜΑΤΩΝ

Εικόνα 2.1: Οργανολογία υγρής χρωματογραφίας (High-performance liquid chromatography, HPLC).	41
Εικόνα 2.2: Τετραπολικός αναλυτής μαζών.	43
Εικόνα 2.3: Σχηματικό διάγραμμα των τμημάτων ενός φασματομέτρου μαζών.	44
Εικόνα 2.4: Οργανολογία υγρής χρωματογραφίας (Liquid Chromatography, LC) συζευγμένη με δίδυμη φασματομετρία μάζας (Tandem Mass Spectrometry, MS/MS).	46
Εικόνα 2.5: Σήμανση αυγών και ερμηνεία του κάθε κωδικού.	49
Εικόνα 2.6: Ροή πληροφορίας στο δίκτυο προειδοποίησης (Rapid Alert System for Food and Feed, RASFF).	51
Εικόνα 2.7: Έννοια του ορίου ανίχνευσης.	54
Εικόνα 2.8: Παράμετροι Επικύρωσης Μεθόδων (Οδηγός International Committee for Harmonization, ICH).	55

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 2.1: Φαρμακολογικές δραστικές ουσίες και η ταξινόμησή τους όσον αφορά τα ανώτατα όρια καταλοίπων στα τρόφιμα ζωικής προέλευσης [Κανονισμός (Ε.Ε.) αριθ. 37/2010 Της Επιτροπής, 2009].	21
Πίνακας 2.2: Ομαδοποίηση διαφόρων αντιμικροβιακών ουσιών (Μουζούρας 1996).	32
Πίνακας 3.1: Μεταπτώσεις ιόντων της μεθόδου LC-ESI-MS/MS και ιόντα παρακολούθησης στην SIM mode.	60
Πίνακας 4.1: Χαρακτηριστικά επικύρωσης αναλυτικής μεθόδου στο γάλα.	63
Πίνακας 4.2: Αποτελέσματα αναλύσεων στο θετικό δείγμα αυγών.	64
Πίνακας 4.3: Αποτελέσματα αναλύσεων στα θετικά δείγματα γάλακτος.	64

*“Education is the most powerful weapon which you
can use to change the world”*

Nelson Mandela

Κεφάλαιο 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Στις μέρες μας, η ανάγκη της κοινωνίας και οι απαιτήσεις των καταναλωτών για ασφαλέστερα και ποιοτικότερα τρόφιμα έχουν οδηγήσει στην ανάπτυξη των βιολογικών προϊόντων, τα οποία εφαρμόζουν πρακτικές που προάγουν την ευζωία των εκτρεφόμενων ζώων και δεν επιβαρύνουν το περιβάλλον.

Ο μεγάλος αριθμός ζώων στις κτηνοτροφικές εγκαταστάσεις οδηγεί συχνότατα σε ταχεία εξάπλωση ποικίλων νόσων με αποτέλεσμα την χορήγηση φαρμακευτικών προϊόντων και ιδιαίτερα των αντιβιοτικών. Τα αντιβιοτικά, είτε ως αυξητικοί είτε ως θεραπευτικοί παράγοντες παίζουν σημαντικό ρόλο στη σύγχρονη κτηνοτροφία και η χρήση τους είναι ευρεία σε πολλές ανεπτυγμένες χώρες. Μία από τις σημαντικότερες χρήσεις των αντιβιοτικών, κατά την περίοδο εντατικοποίησης της κτηνοτροφίας μετά το 2^ο Παγκόσμιο πόλεμο, αφορούσε στην ενίσχυση της ανάπτυξης και της αποτελεσματικότητας των ζωοτροφών σε υγιή ζώα.

Η Ευρωπαϊκή Ένωση και άλλοι οργανισμοί, έχουν οριστεί μέγιστα επιτρεπόμενα όρια (Maximum Residue Limits, MRL) για την παρουσία των αντιβιοτικών στο γάλα και τα αυγά με σκοπό να εξασφαλιστεί η υγεία των καταναλωτών. Για τον αποτελεσματικό προσδιορισμό των υπολειμμάτων των αντιβιοτικών στα τρόφιμα έχουν αναπτυχθεί πολυάριθμες αναλυτικές μέθοδοι που χρησιμοποιούν τις παρακάτω τεχνικές εκχύλισης: στερεής φάσης (Solid-Phase Extraction, SPE), διασποράς στερεάς φάσης (Matrix Solid Phase Dispersion, MSPD), υγρή υπό πίεση (Pressurized Liquid Extraction, PLE) και η μέθοδος QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe - γρήγορη, εύκολη, φθηνή, αποτελεσματική, τραχύς και ασφαλής προσέγγιση. Για την απομάκρυνση (ή μείωση) των περιεχομένων λιπιδίων και πρωτεϊνών στα αυγά, από τις παραπάνω τεχνικές δεν εφαρμόζονται οι SPE και MSPD ως χρονοβόρες και ανεπαρκείς, όπως και η μέθοδος QuEChERS που δεν μπορεί να ανιχνεύσει ορισμένα αντιβιοτικά, όπως οι τετρακυκλίνες και οι κινολόνες.

Η υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης συζευγμένη με δίδυμη φασματομετρία μάζας (Liquid Chromatography tandem-Mass spectrometry, LC-MS/MS)

αποτελεί μία από τις πιο ελπιδοφόρες τεχνικές για την ανάλυση των κτηνιατρικών φαρμάκων στα αυγά λόγω της αρκετά υψηλής ευαισθησίας της. Ο τριπλός τετραπολικός αναλυτής είναι το πιο ευρέως χρησιμοποιούμενο όργανο στη σύγχρονη ανάλυση καταλοίπων καθώς επιτρέπει την ταυτόχρονη ανάλυση > 100 αναλυτών σε μικρό χρονικό διάστημα.

Σκοπός της παρούσας μεταπτυχιακής μελέτης ήταν να εξεταστεί η υπολειμματικότητα αντιβιοτικών σε προϊόντα ζωικής προέλευσης. Τα δείγματα αυγών και γάλακτος που συλλέχθηκαν από καταστήματα λιανικής πώλησης, φέρουν βιολογική αλλά και συμβατική ετικέτα. Συγκεκριμένα εξετάστηκε η υπολειμματικότητα των ακόλουθων αντιβιοτικών: Τριμεθοπρίμη (Trimethoprim), Ενροφλοξασίνη (Enrofloxacin), Οξυτετρακυκλίνη (Oxytetracycline), Τιλμικοσίνη (Tilmicosin), Φλουμεκίνη (Flumequine), Κολιστίνη (Colistin), Χλωραμφενικόλη (Chloramphenicol), Τετρακυκλίνη (Tetracycline), Σουλφαμεθαζίνη (Sulfamethazine) και Κλαριθρομυκίνη (Clarithromycin). Η παρούσα εργασία εξέτασε τόσο την παρουσία των αντιβιοτικών σε γάλα και αυγά βιολογικής και συμβατικής ετικέτας όσο και την ποσοτικοποίησή τους.

Κεφάλαιο 2. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΗ ΕΠΙΣΚΟΠΗΣΗ

2.1. ΠΡΟΪΟΝΤΑ ΖΩΙΚΗΣ ΠΡΟΕΛΕΥΣΗΣ

Η εκτροφή παραγωγικών ζώων αποτελεί μια διαχρονικά σημαντικότερη πηγή παραγωγής πολύτιμων και βιολογικά αναγκαίων τροφίμων για τον άνθρωπο. Στο πλαίσιο αυτό, ως πλέον επωφελή ζώα για τον άνθρωπο χαρακτηρίζονται τα βοοειδή, τα αιγοπρόβατα, οι χοίροι και διάφορα είδη πτηνών. Η εκτροφή τους εξυπηρετεί την παραγωγή τροφίμων υψηλής βιολογικής αξίας, όπως κρέατος, γάλακτος και αυγών (Ρογδάκης 2006).

2.2. ΓΑΛΑ

2.2.1. ΙΣΤΟΡΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

Τα πρώτα ζώα που εξημέρωσε ο άνθρωπος για να παράγει γάλα ήταν πιθανόν τα πρόβατα και οι αίγες, διαδικασία που τοποθετείται πριν από 8.000-10.000 χρόνια (Καμινारीδης & Μοάτσου 2009). Παρότι από ιστορική άποψη δεν είναι γνωστό πότε ακριβώς ο άνθρωπος χρησιμοποίησε για πρώτη φορά το γάλα των ζώων ως τροφή, εντούτοις σύμφωνα με κείμενα των Σουμερίων ως πιθανότερη χρονική περίοδος υπολογίζεται λίγο πριν το 6.000 π.Χ. (Μαντής et al. 2015).

2.2.2. ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ ΤΟΥ ΓΑΛΑΚΤΟΣ

Το γάλα σχηματίζεται στο αδενικό επιθήλιο του μαστικού αδένου. Το αίμα μεταφέρει στο μαστό τις απαραίτητες δομικές ουσίες από τις οποίες τα επιθηλιακά κύτταρα του μαστού συνθέτουν τα κυριότερα συστατικά του γάλακτος (λίπος, πρωτεΐνες, λακτόζη). Ορισμένα περνούν στο γάλα όπως υπάρχουν στο αίμα, χωρίς να υποστούν κανένα μετασχηματισμό στο μαστικό αδένου (Μαντής et al. 2015). Το γάλα προορίζεται από τη φύση να αποτελέσει τη μοναδική τροφή των νεογνών στα πρώτα στάδια της ζωής τους, καθώς είναι η πιο πλήρης απλή φυσική τροφή (Καμινारीδης & Μοάτσου 2009).

Τα κύρια συστατικά του γάλακτος είναι το νερό που βρίσκεται στη μεγαλύτερη αφθονία (87,7%), η λακτόζη που είναι ο χαρακτηριστικός υδατάνθρακας του γάλακτος (4,7%), το λίπος που αποτελείται κυρίως από τριγλυκερίδια (3,7%), οι πρωτεΐνες (80% τους αποτελεί την καζεΐνη και το υπόλοιπο 20% αποτελείται από τις του πρωτεΐνες ορού) και ανόργανα στοιχεία (0,7%) (Καμιναρίδης & Μοάτσου 2009).

Η παρουσία πολυάριθμων συστατικών με εντελώς διαφορετικές ιδιότητες που ανιχνεύονται σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις (<100 mg/kg) αποτελεί ένα από τα χαρακτηριστικά της σύστασης του γάλακτος. Η ετερογενής αυτή ομάδα συστατικών ονομάζεται «δευτερεύοντα συστατικά του γάλακτος» εξαιτίας της χαμηλής τους συγκέντρωσης, παρότι πολλά από αυτά είναι πολύ σημαντικά από διατροφική και τεχνολογική άποψη. Τα δευτερεύοντα συστατικά του γάλακτος κατηγοριοποιούνται σε: αέρια, λιπίδια, ενδογενή ένζυμα, λιποδιαλυτές και υδατοδιαλυτές βιταμίνες, μη-πρωτεϊνικές αζωτούχες ουσίες, ιχνοστοιχεία, ορμόνες-αυξητικοί παράγοντες, μικροοργανισμοί και σωματικά κύτταρα (Καμιναρίδης & Μοάτσου 2009).

2.2.3. ΟΡΙΣΜΟΙ ΤΟΥ ΓΑΛΑΚΤΟΣ

Σύμφωνα με τον Codex Alimentarius του FAO (Food and Agricultural Organization of the United Nations), ως γάλα ορίζεται η φυσιολογική έκκριση του μαστού που λαμβάνεται από μία ή περισσότερες αμέλξεις χωρίς καμία προσθήκη ή αφαίρεση, η οποία προορίζεται να καταναλωθεί ως πόσιμο γάλα ή για περαιτέρω επεξεργασία.

Σύμφωνα με τον ελληνικό Κώδικα Τροφίμων και Ποτών (2003), γάλα είναι το απαλλαγμένο από πρωτόγαλα προϊόν της ολοσχερούς, χωρίς διακοπή άμελης υγιούς γαλακτοφόρου ζώου, που ζει και τρέφεται υπό υγιεινούς όρους και που δεν βρίσκεται σε κατάσταση υπερκόπωσης. Ως «γάλα», χωρίς κάποιο επίθετο, εννοείται το προϊόν γάλα που:

- προέρχεται από αγελάδα
- είναι νωπό
- είναι πλήρες
- δεν έχει υποστεί αφυδάτωση ή συμπύκνωση

- δεν περιέχει άλλες πρόσθετες ύλες

2.2.4. ΕΙΔΗ ΤΟΥ ΓΑΛΑΚΤΟΣ

Το είδος του γάλακτος που έχει μελετηθεί περισσότερο είναι το αγελαδινό, διότι παράγεται σε μεγάλες ποσότητες, κατά κύριο λόγο σε χώρες οικονομικά και τεχνολογικά προηγμένες (Καμιναρίδης & Μοάτσου 2009). Αντίθετα, η παραγωγή του αιγείου γάλακτος προορίζεται παραδοσιακά για την παρασκευή τυροκομικών προϊόντων. Συχνά η παραγωγή των τυροκομικών προϊόντων γίνεται στο επίπεδο της γεωργικής εκμετάλλευσης ή σε γαλακτοκομεία μικρής κλίμακας, χρησιμοποιώντας συχνά νωπό γάλα. Με δεδομένη τη ζωτική σημασία που παίζει η υγιεινή και υψηλή ποιότητα σε όλα τα είδη γάλακτος και για να εξασφαλιστεί η ποιότητα και η ασφάλεια του γάλακτος, είναι απαραίτητο να εφαρμόζονται καλές πρακτικές καθαρισμού–απολύμανσης και να ελαχιστοποιείται η πιθανότητα παρουσίας υπολειμμάτων των απολυμαντικών στον εξοπλισμό του αρμέγματος. (Romero et al. 2017).

Στην Ευρώπη, το επίκεντρο παραγωγής του αιγείου γάλακτος (2.536.773 τόνοι) (FAOSTAT 2012) είναι κυρίως η λεκάνη της Μεσογείου, στην οποία διαδραματίζει σημαντικό οικονομικό, περιβαλλοντικό και κοινωνικό ρόλο, ιδιαίτερα σε χώρες όπως η Γαλλία, η Ιταλία, η Ισπανία και η Ελλάδα (Dubeuf & Le Jaouen 2005). Στις περισσότερες από αυτές, παρά την εντατικοποίηση του τομέα που παρατηρείται τα τελευταία χρόνια, το παραδοσιακό σύστημα (εκτατικό ή ημιεντατικό) εξακολουθεί να εφαρμόζεται ευρύτατα από μικρές γεωργικές εκμεταλλεύσεις, με παραδοσιακή τεχνολογία, χρήση τοπικών φυλών, περιορισμένους οικονομικούς και ανθρώπινους πόρους και αγρότες με σχετικά μικρή κατάρτιση (Dubeuf et al. 2010).

2.2.5. ΒΙΟΛΟΓΙΚΑ ΠΡΟΪΟΝΤΑ

Μια μεγάλη ποικιλία ετικετών που προσδιορίζουν/πιστοποιούν την ποιότητα του περιεχομένου είναι σήμερα διαθέσιμη για την προστασία και την αξιοπιστία των ειδικών προϊόντων διατροφής καθώς και για τη προστασία των καταναλωτών από ψευδείς ισχυρισμούς. Ένα τέτοιο παράδειγμα είναι η βιολογική ετικέτα. Σύμφωνα με τα ευρωπαϊκά πρότυπα για τη βιολογική γεωργία, τα ζώα θα πρέπει να έχουν επαρκή πρόσβαση σε μια υπαίθρια

περιοχή όταν το επιτρέπουν οι καιρικές συνθήκες. Παράλληλα, η διατροφή τους θα πρέπει να αποτελείται σε καθημερινή βάση από τουλάχιστον 60% χονδροειδείς ζωτροφές. Επιπλέον, απαγορεύεται η χρήση αντιβιοτικών, συνθετικών αυξητικών ορμονών, γενετικώς τροποποιημένων οργανισμών και ζωοτροφών που έχουν παραχθεί με συνθετικά λιπάσματα (Caruano et al. 2015).

Ο Οργανισμός Τροφίμων και Γεωργίας των Ηνωμένων Εθνών (Food and Agricultural Organisation, FAO 1999) ορίζει το «βιολογικό» ως μία διαδικασία κατά την οποία εγκρίνονται οι φυσικές ενέργειες και απαγορεύονται οι χημικές ενέργειες. Οι βιολογικές γεωργικές πρακτικές στοχεύουν στην ενίσχυση της βιοποικιλότητας και της βιολογικής δραστηριότητας του εδάφους, έτσι ώστε να επιτευχθούν τα βέλτιστα φυσικά συστήματα και να είναι βιώσιμα από κοινωνικής, οικολογικής και οικονομικής άποψης.

Τα συστήματα βιολογικής παραγωγής γίνονται όλο και περισσότερο δημοφιλή και εκτιμάται ότι η βιολογική γεωργία εφαρμόζεται σε 31 εκατομμύρια εκτάρια σε 120 χώρες (Yussefi, 2006). Οι καταναλωτές εκτιμούν τα βιολογικά προϊόντα και τα συνδέουν τόσο με την υγεία τους (Zanoli & Naspetti 2002; Zhao et al. 2007) όσο και με τα περιβαλλοντικά οφέλη (Zhao et al. 2007). Παρόλο που τα διαθέσιμα στοιχεία σχετικά με τις περιβαλλοντικές επιπτώσεις των διαφόρων γεωργικών μεθόδων βρίσκονται ακόμη σε αρχικό στάδιο, εκτιμάται ότι τα βιολογικά συστήματα χρησιμοποιούν μεθόδους που απαιτούν μικρότερη ενέργεια από ότι τα συμβατικά και συνεπώς συμβάλλουν στην μείωση των εκπομπών αερίων του θερμοκηπίου και έχουν μεγαλύτερες δυνατότητες για τη δέσμευση άνθρακα (Ziesemer, 2007).

2.2.5.1. ΤΟ ΠΑΡΑΔΕΙΓΜΑ «WEIDEMELK» ΤΗΣ ΟΛΛΑΝΔΙΑΣ

Ένα άλλο παράδειγμα πιστοποίησης της ποιότητας αποτελεί η ετικέτα "weidemelk", η οποία εφαρμόστηκε στην Ολλανδία πριν από λίγα χρόνια. Η ετικέτα "weidemelk" υποδηλώνει ότι οι αγελάδες πρέπει να βρίσκονται σε βοσκότοπους τουλάχιστον 120 ημέρες ετησίως, χωρίς να είναι διαδοχικές ημέρες (από τον Απρίλιο έως τον Οκτώβριο), για τουλάχιστον 6 ώρες την ημέρα. Οι ετικέτες ποιότητας για τα βιολογικά και «weidemelk» προϊόντα συμβάλλουν στην καλή διαβίωση των ζώων. Επίσης, συμβάλλουν στη

διατήρηση του παραδοσιακού τοπίου και περιορίζουν τις περιβαλλοντικές επιπτώσεις της γαλακτοπαραγωγής, καθώς βασίζονται σε τοπικούς πόρους για τη διατροφή των αγελάδων και για τη λίπανση του εδάφους (Caruano et al. 2015).

Έτσι, οι καταναλωτές συμπεραίνουν ότι για την παραγωγή του γάλακτος που επισημαίνεται με τις ετικέτες βιολογικό και "weidemelk", έχουν εφαρμοστεί πρακτικές φιλικές στο περιβάλλον και τα ζώα, ενώ αναμένουν ότι το γάλα αυτό θα έχει και μεγαλύτερη διατροφική αξία. Σύμφωνα με ποικίλες μελέτες, η υγεία του καταναλωτή είναι ισχυρότερο κίνητρο για την επιλογή βιολογικών γαλακτοκομικών προϊόντων από ότι είναι η πιο σωστή μεταχείριση των ζώων και οι ορθές περιβαλλοντικές τεχνικές (Bourne & Prescott 2002; Hermansen 2003).

2.2.6. ΟΦΕΛΗ ΣΤΗΝ ΥΓΕΙΑ ΤΩΝ ΚΑΤΑΝΑΛΩΤΩΝ

Η διατροφή των βοοειδών που βασίζεται στους βοσκότοπους βελτιώνει τη διατροφική ποιότητα του γάλακτος και των γαλακτοκομικών προϊόντων και κατ'επέκταση συμβάλλει στην καλύτερη υγεία των καταναλωτών. Για παράδειγμα, η περιεκτικότητα του γάλακτος σε β-καροτένιο, καροτενοειδή, βιταμίνη Α και τοκοφερόλες αυξάνεται όταν η φρέσκια νομή συμπεριλαμβάνεται στη διατροφή των αγελάδων (Noziere et al. 2006). Επίσης, η αυξημένη ποσότητα φρέσκιας νομής στη διατροφή των αγελάδων αλλάζει και το προφίλ των λιπαρών οξέων (Caruano, van der Veer, et al. 2014; Elgersma et al. 2004) και των τριγλυκεριδίων (TAG) (Caruano, Boerrigter-Eenling, R. Elgersma, et al. 2014). Έτσι, ευνοείται η υγεία του καταναλωτή λόγω της αύξησης της σχετικής ποσότητας των ωφέλιμων λιπαρών οξέων, όπως το α-λινολενικό οξύ (ALA) και των συζευγμένων λινολεϊκών οξέων (CLA, ειδικότερα το ισομερές cis-9, trans-11C18: 2 (Elgersma et al. 2008) καθώς και της μείωσης της συνολικής ποσότητας των επιβλαβών λιπαρών οξέων. Έχει αποδειχθεί ότι το βιολογικό γάλα παρουσιάζει υψηλότερη συγκέντρωση σε ALA, ολικά λιπαρά οξέα n3, cis-9, trans-11 CLA, vaccenic οξύ, εικοσαπεντανοϊκό οξύ (EPA) και docosapentanoic acid (DPA) σε σύγκριση με το συμβατικό γάλα (Palupi et al. 2012).

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα μιας πρόσφατης έρευνας, το προφίλ των λιπαρών οξέων του παστεριωμένου βιολογικού γάλακτος HTST (παστερίωση High Temperature Short Time) που παράγεται στην Ολλανδία διαφέρει σημαντικά στο προφίλ των λιπαρών οξέων του γάλακτος χωρίς ειδική ετικέτα. Επίσης, το προφίλ των λιπαρών οξέων του βιολογικού γάλακτος HTST μπορεί να θεωρηθεί πιο ευεργετικό και επιθυμητό από τους καταναλωτές. (Caruano et al. 2015).

Το γάλα με την ετικέτα "weidemelk" δεν παρουσιάζει σημαντικές ιδιότητες, παρά το γεγονός ότι το γάλα "weidemelk" παράγεται από αγελάδες που τρέφονται σε βοσκότοπους (τουλάχιστον ένα μέρος του χρόνου) και έχει προηγουμένως αποδειχθεί ότι η διατροφή σε βοσκότοπους επηρεάζει σημαντικά το προφίλ των λιπαρών οξέων (Caruano, Boerrigter-Eenling, R. Elgersma, et al. 2014). Πολλοί λόγοι μπορούν να εξηγήσουν την ομοιότητα στο προφίλ των τριγλυκεριδίων και των λιπαρών οξέων του συμβατικού και του "weidemelk" γάλακτος. Σύμφωνα με τον κανονισμό για την απόκτηση της ετικέτας "weidemelk", απαιτούνται 6 ώρες την ημέρα για τουλάχιστον 120 μη διαδοχικές ημέρες ανά έτος παραμονή των αγελάδων στους βοσκότοπους. Αυτό όμως δεν επηρεάζει σημαντικά τη σύνθεση του λίπους του γάλακτος. Οι αγελάδες μπορούν να τρέφονται με φρέσκο χορτάρι σε εσωτερικούς χώρους, με αποτέλεσμα τη μείωση της διαφοράς στη σύνθεση των τριγλυκεριδίων και των λιπαρών οξέων μεταξύ του γάλακτος από τις αγελάδες που τρέφονται σε βοσκότοπους και από αγελάδες που δεν τρέφονται αποκλειστικά σε βοσκότοπους (Caruano et al. 2015).

2.3. ΑΥΓΟ

2.3.1. ΙΣΤΟΡΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

Η όρνιθα κατοικιδιοποιήθηκε πριν από 4.500 χιλιάδες χρόνια στη Νότια Κίνα, ενώ η κατοικίδια γαλαπούλα υπήρχε ήδη στην Αμερική κατά την εποχή των Ισπανών κατακτητών. Η κατοικίδια χήνα θεωρείται ως το παλαιότερο κατοικίδιο πτηνό (Ρογδάκης 2006). Ο σκοπός της εκτροφής των ορνίθων είναι η παραγωγή βρώσιμων αυγών και κρέατος. Για την παραγωγή βρώσιμων αυγών εκτρέφονται σμήνη αυγοπαραγωγών ορνίθων, που είναι προϊόντα

συστηματικής γενετικής επιλογής και διασταυρώσεων, με ικανότητα παραγωγής μεγάλου αριθμού αυγών. Οι όρνιθες είναι μικρού σωματικού βάρους (1,7-2,0 kg) και ανήκουν στον λευκό και καστανό τύπο. Για την παραγωγή κρέατος εκτρέφονται τα παχυνόμενα ορνίθια κρεατοπαραγωγής (Ζέρβας et al. 2004).

2.3.2. ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ ΤΩΝ ΑΥΓΩΝ

Στο εσωτερικό των αυγών διακρίνονται 3 κύρια μέρη με διατροφική αξία για τον άνθρωπο:

- Η λέκιθος (κρόκος), η οποία περιέχει μεγάλο μέρος των θρεπτικών ουσιών και είναι μία πορτοκαλοκίτρινη ημίρρευστη σφαίρα.
- Το λεύκωμα (ασπράδι), το οποίο είναι ένα παχύρρευστο διαφανές υγρό που αποτελείται κυρίως από την πρωτεΐνη αλβουμίνη.
- Η χάλαζα, που είναι ένα σύμπλεγμα συστατικών του ασπραδιού και συγκρατεί τον κρόκο στο κεντρικό σημείο του αβγού.

Σύνθεση του λευκώματος (ασπράδι):

- Νερό 85-90%
- Πρωτεΐνες 12%
- Λίπος 0,25%
- Τέφρα 0,6%
- Υδατάνθρακες (κυρίως λακτόζη) 0,7%
- Μικρές ποσότητες λεκιθίνης, χοληστερόλης, βιταμινών Β και ενζύμων

Συστατικά της λεκίθου (κρόκος):

- Νερό 45-51%
- Πρωτεΐνες 16-17%
- Λίπος 31-36%
- Τέφρα 1,3%
- Υδατάνθρακες 0,2-1,1%

Η εξωτερική επικάλυψη των αυγών είναι το κέλυφος το οποίο αποτελείται από ανθρακικό ασβέστιο (www.eufic.org).

2.3.3. ΚΑΝΟΝΙΣΜΟΙ ΓΙΑ ΤΑ ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ ΩΟΠΑΡΑΓΩΓΗΣ

Οι πλέον πρόσφατες νομοθετικές συμπληρωματικές διατάξεις της Ευρωπαϊκής Ένωσης (Ε.Ε.) σχετικά με την εμπορική παραγωγή αυγών υπογραμμίζουν τη σημασία των συστημάτων στέγασης. Η εισαγωγή της οδηγίας 1999/74/CE (EU, 1999a) του Ευρωπαϊκού Συμβουλίου καθόρισε τα ελάχιστα πρότυπα για την προστασία των ορνίθων ωοπαραγωγής σε κλουβιά, σε αχυρώνα και σε συστήματα ελεύθερης βοσκής. Ο κανονισμός (ΕΚ) 889/2008 περιγράφει τους κανόνες παραγωγής, συντήρησης, μεταποίησης, συσκευασίας, μεταφοράς και αποθήκευσης των βιολογικών προϊόντων. Ο κανονισμός 2295/2003 (EU, 2003) ορίζει ότι το σύστημα στέγασης πρέπει να αναγράφεται στη συσκευασία και στο κέλυφος αυγών. Οι κωδικοί που πρέπει χρησιμοποιούνται είναι: 0 για αυγά βιολογικής παραγωγής, 1 για αυγά ελεύθερης βοσκής, 2 για αυγά αχυρώνα και 3 για αυγά κλωβοστοιχίας (Hidalgo et al. 2008).

Τα αυγά που θεωρούνται κατάλληλα προς κατανάλωση προέρχονται από όρνιθες στους αποκαλούμενους εμπλουτισμένους κλωβούς (ΕΕ, 1999a), δηλαδή διαθέτουν τουλάχιστον 750 cm² χώρο. Ένα μεγάλο φάσμα προϊόντων αυγών βρίσκονται στη διάθεση των καταναλωτών σε πολύ διαφορετικές τιμές, αλλά χωρίς ταυτόχρονα να υπάρχει πραγματική πληροφόρηση σχετικά με τις συγκεκριμένες ιδιότητες των βιολογικών αυγών έναντι των αυγών κλωβοστοιχίας (Hidalgo et al. 2008).

2.3.4. ΒΙΟΛΟΓΙΚΑ ΑΥΓΑ

Το σύστημα παραγωγής των βιολογικών αυγών βασίζεται σε συγκεκριμένα πρότυπα παραγωγής. Τα βιολογικά αυγά μπορούν να οριστούν ως προϊόντα ενός συστήματος εκτροφής, στην οποία απαγορεύονται οι συμβατικά καλλιεργούμενες ζωτροφές, συμπεριλαμβανομένων των γενετικώς τροποποιημένων οργανισμών, των ζωικών υποπροϊόντων και των συνθετικών πρόσθετων, ενώ χρησιμοποιούνται μόνο δημητριακά, ελαιόλαδο, σπόροι και ακατέργαστες ζωτροφές. Στην βιολογική εκτροφή τα κοτόπουλα έχουν ελεύθερη πρόσβαση σε υπαίθριους χώρους και η εκτροφή είναι

χαμηλότερης έντασης (Hermansen 2003; Sundrum 2001; Van De Weerd et al. 2009).

2.3.4.1. ΑΝΤΙΛΗΨΕΙΣ ΤΩΝ ΚΑΤΑΝΑΛΩΤΩΝ

Υπάρχουν διάφοροι παράγοντες που επηρεάζουν την αγορά και τη κατανάλωση των βιολογικών αυγών. Πολλοί καταναλωτές πιστεύουν ότι τα αυγά που προέρχονται από βιολογικές εκμεταλλεύσεις έχουν καλύτερη γεύση και μεγαλύτερη διατροφική αξία (Kouba 2003). Ως εκ τούτου, οι καταναλωτές αναμένουν υψηλότερη τιμή στα βιολογικά αυγά σε σχέση με τα συμβατικά αυγά (Küükyilmaz et al. 2012).

Από την πλευρά του καταναλωτή, εκτός από τα ψυχολογικά και δεοντολογικά κίνητρα, δεν δικαιολογούνται οι υψηλότερες τιμές των βιολογικών αυγών. Η μέση τιμή σε ευρώ είναι $0,17 \pm 0,06$ €/αυγό για τα αυγά κλωβοστοιχίας, $0,22 \pm 0,03$ €/αυγό (+ 38%) για αυγά αχυρώνα, $0,27 \pm 0,03$ €/αυγό (+59%) για αυγά ελευθέρας βοσκής και $0,33 \pm 0,03$ €/αυγό (+ 95%) για αυγά βιολογικής παραγωγής (Hidalgo et al. 2008).

2.3.4.2. ΘΡΕΠΤΙΚΗ ΣΥΝΘΕΣΗ ΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΑΥΓΩΝ

Ποικίλες μελέτες έχουν αξιολογήσει την επίδραση των συστημάτων στέγασης στα χαρακτηριστικά του κελύφους των αυγών (Van Den Brand, H. Parmentier & Kemp 2004). Ωστόσο, διάφορες πρακτικές που δεν σχετίζονται άμεσα με το σύστημα στέγασης, όπως η διανομή και η πώληση, διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην ποιότητα των αυγών. Τα συστήματα στέγασης στις ΗΠΑ διαφέρουν σημαντικά από αυτά της Ευρώπης. Ο Cherian και συνεργάτες συνέκριναν τη σύσταση των συμβατικών και των βιολογικών αυγών σε λιπαρά οξέα και δεν εντόπισαν σαφή επίδραση του συστήματος στέγασης σε σχέση με τη σύνθεση των λιπαρών οξέων (Cherian et al. 2002).

Μία μελέτη σχετικά με την ποιότητα των αυγών που οι καταναλωτές προμηθεύονται από τα καταστήματα (Patterson et al. 2001) έδειξε ότι τα βιολογικά αυγά (εμπλουτισμένα διατροφικά αυγά, βιολογικά αυγά, γόνιμα αυγά, αυγά από όρνιθες με καλή διαβίωση, αυγά από όρνιθες που τρέφονταν με συγκεκριμένη διατροφή) ήταν κατά μέσον όρο παλαιότερα, με βάση την ημερομηνία συσκευασίας και χαμηλότερο ύψος λευκώματος, με χαμηλότερες τιμές μονάδας Haugh (HU) και υψηλότερη αναλογία <55 HU αυγών. Η μονάδα

Haugh είναι ένα μέτρο ποιότητας της πρωτεΐνης του αυγού με βάση το ύψος του λευκώματος του αυγού (Monira et al. 2003). Επίσης, διαφοροποιείται η σύνθεση της ξανθοφύλλης στα βιολογικά αυγά σε σύγκριση με τα αυγά ελεύθερης βοσκής, αχυρώνα και κλωβοστοιχίας (Schlatterer & Breithaupt 2006).

Παρόλο που οι διαφορές στη θρεπτική σύνθεση των βιολογικών και συμβατικών προϊόντων είναι μικρές, τα βιολογικά προϊόντα φυτικής προέλευσης έχουν χαμηλότερη περιεκτικότητα σε νιτρικό άλας και υψηλότερη περιεκτικότητα σε βιταμίνη C από ότι τα αντίστοιχα συμβατικά (Williams 2002; Worthington 2001).

Τα βιολογικά αυγά αναμένεται να έχουν υψηλότερη θρεπτική αξία από τα συμβατικά αυγά λόγω της ελεύθερης πρόσβασης των κοτόπουλων στην ύπαιθρο και της κατανάλωσης βιολογικών ζωοτροφών (Cerolini et al. 2005). Ωστόσο, τα δεδομένα σχετικά με τα επίπεδα μακρο-και μικροοργανισμών στα αυγά από συστήματα βιολογικής εκτροφής είναι πολύ περιορισμένα. Δύο μελέτες έδειξαν ότι τα βιολογικά συστήματα μπορούν να επηρεάσουν τη σύσταση των αυγών (Giannenas et al. 2009; Matt et al. 2009).

Τα αποτελέσματα του Küükyilmaz και συνεργατών δείχνουν ότι το σύστημα εκτροφής μπορεί να επηρεάσει τη σύνθεση των αυγών σε μικροοργανισμούς και ιχνοστοιχεία. Η ανεπάρκεια των συγκεντρώσεων μακρο- και (ιχνο-) στοιχείων (P και Zn) στα αυγά από σύστημα βιολογικής εκτροφής μπορεί να έχει αρνητικές συνέπειες τόσο στη διατροφή των πουλερικών όσο και στην ανθρώπινη διατροφή. Σύμφωνα με αυτή την μελέτη υπάρχουν σημαντικές διαφορές στις αντίστοιχες συγκεντρώσεις στοιχείων μεταξύ των αυγών που προέρχονται από συμβατικές και βιολογικές εκτροφές (Küükyilmaz et al. 2012).

Το ενδιαφέρον των ερευνητών έχει κεντρίσει και η επίδραση των γεωργικών μεθόδων στη σύνθεση λιπαρών οξέων των τροφίμων ζωικής προέλευσης. Το γάλα που παράγεται μέσω βιολογικών πρακτικών έχει αποδειχθεί ότι έχει υψηλότερες ποσότητες πολυαποικοδομημένων λιπών (Bergamo et al. 2003; Ellis et al. 2006; Jahreis et al. 1996) και μικρότερη αναλογία ω-6 : ω-3 λιπαρών οξέων από το συμβατικό γάλα (Ellis et al. 2006; Wong et al. 2006),

ενώ άλλες μελέτες δεν αναφέρουν σαφή επίδραση στη σύνθεση λιπαρών οξέων γάλακτος (Ellis et al. 2006; Toledo et al. 2002). Τα βιολογικά αυγά έχουν παρόμοια (Cherian et al. 2002) ή υψηλότερα (Hidalgo et al. 2008) επίπεδα κορεσμένων λιπαρών οξέων σε σύγκριση με τα αυγά άλλων παραγωγικών συστημάτων.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα μελέτης, η κατανάλωση ενός αυγού ανά ημέρα δεν αυξάνει τον κίνδυνο εμφάνισης καρδιαγγειακής νόσου (Kritchevsky, S. B. Kritchevsky 2000). Οι προτιμήσεις των καταναλωτών για ορισμένα τρόφιμα που προέρχονται από συγκεκριμένα συστήματα παραγωγής είναι πιθανόν να επηρεάζονται από παράγοντες που σχετίζονται με το πειβάλλον (Shepherd et al. 2005; Zhao et al. 2007), την υγεία (Zanoli & Naspetti 2002; Zhao et al. 2007) ή/και συμβουλές γιατρών και διαιτολόγων (Ojha et al. 2007). Η κατανάλωση αυγών που εμπεριέχουν λιπαρά ωμέγα-3 είναι πιθανό να συμβάλει σημαντικά στη συνιστώμενη πρόσληψη πολυακόρεστων λιπαρών οξέων (Nutrient Reference Values for Australia and New Zealand, 2006). Ωστόσο, οι μικρές διαφορές στα λιπαρά οξέα που παρατηρήθηκαν μεταξύ των βιολογικών και των συμβατικών αυγών είναι απίθανο να έχουν σημαντικό μεταβολικό αποτέλεσμα στον καταναλωτή (Samman et al. 2009).

2.4. ΠΟΙΟΤΙΚΑ ΠΡΟΪΟΝΤΑ

Οι παράμετροι παραγωγής των ζωικών προϊόντων, όπως για παράδειγμα το είδος του εκτρεφόμενου ζώου, ο χώρος και οι συνθήκες εκτροφής του, καθώς και η διατροφή του, ελέγχονται και καθορίζονται από τον άνθρωπο στις αναπτυγμένες χώρες. Τον κύριο στόχο του περασμένου αιώνα αποτέλεσε η αύξηση παραγωγής ζωικών προϊόντων μέσω της γενετικής βελτίωσης των ζώων καθώς και η προαγωγή της επιστήμης της διατροφής. Όμως δεν δόθηκε η απαιτούμενη προσοχή στις ενδεχόμενες επιπτώσεις στο περιβάλλον. Σαν αποτέλεσμα παρατηρήθηκε αύξηση της παραγωγής μέσω της μαζικής εκτροφής, όλο και περισσότερων γενετικά εξελιγμένων παραγωγικών ζώων, σε πυκνότητες και σε χώρους που στις περισσότερες περιπτώσεις οδηγούσαν σε υπέρμετρη καταπόνηση των ζώων και σε μαζική απόρριψη ρύπων στο περιβάλλον, που ταυτόχρονα οδηγούσαν και σε σταδιακή υποβάθμισή του. Για να πραγματοποιηθεί η μεγιστοποίηση της παραγωγής, χρησιμοποιήθηκαν

διάφορα πρόσθετα ζωοτροφών, τα οποία ωστόσο αποδείχτηκε ότι είχαν αρνητικές επιπτώσεις τόσο στην υγεία των ζώων όσο και στη υγεία των καταναλωτών των ζωικών προϊόντων (π.χ. χρήση αντιβιοτικών ως αυξητικοί παράγοντες) (Φεγγερός 2008).

Εξαιτίας διαφόρων διατροφικών ατυχημάτων και των διαπιστωμένων κινδύνων που διατρέχει το περιβάλλον γενικότερα, έχει μεγιστοποιηθεί το ενδιαφέρον της κοινωνίας για την παραγωγή προϊόντων ζωικής προέλευσης υψηλής διατροφικής αξίας, ασφαλών και υγιεινών, με διαδικασίες παραγωγής που θα σέβονται τους κανόνες ευζωίας και προστασίας του περιβάλλοντος. Με δεδομένα α) το γενετικό δυναμικό του εκτρεφόμενου ζώου, β) την εξασφάλιση του πλέον κατάλληλου χώρου και των ενδεδωγμένων συνθηκών εκτροφής του και, γ) τις συνθήκες υγιεινής αυτού του χώρου, η ευζωία και η ποσοτική αλλά και ποιοτική παραγωγή των ζωικών προϊόντων εξαρτάται σχεδόν αποκλειστικά από την εκάστοτε εφαρμοζόμενη διατροφή (Φεγγερός 2008).

Ο χαρακτηρισμός των προϊόντων ως ποιοτικά περιέχει ένα ευρύ φάσμα χαρακτηριστικών που διαφοροποιείται ανάλογα με την θέση του εκτιμητή. Για παράδειγμα, ο έμπορος εκτιμά διαφορετικά την ποιότητα του κρέατος σε σχέση με τον μεταποιητή και σε σχέση με τον καταναλωτή. Ο όρος ποιοτικά προϊόντα χρησιμοποιείται σήμερα από τους καταναλωτές και αφορά στοιχεία του ζωικού προϊόντος σχετικά με τον τρόπο εκτροφής του ζώου, την προέλευση του προϊόντος, την ευζωία των ζώων, τη συμβολή σε ένα υγιεινό πρότυπο διατροφής των καταναλωτών και την προσαρμογή σε δεδομένο πρότυπο διαβίωσης των ζώων (Χατζηγεωργίου 2008).

2.5. ΤΑ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ

2.5.1. Η ΧΡΗΣΗ ΤΩΝ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΩΝ ΣΕ ΓΕΩΡΓΙΑ ΚΑΙ ΚΤΗΝΟΤΡΟΦΙΑ

Η χρήση κτηνιατρικών φαρμάκων είναι απαραίτητη για την αναπτυσσόμενη βιομηχανία που σχετίζεται με τη διατροφή των ζώων. Για παράδειγμα, στις Ηνωμένες Πολιτείες υπάρχουν περίπου 104-110 εκατομμύρια βοοειδή, 7.5-

8.6 δισεκατομμύρια κοτόπουλα, 60-92 εκατομμύρια χοίροι και 275-292 εκατομμύρια γαλοπούλες (AHI, 2002, NASS, 2002). Ο αριθμός των ζωοτροφών (animal-feeding operations, AFOs) σε χοίρους, πουλερικά και βοοειδή αυξήθηκε σημαντικά κατά τη διάρκεια της δεκαετίας του 1990 (USEPA, 2001). Για να διατηρήσουν την οικονομική τους βιωσιμότητα, οι μεγάλες αγροτικές επιχειρήσεις έχουν αρχίσει να συνάπτουν συμβάσεις με μεμονωμένους αγρότες. Η πρακτική αυτή προσέφει εγγυημένη τιμή στον αγρότη και ένα ελεγχόμενο και σταθερό περιβάλλον παραγωγής τροφίμων για τη γεωργία. Η στενή εγγύτητα του μεγάλου αριθμού ζώων στις εγκαταστάσεις αυτές και η δυνατότητα ταχείας εξάπλωσης των ζωνόσων έχει καταστήσει ως συνήθη πρακτική τη χρήση των φαρμακευτικών προϊόντων και ιδιαίτερα των αντιβιοτικών (Sarmah et al. 2006).

Αναλυτικότερα, τα κτηνιατρικά φάρμακα χρησιμοποιούνται ευρέως για τις θεραπείες των μολύνσεων (π.χ. μαστίτιδα) αλλά και ως μέσο πρόληψης ασθενειών στις αγελάδες. Επιπλέον, οι χημικές αυτές ουσίες έχουν χρησιμοποιηθεί ως πρόσθετα σε ζωοτροφές για τη βελτίωση της αποδοτικότητας της τροφής. Σύμφωνα με τον Codex Alimentarius CAC / MISC 5-1993, ως κτηνιατρικό φάρμακο ορίζεται «κάθε ουσία που εφαρμόζεται ή χορηγείται σε οποιοδήποτε ζώο που παράγει τρόφιμα, όπως ζώα που παράγουν κρέας ή γάλα, πουλερικά, ψάρια ή μέλισσες, είτε για θεραπευτικούς, προληπτικούς, διαγνωστικούς σκοπούς είτε για τροποποίηση των φυσιολογικών λειτουργιών και της συμπεριφοράς». Τα κτηνιατρικά φάρμακα διακρίνονται σε έξι ευρείες κατηγορίες: τα αντιμικροβιακά (αντιβιοτικά), τα αντιπαρασιτικά, τα αντιφλεγμονώδη, τα ηρεμιστικά, τα φάρμακα με αυξητική επίδραση και άλλα. Τα αντιβιοτικά είναι ανασταλτικές ουσίες που σκοτώνουν ή επιβραδύνουν την ανάπτυξη τόσο των βακτηρίων όσο και των μικροβιακών παρασίτων και αντιπροσωπεύουν τη μεγαλύτερη ομάδα κτηνιατρικών φαρμάκων (Bion et al. 2016).

Θα πρέπει να επισημανθεί ότι ένα ευρύ φάσμα κτηνιατρικών φαρμάκων και πρόσθετων ζωοτροφών έχει εγκριθεί προς χρήση στη γεωργία και στην κτηνοτροφία (Bloom, 2004). Αυτά είναι δυνατόν να κατηγοριοποιηθούν σε: αναισθητικά, αντιόξινα, αντιελμινθικά, αντιπαρασιτικά, αντιμολυσματικά, στεροειδή και μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη, αντιβακτηριακά, αντιμικροβιακά,

αντιπαρασιτικά, αντισηπτικά, γαλακτωματοποιητής, συγχρονισμός οίστρου, προαγωγή ανάπτυξης, θρεπτικά συμπληρώματα, καταπραϋντικά, ηρεμιστικά. Τα φάρμακα χορηγούνται στα ζώα μέσω της τροφής ή του νερού, με ένεση, εμφύτευση, διαβροχή, έκχυση, χορήγηση από το στόμα, κατάποση βώλου και τοπικά. Η χρήση και η διάρκεια της θεραπείας καθώς και εάν το φάρμακο χορηγείται σε ένα μεμονωμένο ζώο, ή σε ολόκληρο το κοπάδι, καθορίζουν, εν μέρει, τον τρόπο με τον οποίο χορηγείται ένα συγκεκριμένο φάρμακο. Ορισμένες από τις σημαντικότερες χρήσεις των κτηνιατρικών φαρμάκων είναι: η αντιμετώπιση και πρόληψη λοιμωδών νοσημάτων (π.χ. Τετρακυκλίνη, αντιβιοτικά β-λακταμών και αντιφλεγμονώδη στεροειδή), η διαχείριση αναπαραγωγής (π.χ. στεροειδή, οξυτοκίνη, εργονοβίνη, GnRH, HCG και προσταγλανδίνες, προγεστερόνη και FSH), η παραγωγή (π.χ. βόεια σωματοτροπίνη, εμφυτεύματα ορμονικής ανάπτυξης, ιονοφόρα, υποθεραπευτικά αντιβιοτικά), ο έλεγχος των παρασίτων (π.χ. παρασιτοκτόνα, εντομοκτόνα) και ο έλεγχος μη μολυσματικών ασθενειών (π.χ. συμπληρώματα διατροφής, Rice and Straw, 1996).

2.5.2. ΤΑ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ ΣΤΗΝ ΚΤΗΝΟΤΡΟΦΙΑ

Τα αντιβιοτικά είναι αντιβακτηριδιακά φάρμακα που χρησιμοποιούνται σε ανθρώπους και ζώα για να θεραπεύσουν ασθένειες από μικροβιακή μόλυνση ή ως πρόσθετα στην τροφή των ζώων με σκοπό τη βελτίωση της παραγωγικότητάς τους (Wang et al. 2017). Όμως στις χώρες της Ε.Ε. έχει απαγορευτεί η χρήση αντιμικροβιακών φαρμάκων ως αυξητικοί παράγοντες (Κανονισμός Ε.Κ. αριθμ. 1831/2003). Η ποσότητα των παρασκευασμένων αντιβιοτικών στην Κίνα αυξάνεται τα τελευταία χρόνια. Περίπου 18.100 τόνοι αντιβιοτικών εφαρμόστηκαν στην εκτροφή πτηνών το 2013, που αποτελεί πάνω από το 10% της συνολικής χρήσης των αντιβιοτικών (Wang et al. 2017).

Από τα φάρμακα που εγκρίθηκαν για τη γεωργία, τα αντιβιοτικά είναι τα περισσότερο διαδεδομένα για την υγεία και τη διαχείριση των ζώων. Ο όρος «αντιβιοτικό» συνήθως αναφέρεται σε ένα ευρύ φάσμα ενώσεων, τόσο φυσικών όσο και ημι-συνθετικών, που διαθέτουν αντιβακτηριακή δράση (Kanfer et al. 1998). Από την τυχαία ανακάλυψη της πενικιλίνης από τον

Alexander Fleming το 1928, εκατοντάδες άλλα αντιβιοτικά εμφανίστηκαν στην αγορά και είναι διαθέσιμα για χορήγηση σε ανθρώπους και ζώα για τη θεραπεία ασθενειών, ως αυξητικοί παράγοντες και για τη βελτίωση της αποτελεσματικότητας της τροφής (Addison 1984). Σήμερα, τα αντιβιοτικά παίζουν σημαντικό ρόλο στη σύγχρονη γεωργία και την κτηνοτροφία και η χορήγησή τους αυξάνεται σε πολλές ανεπτυγμένες χώρες. Μία από τις σημαντικότερες χρήσεις των αντιβιοτικών τα τελευταία χρόνια είναι η ενίσχυση της ανάπτυξης και της αποτελεσματικότητας των ζωοτροφών σε υγιή ζώα (Levy 1992)

Τα αντιβιοτικά χρησιμοποιούνται συστηματικά για θεραπευτικούς σκοπούς για την αύξηση της αποτελεσματικότητας της τροφής και τη βελτίωση του ρυθμού ανάπτυξης (Kiser 1976; Cohen 1998). Σύμφωνα με την UCS (Union of Concerned Scientists), στην έκθεση Hogging it, από τα εκτιμώμενα 16 εκατομμύρια κιλά αντιμικροβιακών ενώσεων που χρησιμοποιούνται ετησίως στις Η.Π.Α., περίπου το 70% τους χρησιμοποιείται για μη θεραπευτικούς σκοπούς (UCS, 2001). Τα αντιβιοτικά που χρησιμοποιούνται στη διατροφή των ζώων στις Η.Π.Α. αυξήθηκαν από περίπου 91.000 κιλά το 1950 σε 9,3 εκατομμύρια κιλά το 1999 (AHI, 2002).

Τα αντιβιοτικά χρησιμοποιούνται ευρύτερα για την θεραπεία και την πρόληψη των μολυσματικών ασθενειών με σκοπό τη διατήρηση και τη βελτίωση της ποιότητας ζωής των εκτρεφόμενων ζώων (Dibner & Richards 2005; Castanon 2007). Τα προηγμένα έθνη και οι εθνικές οργανώσεις έχουν θέσει όρια (Tollefson & Miller 2000) για τα υπολειπόμενα επίπεδα κτηνιατρικών φαρμάκων έτσι ώστε οι καταναλωτές να μην εκτίθενται σε μη αποδεκτά επίπεδα καταλοίπων σε τρόφιμα ζωικής προέλευσης που μπορούν να θέσουν σε κίνδυνο την υγεία τους. Η Ευρωπαϊκή Ένωση θεσπίζει ανώτατα όρια καταλοίπων (ΑΟΚ) για τα αντιβιοτικά στα τρόφιμα και απαγορεύει τη χρήση αυτών των ενώσεων ως προσθέτα ζωοτροφών για την προώθηση της ανάπτυξης των ζώων (Council Directive 96/23/EC, 1996).

2.5.3. ΚΑΝΟΝΙΣΜΟΙ ΤΗΣ ΕΥΡΩΠΑΪΚΗΣ ΕΝΩΣΗΣ

Σε διεθνές επίπεδο, η Επιτροπή του Codex Alimentarius, μία από τις κυριότερες οργανώσεις για την ασφάλεια των τροφίμων, θέσπισε ορισμένα μέτρα για τον έλεγχο των καταλοίπων των κτηνιατρικών φαρμάκων στα δείγματα τροφίμων (Companyo et al. 2009), συμπεριλαμβανομένου ενός καταλόγου των ΑΟΚ και μίας συλλογής αναλυτικών μεθόδων που θεωρούνται κατάλληλες για την υποστήριξη των ανώτατων ορίων (Apoth n.d.). Η συμπερίληψη των προτεινόμενων αναλυτικών μεθόδων διακρίνει αυτή την προσέγγιση από αυτή της Ε.Ε., η οποία θεσπίζει τις απαιτήσεις για τις αναλυτικές μεθόδους (Council Decision 2002/657,2002) αλλά δεν προτείνει ειδικές προσεγγίσεις. Επιπλέον, τα αντιμικροβιακά φάρμακα δεν χρησιμοποιούνται πλέον στις χώρες της Ε.Ε. ως αυξητικοί παράγοντες, καθώς υπάρχει νομοθετική απογόρευση από 1/1/2006 (Κανονισμός 1831/2003 Ε.Κ.), αλλά σε άλλες χώρες όπως για παράδειγμα στις Η.Π.Α. εξακολουθούν να χρησιμοποιούνται στην εκτροφή των παραγωγικών ζώων.

Η μη ορθή χρήση των αντιβιοτικών σε αγροτικά ζώα, έχει ως αποτέλεσμα την παρουσία καταλοίπων σε προϊόντα ζωικής προέλευσης (π.χ. αυγά) και μπορεί να προκαλέσει αλλεργική αντίδραση και βακτηριακή αντίσταση (Wang et al. 2017). Μελέτες έχουν δείξει ότι τα αντιβιοτικά είναι πιθανόν να μεταφερθούν στα αυγά, το οποίο θεωρείται ένα οικονομικό και εύκολα προσβάσιμο προϊόν. Για να εξασφαλιστεί η υγεία του καταναλωτή, πολλοί οργανισμοί, έχουν θεσπίσει ένα μέγιστο επιτρεπόμενο όριο (Maximum Residue Limits, MRL) αντιβιοτικών στα αυγά.

Τα υπολείμματα αντιβιοτικών μπορούν επίσης να ανιχνευτούν στο μη επεξεργασμένο αγελαδινό γάλα όταν χορηγούνται αντιβιοτικά για μεγάλα χρονικά διαστήματα ή όταν χρησιμοποιούνται απαγορευμένα αντιβιοτικά λόγω αμέλειας ή απάτης. Η μεγάλη συγκέντρωση υπολειμμάτων αντιβιοτικών μπορεί να αποτελέσει κίνδυνο για την υγεία των καταναλωτών ή ανάπτυξη αντοχής σε αυτά (Bion et al. 2016).

Τα υπολείμματα αντιβιοτικών στα τρόφιμα μπορούν να οδηγήσουν σε αλλεργικές αντιδράσεις σε ορισμένα υπερευαίσθητα άτομα και μπορούν να θέσουν σε κίνδυνο το ανθρώπινο ανοσοποιητικό σύστημα. Επιπροσθέτως, η

παρουσία υποθεραπευτικών δόσεων αυτών των φαρμάκων στα τρόφιμα για μεγάλες περιόδους έχει οδηγήσει στην εμφάνιση βακτηριακών στελεχών που είναι ανθεκτικά στα φάρμακα που χρησιμοποιούνται στην ιατρική. Προκειμένου να αντιμετωπιστούν αυτά τα προβλήματα και να αυξηθεί η ασφάλεια των τροφίμων, η Ε.Ε. θέσπισε ένα σύνολο πολιτικών και μέτρων, συμπεριλαμβανομένου του καθορισμού ανώτατων ορίων καταλοίπων (ΑΟΚ) για ορισμένα αντιμικροβιακά και ενός συστήματος ειδοποιήσεων (Companyó et al. 2009). Ο πλήρης κατάλογος των δραστικών ουσιών και τα ανώτατα όρια καταλοίπων (ΑΟΚ), αναφέρονται στο παράρτημα του κανονισμού της Επιτροπής 37/2010 (Commission Regulation 37/2010, 2010). Καθώς έχει αποδειχθεί ότι έχουν συσσωρευτεί κάποια φάρμακα στα αυγά (Kan & Petz 2000), η χρήση σουλφοναμιδίων, κινολονών, πενικιλλίων, σομολακτριδίων και τετρακυκλινών έχει απαγορευτεί ρητά στη θεραπεία των ζώων που παράγουν αυγά για ανθρώπινη κατανάλωση.

2.5.4. ΜΕΓΙΣΤΑ ΕΠΙΤΡΕΠΤΑ ΟΡΙΑ ΣΤΟ ΓΑΛΑ & ΣΤΑ ΑΥΓΑ

Η χρήση αλλά και η κατάχρηση αντιμικροβιακών ουσιών για τον έλεγχο ασθενειών στα αγροτικά ζώα μπορεί να οδηγήσει στην εμφάνιση καταλοίπων σε τρόφιμα ζωικής προέλευσης που μπορούν να προκαλέσουν αντίσταση των στελεχών των βακτηρίων σε αντιμικροβιακά για ανθρώπινη χρήση (Van den Bogaard & Stobberingh 2000; McEwen & Fedorka-Cray 2002). Ως εκ τούτου, η ασφάλεια της δημόσιας υγείας που μπορεί να τεθεί σε κίνδυνο εξαιτίας αυτών των κτηνιατρικών φαρμάκων, υπήρξε μία από τις κυριότερες ανησυχίες των υγειονομικών αρχών (Commission 2000). Τα τελευταία χρόνια έχουν εισαχθεί νέοι τύποι αντιμικροβιακών φαρμάκων για να αντικαταστήσουν τους παλαιότερους τύπους που έχαναν την αποτελεσματικότητά τους κατά των παθογόνων βακτηρίων. Ωστόσο, η πλειονότητα των αντιμικροβιακών φαρμάκων που αναπτύσσονται σήμερα είναι δομικά συγγενή με εκείνα που ήδη χρησιμοποιούνται, συνεπώς η ανάγκη διατήρησης της αποτελεσματικότητάς τους είναι ακόμα πιο σημαντική (Sara Bogialli et al. 2009).

Στην Ευρώπη, τα αντιβιοτικά (β-λακτάμες, τετρακυκλίνες, σουλφοναμίδες, αμινογλυκοσιδές, φθοροκινολόνες, μακρολίδια κ.λπ.) στο νωπό γάλα

διέπονται από τον κανονισμό (ΕΕ) αριθ. 37/2010 της Επιτροπής, με ανώτατα επιτρεπόμενα όρια (Maximum Residue Limits, MRLs) που κυμαίνονται από 4 έως 1500 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (Bion et al. 2016).

Σύμφωνα με τον κανονισμό 1181/2002 της Ευρωπαϊκής Επιτροπής τα ανώτατα όρια καταλοίπων (ΑΟΚ) είναι 150 ng/g για την ερυθρομυκίνη (erythromycin), 200 ng/g για την τυλοσίνη (tylosin) στα αυγά, ενώ η χρήση της Τιλμικοσίνης (Tilmicosin) μπορεί να χορηγηθεί σε κοτόπουλα κρεοπαραγωγής, αλλά η χρήση της δεν επιτρέπεται για τη θεραπεία ορνίθων ωοπαραγωγής (Commission Regulation (EC) No 1181/2002, 2002).

Για παράδειγμα, το μέγιστο επιτρεπόμενο όριο για την Τετρακυκλίνη (Tetracycline), την χλωροτετρακυκλίνη (Chlortetracycline) και την τυλοσίνη (Tylosin) στα αυγά είναι 200 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$, ενώ το επιτρεπόμενο όριο για την λινκομυκίνη (Lincomycin) είναι 50 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ (Wang et al. 2017).

Η χρήση αντιβιοτικών στις γαλακτοπαραγωγικές αγελάδες για τη θεραπεία της μαστίτιδας εξακολουθεί να παρουσιάζει υψηλό κίνδυνο επιμόλυνσης του γάλακτος. Στην γαλακτοπαραγωγή, η συνήθης πρακτική περιλαμβάνει τον ποιοτικό έλεγχο στο στάδιο της συλλογής του νωπού γάλακτος. Για το σκοπό αυτό, υπάρχουν αρκετοί έλεγχοι όπως ανασταλτικές δοκιμές, δοκιμασίες υποδοχέα ή ανοσοδοκιμασίες (Navrátilová 2008). Οι δοκιμές αυτές είναι οικονομικές και γρήγορες. Ωστόσο, δεν μπορούν ούτε να ταυτοποιήσουν το αντιβιοτικό ούτε να ποσοτικοποιήσουν την ακριβή συγκέντρωσή του και, συχνά, τα ύποπτα δείγματα δεν μπορούν να επιβεβαιωθούν και να ταυτοποιηθούν. Το γάλα μπορεί να μολυνθεί πολύ εύκολα και για αυτό το λόγο πρέπει να διεξάγονται πολύ συχνά αναλυτικοί έλεγχοι (Moretti et al. 2016).

Οι δοκιμές μικροβιακών αναστολέων χρησιμοποιούνται ευρέως για την ανίχνευση αντιβιοτικών στο γάλα πάνω από τα ανώτατα όρια (Maximum Residue Limits, MRL) που θεσπίζονται από τη νομοθεσία (Ευρωπαϊκή Ένωση, 2010). Η ανίχνευση μεγάλου αριθμού ουσιών στο γάλα πάνω από τα επιτρεπόμενα όρια (Maximum Residue Limits, MRL) επιτυγχάνεται με την εφαρμογή αυτών των δοκιμών ανίχνευσης εξασφαλίζοντας έτσι την ασφάλεια

τόσο του γάλακτος όσο και των γαλακτοκομικών προϊόντων (Romero et al. 2016).

Ο ευρωπαϊκός κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 853/2004 ορίζει ότι οι υπεύθυνοι επιχειρήσεων τροφίμων υποχρεούνται να διασφαλίζουν ότι το νωπό γάλα δεν θα διατίθεται στην αγορά στην περίπτωση που περιέχει κατάλοιπα αντιβιοτικών που υπερβαίνουν τα ανώτατα όρια καταλοίπων (Maximum Residue Limits, MRL) που καθορίζονται από τον κανονισμό της Επιτροπής (ΕΕ) αριθ. 37/2010, 2009.

2.6. ΑΝΩΤΑΤΑ ΕΠΙΤΡΕΠΤΑ ΟΡΙΑ (Maximum Residue Limits, MRL)

Πίνακας 2.1: Φαρμακολογικές δραστικές ουσίες και η ταξινόμησή τους όσον αφορά τα ανώτατα όρια καταλοίπων στα τρόφιμα ζωικής προέλευσης [Κανονισμός (Ε.Ε.) αριθ. 37/2010 Της Επιτροπής, 2009].

Φαρμακολογικώς δραστική ουσία	Ζωικά είδη	Ανώτατα Όρια Καταλοίπων (ΑΟΚ)	Ιστοί-Στόχοι	Θεραπευτική ταξινόμηση
Τριμεθοπρίμη	Όλα τα είδη παραγωγής τροφίμων	50 µg/kg	Μύες, Λιπώδης ιστός, Ήπαρ, Νεφροί, Γάλα	Φάρμακα κατά των λοιμώξεων / Χημειοθεραπευτικά
Ενροφλοξασίνη	Βοοειδή, πρόβατα, αίγες	100 µg/kg 100 µg/kg 300 µg/kg 200 µg/kg 100 µg/kg	Μύες Λιπώδης ιστός Ήπαρ Νεφροί Γάλα	Φάρμακα κατά των λοιμώξεων / Αντιβιοτικά
	Πουλερικά			

		100 µg/kg 100 µg/kg 200 µg/kg 300 µg/kg	Μύες Δέρμα και λιπώδης ιστός Ήπαρ Νεφροί	
Οξυτετρακυκλίνη	Όλα τα είδη παραγωγής τροφίμων	100 µg/kg 300 µg/kg 600 µg/kg 100 µg/kg 200 µg/kg	Μύες Ήπαρ Νεφροί Γάλα Αβγά	Φάρμακα κατά των λοιμώξεων / Αντιβιοτικά
Τιλμικοσίνη	Πουλερικά	75 µg/kg 75 µg/kg 1000 µg/kg 250 µg/kg	Μύες Δέρμα και λιπώδης ιστός Ήπαρ Νεφροί	Φάρμακα κατά των λοιμώξεων / Αντιβιοτικά
	Όλα τα είδη παραγωγής τροφίμων	50 µg/kg 50 µg/kg 1000 µg/kg 1000 µg/kg 50 µg/kg	Μύες Λιπώδης ιστός Ήπαρ Νεφροί Γάλα	
Φλουμεκίνη	Βοοειδή, πρόβατα, αίγες	50 µg/kg	Γάλα	Φάρμακα κατά των λοιμώξεων / Αντιβιοτικά
	Πουλερικά	400 µg/kg 250 µg/kg	Μύες Δέρμα και	

		800 µg/kg 1000 µg/kg	Λιπώδης ιστός Ήπαρ Νεφροί	
Κολιστίνη	Όλα τα είδη παραγωγής τροφίμων	150 µg/kg 150 µg/kg 150 µg/kg 200 µg/kg 50 µg/kg 300 µg/kg	Μύες Λιπώδης ιστός Ήπαρ Νεφροί Γάλα Αβγά	Φάρμακα κατά των λοιμώξεων / Αντιβιοτικά
Τετρακυκλίνη	Όλα τα είδη παραγωγής τροφίμων	100 µg/kg 300 µg/kg 600 µg/kg 100 µg/kg 200 µg/kg	Μύες Ήπαρ Νεφροί Γάλα Αβγά	Φάρμακα κατά των λοιμώξεων / Αντιβιοτικά
Σουλφοναμίδες (Όλες οι ουσίες που ανήκουν στην ομάδα των σουλφοναμιδών)	Όλα τα είδη παραγωγής τροφίμων	100 µg/kg 100 µg/kg 100 µg/kg 100 µg/kg	Μύες Λιπώδης ιστός Ήπαρ Νεφροί	Φάρμακα κατά των λοιμώξεων / Αντιβιοτικά
	Βοοειδή, πρόβατα, αίγες	100 µg/kg	Γάλα	
Κλαριθρομυκίνη	Πουλερικά	200 µg/kg	Αβγά	Φάρμακα κατά των λοιμώξεων / Αντιβιοτικά

Επί του παρόντος, τα αντιβιοτικά είναι η πιο οικονομική και αποτελεσματική λύση για την αντιμετώπιση της πνευμονίας, της μαστίτιδας και άλλων ασθενειών στις αγελάδες γαλακτοπαραγωγής (Goshen & Shrigel 2006; Katsuda et al. 2009; Barlow 2011). Ωστόσο, το γάλα που παράγεται από αγελάδες που έχουν υποβληθεί σε θεραπεία με χορήγηση αντιβιοτικών, είναι πιθανόν να περιέχει υπολείμματα αντιβιοτικών, γεγονός που μπορεί να οδηγήσει σε διάφορα προβλήματα ασφάλειας των τροφίμων (Oliver et al. 2011). Το γάλα που περιέχει αντιβιοτικά μπορεί να καταναλωθεί από τους νεογέννητους μόσχους, αλλά είναι απαραίτητο να εξεταστεί η επίδραση των αντιβιοτικών στα μικρόβια της μεγάλης κοιλίας (Li et al. 2017). Τα βακτηριοειδή και τα ινώδη βακτηρίδια συμβάλλουν στην πέψη στην μεγάλη κοιλία και τα βακτηριοειδή είναι πιο ευαίσθητα σε παστεριωμένο γάλα που περιείχε αντιβιοτικά. Επιπλέον, το γάλα που περιείχε αντιβιοτικά επηρεάζει τον μικροβιακό πληθυσμό της μεγάλης κοιλίας. Η συνθάση της πρωτεϊνικής κινάσης γλυκογόνου (GSK-3β) και οι κινάσες εξαρτώμενες από την κυκλίνη (CDK2, CDK7) στα βακτήρια της μεγάλης κοιλίας μπορούν να επηρεάσουν τον κυτταρικό κύκλο του μεταβολισμού του λίπους του γάλακτος στα πρώιμα στάδια ανάπτυξης των μόσχων (2-6 μηνών) (Li et al. 2017).

Πολλά είδη μικροβίων είναι ανθεκτικά στα διάφορα φάρμακα και παρουσιάζουν ένα ευρύ φάσμα αντίστασης (Davies & Davies 2010). Η μεγάλη κοιλία των βοοειδών αποτελείται από μία μεγάλη ποσότητα μικροβίων (όπως μύκητες, βακτήρια και πρωτόζωα) που συμβάλλουν στη μετατροπή των φυτικών υλικών σε εύπεπτες ενώσεις (συμπεριλαμβανομένων των βακτηριακών πρωτεϊνών και των πτητικών λιπαρών οξέων) (Brulc 2009). Συνεπώς, τα μικρόβια της μεγάλης κοιλίας επηρεάζουν την ποιότητα και την παραγωγή κρέατος και γάλακτος (Stevenson & Weimer 2007; Sundset 2009; Welkie et al. 2010).

Στον συγχρονισμό οίστρων στα αιγοειδή, η πρακτική περιλαμβάνει ενδοκολπικούς σπόγγους, οι οποίοι είναι εμποτισμένοι με προγεστερόνη ή συνθετικά προγεστογόνα, και εφαρμόζονται συνήθως 6 έως 16 ημέρες πριν από την τεχνητή σπερματέγχυση (Menchaca & Rubianes 2004; Rowe et al. 2009). Ωστόσο, αυτή η πρακτική μπορεί να οδηγήσει σε κλινική κολπίτιδα

(Motlomelo et al. 2002; Penna et al. 2013), που μπορεί να επηρεάσει αρνητικά τα ποσοστά γονιμότητας (Scudamore 1988).

Για να αποφευχθούν αυτές οι αρνητικές επιπτώσεις, ορισμένοι ερευνητές συνιστούν τα σφουγγάρια να διαβρέχονται με αντιβιοτικά πριν από την εισαγωγή στον κόλπο (Guerra et al. 2002; Suárez et al. 2006; Gatti et al. 2011), με συνηθέστερο αντιβιοτικό την Οξυτετρακυκλίνη (Manes et al. 2013). Στη συγκεκριμένη χρήση των αντιβιοτικών δεν υπάρχουν εγκεκριμένες συστάσεις αναφορικά με τη δόση και την περίοδο αναμονής που απαιτείται για να αποφευχθεί η παρουσία καταλοίπων στο γάλα. Στις αίγες, ο συγχρονισμός των οίστρων με τη χρήση ενδοκολπικών σπόγγων πραγματοποιείται κατά τη διάρκεια της γαλακτοπαραγωγής και συνεπώς η ενσωμάτωση αντιβιοτικών στα σφουγγάρια μπορεί να οδηγήσει σε μόλυνση του γάλακτος. Μερικοί ερευνητές εντόπισαν υπολείμματα αντιβιοτικών στο αγελαδινό γάλα 24 έως 48 ώρες μετά την ενδομήτρια χορήγηση υποθέτων, εγχύσεων και δισκίων πενικιλίνης, στρεπτομυκίνης και Τετρακυκλίνης (Black et al. 1979; Bishop et al. 1984). Στις προβατίνες, τα υπολείμματα αντιβιοτικών στο γάλα μετά τη συμπίληψη των ενδοκολπικών σπόγγων που είχαν εμποτιστεί με την προκαΐνη-βενζυλοπενικιλίνη αξιολογήθηκαν από τους (Berruga et al. 2008) με τη χρήση διαφορετικών δοκιμών μικροβιακών αναστολέων. Τα αποτελέσματα ελήφθησαν κατά το χρόνο του πρώτου αρμέγματος, και μερικές φορές αργότερα, λόγω της παρουσίας υπολειμμάτων αντιβιοτικού στο γάλα. Στις γαλακτοπαραγωγές αίγες, οι σχετικές πληροφορίες είναι περιορισμένες (Romero et al. 2016).

Η προληπτική χρήση μικρών ποσοτήτων δοξυκυκλίνης, οξυτετρακυκλίνης ή σουλφαθειαζόλης στα ενδοκολπικά σφουγγάρια που χρησιμοποιούνται για συγχρονισμό οίστρων συμβάλλει στη μείωση των ποσοστών κλινικής κολπίτιδας στις γαλακτοπαραγωγές αίγες και δεν οδηγεί σε θετικό αποτέλεσμα σε δοκιμές αναστολέων που χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση αντιβιοτικών στο αίγιο γάλα (Romero et al. 2016).

Για να αποφευχθεί η είσοδος αντιβιοτικών στην τροφική αλυσίδα, η ανίχνευσή τους στα τροφίμων πρέπει να πραγματοποιείται το συντομότερο δυνατό. Στο γάλα, η ανίχνευση θα πρέπει να πραγματοποιείται στα

σημεία συλλογής του γάλακτος όπως τα κτηνοτροφικά κέντρα και τα κέντρα συλλογής γάλακτος. Στα ημικατεργασμένα γαλακτοκομικά συστατικά (π.χ. αποβουτυρωμένο γάλα), θα πρέπει να πραγματοποιείται στην είσοδο του εργοστασίου. Συνεπώς, είναι επιθυμητό οι ταχείες μέθοδοι με ελάχιστη προετοιμασία δείγματος και με δυνατότητα ανίχνευσης ενός ευρύτερου φάσματος αντιβιοτικών. Πολλά κιτ δοκιμών είναι ήδη εμπορικά διαθέσιμα. Οι διαφορετικές αρχές ανίχνευσης περιλαμβάνουν είτε μικροβιολογικές (Le Breton & Savoy-Perroud, M-C Diserens 2007) είτε βιοχημικές αλληλεπιδράσεις (Reybroeck et al. 2010). Τα αποτελέσματα εμφανίζονται σε λιγότερο από 10 λεπτά με δοκιμές με ράβδους και μέχρι 3 ώρες με ανασταλτικές δοκιμές (Bion et al. 2016).

Τις τελευταίες δεκαετίες, η αντοχή στα αντιβιοτικά (antibiotic resistance, AR) αναγνωρίζεται όλο και περισσότερο ως παγκόσμιο πρόβλημα κλινικής και δημόσιας υγείας (Levy 2002). Η εκτεταμένη χρήση αντιβιοτικών στην ιατρική, στην κτηνοτροφία και στη γεωργία προκάλεσε την επιλογή στελεχών ανθεκτικών σε πολλαπλά φάρμακα. Για μεγάλο χρονικό διάστημα το ενδιαφέρον των ερευνητών για τη μελέτη της εν λόγω αντοχής περιοριζόταν στα θετικά κατά Gram και αρνητικά κατά Gram παθογόνα είδη: *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, και *Enterobacter spp.* (Rice 2008) και τα παθογόνα βακτήρια που ανήκουν στα είδη *Stenotrophomonas*, *Burkholderia*, *Acinetobacter* και *Pseudomonas* (Munsch-Alatossava, P. Alatossava 2007).

Τα κοινά μη παθογόνα βακτήρια που συναντώνται στα τρόφιμα, είναι ισχυροί βιολογικοί κίνδυνοι καθώς υπάρχει η πιθανότητα εξάπλωσης των ανθεκτικών γονιδίων στους ανθρώπους μέσω των τροφίμων. Για αυτόν το λόγο, πραγματοποιήθηκαν διάφορες μελέτες για την αξιολόγηση της αντίστασης των βακτηρίων στα πουλερικά και τα προϊόντα τους (Ahmed et al. 2009), καθώς και στο ακατέργαστο και παστεριωμένο γάλα (Straley et al. 2006; Munsch-Alatossava, P. Alatossava 2007; Munsch-Alatossava, P. Gauchi et al. 2012).

Στα εργαστήρια ελέγχου, ο έλεγχος των υπολειμμάτων αντιβιοτικών στο γάλα διεξάγεται κυρίως με μικροβιακές ανασταλτικές δοκιμές, οι οποίες είναι

οικονομικές, εύχρηστες, δεν απαιτούν ειδικό εξοπλισμό και έχουν υψηλή απόδοση δείγματος. Ωστόσο, δεν εξειδικεύονται σε αντιμικροβιακούς παράγοντες και μπορεί να επηρεαστούν από ορισμένες ουσίες στο νωπό γάλα που είναι ικανές να αναστέλλουν τη μικροβιακή ανάπτυξη (όπως το πρωτόγαλα (Romero et al., 2014b)). Επίσης, δεν εξειδικεύονται σε φυσικά ανασταλτικούς παράγοντες (Carlsson et al. 1989) και σε αντιπαρασιτικούς παράγοντες (Romero et al. 2015), προκαλώντας διφορούμενα αποτελέσματα.

Μελέτες σχετικά με την εμφάνιση ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων στο αίγιο γάλα είναι περιορισμένες. Κάποιοι ερευνητές ανέφεραν ποσοστά μη ικανοποιητικών αποτελεσμάτων έως και 7% (Zeng et al. 1996; Beltrán et al. 2015) στο αίγιο γάλα, γεγονός που μπορεί να οδηγήσει σε σοβαρές οικονομικές συνέπειες στους αγρότες και γενικά στη γαλακτοβιομηχανία.

Το 42% του πληθυσμού φέρει βακτήρια ανθεκτικά στα φάρμακα, γεγονός που οδηγεί σε αυξανόμενες ανησυχίες για περαιτέρω εξάπλωση (Le et al. 2009). Η απειλή των ανθεκτικών βακτηρίων προκλήθηκε από την κατάχρηση των αντιβιοτικών στην κτηνοτροφία και στις υδατοκαλλιέργειες (Tenhagen et al. 2014; Serratosa et al. 2006). Τα εναπομείναντα αντιβιοτικά στα τρόφιμα και η εξάπλωση ανθεκτικών βακτηρίων αποτελούν αιτία ανησυχίας τόσο για την ανθρώπινη υγεία όσο και για το περιβάλλον (Gullberg et al. 2011; Jiang et al. 2013).

Συχνά, ορισμένοι αγρότες δεν δίνουν την απαραίτητη προσοχή στα εναπομείναντα επίπεδα αντιβιοτικών ή ενδεχομένως δεν υπάρχει κατανόηση σχετικά με την απαιτούμενη περίοδο αναμονής μετά τη χορήγηση αντιβιοτικών. Τα αντιβιοτικά είναι διαθέσιμα για χορήγηση στα ζώα χωρίς συνταγή και τα εισαγόμενα προϊόντα δεν διαθέτουν οδηγίες στις τοπικές γλώσσες. Η πληροφόρηση για προσεκτική χρήση αντιβιοτικών είναι επίσης ανεπαρκής στις περισσότερες αναπτυσσόμενες χώρες (Duong et al. 2006). Επομένως, η καλύτερη πληροφόρηση των αγροτών και η ισχυρότερη νομοθεσία είναι αναγκαία (Yamaguchi et al. 2015).

2.7. ΗΘΙΚΗ ΚΑΙ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ

Το ζήτημα της καλής διαβίωσης των αγροτικών ζώων (Farm Animal Welfare, FAW) ήρθε στο προσκήνιο μετά τον Δεύτερο Παγκόσμιο Πόλεμο, όπου μετά το τέλος του, οι κτηνοτροφικοί κλάδοι υιοθέτησαν εντατικές καλλιέργειες με σκοπό να μειώσουν το μέσο κόστος παραγωγής. Οι συνέπειες της εντατικής αναπαραγωγής είχαν αρχίσει να προκαλούν ανησυχία και στη δεκαετία του 1960, μετά τη δημοσίευση του Ruth Harrison's Animal Machines. Η δημόσια κατακραυγή οδήγησε στη δημιουργία ειδικής επιτροπής για την εξέταση των θεμάτων της καλής διαβίωσης των αγροτικών ζώων (Farm Animal Welfare, FAW). Η προκύπτουσα έκθεση Brambell (1965) έχει καταστεί παγκόσμιο κοινωνικοπολιτικό σημείο αναφοράς, ειδικά για την αξιολόγηση των συνθηκών που αφορούν την ευημερία των ζώων. Στη συνέχεια, η ευημερία των ζώων άρχισε να αποκτά σημαντική βαρύτητα μεταξύ επιστημόνων, πολιτικών και οικονομολόγων.

Η ευημερία των ζώων είναι ένα ζήτημα που προκαλεί ένα ευρύ φάσμα αντιδράσεων στο καταναλωτικό κοινό (Pratt & Wynne 1995). Οι στάσεις των καταναλωτών σε αυτό το ζήτημα διαφέρουν σημαντικά εντός της Ευρωπαϊκής Ένωσης. Οι κάτοικοι στις βόρειες χώρες της Ε.Ε. φαίνεται να είναι πιο ευαίσθητοι από τους κατοίκους των νότιων χωρών και των νέων κρατών μέλων (Ευρωπαϊκή Επιτροπή, 2005). Οι ανησυχίες για την ευημερία των ζώων μπορεί να προέρχονται είτε από συγκεκριμένες ομάδες καταναλωτών (π.χ. χορτοφάγους) είτε από πολίτες που πιστεύουν ότι ο τρόπος εκτροφής των ζώων είναι λανθασμένος και ανήθικος (Brom 2000). Προηγούμενες μελέτες δείχνουν ότι οι καταναλωτές ανησυχούν περισσότερο για την καλή μεταχείριση των πουλερικών σε σχέση με οποιοδήποτε άλλα ζώα εκτροφής (Verbeke & Viaene 2000; Mceachern & Schröder 2002). Επιπλέον, υπάρχει η άποψη ότι η αυξανόμενη ζήτηση για "φυσικά τρόφιμα" πιθανότατα ενθαρρύνεται από προσωπικούς στόχους (π.χ. προστασία της υγείας του καταναλωτή, απουσία χημικών ουσιών) παρά από την ένδειξη συμπόνιας στα ζώα εκτροφής (Webster 2001).

Οι ανησυχίες των καταναλωτών αναφορικά με την ευημερία των ζώων μπορούν να θεωρηθούν ως μία πολυδιάστατη έννοια που χωρίζεται σε δύο

μέρη: τη ζωοκεντρική και την ανθρωποκεντρική. Αυτές οι έννοιες σχετίζονται με τον τρόπο με τον οποίο τα ζώα αντιμετωπίζονται σε συστήματα παραγωγής (zoocentric) και με το πως η ευημερία των ζώων επηρεάζει την ασφάλεια και την ποιότητα των τροφίμων (ανθρωποκεντρικά). Οι Miele & Vittoria 2001 διαπίστωσαν ότι ο χώρος που δόθηκε στα ζώα συνδέθηκε με τη ποιότητα ζωής τους, η οποία με τη σειρά της συνδέεται με ηθικές αξίες οι οποίες ήταν οι πιο σημαντικοί παράγοντες. Ο σεβασμός αυτών των αξιών προϋποθέτει την αποφυγή της οικονομικής εκμετάλλευσης των ζώων. Ωστόσο, οι ανησυχίες των καταναλωτών για την ευημερία των ζώων είναι δευτερεύουσας σημασίας σε σύγκριση με τις ανησυχίες για την ανθρώπινη υγεία η οποία σαφώς σχετίζεται με την ασφάλεια των τροφίμων (Verbeke και Viaene 1998). Σύμφωνα με τους (Mceachern & Schröder 2002), οι καταναλωτές δεν μπορούν να διαχωρίσουν τα προϊόντα φιλικά προς τα ζώα και τα βιολογικά προϊόντα, και συχνά τα θεωρούν ως ίδια.

Τα αποτελέσματα που διεξήχθησαν σε διάφορες χώρες της Ε.Ε. επιβεβαιώνουν ότι η ευημερία των ζώων δεν αποτελεί το σημαντικότερο παράγοντα επιλογής του κρέατος (Verbeke & Viaene 2000; Alberto et al. 2003; McCarthy et al. 2003; McCarthy et al. 2004), ενώ η υγιεινή και η ασφάλεια είναι προτεραιότητα των περισσότερων καταναλωτών. Τα άτομα με υψηλότερα εισοδήματα, που ζουν σε μεγάλες και μεσαίες πόλεις, ενδιαφέρονται περισσότερο για την καλή διαβίωση των ζώων.

Οι καταναλωτές συνδέουν τα τρόφιμα που είναι φιλικά προς τα ζώα με την υψηλότερη ποιότητα του παραγόμενου προϊόντος (Anwander et al. 2003). Όμως, θα μπορούσαν να απορρίψουν τις (ίσως μη ρεαλιστικές) προσδοκίες τους σχετικά με την καλύτερη γεύση των προϊόντων που παράγονται με μεθόδους που είναι φιλικές προς τα ζώα (animal-friendly products, AFP) και έτσι δημιουργείται φραγμός στην αυξανόμενη ζήτηση για τα συγκεκριμένα προϊόντα. Συνεπώς, θα πρέπει να γνωστοποιούνται τα χαρακτηριστικά που είναι φιλικά προς τα ζώα ή άλλα χαρακτηριστικά αξιοπιστίας, ώστε να αποφευχθούν οι μη ρεαλιστικές προσδοκίες (Nocella et al. 2010).

Τα υψηλότερα πρότυπα καλής διαβίωσης των ζώων αυξάνουν το κόστος της αλυσίδας εφοδιασμού των πιστοποιημένων προϊόντων φιλικών προς τα ζώα

(animal-friendly products, AFP). Όμως, είναι δύσκολο να εκτιμηθεί κατά πόσον η εισαγωγή υψηλότερων προτύπων είναι οικονομικά βιώσιμη. Ωστόσο, οι διαδικασίες παραγωγής που ξεπερνούν τα όρια των κανονισμών της Ε.Ε. φαίνεται να οδηγούν σε πολύ μεγαλύτερο πρόσθετο κόστος παραγωγής. Αυτό δείχνει πόσο σημαντικές είναι οι πρόσθετες πληροφορίες για την καλή διαβίωση των αγροτικών ζώων (Farm Animal Welfare, FAW) και γιατί η κατάλληλη επισήμανση είναι απαραίτητη. Τα πρότυπα για την ευημερία των ζώων στην Ε.Ε. θα μπορούσαν να αναπτυχθούν από τους υπεύθυνους, με βάση τα επιστημονικά στοιχεία και τις κοινωνικοοικονομικές εκτιμήσεις κάθε χώρας (Nocella et al. 2010).

2.8. ΚΑΤΗΓΟΡΙΕΣ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΩΝ

2.8.1. ΓΕΝΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΓΙΑ ΤΑ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ

Τα αντιβιοτικά χωρίζονται με βάση την πηγή προέλευσης τους σε τρεις κατηγορίες. Η πρώτη κατηγορία είναι τα «φυσικά αντιβιοτικά» τα οποία είναι χημικές ουσίες που παράγονται από μικροοργανισμούς, συνήθως βακτήρια και μύκητες, και παρεμποδίζουν ή αναστέλλουν την ανάπτυξη βακτηρίων (The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products Veterinary Medicines Evaluation Unit 1999).

Η δεύτερη κατηγορία των αντιβιοτικών είναι τα «ημι-συνθετικά», τα οποία προέρχονται από τα φυσικά αντιβιοτικά με μικρές τροποποιήσεις στη δομή τους. Για παράδειγμα, μετά την ανακάλυψη της βενζυλοπενικιλίνης, μία μικρή τροποποίηση στον αυξητικό παράγοντα του *Penicillium* οδήγησε στην εισαγωγή ενός μόνο ατόμου οξυγόνου στην αλυσίδα του φυσικού προϊόντος, σχηματίζοντας τη φαινοξυμεθυλοπενικιλίνη. Το παράγωγο αυτό είναι πιο σταθερό σε όξινο περιβάλλον και είναι κατάλληλο για τη χορήγηση από το στόμα (per os). Μετά τη χημική ταυτοποίηση πολλών φυσικών αντιβιοτικών, πλήθος παραγώγων προέκυψαν και συνεχίζουν να ανακαλύπτονται (The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products Veterinary Medicines Evaluation Unit 1999).

Η τρίτη κατηγορία, τα «συνθετικά αντιβιοτικά», είναι προϊόντα χημικής σύνθεσης και χαρακτηρίζονται ως χημειοθεραπευτικά. Αναπτύχθηκαν τα σουλφοναμίδια που μέχρι σήμερα, παίζουν σημαντικό ρόλο στη θεραπεία μολυσματικών ασθενειών. Πιο πρόσφατα παραδείγματα συνθετικών αντιβιοτικών είναι τα νιτροφουράνια και οι κινολόνες (The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products Veterinary Medicines Evaluation Unit 1999).

2.9. ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΤΩΝ ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΩΝ ΟΥΣΙΩΝ

Οι αντιμικροβιακοί παράγοντες (αντιμικροβιακά) είναι βιοσυνθετικές, συνθετικές ή ημισυνθετικές ουσίες που σε χαμηλές συγκεντρώσεις εκδηλώνουν μικροβιοκτόνο ή μικροβιοστατική δράση. Η πρώτη ουσία με αντιμικροβιακές ιδιότητες ήταν η κόκκινη χρωστική προντοζίνη, που χρησιμοποιήθηκε για τη βαφή νημάτων. Στις αρχές της δεκαετίας του 1930, ο Domagk διαπίστωσε ότι η ουσία αυτή είχε θεραπευτικά αποτελέσματα, κατά τη χορήγησή της σε ζώα με λοίμωξη από αιμολυτικό στρεπτόκοκκο. Η προντοζίνη στον οργανισμό του ζώου μεταβολιζόταν σε σουλφανιλαμίδη, η οποία εκδήλωνε την αντιμικροβιακή δράση. Η σουλφανιλαμίδη αποτέλεσε την μητρική ουσία για τη μεγάλη αντιμικροβιακή οικογένεια των σουλφοναμιδών. Οι περισσότερες όμως ουσίες με αντιμικροβιακές ιδιότητες απομονώθηκαν αργότερα από μικροοργανισμούς. Στην πραγματικότητα πρόκειται για τοξικές ουσίες, οι οποίες παράγονται από μερικούς μικροοργανισμούς και οι οποίες χρησιμοποιούνται απ' αυτούς σαν όπλο εναντίον άλλων μικροοργανισμών στον αγώνα για επιβίωση. Το φαινόμενο του ανταγωνισμού μεταξύ μικροοργανισμών και η χρήση μικροβίων, ως πηγή δραστικών ουσιών εναντίων λοιμωδών ασθενειών, ενδεχομένως ήταν γνωστή από την αρχαιότητα (Μουζούρας 1996).

Οι αντιμικροβιακές ουσίες μπορούν να ταξινομηθούν σε διάφορες ομάδες ανάλογα με: την ομάδα που πέρχονται, τον τρόπο δράσης τους, το φάσμα και το μηχανισμό της δράσης τους. Το μεγαλύτερο ενδιαφέρον να παρουσιάζει η ταξινόμηση των αντιμικροβιακών ουσιών σε βακτηριοκτόνες

(θανάτωση-καταστροφή βακτηρίων) και σε βακτηριοστατικές (αναστολή ανάπτυξης βακτηρίων (Μουζούρας 1996) (**Error! Reference source not found.**).

Πίνακας 2.2:Ομαδοποίηση διαφόρων αντιμικροβιακών ουσιών (Μουζούρας 1996).

ΒΑΚΤΗΡΙΟΚΤΟΝΑ	ΒΑΚΤΗΡΙΟΣΤΑΤΙΚΑ
Πενικιλίνες	Μακρολίδια
Αμινογλυκοσίδες	Τετρακυκλίνες
Τριμεθοπρίμη+ Σουλφαδιαζίνη	Σουλφοναμίδες

Στην συγκεκριμένη μεταπτυχιακή μελέτη εξετάστηκε η υπολειμματικότητα των ακόλουθων αντιβιοτικών: Τριμεθοπρίμη (Trimethoprim), Ενροφλοξασίνη (Enrofloxacin), Οξυτετρακυκλίνη (Oxytetracycline), Τιλμικοσίνη (Tilmicosin), Φλουμεκίνη (Flumequine), Κολιστίνη (Colistin), Χλωραμφενικόλη (Chloramphenicol), Τετρακυκλίνη (Tetracycline), Σουλφαμεθαζίνη (Sulfamethazine) και Κλαριθρομυκίνη (Clarithromycin).

Οι τετρακυκλίνες (Tetracyclines) είναι βακτηριοστατικά αντιμικροβιακά με ευρύ φάσμα. Το αντιμικροβιακό τους φάσμα περιλαμβάνει βακτήρια θετικά και αρνητικά κατά Gram καθώς επίσης χλαμύδια, σπειροχαίτες, μυκοπλάσματα, ρικέτσιες, ακτινομύκητες και πρωτόζωα. Μεγάλος αριθμός μικροβιακών στελεχών αναπτύσσει εύκολα ανθεκτικά στελέχη έναντι των τετρακυκλινών. Η αντοχή οφείλεται σε μηχανισμούς οι οποίοι παρεμποδίζουν την είσοδο των αντιμικροβιακών αυτών ουσιών στο κυτταρόπλασμα. Οι τετρακυκλίνες χρησιμοποιούνται συχνά σε κτηνιατρικά φάρμακα εξαιτίας του ευρέως φάσματος δράσης τους και του χαμηλού τους κόστους. Η δράση των τετρακυκλινών οφείλεται στη σύνδεσή τους με την 30S ριβοσωμική υπομονάδα με αποτέλεσμα να παρεμποδίζεται η σύνθεση των πρωτεϊνών (Hilbert & Smulders 2004).

Οι τετρακυκλίνες ενώ έχουν τα ίδια αντιμικροβιακά χαρακτηριστικά, διαφέρουν ως προς τις φαρμακοκινητικές τους ιδιότητες (Μουζούρας 1996). Αποτελούν

την πιο σπουδαία ομάδα βακτηριοστατικών αντιβιοτικών τόσο για τον άνθρωπο, όσο και για την κτηνιατρική (Τσιγκοΐδα et al. 1988). Ο βασικός χημικός τους πυρήνας είναι παράγωγο του ναφθαλενίου και αποτελείται από 4 δακτύλιους και για αυτό ονομάστηκαν "τετρακυκλίνες". Οι πρώτες φυσικές τετρακυκλίνες ήταν η Οξυτετρακυκλίνη (Oxytetracycline) και η χλωροτετρακυκλίνη (Chlortetracycline), ενώ στις ημισυνθετικές τετρακυκλίνες ανήκει η Τετρακυκλίνη (Tetracycline) (Μουζούρας 1996). Είναι συνήθως κίτρινες χρυσίζουσες ή κίτρινες κρυσταλλικές ενώσεις και είναι διαλυτές στο νερό και στους περισσότερους οργανικούς διαλύτες. Επίσης οι τετρακυκλίνες είναι σχετικά σταθερές αλλά όχι ανθεκτικές στη θέρμανση (Τσιγκοΐδα et al. 1988).

Η Οξυτετρακυκλίνη (Oxytetracycline) απομονώθηκε από τον στρεπτομύκητα εδάφους *Streptomyces rimosus*, για αυτό πήρε και την εμπορική ονομασία Terramycin (Terra=έδαφος). Αποτελεί τον πιο χρησιμοποιημένο αντιμικροβιακό παράγοντα στην κτηνιατρική πρακτική, με σημαντικότερες ενδείξεις χρήσης τις γαστρεντερικές και πνευμονικές λοιμώξεις. Χορηγείται παρεντερικά και από το στόμα, είτε υπό μορφή υδατοδιαλυτής σκόνης, είτε υπό μορφή φαρμακούχου προμείγματος με την τροφή. Η Τετρακυκλίνη (Tetracycline) έχει το ίδιο φάσμα δράσης με την Οξυτετρακυκλίνη (Oxytetracycline) και την χλωροτετρακυκλίνη (Chlortetracycline), αλλά χορηγείται σπανιότερα. Μπορεί να χορηγηθεί παρεντερικά και από το στόμα σε συγκεκριμένες δόσεις ανάλογα με το είδος του ζώου (Μουζούρας 1996).

Τα μακρολίδια είναι ομάδα αντιμικροβιακών που είναι δραστικά κυρίως κατά των Gram θετικών βακτηριδίων, των μυκοπλασμάτων και των ρικετσιών (Μουζούρας 1996). Περιλαμβάνουν ένα μακροκυκλικό δακτύλιο λακτόνης και ένα ή περισσότερα σάκχαρα (Τσιγκοΐδα et al. 1988). Σε αυτή την κατηγορία ανήκει η Τιλμικοσίνη (Tilmicosin). Η Κλαριθρομυκίνη (Clarithromycin) είναι ημισυνθετικό μακρολιδικό αντιβιοτικό. Συνηθέστερα, η Τιλμικοσίνη (Tilmicosin) χορηγείται υποδόρια στους μόσχους για την αντιμετώπιση της παστεριδιακής πνευμονίας (Μουζούρας 1996). Τα μακρολίδια είναι κυρίως βακτηριοστατικά αλλά ανάλογα με τον αριθμό των μικροοργανισμών και τη συγκέντρωση του αντιβιοτικού, μπορούν να είναι και βακτηριοκτόνα (Alexander 1976).

Είναι επίσης το πιο αποτελεσματικό θεραπευτικό φάρμακο κατά των ασθενειών που παράγονται από τα είδη *Mycoplasma*. Επιπλέον, έχει αποδειχθεί ότι τα μακρολίδια είναι δραστικά έναντι μη κλασσικών παθογόνων όπως ο *Helicobacter pylori*. Αυτή η οικογένεια αντιβιοτικών είναι μία ενδιαφέρουσα εναλλακτική λύση για ασθενείς που παρουσιάζουν ευαισθησία ή αλλεργία στην πενικιλίνη και για λοιμώξεις ανθεκτικές στη πενικιλίνη. Για τους λόγους αυτούς, τα μακρολίδια χορηγούνται ευρέως στα κτηνοτροφικά ζώα, για τη θεραπεία ενός ευρύτερου φάσματος λοιμώξεων, ιδιαίτερα ασθενειών του αναπνευστικού. Όμως, εάν δεν τηρούνται οι συστάσεις σχετικά με τους χρόνους χορήγησης των φαρμάκων, υπάρχει σημαντικός κίνδυνος ανίχνευσης καταλοίπων μακρολιδίων στα τρόφιμα ζωικής προέλευσης (Sara Bogialli et al. 2009).

Οι κινολόνες (Quinolones) είναι συνθετικοί αντιμικροβιακοί παράγοντες με μικροβιοκτόνο δράση. Ταξινομούνται σε δύο γενεές ανάλογα με τον χρόνο εμφάνισης και τις φαρμακολογικές ιδιότητες τους. Στις κινολόνες Α΄ γενεάς συγκαταλέγεται η Φλουμεκίνη (Flumequine), ενώ στις κινολόνες Β΄ γενεάς συγκαταλέγεται η Ενροφλοξασίνη (Enrofloxacin) (Μουζούρας 1996).

Η Φλουμεκίνη (Flumequine) χορηγείται κυρίως στα πτηνά με το νερό για την αντιμετώπιση των κολοβακτηριδιακών λοιμώξεων και της σαλμονέλλωσης. Δεν πρέπει όμως να συνδυάζεται με τις τετρακυκλίνες, τις σουλφοναμίδες και τη νιτροφουραντοΐνη. Η Ενροφλοξασίνη (Enrofloxacin) είναι ευρέος φάσματος αντιμικροβιακός παράγοντας που αναπτύχθηκε το 1983. Είναι ιδιαίτερα δραστική έναντι των Gram αρνητικών μικροβίων όπως *Escherichia coli*, *Salmonella spp.*, *Klebsiella spp.*, και *Pseudomonas aeruginosa*. Χορηγείται στα μηρυκαστικά για την αντιμετώπιση λοιμώξεων ενώ στα πτηνά χορηγείται με το νερό για τη θεραπεία της σαλμονέλλωσης, των μυκοπλασματικών λοιμώξεων, της κολοβακτηριδίασης και της παστεριδίασης (Μουζούρας 1996).

Οι πολυμυξίνες (Polymyxins) είναι αντιμικροβιακά στενού φάσματος με σημαντικότερους εκπροσώπους τη πολυμυξίνη Β (Polymyxin Β) και τη πολυμυξίνη Ε ή Κολιστίνη (Polymyxin Ε ή Collistin). Η αντιμικροβιακή τους δράση περιορίζεται μόνο έναντι των Gram αρνητικών μικροβίων και παρουσιάζουν μεγάλη δράση έναντι της ψευδομονάδας. Οι πολυμυξίνες

μπορούν να συνδυαστούν με πολλά αντιμικροβιακά και ειδικότερα με τις τετρακυκλίνες, ενισχυμένες σουλφοναμίδες, αμοξικιλίνη (Μουζούρας 1996). Είναι κυρίως πολυπεπτίδια τα οποία σχηματίζουν άλατα με ανόργανα οξέα τα οποία είναι υδατοδιαλυτά και σταθερά (Alexander 1976).

Η Χλωραμφενικόλη (Chloramphenicol) είναι αντιμικροβιακό με ευρύτατο μικροβιακό φάσμα και σημαντικές φαρμακοκινητικές ιδιότητες. Έχει μικροβιοστατικές -και σε υψηλές συγκεντρώσεις- μικροβιοκτόνες ιδιότητες έναντι των κατά Gram θετικών και αρνητικών μικροβίων. Το φάσμα δράσης περιλαμβάνει διάφορους παθογόνους μικροοργανισμούς όπως: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Salmonella* (Μουζούρας 1996). Συνηθέστερα, χορηγούνται παράγωγα της Χλωραμφενικόλης, όπως η Thiamphenicol και η Florfenicol (Μουζούρας 1996), καθώς είναι σχετικά τοξική και μετά από παρατεταμένη χρήση έχει ανεπιθύμητες επιδράσεις στον άνθρωπο, περιορίζοντας έτσι τη χρήση της και στα παραγωγικά ζώα (Τσιγκκίδα et al. 1988).

Η Τριμεθοπρίμη (Trimethoprim) ανήκει στους αναστολείς σύνθεσης των πυρηνικών οξέων μαζί με τις σουλφοναμίδες, τη νοβοβιοκίνη, τη ριφαμπικίνη και τις κινολόνες. Πρόκειται για αντιμικροβιακούς παράγοντες οι οποίοι παρεμβαίνουν σε κάποιο στάδιο σύνθεσης των πυρηνικών οξέων αναστέλλοντας τη σύνθεσή τους. Κλασικός συνδυασμός είναι η Τριμεθοπρίμη με τις σουλφοναμίδες για την αντιμετώπιση ιδιαίτερα ανθεκτικών στελεχών (Μουζούρας 1996). Μπορεί να χορηγηθεί σε πολλά ζώα είτε από το στομα είτε με ένεση, όμως το παραγόμενο γάλα από μοσχαριά που τους έχει χορηγηθεί το συγκεκριμένο αντιβιοτικό δεν πρέπει να προορίζεται για ανθρώπινη κατανάλωση για τουλάχιστον 72 ώρες μετά από τη χορήγηση από του στόματος και για 7 ημέρες μετά την τελευταία ένεση (Alexander 1976).

Η Σουλφαμεθαζίνη (Sulfamethazine) ανήκει στην κατηγορία των σουλφοναμίδων. Οι σουλφοναμίδες έχουν το ίδιο αντιμικροβιακό φάσμα αλλά διαφέρουν μεταξύ τους ως προς ορισμένες φαρμακοκινητικές ιδιότητες. Με βάση το βαθμό απορρόφησης από τον εντερικό σωλήνα διακρίνονται σε διασυστημικής δράσης (χορηγούμενες σε περιπτώσεις γενικών λοιμώξεων, όπως είναι η σουλφαμεθαζίνη) και σε σουλφοναμίδες χορηγούμενες επί

λοιμώξεων του γαστρεντερικού. Οι σουλφοναμίδες είναι βακτηριοστατικές ουσίες και όχι βακτηριοκτόνες. Αναστέλλουν την ανάπτυξη θετικών και αρνητικών κατά Gram βακτηρίων και είναι δραστικές έναντι μερικών χλαμυδίων, πρωτόζωων όπως κοκκίδια και *Toxoplasma spp.* (Μουζούρας 1996).

2.10. ΜΕΘΟΔΟΙ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ ΚΑΙ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΤΩΝ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΩΝ

Το αυγό είναι ένα οικονομικό και εξαιρετικά θρεπτικό τρόφιμο και συμπεριλαμβάνεται σε πολλές δίαιτες. Η παγκόσμια παραγωγή αυγών το 2008 ανήλθε σε 65 εκατομμύρια τόνους (European Egg Processors Association, www.eepa.info). Από τον Ιανουάριο του 2000 μέχρι τον Αύγουστο του 2010, το σύστημα έγκαιρης προειδοποίησης για τα τρόφιμα και τις ζωοτροφές (Rapid Alert System for Food and Feed, RASFF) της Ευρωπαϊκής Ένωσης κατέγραψε οκτώ κοινοποιήσεις συναγερμού και έντεκα κοινοποιήσεις πληροφοριών σχετικά με την παρουσία κτηνιατρικών φαρμάκων σε αυγά και προϊόντα με βάση τα νιτροφουράνια, τις κινολόνες και τις μακρολίδες. Το 2016 έχουν καταγραφεί οκτώ κοινοποιήσεις συναγερμού και έξι κοινοποιήσεις πληροφοριών (Rapid Alert System for Food and Feed, http://ec.europa.eu/food/food/rapidalert/index_en.htm).

Το βασικότερο εργαλείο για τους ελέγχους που διενεργούνται από τις υγειονομικές αρχές είναι οι κατάλληλες αναλυτικές μέθοδοι. Η ανάπτυξη μεθόδων πολλαπλών κατηγοριών, αποτελεί μία σημαντική τάση στην ανάλυση των υπολειμμάτων και των μολυσματικών ουσιών σε δείγματα τροφίμων, καθώς υπάρχει η δυνατότητα ανίχνευσης, επιβεβαίωσης και ποσοτικοποίησης πολλών διαφορετικών ενώσεων. Η ανάπτυξη των μεθόδων έγινε εφικτή εξαιτίας της τεράστιας προόδου που σημειώθηκε από τις τεχνικές φασματομετρίας μάζας (Mass Spectrometry, MS) (Jiménez et al. 2011).

Είναι απαραίτητο να αναπτυχθούν ευαίσθητες αναλυτικές μέθοδοι σύμφωνα με την ισχύουσα νομοθεσία, επιτρέποντας τον ταυτόχρονο προσδιορισμό διαφόρων κατηγοριών των κτηνιατρικών φαρμάκων, καθώς στα αυγά

μπορούν να εντοπιστούν διαφορετικές ομάδες κτηνιατρικών φαρμάκων. Με αυτό τον τρόπο εξασφαλίζεται η ασφάλεια των παρεχόμενων προϊόντων (Frenich et al. 2010). Επομένως, μία ενιαία και ταυτόχρονη διαδικασία εκχύλισης που υπολογίζει τις διαφορετικές φυσικοχημικές ιδιότητες των αντιβιοτικών (Cunha et al. 2007), προσδιορίζοντας τετρακυκλίνες και κινολόνες (Commission Regulation (EC) No 165/2010), φθοριοκινολόνες, σουλφοναμίδια και υπολείμματα β-λακτάμης (Romero-González et al. 2008), είναι απαραίτητη.

Λόγω των διαφορετικών φυσικοχημικών ιδιοτήτων των αναλυτών, η διαδικασία εκχύλισης και ο καθαρισμός είναι τα πιο απαιτητικά βήματα σε μία μέθοδο πολλαπλών κατηγοριών. Εξαιτίας της υψηλής περιεκτικότητάς τους σε λιπίδια και πρωτεΐνες, τα αυγά αποτελούν μία πολύ περίπλοκη μήτρα, καθώς μερικοί αναλύτες δεσμεύονται με λιποπρωτεΐνες, εμποδίζοντας έτσι την εκχύλιση τους, ενώ αρκετοί οργανικοί διαλύτες σχηματίζουν γαλακτώματα και αφρούς με τη μήτρα (Aerts et al. 1994). Το ακετονιτρίλιο θεωρείται ο πιο κατάλληλος διαλύτης εκχύλισης, επειδή κατακρημνίζει τις πρωτεΐνες και τα ένζυμα, τα οποία θα μπορούσαν να επηρεάσουν τα κατάλοιπα φαρμάκων κατά τη διάρκεια της επεξεργασίας του δείγματος (Frenich et al. 2010). Επιπλέον, η προσθήκη n-εξανίου απομακρύνει τα λιπίδια (Dubois et al. 2001).

Όσον αφορά τον καθαρισμό, δεν έχει επιτευχθεί ικανοποιητική ανάκτηση για όλες τις ενώσεις παράλο που έχουν εξεταστεί διαφορετικές προσεγγίσεις, όπως η εκχύλιση στερεάς φάσης (solid phase extraction, SPE), η γρήγορη, εύκολη, φθηνή, αποτελεσματική και ασφαλής μέθοδος (QuEChERS, Quick Easy Cheap Effective Rugged Safe) και η διασπορά στερεάς φάσης (matrix solid phase dispersion) (Frenich et al. 2010).

Στην ανάλυση των υπολειμμάτων κτηνιατρικών φαρμάκων στα αυγά, οι περισσότερες μελέτες επικεντρώνονται σε μία κατηγορία ενώσεων που προσδιορίζονται με μικροβιολογικές δοκιμές (microbial screening assays) (Pikkemaat et al. 2007), υγρή χρωματογραφία με ανιχνευτή φθορισμού (liquid chromatography (LC) with fluorescence detection) (Huang et al. 2006; Maxwell et al. 1999; Shim et al. 2003) ή με ανιχνευτή συστοιχίας διόδων (diode array detection) (Nikolaidou et al. 2008), υγρή χρωματογραφία σε

συνδυασμό με φασματομετρία μάζας (liquid chromatography-mass spectrometry, LC-MS) (Forti & Scortichini 2009).

Την τελευταία δεκαετία, με στόχο την ανάλυση των αντιβιοτικών, υπάρχει η ανάγκη για σχεδιασμό νέων και αξιόπιστων μεθόδων για τον προσδιορισμό ενός ευρύτερου φάσματος συστατικών. Όμως τα αντιβιοτικά περιλαμβάνουν πολλές ενώσεις με διάφορες χημικές δομές, αμφοτερικές ιδιότητες και πολικότητα, το οποίο δυσκολεύει σε μεγάλο βαθμό τις μεθόδους που χρησιμοποιούνται για την εκχύλιση, τον καθαρισμό και την οργανική ανάλυση. Διάφορες διαδικασίες εκχύλισης, όπως η εκχύλιση στερεής φάσης (Solid-Phase Extraction, SPE), η εκχύλιση διασποράς στερεάς φάσης (Matrix Solid Phase Dispersion, MSPD), η υπό πίεση υγρή εκχύλιση (Pressurized Liquid Extraction, PLE), και η γρήγορη, εύκολη, φθηνή, αποτελεσματική, τραχύς και ασφαλής προσέγγιση (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe, QuEChERS), έχουν εφαρμοστεί για την αφαίρεση ή τη μείωση της παρεμβολής-παρεμπόδισης που προκαλεί η υψηλή περιεκτικότητα των λιπιδίων και πρωτεϊνών σε αυγά. Από αυτές, οι SPE και η MSPD είναι χρονοβόρες και ανεπαρκείς στην απόδοση του δείγματος, ενώ η μέθοδος QuEChERS παρότι αποτελεί μια γρήγορη και οικονομική μέθοδο, εντούτοις δεν μπορεί να ανιχνεύσει ορισμένα αντιβιοτικά, όπως οι τετρακυκλίνες και οι κινολόνες (Frenich et al. 2010).

Οι Frenich et al. το 2010 σύγκριναν τις παρακάτω τέσσερις μεθόδους εκχύλισης: SPE (solid-phase extraction), MSPD (matrix solid-phase dispersion), QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe) και εκχύλισης με διαλύτη (solvent extraction). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η διαδικασία εκχύλισης με διαλύτη ήταν η πλέον κατάλληλη για την ταυτόχρονη εκχύλιση αντιβιοτικών στα αυγά. Τα τελευταία χρόνια, η εκχύλιση με διαλύτη (solvent extraction) βελτιώθηκε περαιτέρω μέσω της εκχύλισης σε στερεή φάση (SPE). Ωστόσο, πρέπει να αναπτυχθεί μία μέθοδος εκχύλισης και καθαρισμού για την ανάλυση των πολυκύτταρων αντιβιοτικών στα αυγά (Frenich et al. 2010).

Παράλληλα, έχουν αναπτυχθεί ανοσοχημικές μέθοδοι και μέθοδοι ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay, Ενζυμοσυνδεδεμένοι Ανοσο-

προσροφητικοί Προσδιορισμοί) με σκοπό τον γρήγορο προσδιορισμό των υπολειμμάτων αντιβιοτικών (Zhang et al. 2007). Ωστόσο, αυτές οι μέθοδοι προσδιορίζουν επιλεγμένους αναλυτές και παρέχουν μόνο ημιποσοτική ανάλυση. Όταν η υγρή χρωματογραφία (LC), συνδυάζεται με διάφορα συστήματα ανίχνευσης όπως με την φασματομετρία μάζας (MS) (Bruno et al. 2002), τότε αυξάνεται ο αριθμός των αναλυτών που μπορούν να προσδιοριστούν ταυτόχρονα.

Τα τελευταία χρόνια αξιολογήθηκαν αρκετές μέθοδοι όπως η εκχύλιση διασποράς στερεάς φάσης (Matrix Solid Phase Dispersion, MSPD), χρησιμοποιώντας θερμό νερό για τον προσδιορισμό των κινολονών σε αυγά (S. Bogialli et al. 2009), καθώς και η εκχύλιση με υγρό υπό πίεση (Pressurized Liquid Extraction, PLE) για εκχύλιση φθοροκινολονών σε αυγά χρησιμοποιώντας ένα μίγμα ακετονιτριλίου και φωσφορικού οξέος (Herranz et al. 2007). Και οι δύο τεχνικές επιτρέπουν τη μείωση της κατανάλωσης διαλύτη και του χρόνου ανάλυσης. Επιπλέον, εφαρμόστηκε η μέθοδος QuEChERS, για την εκχύλιση κτηνιατρικών φαρμάκων από το γάλα και τους βρώσιμους ιστούς (Aguilera-Luiz et al. 2008; Stubbings & Bigwood 2009).

2.11. ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΗΣ ΥΓΡΗΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ

Η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) είναι η πλέον διαδεδομένη αναλυτική τεχνική διαχωρισμού. Η τεχνική αυτή χαρακτηρίζεται από την υψηλή ευαισθησία της, την εύκολη προσαρμογή της σε ακριβείς ποσοτικούς προσδιορισμούς, την καταλληλότητά της σε διαχωρισμούς μη πτητικών ή θερμικά ευαίσθητων συστατικών και κυρίως, την εφαρμογή της σε προσδιορισμούς διαφόρων ουσιών. Παραδείγματα αποτελούν τα αμινοξέα, οι πρωτεΐνες, τα νουκλεϊκά οξέα, οι υδρογονάνθρακες, οι υδατάνθρακες, οι φαρμακευτικές ενώσεις, τα τερπενοειδή, τα φυτοφάρμακα, τα αντιβιοτικά, τα στεροειδή, οι οργανομεταλλικές ενώσεις και μια ποικιλία ανόργανων ουσιών (Skoog et al. 2007).

2.12. ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ ΥΓΡΗΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ

Μία συσκευή HPLC αποτελείται από τα εξής μέρη: 1. το σύστημα παροχής κινητής φάσεως, 2. το σύστημα εισαγωγής δείγματος, 3. τη στήλη, 4. τον ανιχνευτή, και 5. τον καταγραφέα (Εικόνα 2.1).

Σύστημα παροχής κινητής φάσεως: αποτελείται από μια αντλία υψηλής πίεσεως και ένα σύστημα για την βαθμιαία αλλαγή της συστάσεως της κινητής φάσεως.

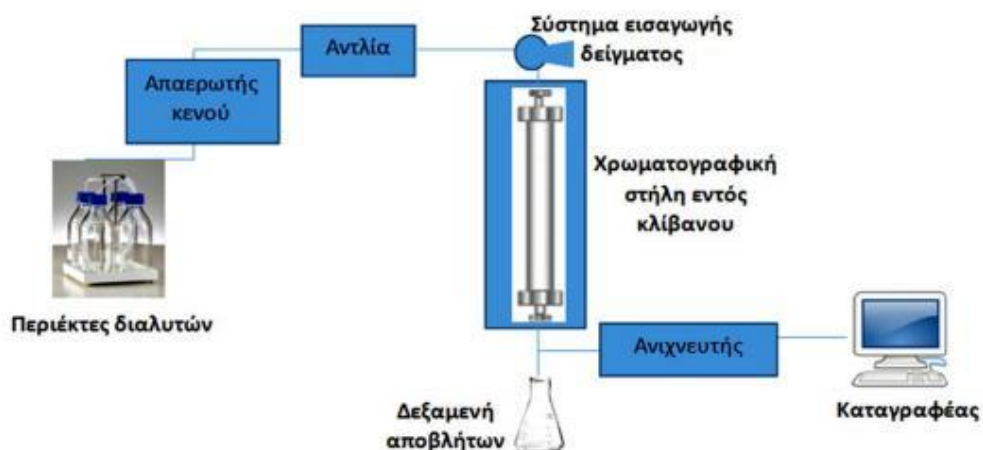
Σύστημα εισαγωγής δείγματος (Injector): συνήθως είναι μια περιστρεφόμενη βαλβίδα υψηλής πίεσεως, με βρόχο δείγματος. Αποτελείται από ένα ακίνητο χαλύβδινο κύλινδρο με 6 διαύλους, από τους οποίους ο ένας οδηγεί στη στήλη.

Στήλες: είναι ευθύγραμμοι σωλήνες από χάλυβα που εμπεριέχουν ένα κατάλληλο για την ανάλυση προσροφητικό υλικό.

Ανιχνευτής: είναι το πλέον σημαντικό σημείο του συστήματος, αφού επιτρέπει την οπτικοποίηση του διαχωρισμού που λαμβάνει χώρα εντός της στήλης και επιτρέπει την αξιοποίησή του στην ανάλυση.

Καταγραφέας: τα σύγχρονα συστήματα HPLC, αντί για τον καταγραφέα διαθέτουν ηλεκτρονικούς υπολογιστές που ελέγχουν τη λειτουργία του συστήματος παροχής κινητής φάσεως και πραγματοποιούν τη συλλογή, αποθήκευση και επεξεργασία των σημάτων των ανιχνευτών καθώς και την παρουσίαση των αποτελεσμάτων της αναλύσεως (Χατζηγιάννου & Κουππάρης 2010).

Για να αναπτυχθούν ικανοποιητικές ταχύτητες ροής του υγρού έκλουσης όταν χρησιμοποιούνται υλικά πλήρωσης αποτελούμενα από σωματίδια μεγέθους 2 έως 10 μm , οι απαιτούμενες πιέσεις από τις αντλίες φθάνουν τις μερικές χιλιάδες psi (1 atm = 14,696 psi). Ως αποτέλεσμα των υψηλών πιέσεων, η οργανολογία της HPLC είναι πολυπλοκότερη και δαπανηρότερη από την οργανολογία άλλων ειδών χρωματογραφίας (Skoog et al. 2007).



Εικόνα 2.1: Οργανολογία υγρής χρωματογραφίας (High-performance liquid chromatography, HPLC).

2.13. ΠΟΙΟΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΜΕ ΥΓΡΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ

Από ένα χρωματογράφημα λαμβάνεται μόνο ένα είδος ποιοτικής πληροφορίας για κάθε ουσία σε ένα δείγμα που είναι ο χρόνος κατακράτησής της ή η θέση της σε μία στατική φάση μετά από μία ορισμένη περίοδο έκλουσης. Τα φασματικά μήκη κύματος μπορούν να προσδιορισθούν με πολύ μεγαλύτερη επαναληψιμότητα σε σχέση με τους χρόνους κατακράτησης των χρωματο-γραφημάτων (tR).

Η χρωματογραφία χρησιμοποιείται ευρύτατα για τη διαπίστωση της παρουσίας ή απουσίας συστατικών σε μίγματα, που περιέχουν ένα περιορισμένο αριθμό ουσιών γνωστής ταυτότητας. Στην περίπτωση που τα χρωματογραφήματα δεν οδηγούν σε μία θετική ταυτοποίηση των ουσιών σε ένα δείγμα, τότε αυτό αποτελεί ένδειξη απουσίας ορισμένων ενώσεων. Έτσι, εάν ένα δείγμα δεν παρέχει μία κορυφή στον ίδιο χρόνο κατακράτησης ενός προτύπου, το οποίο μετρείται κάτω από τις ίδιες συνθήκες, μπορεί να θεωρηθεί βέβαιη η απουσία της συγκεκριμένης ένωσης (ή είναι παρούσα σε επίπεδα συγκέντρωσης κάτω από το όριο ανίχνευσης της μεθόδου). Σαν αποτέλεσμα, η χρωματογραφία αποτελεί το πρώτο στάδιο ζωτικής σημασίας για το χρωματογραφικό διαχωρισμό των ενώσεων σε ένα πολύπλοκο μίγμα (Skoog et al. 2007).

2.14. ΠΟΣΟΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΜΕ ΥΓΡΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ

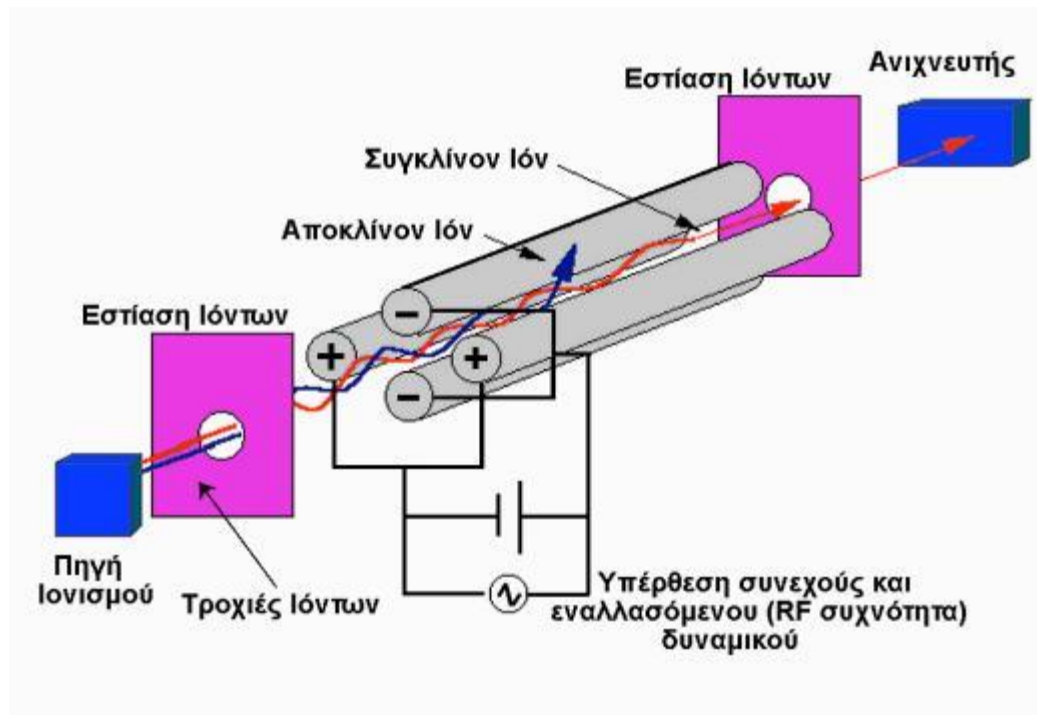
Πραγματοποιείται σύγκριση του ύψους ή της επιφάνειας της κορυφής του αναλύτη με τις αντίστοιχες κορυφές ενός ή περισσότερων προτύπων. Για την επίπεδη χρωματογραφία η επιφάνεια που καλύπτει κάθε διαχωριζόμενη ουσία αποτελεί την αναλυτική παράμετρο (Skoog et al. 2007).

2.15. ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΗΣ ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑΣ ΜΑΖΑΣ

Φασματομετρία μάζας ονομάζεται η τεχνική κατά την οποία τα συστατικά ενός δείγματος μετατρέπονται σε ταχύτατα κινούμενα ιόντα και διαχωρίζονται σε σχέση με το λόγο της μάζας προς το φορτίο τους (m/z). Η αρχή της συγκεκριμένης τεχνικής βασίζεται στην παρατήρηση ότι τα θετικά ιόντα αποκλίνουν της φοράς τους κατά την κίνηση τους σε ηλεκτρικά ή μαγνητικά πεδία. Η φασματομετρία μάζας προσφέρει πληροφορίες για την ποιοτική και ποσοτική σύσταση αγνώστων μιγμάτων ανόργανων και οργανικών ενώσεων, τη χημική δομή πολύ μεγάλου αριθμού ενώσεων, την παρουσία και το ποσοστό ισοτόπων και τη δομή και σύσταση στερεών επιφανειών (Skoog et al. 2007).

Ο τριπλός τετραπολικός αναλυτής της φασματομετρίας μάζας (triple quadrupole mass spectrometry) αποτελεί την βασική τεχνική για την παρατήρηση και την επιβεβαίωση των μολυσματικών ουσιών και των υπολειμμάτων στα τρόφιμα. Αποτελείται από τέσσερις παράλληλες μεταλλικές ράβδους (πόλους), οι οποίες είναι συμμετρικά τοποθετημένες, ως προς τη δέσμη των ιόντων και διαγωνίως συνδέονται ηλεκτρικά μεταξύ τους. Κάθε ζεύγος ράβδων συνδέεται με τον πόλο πηγής τάσεως που περιέχει μία συνεχή και μία εναλλασόμενη υψίσυχνη, στην περιοχή των ραδιοσυχνοτήτων, συνιστώσα (Χατζηγιωάννου & Κουππάρης 2010) (Εικόνα 2.2). Αρκετές μελέτες έχουν γίνει και με τη χρήση ενός αναλυτή χρόνου πτήσης συζευγμένο με φασματομετρία μάζας TOF-MS (Time Of Flight) για τον έλεγχο ενώσεων σε μήτρες τροφίμων σε σειρά (Stolker et al. 2008; Ortelli et al. 2009; Kaufmann et al. 2008). Ωστόσο, οι μέθοδοι που βασίζονται στον χρόνο πτήσης (TOF-MS) είναι λιγότερο ευαίσθητες (έχουν υψηλότερο όριο ανίχνευσης) από τις μεθόδους με τριπλό τετραπολικό αναλυτή και δεν συμπεριλαμβάνονται στις

μεθόδους επιβεβαίωσης σύμφωνα με την απόφαση 2002/657 του Συμβουλίου (Council Decision 2002/657).



Εικόνα 2.2: Τετραπολικός αναλυτής μαζών.

Η συζευγμένη φασματομετρία μαζών (tandem mass spectrometry ,MS/MS) περιλαμβάνει δύο ή περισσότερα επίπεδα φασματομετρικής ανάλυσης. Κάθε φασματόμετρο μαζών μπορεί να σαρώσει πλήθος δυναμικών, να επιλέξει ένα ιόν ή να μεταφέρει όλα τα ιόντα. Μεταξύ των διαφόρων επιπέδων MS τα ιόντα μπορούν να υποβληθούν σε διαφορετικές διαδικασίες, όπως σε σύγκρουση με αδρανή ή δραστικά αέρια, σύγκρουση με επιφάνειες, αλληλεπίδραση με φως, ηλεκτρόνια ή άλλα ιόντα, επιτάχυνση, επιβράδυνση, ουδετεροποίηση, αποσύνθεση, κτλ. (Χατζηιωάννου & Κουππάρης 2010).

2.16. ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ ΤΟΥ ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΟΥ ΜΑΖΩΝ

Το φασματόμετρο μαζών αποτελείται από τα εξής τμήματα: 1. το σύστημα εισαγωγής του δείγματος, 2. την πηγή ιόντων, 3. τον αναλυτή μαζών, και 4. τον ανιχνευτή. Κάθε φασματόμετρο μαζών περιλαμβάνει συστήματα δημιουργίας υψηλού κενού, συστήματα παρουσιάσεως των φασμάτων, όπως καταγραφείς και παλμογράφους καθώς και ηλεκτρονικό υπολογιστή.

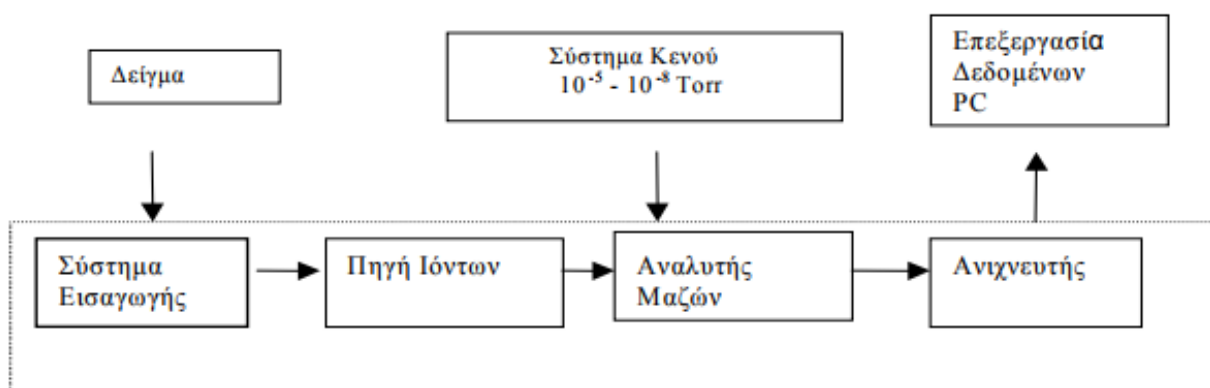
Σύστημα εισαγωγής του δείγματος: ο σκοπός του συγκεκριμένου συστήματος είναι η προετοιμασία του δείγματος για την εισαγωγή του στο χώρο ιονισμού (πηγή ιόντων), υπό συνθήκες σταθερής ροής και σε αέρια πάντοτε κατάσταση.

Πηγή ιόντων: πραγματοποιείται η παραγωγή ιόντων χαρακτηριστικών της υπό προσδιορισμό ουσίας (ion-source), είτε με μονομοριακές (πρόσκρουση ηλεκτρονίων, ιονισμός με πεδίο), είτε με διμοριακές (χημικός ιονισμός) τεχνικές.

Αναλυτής μαζών: η βασική λειτουργία του είναι ο διαχωρισμός ιόντων που παράγονται στην πηγή ιόντων, ανάλογα με τις διαφορετικές τιμές των λόγων m/z .

Ανιχνευτής: παράγει στην έξοδό του ηλεκτρικό σήμα (συνήθως ηλεκτρικό ρεύμα) ανάλογο του αριθμού ιόντων και του φορτίου τους που δέχεται στην είσοδό του στη χρονική μονάδα (Χατζηγιάννου & Κουππάρης 2010).

Σύστημα κενού: απαιτείται η λειτουργία ενός πολύπλοκου συστήματος κενού για να διατηρεί χαμηλή πίεση (10^{-4} έως 10^{-8} torr) σε όλα τα τμήματα του οργάνου, εκτός από το τμήμα του επεξεργαστή σήματος και του συστήματος ανάγνωσης και καταγραφής των δεδομένων. Το υψηλό κενό είναι απαραίτητο, καθώς τα φορτισμένα σωματίδια, συμπεριλαμβανομένων και των ηλεκτρονίων, αλληλοεπιδρούν με τα συστατικά της ατμόσφαιρας και καταστρέφονται (Skoog et al. 2007) (Εικόνα 2.3).



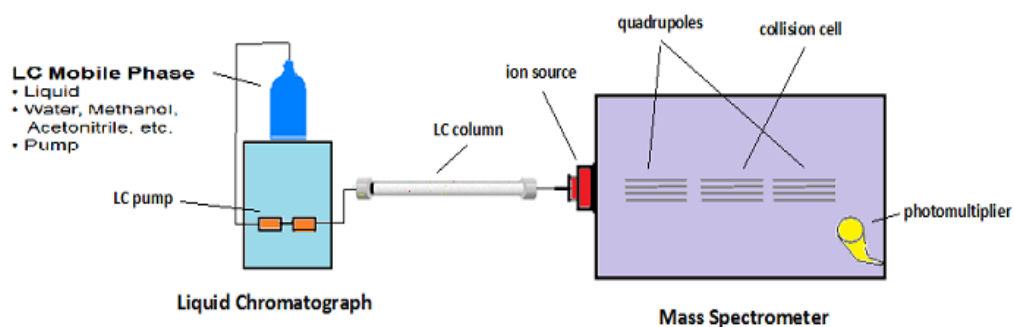
Εικόνα 2.3: Σχηματικό διάγραμμα των τμημάτων ενός φασματομέτρου μαζών.

2.17. ΥΓΡΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΣΥΖΕΥΓΜΕΝΗ ΜΕ ΔΙΔΥΜΗ ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΑΣ-ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΑΣ ΤΡΙΠΛΟΥ ΤΕΤΡΑΠΟΛΟΥ (Liquid chromatography tandem-mass spectrometry, LC-MS/MS)

Έχουν προταθεί πολυάριθμες αναλυτικές μέθοδοι για την ανίχνευση υπολειμμάτων των αντιβιοτικών στο γάλα και στα γαλακτοκομικά προϊόντα. Ενδεικτικά ο Ortelli και οι συνεργάτες δημοσίευσαν μία τέτοια προσέγγιση (Ortelli et al. 2009), η οποία είναι αποτελεσματική ωστόσο, απαιτεί τη χρήση της εξειδικευμένης υγρής χρωματογραφίας φασματομετρίας μάζας συζευγμένης με αναλυτή χρόνου πτήσης (LC-TOF-MS). Αυτή έχει το πλεονέκτημα της υψηλής διαχωριστικής ικανότητας και την ανίχνευση ουσιών σε μη στοχευμένο πλαίσιο (untargeted screening), ωστόσο η οργανολογία της παραμένει ακόμα ακριβή και σε κάποιες εφαρμογές δεν επιτυγχάνει τόσο ικανοποιητικά LOQ σε σχέση με την δίδυμη φασματομετρία μάζας ή τη φασματομετρία μάζας τριπλού τετραπόλου. Επιπλέον, είναι υποχρεωτική η διενέργεια ενός βήματος δειγματοληψίας για την εκχύλιση και την συγκέντρωση των αναλυτών (Bion et al. 2016) (Εικόνα 2.4).

Επομένως, η υγρή χρωματογραφία συζευγμένη με τη δίδυμη φασματομετρία μάζας (LC-MS/MS) (Wang et al. 2005; Gentili et al. 2005; Zhan et al. 2012) αποτελεί μία από τις πιο ελπιδοφόρες τεχνικές για την ανάλυση των κτηνιατρικών φαρμάκων στα αυγά λόγω της αρκετά υψηλής ευαισθησίας της. Επιπλέον, η ευαισθησία της συγκεκριμένης μεθόδου μπορεί να αυξηθεί, όταν η υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης (HPLC) συνδυάζεται με τη δίδυμη φασματομετρία μάζας (MS/MS), επιτρέποντας τη μείωση του χρωματογραφικού χρόνου (Jia et al. 2008; Martínez-Vidal et al. 2009). Σαν αποτέλεσμα παράγονται στενότερες κορυφές, αυξάνοντας την ευαισθησία ανίχνευσης ενώ καθίσταται πιο εύκολη η ανάπτυξη πολυδύναμων αναλυτικών μεθόδων, δηλαδή μεθόδων που ανιχνεύουν ταυτόχρονα πλήθος χημικών ουσιών.

Η τεχνική LC-MS/MS επιτρέπει συνήθως τον προσδιορισμό φαρμάκων με υψηλές μοριακές μάζες καθώς και πολικούς, μη πτητικούς και θερμικώς ασταθείς αναλύτες χωρίς παραγωγοποίηση. Για την ανάλυση πολύπλοκων μητρών όπως το ήπαρ, το νεφρό ή τον μυ που χρησιμοποιούνται συνήθως στην ανάλυση κτηνιατρικών φαρμάκων, απαιτείται ένα κατάλληλο στάδιο προετοιμασίας του δείγματος για την ελαχιστοποίηση των επιδράσεων της μήτρας στη διαδικασία ιονισμού. Ωστόσο, λόγω της υψηλής επιλεκτικότητας του διπλού φασματομέτρου μάζας, ο καθαρισμός του δείγματος είναι σχετικά απλός. Η συνεχής ανάπτυξη της LC-MS/MS οδηγεί σε νέες στρατηγικές για τον έλεγχο των κτηνιατρικών φαρμάκων, ιδιαίτερα στον τομέα ανίχνευσης υπολειμμάτων αντιβιοτικών που ανήκουν σε διαφορετικές κατηγορίες. Ο τριπλός τετραπολικός αναλυτής είναι το πιο ευρέως χρησιμοποιούμενο όργανο στη σύγχρονη ανάλυση καταλοίπων με εξαιρετικές επιδόσεις, που επιτρέπουν την ταυτόχρονη ανάλυση > 100 αναλυτών σε μικρό χρονικό διάστημα (Hiemstra & de Kok 2007).



Εικόνα 2.4: Οργανολογία υγρής χρωματογραφίας (Liquid Chromatography, LC) συζευγμένη με δίδυμη φασματομετρία μάζας (Tandem Mass Spectrometry, MS/MS).

2.18. Η ΣΗΜΑΣΙΑ ΤΗΣ ΙΧΝΗΛΑΣΙΜΟΤΗΤΑΣ

Στις μέρες μας, η εφαρμογή της ιχνηλασιμότητας στον κλάδο των τροφίμων είναι υποχρεωτική καθώς οι επιχειρήσεις καλούνται να εφαρμόσουν συστήματα ιχνηλασιμότητας και η πολιτεία καλείται να ελέγξει τη συμμόρφωση των επιχειρήσεων με τις εν λόγω απαιτήσεις. Εάν όλες οι επιχειρήσεις που εμπλέκονται στην αλυσίδα παραγωγής και διακίνησης ενός προϊόντος, εφαρμόσουν ένα σύστημα ιχνηλασιμότητας, τότε αποκαθίσταται πλήρης ιχνηλασιμότητα σε όλη την αλυσίδα, από το χωράφι έως το πιάτο. Όταν όμως

ένας κρίκος της αλυσίδας δε λειτουργεί, σταματάει η ιχνηλασιμότητα και συνεπώς με βάση τη νομοθεσία, δεν μπορεί να εξαιρεθεί κανένας ενδιάμεσος κρίκος της αλυσίδας (Κυριακίδης 2005).

Με τον όρο ιχνηλασιμότητα αναφερόμαστε στη δυνατότητα απόδοσης της προέλευσης της εφαρμογής ή της τοποθεσίας μίας οντότητας μέσω καταγεγραμμένων στοιχείων αναγνώρισης (ISO 8402:1994). Σύμφωνα με τον Καν.178/2000/ΕΚ ιχνηλασιμότητα είναι η δυνατότητα να παρακολουθείς ένα τρόφιμο, μία ζωοτροφή, ένα ζώο, ένα συστατικό ή μία ουσία ενός τροφίμου σε όλα τα στάδια της παραγωγής, της επεξεργασίας, της εξέτασης, της μετακίνησης, και της έκθεσής του. Ο κοινά αποδεκτός ορισμός της ιχνηλασιμότητας είναι από το πρότυπο ISO 9000. Σύμφωνα με αυτό, ως ιχνηλασιμότητα (traceability) ορίζεται *«η δυνατότητα ιχνηλάτησης του ιστορικού, της εφαρμογής ή της θέσης αυτού το οποίο είναι υπό εξέταση (μέσω καταγεγραμμένων αναγνωριστικών στοιχείων)»*.

Στη Λευκή Βίβλο για την ασφάλεια των τροφίμων (12-01-2000) αναφέρεται ότι *«Μια επιτυχημένη πολιτική τροφίμων απαιτεί την ιχνηλασιμότητα των τροφίμων και ζωοτροφών και των συστατικών τους. Για να διευκολυνθεί η ιχνηλασιμότητα πρέπει να εισαχθούν οι κατάλληλες διαδικασίες.»*. Σύμφωνα με τον «Γενικό Νόμο Τροφίμων» (Κανονισμός (ΕΚ) 178/2002), ο οποίος δημοσιεύθηκε δύο χρόνια μετά τη Λευκή Βίβλο, *ιχνηλασιμότητα είναι η ικανότητα ιχνηλάτησης (the ability to trace) και παρακολούθησης τροφίμων, ζωοτροφών και ζώων που χρησιμοποιούνται για την παραγωγή τροφίμων ή ουσιών που πρόκειται ή αναμένεται να ενσωματωθούν σε τρόφιμα ή ζωοτροφές, σε όλα τα στάδια της παραγωγής, μεταποίησης και διανομής τους.*

Η εφαρμογή της ιχνηλασιμότητας προϋποθέτει την ανάπτυξη ενός συστήματος ιχνηλασιμότητας. Πρακτικά, ένα σύστημα ιχνηλασιμότητας είναι ένας μηχανισμός καταγραφής και διατήρησης όλων των πληροφοριών που αφορούν τη διαδρομή που ακολούθησε μία συγκεκριμένη μονάδα ή παρτίδα ενός προϊόντος ή συστατικού από τον (τους) αρχικό (-ούς) προμηθευτή (-ες) έως τον τελικό καταναλωτή (Κυριακίδης 2005).

Οι υπεύθυνοι των επιχειρήσεων τροφίμων πρέπει να καθορίσουν:

- το σκοπό του συστήματος ιχνηλασιμότητας.
- τις πληροφορίες που απαιτούνται για την ιχνηλασιμότητα.
- τις πληροφορίες που πρέπει να συνοδεύουν τα συστατικά των τροφίμων.
- τις εσωτερικές διαδικασίες πληροφόρησης που χρειάζονται για να διατηρήσουν την ιχνηλασιμότητα κατά τη διάρκεια της παρασκευής τροφίμων ή της προετοιμασίας όπου εφαρμόζεται.
- τις πληροφορίες που πρέπει να συνοδεύουν τη διανομή των τροφίμων που έχουν παρασκευαστεί.

Παράλληλα, θα πρέπει να δημιουργήσουν:

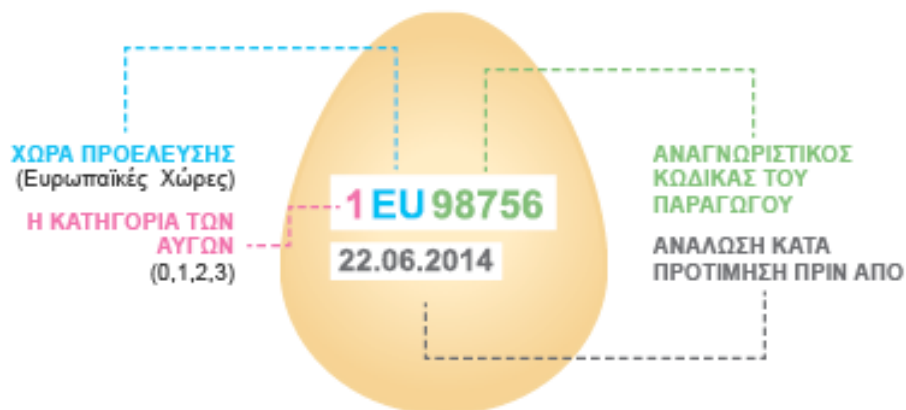
- σύστημα καταγραφής στοιχείων.
- μηχανισμούς ανασκόπησης και αξιολόγησης του συστήματος ιχνηλασιμότητας (Γεωργαλλάς & Ηροδότου n.d.).

Η ιχνηλασιμότητα των τροφίμων παρουσιάζει πολλά πλεονεκτήματα. Το σημαντικότερο πλεονέκτημα είναι ότι εξασφαλίζεται η προστασία του καταναλωτή μέσω της απόσυρσης μη ασφαλών τροφίμων. Επιπλέον πραγματοποιείται καλύτερος έλεγχος εντός της αλυσίδας ώστε να εντοπίζονται διάφορα προβλήματα. Παρέχεται περισσότερη πληροφόρηση για τα τρόφιμα και σαν αποτέλεσμα αποφεύγεται η εμφάνιση δυσανεξίας ή αλλεργίας στους καταναλωτές (Anon n.d.). Όμως η ιχνηλασιμότητα δε σχετίζεται μόνο με την ασφάλεια των τροφίμων αλλά προασπίζει και την ποιότητα. Οι επιχειρήσεις μπορούν να προβλέψουν πιθανά κέρδη ή απώλειες και να διευρύνουν τους στόχους που οι ίδιες θα θέσουν για την εφαρμογή της ιχνηλασιμότητας, προχωρώντας πέρα από την υποχρεωτική απαίτηση για ασφάλεια και εγκαθιδρύοντας κατά συνέπεια συστήματα περισσότερο πλήρη και περισσότερο λεπτομερή (Κυριακίδης 2005).

Τα απαραίτητα στοιχεία ιχνηλασιμότητας είναι η επωνυμία του προμηθευτή, ο κωδικός παρτίδας προμηθευτή, η ημερομηνία παράδοσης, η βεβαίωση αποδοχής και τα αποτελέσματα του ποιοτικού ελέγχου (in-house) (Anon n.d.)

(Εικόνα

2.5)



Εικόνα 2.5: Σήμανση αυγών και ερμηνεία του κάθε κωδικού.

Όσον αφορά το κόστος η εφαρμογή της ιχνηλασιμότητας, για να αξιολογηθεί θα πρέπει να συγκριθεί με το κόστος της μη εφαρμογής της. Επιπλέον, θα πρέπει εκτός από το κόστος των επιχειρήσεων, να συμπεριλαμβάνεται και το κοινωνικό κόστος από τη μη εφαρμογή της ιχνηλασιμότητας, κυρίως το κόστος σε περιόδους κρίσης. Για παράδειγμα η κρίση με τις διοξίνες το 1999 στο Βέλγιο αποδεικνύει ότι το κόστος από την εφαρμογή της ιχνηλασιμότητας είναι πολύ μικρότερο από το κόστος μίας πιθανής κρίσης που μπορεί να αποφευχθεί από την εφαρμογή της. Η συγκεκριμένη κρίση αποτέλεσε την αρχή για την υποχρεωτική ιχνηλασιμότητα τροφίμων και ζωοτροφών (Κυριακίδης 2005).

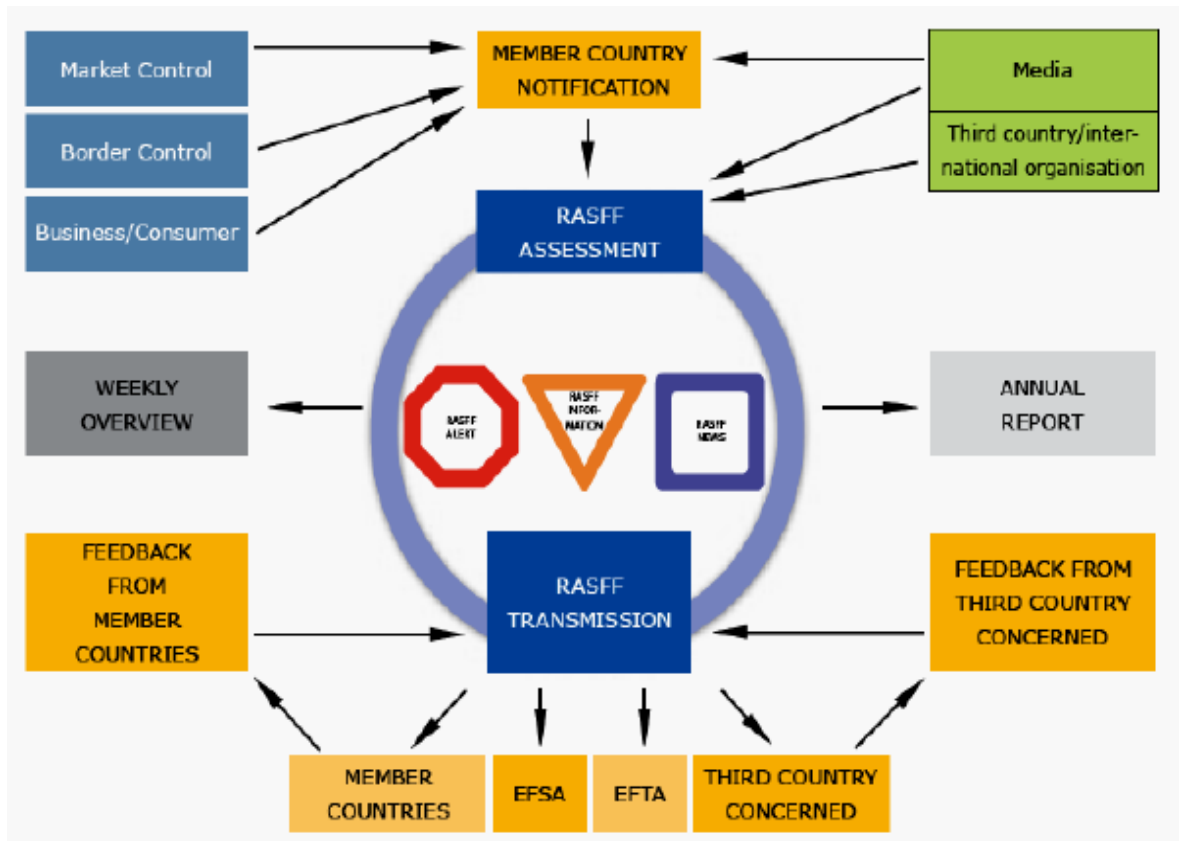
Επαλήθευση και αναθεώρηση του συστήματος ιχνηλασιμότητας

Οι υπεύθυνοι των επιχειρήσεων τροφίμων πρέπει να επαληθεύουν ότι οι πληροφορίες ιχνηλασιμότητας που λαμβάνουν από τους προμηθευτές είναι ορθές και ακριβείς ώστε να είναι εφικτή και η ιχνηλασιμότητα των πρώτων υλών. Το σύστημα ιχνηλασιμότητας πρέπει να αναθεωρείται τουλάχιστον κάθε χρόνο προκειμένου να διασφαλίζεται το επιθυμητό αποτέλεσμα. Η ομάδα αναθεώρησης του συστήματος για να είναι αποτελεσματική θα πρέπει να αποτελείται από άτομα που προέρχονται από κάθε τομέα της επιχείρησης (Γεωργαλλάς & Ηροδότου).

2.19. ΔΙΚΤΥΟ ΠΡΟΕΙΔΟΠΟΙΗΣΗΣ

Το δίκτυο προειδοποίησης (Rapid Alert System for Food and Feed, RASFF) άρχισε να λειτουργεί το 1988 και στηρίχθηκε στο άρθρο 50 του νόμου για τα τρόφιμα (EC 178/2002). Οι εμπλεκόμενοι στο δίκτυο προειδοποίησης είναι τα κράτη-μέλη, η Ευρωπαϊκή Επιτροπή και η EFSA (European Food Safety Authority). Το RASFF βασίζεται στην ιχνηλασιμότητα και επιτρέπει την ταχεία ανταλλαγή πληροφοριών όπου εντοπισθεί κίνδυνος για την ασφάλεια των τροφίμων. Ο στόχος του συγκεκριμένου δικτύου είναι να αποτραπεί (ει δυνατόν) η κλιμάκωση ενός συμβάντος σε μείζονα κρίση (Καλογερόπουλος n.d.) (Εικόνα 2.6).

Το φθινόπωρο το 2004 σε ένα ολλανδικό αγρόκτημα, ανιχνεύθηκαν υψηλά επίπεδα διοξίνης σε γάλα. Οι αρχές απέκλεισαν το αγρόκτημα και βρήκαν ότι η πηγή μόλυνσης ήταν ο μολυσμένος με διοξίνη άργιλος, που χρησιμοποιήθηκε για να διαχωριστούν πατάτες υψηλής και χαμηλότερης ποιότητας. Σαν αποτέλεσμα ενεργοποιήθηκε το RASFF και αποκλείστηκαν πάνω από 200 φάρμες σε Ολλανδία, Βέλγιο, Γαλλία και Γερμανία που είχαν χρησιμοποιήσει τη μολυσμένη ζωοτροφή. Τα μολυσμένα προϊόντα δεν έφθασαν ποτέ στους καταναλωτές (Καλογερόπουλος n.d.).



Εικόνα 2.6: Ροή πληροφορίας στο δίκτυο προειδοποίησης (Rapid Alert System for Food and Feed, RASFF).

2.20. ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ

Ορθότητα-Πιστότητα (Precision)

Η πιστότητα αποτελεί το πλέον χρησιμοποιούμενο - και μερικές φορές (λανθασμένα) το αποκλειστικό – χαρακτηριστικό ποιότητας (κριτήριο) μίας αναλυτικής μεθόδου και εκφράζει την προσέγγιση της συμφωνίας μεταξύ των επαναλαμβανομένων αποτελεσμάτων της μεθόδου. Η πιστότητα μπορεί να περιγραφεί ως η ποσότητα που μετρά τη διασπορά (dispersion) των αποτελεσμάτων όταν η αναλυτική μεθοδολογία επαναλαμβάνεται σε ένα δείγμα (Κουππάρης n.d.).

Η διασπορά των αποτελεσμάτων προκαλείται από διάφορες τυχαίες πηγές και θα βρίσκεται γύρω από την αναμενόμενη τιμή του αποτελέσματος εάν δεν υπάρχει συστηματικό σφάλμα. Στην ανάλυση θεωρείται ότι η διασπορά είναι

τέτοια έτσι, ώστε να περιγράφεται ως μία τυχαία κατανομή (normal distribution ή Gaussian) (Κουππάρης n.d.).

Η ορθότητα ορίζεται ως η διαφορά της μέσης τιμής x -μ (σφάλμα), μεταξύ της μέσης τιμής x , μίας σειράς μετρήσεων και της αληθινής τιμής με την μετρούμενη ποσότητα. Υπολογίζεται με βάση τον τύπο:

(European Commission, 2007).

Στην πράξη γίνονται περιορισμένες παρατηρήσεις (μετρήσεις) και λαμβάνονται ως εκτιμήτριες των :

- μ (αληθής τιμή): ο μέσος όρος (mean) x_{mean}
- σ (τυπική απόκλιση πληθυσμού): η τυπική απόκλιση s ή SD

Συχνά ως εκτιμήτρια της s μπορεί να ληφθεί από το εύρος (range) των μετρήσεων.

Τα υποσύνολα της πιστότητας είναι η επαναληψιμότητα (Repeatability) και η αναπαραγωγιμότητα (Reproducibility) (Κουππάρης n.d.).

Ως μέτρο της επαναληψιμότητας χρησιμοποιείται η τυπική σχετική απόκλιση (relative standard deviation, SDr ή RSD) η οποία δίνεται από τον τύπο :

$$SDr (\%) = 100 \cdot \frac{s}{x}$$

όπου :

- s τυπική απόκλιση των μετρήσεων
- x μέσος όρος των μετρήσεων

(Ellison et al. 2003).

Η επαναληψιμότητα (Repeatability) είναι το μέτρο της διασποράς των αποτελεσμάτων διαδοχικών ελέγχων στο ίδιο δείγμα, που εκτελούνται κάτω από τις ίδιες συνθήκες, δηλαδή ίδια μέθοδος ελέγχου, ίδιος αναλυτής, ίδια συσκευή, ίδιο εργαστήριο και βραχύ χρονικό διάστημα. Η

αναπαραγωγιμότητα (Reproducibility) είναι το μέτρο της διασποράς μεταξύ των αποτελεσμάτων που λαμβάνονται με την ίδια μέθοδο στο ίδιο δείγμα, κάτω από διαφορετικές συνθήκες, δηλαδή διαφορετικός αναλυτής, διαφορετικές συσκευές, διαφορετικές παρτίδες αντιδραστηρίων, διαφορετικούς χρόνους (Κουππάρης n.d.).

Ανιχνευσιμότητα (Detectability)

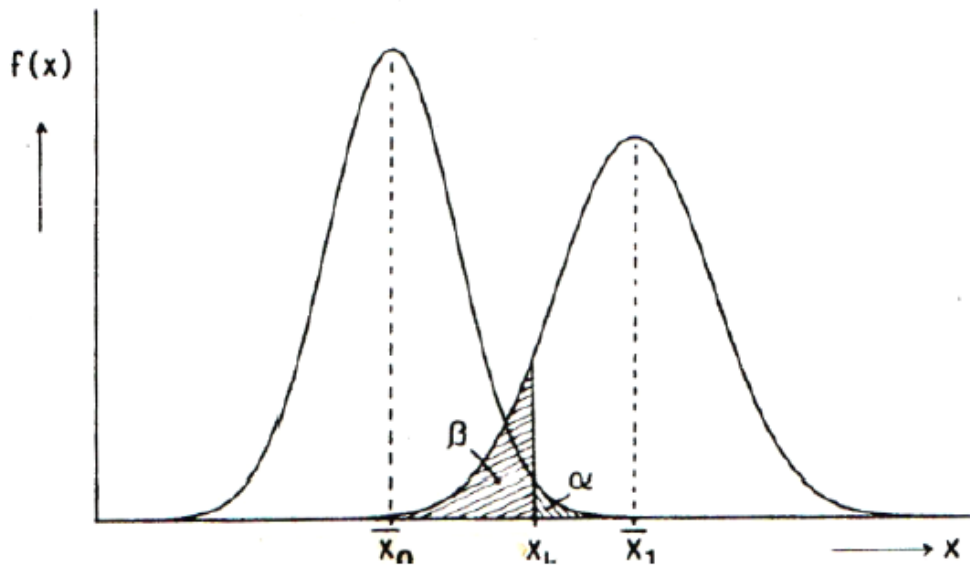
Η ανιχνευσιμότητα εκφράζει την ικανότητα της μεθόδου να ανιχνεύει/ποσοτικοποιεί χαμηλές συγκεντρώσεις του αναλύτη. Η ικανότητα αυτή ποσοτικοποιείται με δύο εκφράσεις:

- Όριο ανιχνεύσεως (Detection Limit, DL ή LOD)
- Όριο ποσοτικοποίησης (Quantitation Limit, QL ή LOQ)

Ο ορισμός αυτών των ορίων βασίζεται στην ικανότητα της μεθόδου να διακρίνει το σήμα του αναλύτη από το σήμα του υποβάθρου ή θορύβου και τα επιτρεπόμενα σφάλματα πρώτου και δευτέρου είδους (Κουππάρης n.d.). Το όριο ποσοτικοποίησης προσδιορίζεται ως το ελάχιστο επίπεδο συγκέντρωσης στο οποίο ο αναλυτής μπορεί να προσδιοριστεί αξιόπιστα (με αποδεκτή ορθότητα και πιστότητα).

Όριο ανιχνεύσεως: Η συγκέντρωση του αναλύτη της οποίας το αναλυτικό σήμα διαφέρει από το σήμα του λευκού δείγματος κατά 3,3 φορές την τυπική απόκλιση του σήματος του λευκού (Εικόνα 2.7).

Όριο ποσοτικοποίησης: Η συγκέντρωση του αναλύτη της οποίας το αναλυτικό σήμα διαφέρει από το σήμα του λευκού δείγματος κατά 10 φορές την τυπική απόκλιση του σήματος του λευκού (Κουππάρης n.d.).



Εικόνα 2.7: Έννοια του ορίου ανίχνευσης.

όπου :

x_0 = Μέσο σήμα λευκού δείγματος,

x_1 = Μέσο σήμα δείγματος,

x_k = τιμή κριτηρίου,

α = πιθανότητα ότι το σήμα του λευκού θεωρείται ως σήμα αναλύτη,

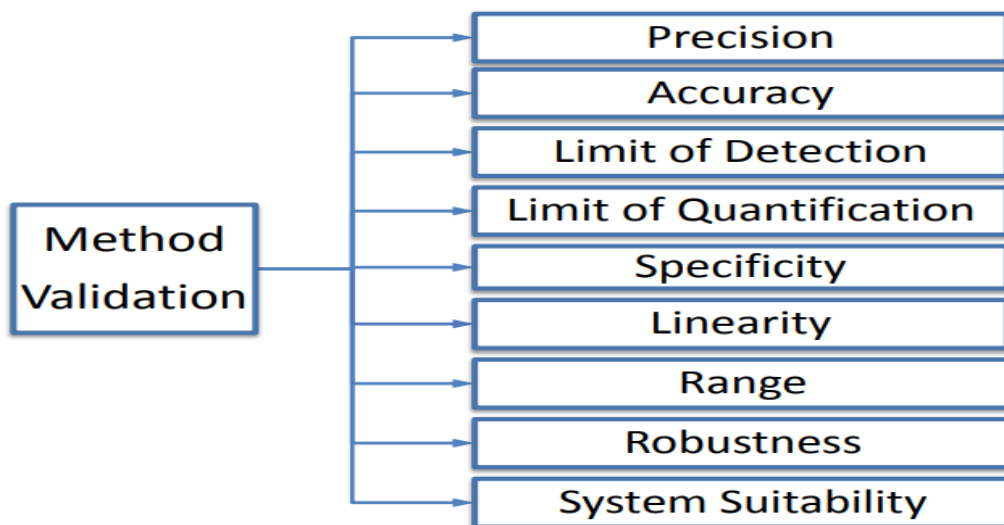
β = πιθανότητα ότι το σήμα του δείγματος θεωρείται ως σήμα λευκού δείγματος

Γραμμικότητα (Linearity)

Εξετάζεται σε όλο το εύρος της περιοχής συγκεντρώσεων (range) της αναλυτικής μεθόδου και αποδεικνύεται απευθείας στην καθαρή προσδιοριζόμενη ουσία (αραιώσεις ενός προτύπου διαλύματος παρακαταθήκης), ή/και ξεχωριστές ζυγίσεις συνθετικού μείγματος των συστατικών ενός προϊόντος, και εφαρμογή της ελεγχόμενης αναλυτικής μεθόδου (εξετάζεται κατά τον έλεγχο της περιοχής συγκεντρώσεων) (Κουππάρης n.d.).

Η γραμμικότητα αποδεικνύεται με οπτική εξέταση του διαγράμματος αναλυτικό σήμα ως προς συγκέντρωση ή περιεκτικότητα του αναλύτη. Στη συνέχεια αξιολογείται με στατιστικές μεθόδους (ανάλυση παλινδρόμησης

ελαχίστων τετραγώνων, least squares regression analysis) και υπολογίζεται η εξίσωση της ευθείας παλινδρόμησης. Ο συντελεστής συσχέτισης (correlation coefficient), η τομή στον άξονα των y (y-intercept), η κλίση (slope) της ευθείας παλινδρόμησης και η τυπική απόκλιση των υπολοίπων ($S_{y/x}$) (τυπικό σφάλμα) περιλαμβάνονται στο φάκελο της μεθόδου. $Y = a (\pm S_a) + b (\pm S_b) X$, $r = \dots\dots\dots$, $S_{y/x} = \dots\dots\dots$ (Κουππάρης n.d.) (Εικόνα 2.8).



Εικόνα 2.8: Παράμετροι Επικύρωσης Μεθόδων (Οδηγός International Committee for Harmonization, ICH).

Κεφάλαιο 3. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

3.1. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Τα αναλυτικά πρότυπα (αντιβιοτικά) αγοράστηκαν από την εταιρία Sigma-Aldrich και ήταν της μέγιστης δυνατής καθαρότητας. Οι διαλύτες (μεθανόλη, φορμικό οξύ, ακετονιτρίλιο και ύδωρ) που χρησιμοποιήθηκαν ήταν της εταιρείας T.J. Baker. Το διάλυμα EDTA παρασκευάστηκε από υλικά που αγοράστηκαν από την εταιρία Sigma-Aldrich. Η πλατφόρμα ανάδευσης, το λουτρό υπερήχων, η φυγόκεντρος και ο περιστροφικός εξατμιστήρας κενού διατίθενται στο Εργαστήριο Φυσιολογίας Θρέψεως και Διατροφής του Γ.Π.Α., όπως και τα υπόλοιπα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν (σωλήνες φάλκον, φίλτρα σύριγγας PVDF και φυσίγγια στερεάς εκχύλισης SPE).

Το σύστημα υγρής χρωματογραφίας συνδεδεμένο με δίδυμη φασματομετρία μαζών τριπλού τετραπόλου (HPLC-MS-MS) που χρησιμοποιήθηκε είναι της εταιρείας (Thermo Scientific High Performance Liquid Chromatography system coupled to a TSQ Quantum Vantage, Thermo Fischer Scientific, San Jose, CA) του εργαστηρίου Φυσιολογίας Θρέψεως και Διατροφής του Γ.Π.Α.. Η φασματομετρική ανάλυση μαζών διενεργήθηκε με θερμικό ιονισμό ηλεκτροψεκασμού (Heated Electrospray Ionization, HESI). Οι συνθήκες εργασίας ήταν οι ακόλουθες: τάση ψεκασμού 4,2 kV, θερμοκρασίες του εξατμιστή και του τριχοειδούς 280 °C και 260 °C, το περίβλημα και το βοηθητικό αέριο στις 60 και 40 αυθαίρετες μονάδες. Ο διαχωρισμός της υγρής χρωματογραφίας επετεύχθη επί Hypersil Gold, 3 mm, 150 3 mm i.d. της χρωματογραφικής στήλης (Thermo Fischer Scientific, San Jos, CA).

Η κινητή φάση που χρησιμοποιήθηκε για το διαχωρισμό των δραστικών ουσιών αποτελείται από: κανάλι (A) 0,3% φορμικό οξύ σε νερό και κανάλι (B) ακετονιτρίλιο. Ο ρυθμός ροής διατηρήθηκε σε 0.5 mL/min. Το σύστημα βαθμιδωτής έκλουσης αποτελείται από: 25% B (0 λεπτά), 25% B (5 λεπτά), 30% B (10 λεπτά), 40% B (15 λεπτά), 50% B (20 λεπτά) B (30 λεπτά) όπου η κινητή φάση παρέμεινε για επιπλέον 5 λεπτά και επανήλθε βαθμιαία εντός 2 λεπτών στις αρχικές συνθήκες, και παρέμεινε για επιπλέον 2 λεπτά. Μετά την

διαδικασία αυτή ακολούθησε μια περίοδος εξισορρόπησης 15 λεπτών πριν την έγχυση του επόμενου δείγματος.

Οι κορυφές ταυτοποιήθηκαν συγκρίνοντας τον χρόνο κατακράτησής τους και αντιπαραβάλλοντας τα δεδομένα που ελήφθησαν από τη φασματομετρία μάζας με τα αντίστοιχα των ενώσεων αναφοράς. Σε ότι αφορά τη ποσοτικοποίηση των ευρεθεισών δραστικών ουσιών στα εκάστοτε δείγματα, αυτή πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας τις αντίστοιχες καμπύλες βαθμονόμησης που ελήφθησαν για τις πρότυπες ενώσεις αναφοράς. Όλα τα πρότυπα διαλύθηκαν σε μεθανόλη.

3.2. ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑ

Για το σκοπό της εργασίας που ήταν η ανίχνευση υπολειμμάτων αντιβιοτικών σε προϊόντα ζωικής προέλευσης και πιο συγκεκριμένα της Τριμεθοπρίμης (Trimethoprim), Ενροφλοξασίνης (Enrofloxacin), Οξυτετρακυκλίνης (Oxytetracycline), Τιλμικοσίνης (Tilmicosin), Φλουμεκίνης (Flumequine), Κολιστίνης (Colistin), Χλωραμφενικόλης (Chloramphenicol), Τετρακυκλίνης (Tetracycline), Σουλφαμεθαζίνη (Sulfamethazine) και Κλαριθρομυκίνης (Clarithromycin), συλλέχθηκαν δείγματα αυγών και γάλακτος από καταστήματα λιανικής πώλησης. Τα δείγματα που συλλέχθηκαν αφορούν τόσο βιολογικά όσο και συμβατικά αυγά και γάλατα του εμπορίου. Τα δείγματα που προέρχονταν από το Γ.Π.Α., ορίστηκαν ως δείγματα αναφοράς (blank). Τα υπόλοιπα δείγματα προέρχονται από διάφορες ελληνικές εταιρίες που στην παρούσα εργασία αναφέρονται μόνο με κωδικούς για λόγους προστασίας των δεδομένων τους. Η πειραματική διαδικασία είναι όμοια για τα δείγματα των αυγών και για τα δείγματα του γάλακτος. Το σύνολο των δειγμάτων που συλλέχθηκαν και αναλύθηκαν είναι οκτώ από πέντε διαφορετικές εταιρίες. Πιο συγκεκριμένα, δύο δείγματα βιολογικών αυγών από δύο διαφορετικές εταιρίες, δύο δείγματα συμβατικών αυγών από διαφορετικές εταιρίες, ένα δείγμα βιολογικού και ένα δείγμα συμβατικού γάλακτος από διαφορετικές εταιρίες, ένα δείγμα αναφοράς από το Γ.Π.Α. για τα αυγά και ένα δείγμα αναφοράς από το Γ.Π.Α. για το γάλα.

3.3. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΥΠΟ ΜΕΛΕΤΗ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΩΝ

3.3.1. ΑΥΓΑ

Σε 2 g ομογενοποιημένα αυγά που είναι τοποθετημένα σε σωλήνα τύπου φάλκον (15 mL) προστίθενται 8 mL μίγματος ακετονιτριλίου:νερού, 4:1 (που περιέχει 0.1% φορμικό οξύ) και 0.5 mL διαλύματος EDTA (0.1 M). Το προκύπτον μίγμα αναδεύεται σε πλατφόρμα ανάδευσης για 10 min στις 250 rpm και εν συνεχεία σε λουτρό υπερήχων για 20 min. Το μίγμα φυγοκεντρείται για 10 min στις 4500 rpm σε θερμοκρασία 10 °C και η υπερκείμενη στιβάδα συλλέγεται. Κατόπιν, διαβιβάζεται σε προ-ενεργοποιημένο (με 0.5 mL διαλύματος 0.1% φορμικού οξέος σε ακετονιτρίλιο) φυσίγγιο στερεάς εκχύλισης (Hybrid SPE) οπότε με εφαρμογή κενού διέρχεται το μίγμα από το πληρωτικό υλικό του φυσίγγιου. Προστίθεται 1 mL του διαλύματος 0.1% φορμικού οξέος σε ακετονιτρίλιο και διαβιβάζεται για την ολική παραλαβή των δραστικών ουσιών. Στη συνέχεια, τόσο το πρώτο όσο και το δεύτερο έκπλυμα από το φυσίγγιο, ενώνονται και εξατμίζονται έως ξηρού υπό κενό (σε περιστροφικό εξατμιστήρα, σε θερμοκρασία <35 °C). Τέλος, το ξηρό υπόλειμμα επαναδιαλύεται σε 1 mL του διαλύματος 0.1% φορμικού οξέος σε ακετονιτρίλιο, φιλτράρεται (0.45 μm, PVDF φίλτρα σύριγγας) και εγχύεται στο χρωματογραφικό σύστημα (LC-ESI-MS/MS). Εξετάστηκε η υπολειμματικότητα των ακόλουθων αντιβιοτικών: Τριμεθοπρίμη (Trimethoprim), Ενροφλοξασίνη (Enrofloxacin), Οξυτετρακυκλίνη (Oxytetracycline), Τιλμικοσίνη (Tilmicosin), Φλουμεκίνη (Flumequine), Κολιστίνη (Colistin), Χλωραμφενικόλη (Chloramphenicol), Τετρακυκλίνη (Tetracycline), Σουλφαμεθαζίνη (Sulfamethazine) και Κλαριθρομυκίνη (Clarithromycin).

3.3.2. ΓΑΛΑ

Σε 1 mL γάλα που είναι τοποθετημένα σε σωλήνα τύπου φάλκον (15 mL) προστίθενται 6 mL ακετονιτριλίου που περιέχει 0.1% φορμικό οξύ σε δυο ισόποσες δόσεις (3 mL) με έντονη ανάδευση για 30 sec σε κάθε μία προσθήκη. Το προκύπτον μίγμα αναδεύεται σε πλατφόρμα ανάδευσης για 10 min στις 250 rpm. Το μίγμα φυγοκεντρείται για 5 min στις 4500 rpm σε θερμοκρασία 10 °C και η υπερκείμενη στιβάδα συλλέγεται. Στη συνέχεια

διαβιβάζεται σε έτερο σωλήνα τύπου φάλκον (15 mL) ο οποίος περιέχει 100 mg C18 υλικό και το προκύπτον μίγμα ανακινείται σε αναδευτήρα περιδίνησης για 30 sec. Στη συνέχεια φυγοκεντρείται για 5 min στις 4500 rpm σε θερμοκρασία 10°C και η υπερκείμενη στιβάδα συλλέγεται σε σωλήνα τύπου φάλκον (15 mL) και τοποθετείται στους -18 °C για 1 h. Έπειτα το μίγμα φυγοκεντρείται για 10 min στις 4500 rpm σε θερμοκρασία 10 °C και η υπερκείμενη στιβάδα συλλέγεται και εξατμίζεται με την βοήθεια ρεύματος αζώτου σε water bath στους 35°C, έως όγκου 1 mL. Στο υπόλειμμα προστίθενται 1 mL H₂O, αυτό φιλτράρεται (0.45 μm, PVDF φίλτρα σύριγγας) σε ειδικό φιαλίδιο του HPLC και εγχύεται στο χρωματογραφικό σύστημα (LC-ESI-MS/MS). Εξετάστηκε η υπολειμματικότητα των ίδιων αντιβιοτικών με παραπάνω.

3.3.2.1. Φορτίσεις τυφλών δειγμάτων μήτρας

Για την παρασκευή των φορτισμένων δειγμάτων ακολουθούνται οι ίδιες πειραματικές πορείες με παραπάνω, χρησιμοποιώντας ως αρχικό διάλυμα εργασίας μεθανολικό μίγμα των δραστικών ουσιών σε συγκέντρωση 5 μg/mL σε μεθανόλη (χωρίς να χρειάζεται προσαρμογή των όγκων λόγω των μικρών όγκων φόρτισης). Το διάλυμα αυτό παρασκευάζεται από τα σχετικά διαλύματα παρακαταθήκης των δραστικών ουσιών της μεθόδου.

3.3.2.2. Γραμμικότητα της αναλυτικής μεθόδου-επικύρωση

Η γραμμικότητα της μεθόδου μελετήθηκε σε εύρος συγκεντρώσεων από 5-500 ng/mL, χρησιμοποιώντας 7 επίπεδα συγκέντρωσης (5,10, 20, 50, 100, 200, 500 ng/mL) με τρεις (n=3) επαναλαμβανόμενες μετρήσεις-προσδιορισμούς ανά έκαστο επίπεδο.

Υγρή χρωματογραφία φασματομετρίας μάζας τριπλού τετραπόλου με τη τεχνική ηλεκτροψεκασμού (LC-ESI-MS/MS)

Στη παρούσα διατριβή και για την ανίχνευση-ποσοτικοποίηση των υπολειμμάτων των αντιβιοτικών ουσιών χρησιμοποιήθηκε η τεχνική MS/MS με τη παρακολούθηση πολλαπλών μεταπτώσεων (Multiple Reaction Monitoring, MRM mode) για κάθε μία δραστική ουσία. Επίσης και η παρακολούθηση μεμονωμένων ιόντων (Selected Ion Monitoring, SIM mode) ήταν ικανή να οδηγήσει σε ανίχνευση και ποσοτικοποίηση των παραπάνω

δραστικών ουσιών, με υψηλότερα όμως όρια ανίχνευσης/ποσοτικοποίησης για κάποιες από αυτές.

Παρακάτω παρατίθεται Πίνακας 3.1 με τις μεταπτώσεις της μεθόδου LC-ESI-MS/MS και τα χαρακτηριστικά τους που επιλέχθηκαν στη συγκεκριμένη μέθοδο για τα αντιβιοτικά που μελετήθηκαν.

Πίνακας 3.1: Μεταπτώσεις ιόντων της μεθόδου LC-ESI-MS/MS και ιόντα παρακολούθησης στην SIM mode.

Δραστική ουσία	Πρόδρομο Ιόν (m/z)	Θυγατρικό Ιόν (m/z)	Ενέργεια Σύγκρουσης, CE(EV)	Ιονισμός	Ιόντα παρακολούθησης (SIM mode)
Οξυτετρακυκλίνη	461,1	426,3 ^π	18	ESI(+)	461,1-426,3-444,3
		444,3	18		
Τριμεθοπρίμη	290,8	230,2 ^π	30	ESI(+)	290,8-230,2-275
		275	24		
Ενροφλοξασίνη	360,2	316,3 ^π	28	ESI(+)	360,2-316,3-245,2
		245,2	22		
Τιλμικοσίνη	916	174 ^π	18	ESI(+)	916-174-101
		101	24		
Φλουμεκίνη	262,3	244,2 ^π	32	ESI(+)	262,3-244,2-202,3
		202,3	27		
Κολιστίνη Β	578,8	227,3 ^π	30	ESI(+)	578,8-227,3-101,2
		101,2	41		
Κολιστίνη Α	585,7	241,4 ^π	28	ESI(+)	585,7-241,4-101,2
		101,2	38		
Χλωραμφενικόλη	321	257	7	ESI(-)	321-257-152

		152 ^π	15		
Τετρακυκλίνη	445,1	427 ^π	24	ESI(+)	445,1-427-410
		410	37		
Σουλφαμεθαζίνη	279,1	124 ^π	25	ESI(+)	279,1-124-92,1
		92,1	13		
Κλαριθρομυκίνη	748,5	157,9	33	ESI(+)	748,5-157,9- 590,1
		590,1 ^π	17		

π: ιόν ποσοτικοποίησης

4.1. Επικύρωση της αναλυτικής μεθόδου-αποτελέσματα

Στον παρακάτω Πίνακας 4.1 αναγράφονται τα στοιχεία που αφορούν στην επικύρωση της αναλυτικής μεθόδου για το γάλα, ενώ αντίστοιχα αποδεκτές τιμές ελήφθησαν και για την μέθοδο στα αυγά. Η γραμμικότητα της μεθόδου μελετήθηκε στο εύρος συγκεντρώσεων από 5-500 ng/mL με αποδεκτές τιμές συντελεστή συσχέτισης $r^2 > 0.99$. Σε ότι αφορά την ανάκτηση (recovery) των δραστικών ουσιών οι τιμές των ανακτήσεων των ουσιών και στα δύο επίπεδα φόρτισης (10 και 100 ng/g), και για τα δύο υποστρώματα (γάλα και αυγά) που μελετήθηκαν κυμαίνονταν εντός του αποδεκτού εύρους 70-120% (RSD% 20%).

Αναφορικά με τις μελέτες επαναληψιμότητας και αναπαραγωγιμότητας που εκφράζουν την πιστότητα της μεθόδου, οι τιμές των % σχετικών τυπικών αποκλίσεων (RSD%) ήταν για όλες τις δραστικές ουσίες κατώτερες του 20%. Σε ότι αφορά την επίδραση της μήτρας (Matrix effect, ME) (γάλα, αυγά) έγινε σύγκριση των αποκρίσεων των αντιβιοτικών ουσιών αλλά και των κλίσεων (slopes) των καμπυλών βαθμονόμησης των δέκα δραστικών ουσιών σε εκχυλίσματα τυφλής μήτρας και σε αντίστοιχα εκχυλίσματα εμβολιασμένα με το μίγμα των δραστικών ουσιών (Fraselle et al. 2007). Τα αποτελέσματα έδειξαν μικρή επίδραση της μήτρας (ME%, 10-23%), γεγονός που αποδεικνύει και την ειδικότητα (specificity) των μεθόδων στο γάλα και τα αυγά. Στο πλαίσιο αυτό πρέπει να τονιστεί ότι η ποσοτικοποίηση των δραστικών ουσιών πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας είτε φορτισμένα εκχυλίσματα της μήτρας, είτε φορτισμένες μήτρες οι οποίες κατεργάστηκαν με την ίδια πειραματική διαδικασία. Στη συνέχεια τα αποτελέσματα προσδιορίστηκαν είτε μέσω των καμπυλών βαθμονόμησης είτε με τη μέθοδο παρεμβολής για κάθε δραστική ουσία.

Πίνακας 4.1: Χαρακτηριστικά επικύρωσης αναλυτικής μεθόδου στο γάλα.

Δραστική ουσία	Εύρος Συγκέντρωσης 5-500 (ng/mL)	Συντελεστής Συσχέτισης (R ²)	Ανάκτηση ±RSD %, n = 5		Επαναληψιμότητα, RSD % n = 5	Αναπαραγωγιμότητα, RSD % n = 5
			10 ng/g	100 ng/g		
Ενροφλοξασίνη	$y=25618x+567009$	0,9961	79±8	81±6	3,3	5,7
Κλαριθρομυκίνη	$y=3202,2x-23055$	0,9995	84±10	93±14	4,8	7,4
Σουλφαμεθαζίνη	$y=5503,8x-3222,5$	0,9993	77±8	90±7	9,4	13,9
Τετρακυκλίνη	$y=56481,8x+237884$	0,9899	86±10	84±9	10,5	12,1
Τριμεθοπρίμη	$y=49932x+882101$	0,9977	92±9	104±12	14,8	14,2
Οξυτετρακυκλίνη	$y=10199,5x+302655$	0,9945	81±7	90±7	10,6	19,2
Χλωραμφενικόλη	$y=213775x-4088900$	0,9936	78±6	80±6	7,7	10,5
Φλουμεκίνη	$y=7009x+59875$	0,9972	73±5	79±6	10,5	9,8
Τιλμικοσίνη	$y=50982,5x+599502$	0,9980	79±10	83±12	8,4	17,5
Κολλιστίνη Α	$y=92172,6x-673603$	0,9988	100±14	88±9	14,8	13,9
Κολλιστίνη Β	$y=26579x-343998$	0,9928	90±9	84±14	12,5	15,7

Σε ότι αφορά το όριο ποσοτικοποίησης της μεθόδου (LOQ) αυτό προσδιορίστηκε στα 10 ng/g γεγονός που πιστοποιήθηκε και από τη μελέτη ανάκτησης στο συγκεκριμένο επίπεδο συγκέντρωσης.

Τα αποτελέσματα των αναλύσεων των δειγμάτων που ελέγχθηκαν παρουσιάζονται στους Πίνακας 4.2 και Πίνακας 4.3. Σε περιορισμένα δείγματα αυγών και γάλακτος ανιχνεύθηκαν κατάλοιπα αντιβιοτικών. Πιο συγκεκριμένα, σε δείγματα συμβατικών αυγών, ανιχνεύθηκε η Ενροφλοξα σίνη (Enrofloxacin) σε $21,9 \pm 3,4$ (ng/g) και η Σουλφαμεθαζίνη (Sulfamethazine) σε $17,3 \pm 2,9$ (ng/g). Σε δείγματα βιολογικού γάλακτος, ανιχνεύθηκε η Κλαριθρομυκίνη (Clarithromycin) σε $20,9 \pm 6,8$ (ng/g) και η Τριμεθοπρίμη (Trimethoprim) σε $18,1 \pm 1,8$ (ng/g). Τέλος, σε δείγματα συμβατικού γάλακτος, ανιχνεύθηκε η Κλαριθρομυκίνη (Clarithromycin) σε $25,6 \pm 5,5$ (ng/g).

Πίνακας 4.2: Αποτελέσματα αναλύσεων στο θετικό δείγμα αυγών.

ΑΥΓΟ	Ενροφλοξασίνη ng/g	Σουλφαμεθαζίνη ng/g
ΣΥΜΒΑΤΙΚΟ	21,9±3,4	17,3±2,9

Πίνακας 4.3: Αποτελέσματα αναλύσεων στα θετικά δείγματα γάλακτος.

ΓΑΛΑ	Κλαριθρομυκίνη ng/g	Τριμεθοπρίμη ng/g
ΒΙΟΛΟΓΙΚΟ	20,9±6,8	18,1±1,8
ΣΥΜΒΑΤΙΚΟ	25,6±5,5	-

Κεφάλαιο 5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Τα δείγματα γάλακτος και αυγών που συλλέχθηκαν και αναλύθηκαν είναι από διαφορετικές ελληνικές εταιρίες, με βιολογική αλλά και με συμβατική ετικέτα. Τα κατάλοιπα των αντιβιοτικών που ανιχνεύθηκαν στα δείγματα συμβατικών αυγών και σε δείγματα συμβατικού γάλακτος είναι κάτω από τα ανώτατα όρια καταλοίπων στα τρόφιμα ζωικής προέλευσης που καθορίζονται από τον κανονισμό (Ε.Ε.) αριθ. 37/2010 της επιτροπής. Καθώς το ποσοστό ανίχνευσης των συγκεκριμένων αντιβιοτικών στα δείγματα είναι πολύ μικρό, μπορεί να θεωρηθεί ότι δεν θέτουν σε κίνδυνο την υγεία και την ασφάλεια των καταναλωτών.

Σε ένα από τα δείγματα βιολογικού γάλακτος ανιχνεύθηκε η Κλαριθρομυκίνη και η Τριμεθοπρίμη. Όμως το βιολογικό γάλα, σύμφωνα με την νομοθεσία, πρέπει να είναι απαλλαγμένο από οποιαδήποτε κατάλοιπα αντιβιοτικών, αντιπαρασιτικών κτηνιατρικών φαρμάκων (αλλοπαθητικών) καθώς απαγορεύεται ακόμα και η προληπτική χορήγηση και σε περίπτωση που αυτή κρίνεται απαραίτητη ο χρόνος αναμονής είναι διπλάσιος από αυτόν που προβλέπει η νομοθεσία για τις συμβατικές εκτροφές (κανονισμός (Ε.Κ.) αριθ. 889/2008 της επιτροπής).

Στη διεθνή βιβλιογραφία υπάρχουν εξαιρετικά περιορισμένες αναφορές για ανίχνευση υπολειμμάτων αντιβιοτικών δραστικών ουσιών σε βιολογικό γάλα. Αυτό είναι φυσιολογικό κρίνοντας τα πολύ αυστηρά κριτήρια που έχουν θεσπιστεί τόσο στο κομμάτι της παραγωγής, όσο και στον έλεγχο των υπολειμμάτων τόσο στο συμβατικό όσο και στο βιολογικό γάλα. Συγκεκριμένα οι Ürkek και οι συνεργάτες, ανέφεραν την ανίχνευση υπολειμμάτων σε δείγματα οργανικού γάλατος από την Τουρκία, σε μία μελέτη η οποία εστίαζε στη σύγκριση των δύο τύπων γάλατος σε διάφορα κριτήρια (Ürkek et al. 2017).

Σε πιο ευρύ πλαίσιο και σε ότι αφορά την εύρεση ρυπαντών σε βιολογικά προϊόντα υπάρχουν αναφορές για εύρεση άλλων τύπων ρυπαντών-ξενοβιοτικών παραγόντων, εκτός από τα αντιβιοτικά σε αντίστοιχα προϊόντα. Το 1997 ο Smith και οι συνεργάτες δημοσίευσαν ερευνητικά αποτελέσματα

στην υπολειμματικότητα φυτοφαρμακών, αντιβιοτικών και άλλων ξενοβιοτικών σε βιολογικό και συμβατικό βοδινό κρέας (Smith et al. 1997). Η μελέτη δεν έδειξε υπολειμματικότητα σε αντιβιοτικά στο βιολογικό κρέας, ωστόσο ανιχνεύτηκαν υπολείμματα φυτοφαρμάκων σε αυτό. Χαρακτηριστικά, ο Ghidini και οι συνεργάτες δημοσίευσαν εργασία στην οποία ανέφεραν την ανίχνευση ρυπαντών (π.χ. βαρέα μέταλλα, πολυχλωριωμένα διφαινύλια PCBs) και σε βιολογικό γάλα, σε επίπεδα όμως χαμηλότερα των ορίων εκείνων που θέτουν σε κίνδυνο την υγεία του καταναλωτή (Ghidini et al. 2005).

Διαρκής στόχος του κλάδου των τροφίμων αποτελεί η παραγωγή ασφαλών και ποιοτικών προϊόντων με αυξημένη διατροφική αξία και επιθυμητές οργανοληπτικές ιδιότητες. Αρχικά, για να εξασφαλιστεί η ασφάλεια των τροφίμων, η καλύτερη πληροφόρηση των αγροτών κρίνεται απαραίτητη. Επιπλέον, αυστηρότεροι και συχνότεροι έλεγχοι, με σκοπό την εξασφάλιση της εμπιστοσύνης των καταναλωτών στην ακεραιότητα της τροφικής αλυσίδας. Επομένως, πρέπει να αναπτυχθεί ένα πιο ολοκληρωμένο και αποτελεσματικό σύστημα ελέγχου αλλά και να πραγματοποιούνται τακτικοί έλεγχοι και τυχαίες δειγματοληψίες.

Οι καταναλωτές από την μεριά τους οφείλουν να αναζητούν αξιόπιστες πληροφορίες για το προϊόν πριν πραγματοποιηθεί η αγορά τους. Οι πληροφορίες που πρέπει να εξετάζει ο κάθε καταναλωτής είναι η επωνυμία του προμηθευτή, ο κωδικός παρτίδας προμηθευτή, η ημερομηνία παράδοσης, η βεβαίωση αποδοχής και τα αποτελέσματα του ποιοτικού ελέγχου. Οι παραπάνω πληροφορίες ενδεχομένως πιστοποιούν περισσότερο την ποιότητα του προϊόντος.

Συμπερασματικά, κρίνεται αναγκαία η συνεχής βελτίωση των ελέγχων σε ολόκληρη την αλυσίδα, ώστε να εξασφαλίζεται η υψηλού επιπέδου προστασία της υγείας των ανθρώπων, των ζώων και των φυτών αλλά και η ορθή εφαρμογή της νομοθεσίας σε όλη την τροφική αλυσίδα. Στην περίπτωση που κατάλοιπα των αντιβιοτικών ανιχνευθούν πάνω από τα ανώτατα όρια καταλοίπων στα τρόφιμα ζωικής προέλευσης, τότε η ολιστική αξιολόγηση των αποτελεσμάτων και η εκτίμηση του κινδύνου είναι απαραίτητες, ώστε να

διαπιστωθεί ο βαθμός έκθεσης του πληθυσμού, και να παρασχεθούν οι αναγκαίες πληροφορίες στις αρμόδιες αρχές για λήψη αποτελεσματικών μέτρων.

Κεφάλαιο 6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

6.1. ΕΛΛΗΝΙΚΗ

Γεωργαλλάς, Γ. & Ηροδότου, Η., Ανάκληση και ιχνηλασιμότητα των τροφίμων. *Οδηγός Υγιεινής για τις επιχειρήσεις τροφίμων*, pp.1–44.

Ζέρβας, Γ., Καλαϊσάκης, Π. & Φεγγερός, Κ., 2004. *Διατροφή αγροτικών ζώων* 2nd ed., Αθήνα: Σταμούλη.

Καλογερόπουλος, Ν., Τοξικοί παράγοντες σε τρόφιμα και σχετική νομοθεσία.

Καμιναρίδης, Σ. & Μοάτσου, Γ., 2009. *Γαλακτοκομία*, Αθήνα: Έμβρυο.

Κουππάρης, Μ., Επικύρωση/Επαλήθευση αναλυτικών μεθόδων (2). *Έλεγχος και Διασφάλιση Ποιότητας - Διαπίστευση*.

Κυριακίδης, Σ., 2005. Ιχνηλασιμότητα και ασφάλεια των τροφίμων. *Διαχείριση Ασφάλειας στην Αλυσίδα Τροφίμων – Εφαρμογή HACCP. Εμπειρίες – Προβλήματα – Εξελίξεις - Πιστοποίηση*, pp.1–7.

Μαντής, Α. et al., 2015. *Υγιεινή και τεχνολογία του γάλακτος και των προϊόντων του*, Θεσσαλονίκη: Αδελφοί Κυριακίδη.

Μουζούρας, Σ.Γ., 1996. *Κτηνιατρική Φαρμακολογία*, Αθήνα.

Ρογδάκης, Ε., 2006. *Γενική Ζωοτεχνία*, Αθήνα: Σταμούλη.

Τσιγκοΐδα, Α., Μανωλκίδης, Κ.Σ. & Φωτακόπουλος, Θ., 1988. *Αντιβιοτικά και μαστίτιδες* 2nd ed., Αθήνα: Εθνική επιτροπή γάλακτος.

Φεγγερός, Κ., 2008. Ποιότητα ζωοτροφών και παραγωγή ζωικών προϊόντων. *1ο Πανελλήνιο Συνέδριο για το Κρέας και τα Προϊόντα του*, pp.21–23.

Χατζηγεωργίου, Ι., 2008. Η συμβολή της βόσκησης στην παραγωγή ποιοτικού κρέατος. *1ο Πανελλήνιο Συνέδριο για το Κρέας και τα Προϊόντα του*, pp.25–27.

Χατζηγιάννου, Θ. & Κουππάρης, Μ., 2010. *Ενόργανη ανάλυση* Μαυρομάτη., Αθήνα.

- Addison, J.B., 1984. Antibiotics in sediments and run-off waters from feedlots. *Residue Reviews*, 92, pp.1–24.
- Aerts, M.M., Hogenboom, A.C. & Brinkman, U.A., 1994. Analytical strategies for the screening of veterinary drugs and their residues in edible products. *Journal of Chromatography B*, 667, pp.1–40.
- Aguilera-Luiz, M.M. et al., 2008. Multi-residue determination of veterinary drugs in milk by ultra-high-pressure liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1205, pp.10–16.
- Ahmed, A. et al., 2009. Genetic analysis of antimicrobial resistance in *Escherichia coli* isolated from diarrheic neonatal calves. *Veterinary Microbiology*, 136(3-4), pp.397–402.
- Alberto, B., Olaizolab, A. & Corcoranc, K., 2003. Extrinsic Attributes of Red Meat as Indicators of Quality in Europe: An Application for Market Segmentation. *Food Quality and Preference*, 14, pp.265–76.
- Alexander, F., 1976. *An introduction to veterinary pharmacology* 3rd ed., London and New York: Churchill livingstone.
- Anon, Αρχές και νομοθεσία περί ασφάλειας τροφίμων, Ορθή Βιομηχανική Πρακτική – Υγιεινή, Ιχνηλασιμότητα. In pp. 1–29.
- Anon, Codex Veterinary Drugs Residues in Food online database. Available at: <http://www.codexalimentarius.net/vetdrugs/data/index.html?lang=en> [Accessed October 5, 2017b].
- Anwander, P.-H., Sybil & Fawaz, R.B., 2003. Swiss Market for Meat from Animal-friendly Production Responses of Public Private Actors in Switzerland. *Journal of Agricultural and Environmental Economics*, 16, pp.119–36.
- Barlow, J., 2011. Mastitis therapy and antimicrobial susceptibility: a multispecies review with a focus on antibiotic treatment of mastitis in dairy cattle. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, 16, pp.383–407.

- Beltrán, M. et al., 2015. Performance of the current microbial tests for screening antibiotic in sheep and goat Milk. *International Dairy Journal*, 41, pp.13–15.
- Bergamo, P. et al., 2003. Fat-soluble vitamin contents and fatty acid composition in organic and conventional Italian dairy products. *Food Chemistry*, 82, pp.625–631.
- Berruga, M.I. et al., 2008. Short communication: Antibiotic residues in milk following the use of intravaginal sponges for estrus synchronization in dairy ewes. *Journal of dairy science*, 91, pp.3917–3921.
- Bion, C. et al., 2016. Analysis of 27 antibiotic residues in raw cow's milk and milk-based products - validation of Delvotest T. *Food Additives & Contaminants, Part A*, 33(1), pp.54–59. Available at: <http://dx.doi.org/10.1080/19440049.2015.1104731>.
- Bishop, J.R. et al., 1984. Retention data for antibiotics commonly used for bovine infections. *Journal of Dairy Science*, 67, pp.437–440.
- Black, W.D. et al., 1979. A study of drugs residues in milk following intrauterine infusion of antibacterial drugs in lactating cows. *Canadian Veterinary Journal*, 20, pp.354–357.
- Van den Bogaard, A.E. & Stobberingh, E.E., 2000. Epidemiology of resistance to antibiotics. Links between animals and humans. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 14, pp.327–335.
- Bogialli, S. et al., 2009. Development and validation of a rapid assay based on liquid chromatography-tandem mass spectrometry for determining macrolide antibiotic residues in eggs. *Journal of Chromatography A*, 1216(40), pp.6810–6815.
- Bogialli, S. et al., 2009. Simple assay for monitoring seven quinolone antibacterials in eggs: extraction with hot water and liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry: laboratory validation in line with the European Union Commission Decision 657/2002/EC. *Journal of Chromatography A*, 1216, pp.794–800.

- Bourne, D. & Prescott, J., 2002. A comparison of the nutritional value, sensory qualities, and food safety of organically and conventionally produced foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 42, pp.1–34.
- Van Den Brand, H. Parmentier, H.K. & Kemp, B., 2004. Effects of housing system (outdoor vs cages) and age of laying hens on egg characteristics. *British Poultry Science*, 45, pp.745–752.
- Le Breton, M.-H. & Savoy-Perroud, M-C Diserens, J.-M., 2007. Validation and comparison of the Copan milk test and Delvotest SP-NT for the detection of antimicrobials in milk. *Analytica Chimica Acta*, 586, pp.280–283.
- Brom, F.W.A., 2000. Food, Consumer Concerns, and Trust: Food Ethics for a Globalizing Market. *Journal of Agricultural and Environmental Ethics*, 12, pp.127–39.
- Brulc, J., 2009. Genecentric metagenomics of the fiber-adherent bovine rumen microbiome reveals forage specific glycoside hydrolases. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106, pp.1948–1953.
- Bruno, F. et al., 2002. An original approach to determining traces of tetracycline antibiotics in milk and eggs by solid-phase extraction and liquid chromatography/mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 16, pp.1365–1376.
- Capuano, E. et al., 2015. Fatty acid and triglycerides profiling of retail organic, conventional and pasture milk: Implications for health and authenticity. *International Dairy Journal*, 42, pp.58–63. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.idairyj.2014.11.002>.
- Capuano, E., van der Veer, G., et al., 2014. Verification of fresh grass feeding, pasture grazing and organic farming by cows farm milk fatty acid profile. *Food Chemistry*, 164, pp.234–241.
- Capuano, E., Boerrigter-Eenling, R. Elgersma, A. & van Ruth, S.M., 2014. Effect of fresh grass feeding, pasture grazing and organic/biodynamic farming on bovine milk triglyceride profile and implications for authentication. *European Food Research and Technology*, 238, pp.573–

580.

Carlsson, A., Björck, L. & Persson, K., 1989. Lactoferrin and lysozyme in milk during acute mastitis and their inhibitory effect in Delvotest P. *Journal of dairy science*, 72, pp.3166–3175.

Castanon, J.I.R., 2007. History of the use of antibiotic as growth promoters in European poultry feeds. *Poultry Science*, 86, p.2466–2471.

Cerolini, S., Zaniboni, L. & La Cognata, R., 2005. Lipid characteristics in eggs produced in different housing systems. *Italian Journal of Animal Science*, 4, p.520.

Cherian, G., Holsonbake, T.B. & Goeger, M.P., 2002. Fatty acid composition and egg components of specialty eggs. *Poultry Science*, 81, pp.30–33.

Cohen, M., 1998. *Antimicrobial Resistance: Issues and Options*, Washington, DC: National Academies Press.

Commission, E., 2000. The White Paper on Food Safety. Available at: [http://europa.eu.in/comm/dgs/health con-sumer/library/pub/pb06 en.pdf](http://europa.eu.in/comm/dgs/health%20consumer/library/pub/pb06_en.pdf).

Companyó, R. et al., 2009. Antibiotics in food: legislation and validation of analytical methodologies. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 395, pp.877–891.

Cunha, S. et al., 2007. Evaluation of the QuEChERS sample preparation approach for the analysis of pesticide residues in olives. *Journal of Separation Science*, 30, pp.620–632.

Davies, J. & Davies, D., 2010. Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 74, pp.417–433.

Dibner, J.J. & Richards, J.D., 2005. Antibiotic growth promoters in agriculture: history and mode of action. *Poultry Science*, 84, p.634–643.

Dubeuf, J. & Le Jaouen, J., 2005. The sheep and goat dairy sectors in the European Union: present situation and stakes for the future. *International Dairy Federation*, 501, pp.1–6.

- Dubeuf, J., Ruiz-Morales, F. & Castel-Genis, J., 2010. Initiatives and projects to promote the Mediterranean local cheeses and their relations to the development of livestock systems and activities. *Small Ruminant Research*, 93, pp.67–75.
- Dubois, M. et al., 2001. Identification and quantification of five macrolide antibiotics in several tissues, eggs and milk by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 753(B), pp.189–202.
- Duong, V.N. et al., 2006. Preliminary analysis of tetracycline residues in marketed pork in Hanoi, Vietnam. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1081, p.534–542.
- Elgersma, A. et al., 2004. Quick changes in milk fat composition after transition from fresh grass to a silage diet and effects on consumer health benefits. *Animal Feed Science and Technology*, 117, pp.13–27.
- Elgersma, A., van der Hoeven, E. Witkowska, I.M. & Smit, H.J., 2008. Effects of the grazed horizon in perennial ryegrass swards on the conjugated linoleic acid concentration in milk of dairy cows. *Grassland Science in Europe*, 13, pp.388–390.
- Ellis, K.A. et al., 2006. Comparing the fatty acid composition of organic and conventional milk. *Journal of Dairy Science*, 89, pp.1938–1950.
- Ellison, S.L.R. et al., 2003. EURACHEM/CITAC Guide: Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement. *Journal of Analytical Chemistry*, 58(2), p.191.
- Forti, A.F. & Scortichini, G., 2009. Determination of ten sulphonamides in egg by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 637(1–2), pp.214–219.
- Fraselle, S. et al., 2007. Validation of a method for the detection and confirmation of nitroimidazoles and the corresponding hydroxy metabolites in pig plasma by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry *Analytica Chimica Acta*,. *Analytica Chimica*

Acta, (586 (1-2)), pp.383–393.

Frenich, A.G. et al., 2010. Comparison of several extraction techniques for multiclass analysis of veterinary drugs in eggs using ultra-high pressure liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 661(2), pp.150–160.

Gatti, M., Zunino, P. & Ungerfeld, R., 2011. Changes in the aerobic vaginal mucous load after treatment with intravaginal sponges in anoestrous ewes: Effect of medroxyprogesterone acetate and antibiotic treatment use. *Reproduction in Domestic Animals*, 46, pp.205–208.

Gentili, A., Perret, D. & Marchese, S., 2005. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry for performing confirmatory analysis of veterinary drugs in animal-food products. *Trends in Analytical Chemistry*, 24(7), pp.704–733.

Ghidini, S. et al., 2005. Comparison of contaminant and residue levels in organic and conventional milk and meat products from Northern Italy. *Food Additives and Contaminants*, 22(1), pp.9–14.

Giannenas, I. et al., 2009. Trace mineral content of conventional, organic and courtyard eggs analysed by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS). *Food Chemistry*, 114, pp.706–711.

Goshen, T. & Shpigel, N., 2006. Evaluation of intrauterine antibiotic treatment of clinical metritis and retained fetal membranes in dairy cows. *Theriogenology*, 66, pp.2210–2218.

Guerra, M.M.P. et al., 2002. Study of the microbial flora and evaluation of the effectiveness of Gen-tocin® 40 mg in the prevention of vaginal infection in dairy goats submitted to estrous synchronization. *Hora vet.*, 22, pp.13–17.

Gullberg, E. et al., 2011. Selection of resistant bacteria at very low antibiotic concentrations. *PLOS Pathogens*, 7, p.No. e1002158.

Hermansen, J.E., 2003. Organic livestock production systems and appropriate

- development in relation to public expectations. *Livestock Production Science*, 80, pp.3–15.
- Herranz, S., Moreno-Bondi, M.C. & Marazuela, M.D., 2007. Development of a new sample pretreatment procedure based on pressurized liquid extraction for the determination of fluoroquinolone residues in table eggs. *Journal of Chromatography A*, 1140, pp.63–70.
- Hidalgo, A. et al., 2008. A market study on the quality characteristics of eggs from different housing systems. *Food Chemistry*, 106(3), pp.1031–1038.
- Hiemstra, M. & de Kok, A., 2007. Comprehensive multi-residue method for the target analysis of pesticides in crops using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, A 1154, pp.3–25.
- Hilbert, F. & Smulders, F.J.M., 2004. Antibiotics/Resistance in Food-Borne Pathogens. In *Encyclopedia of Meat Science*. Elsevier, pp. 38–43.
- Huang, J.F. et al., 2006. Determination of fluoroquinolones in eggs using in-tube solid-phase microextraction coupled to high-performance liquid chromatography. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 384, pp.1228–1235.
- Jahreis, G., Fritsche, J. & Steinhart, H., 1996. Monthly variations of milk composition with special regard to fatty acids depending on season and farm management systems – Conventional versus ecological. *Lipid/Fett*, 98, pp.356–359.
- Jia, X. et al., 2008. Simultaneous determination of tetracyclines and quinolones antibiotics in eggs by ultra-performance liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *Journal of AOAC International*, 91, pp.461–468.
- Jiang, L. et al., 2013. Prevalence of antibiotic resistance genes and their relationship with antibiotics in the Huangpu River and the drinking water sources, Shanghai, China. *Science of The Total Environment*, p.458–460, 267–272.

- Jiménez, V. et al., 2011. Development and validation of a multiclass method for the analysis of antibiotic residues in eggs by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1218(11), pp.1443–1451.
- Kan, C.A. & Petz, M., 2000. Residues of Veterinary Drugs in Eggs and Their Distribution between Yolk and White. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 48, pp.6397–6403.
- Kanfer, I., Skinner, M.F. & Walker, R.B., 1998. Analysis of macrolide antibiotics. *Journal of Chromatography A*, 812, pp.25–286.
- Katsuda, K. et al., 2009. Antimicrobial resistance and genetic characterization of fluoroquinolone-resistant *Mannheimia haemolytica* isolates from cattle with bovine pneumonia. *Veterinary Microbiology*, 139, pp.74–79.
- Kaufmann, A. et al., 2008. Quantitative multiresidue method for about 100 veterinary drugs in different meat matrices by sub 2- μ m particulate high-performance liquid chromatography coupled to time of flight mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1194, pp.66–79.
- Kiser, J.S., 1976. A perspective on the use of antibiotics in animal feeds. *Journal of Animal Science*, 42, pp.1058–1072.
- Kouba, M., 2003. Quality of organic animal products. *Livestock Production Science*, 80, pp.33–40.
- Kritchevsky, S. B. Kritchevsky, D., 2000. Egg consumption and coronary heart disease: An epidemiologic overview. *Journal of the American College of Nutrition*, 19(5 Suppl, p.549S–555S.
- Küükyilmaz, K. et al., 2012. Effect of an organic and conventional rearing system on the mineral content of hen eggs. *Food Chemistry*, 132(2), pp.989–992.
- Le, T.M. V. et al., 2009. High prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants in commensal members of the Enterobacteriaceae in HoChi Minh City, Vietnam. *Journal of Medical*

- Microbiology*, 58, p.1585–1592.
- Levy, S., 2002. Factors impacting on the problem of antibiotic resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 49, pp.25–30.
- Levy, S.B., 1992. *The Antibiotic Paradox: How Miracle Drugs are Destroying the Miracle*, New York: Plenum Publication.
- Li, W. et al., 2017. Metagenomic analysis reveals the influences of milk containing antibiotics on the rumen microbes of calves. *Archives of Microbiology*, 199(3), pp.433–443.
- Manes, J.M. et al., 2013. Changes in the aerobic vaginal bacteria load and antimicrobial susceptibility after different oestrus synchronization treatments in goats. *Animal Production Science*, 53, p.:555–559.
- Martínez-Vidal, J.L. et al., 2009. Multiclass Analysis of Antibiotic Residues in Honey by Ultraperformance Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 57, pp.1760–1767.
- Matt, D., Veromann, E. & Luik, A., 2009. Effect of housing systems on biochemical composition of chicken eggs. *Agronomy Research*, 7(II), pp.662–667.
- Maxwell, R.J., Cohen, E. & Donoghue, D.J., 1999. Determination of sarafloxacin residues in fortified and incurred eggs using on-line microdialysis and HPLC/programmable fluorescence detection. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 47, pp.1563–1567.
- McCarthy, M. et al., 2004. Factors Influencing Consumption of Pork and Poultry in the Irish Market. *Appetite*, 43, pp.19–28.
- McCarthy, M. et al., 2003. Factors Influencing Intention to Purchase Beef in the Irish Market. *Meat Science*, 65, pp.1071–83.
- Meachern, M.G. & Schröder, M.J.A., 2002. The Role of Livestock Production Ethics in Consumer Values Towards Meat. *Journal of Agricultural and Environmental Ethics*, 15, pp.221–37.

- McEwen, S.A. & Fedorka-Cray, P.J., 2002. Antimicrobial use and resistance in animals. *Clinical Infectious Diseases*, 34, pp.93–106.
- Menchaca, A. & Rubianes, E., 2004. New treatments associated with timed artificial insemination in small ruminants. *Reproduction Fertility and Development*, 16, pp.403–413.
- Miele, M. & Vittoria, P., 2001. L'etica del mangiare. I valori e le preoccupazioni dei consumatori per il benessere animale negli allevamenti: un'applicazione dell'analisi Means-end Chain. *Rivista di Economia Agraria*, 1, pp.81–102.
- Monira, K.N., Salahuddin, M. & Miah, G., 2003. Effect of breed and holding period on egg quality characteristics of chicken. *International Journal of Poultry Science*, 2(4), pp.261–263.
- Moretti, S. et al., 2016. Multiclass method for the determination of 62 antibiotics in milk. *Journal of Mass Spectrometry*, (February), pp.792–804.
- Motlomelo, K.C., Greyling, J.P.C. & Schwalbach, L.M.J., 2002. Synchronisation of oestrus in goats: The use of different progestogen treatments. *Small Ruminant Research*, 45, p.45–49.
- Munsch-Alatossava, P. Alatossava, T., 2007. Antibiotic resistance of raw-milk-associated psychrotrophic bacteria. *Microbiological Research*, 162(2), pp.115–23.
- Munsch-Alatossava, P. Gauchi, J., Chamlagain, B. & Alatossava, T., 2012. Trends of antibiotic resistance in mesophilic and psychrotrophic bacterial populations during cold storage of raw milk. *ISRN Microbiology*, pp.1–13.
- Navrátilová, P., 2008. Screening methods used for the detection of veterinary drug residues in raw cow milk – a review. *Czech Journal of Food Sciences*, 26, pp.393–401.
- Nikolaidou, K.I., Samanidou, V.F. & Papadoyannis, I.N., 2008. Development and validation of an HPLC method for the determination of seven

- tetracycline antibiotics residues in chicken muscle and egg yolk according to 2002/657/EC. *Journal of Liquid Chromatography*, 31, pp.2141–2158.
- Nocella, G., Hubbard, L. & Scarpa, R., 2010. Farm animal welfare, consumer willingness to pay, and trust: Results of a cross-national survey. *Applied Economic Perspectives and Policy*, 32(2), pp.275–297.
- Noziere, P. et al., 2006. Carotenoids for ruminants: from forages to dairy products. *Animal Feed Science and Technology*, 131, pp.418–450.
- Ojha, R. et al., 2007. Dietitians and naturopaths require evidence-based nutrition information on organic food. *Nutrition and Dietetics*, 64, pp.31–36.
- Oliver, S., Murinda, S. & Jayarao, B., 2011. Impact of antibiotic use in adult dairy cows on antimicrobial resistance of veterinary and human pathogens: a comprehensive review. *Foodborne Pathogens and Disease*, 8, pp.337–355.
- Ortelli, D. et al., 2009. Comprehensive fast multiresidue screening of 150 veterinary drugs in milk by ultra-performance liquid chromatography coupled to time of flight mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 877, pp.2363–2374.
- Palupi, E. et al., 2012. Comparison of nutritional quality between conventional and organic dairy products: a meta-analysis. *Journal of Science of Food and Agriculture*, 92, pp.2774–2781.
- Patterson, P.H. et al., 2001. Egg marketing in national supermarkets: specialty eggs – Part 2. *Poultry Science*, 80, pp.390–395.
- Penna, B. et al., 2013. Progestin-impregnated intravaginal sponges for estrus induction and synchronozation influences on goats' vaginal flora and antimicrobial susceptibility. *Animal Reproduction Science*, 142, pp.71–74.
- Pikkemaat, M.G. et al., 2007. Improved microbial screening assay for the detection of quinolone residues in poultry and eggs. *Food Additives & Contaminants*, 24, pp.842–850.

- Pratt, J.H. & Wynne, A., 1995. The Livestock Industry: Some Controversial Issues. *Nutrition & Food Science*, 3, pp.24–28.
- Reybroeck, W. et al., 2010. Validation of the β -s.t.a.r. 1+1 for rapid screening of residues of β -lactam antibiotics in milk. *Food Additives & Contaminants*, 27, pp.1084–1095.
- Rice, L., 2008. Federal funding for the study of antimicrobial resistance in nosocomial pathogens: no ESKAPE. *The Journal of Infectious Diseases*, 197, pp.1079–81.
- Romero-González, R., Garrido Frenich, A. & Martínez Vidal, J., 2008. Multiresidue method for fast determination of pesticides in fruit juices by ultra performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Talanta*, 76, pp.211–225.
- Romero, T. et al., 2015. Effect in vitro of anti-parasitic drugs on microbial inhibitor tests. *Journal of Food Protection*, 78, pp.1756–1759.
- Romero, T. et al., 2017. Interference of non-specific detergents in microbial inhibitor test results for screening antibiotics in goat's milk. *Journal of Applied Animal Research*, 45(1), pp.159–163. Available at: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/09712119.2015.1129341>.
- Romero, T. et al., 2016. Short communication: Drug residues in goat milk after prophylactic use of antibiotics in intravaginal sponges for estrus synchronization. *Journal of dairy science*, 99(1), pp.141–5. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26585470>.
- Rowe, J.D., Tell, L.A. & Wagnerand, D.C., 2009. Animal safety report on intravaginal progesterone controlled internal drug releasing devices in sheep and goats. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 32, pp.303–305.
- Samman, S. et al., 2009. Fatty acid composition of certified organic, conventional and omega-3 eggs. *Food Chemistry*, 116(4), pp.911–914. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.03.046>.

- Sarmah, A.K., Meyer, M.T. & Boxall, A.B.A., 2006. A global perspective on the use, sales, exposure pathways, occurrence, fate and effects of veterinary antibiotics (VAs) in the environment. *Chemosphere*, 65(5), pp.725–759.
- Schlatterer, J. & Breithaupt, D., 2006. Xanthophylls in commercial egg yolks: Quantification and identification by HPLC and LC-(APCI)MS using a C30 phase. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 54, pp.2267–2273.
- Scudamore, C.L., 1988. Intravaginal sponge insertion technique. *The Veterinary Record*, 123, p.554.
- Serratosa, J. et al., 2006. Residues from veterinary medicinal products, growth promoters and performance enhancers in food-producing animals: a European Union perspective. *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)*, 25, p.637–653.
- Shepherd, R., Magnusson, M. & Sjöden, P.-O., 2005. Determinants of consumer behavior related to organic foods. *Ambio*, 34, pp.352–358.
- Shim, J.H. et al., 2003. Simultaneous measurement of fluoroquinolones in eggs by a combination of supercritical fluid extraction and high pressure liquid chromatography. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 67, pp.1342–1348.
- Skoog, D.A., Holler, F.J. & Crouch, S.R., 2007. *Αρχές Ενόργανης Ανάλυσης* 6th ed. M. I. Καραγιάννης & K. H. Ευσταθίου, eds., Αθήνα: Κωσταράκη.
- Smith, G.C., Heaton, K. & Sofos, J., 1997. Residues of antibiotics, hormones and pesticides in conventional, natural and organic beef. *Journal of Muscle Foods*, (8), pp.157–172.
- Stevenson, D. & Weimer, P., 2007. Dominance of Prevotella and low abundance of classical ruminal bacterial species in the bovine rumen revealed by relative quantification real-time PCR. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 75, pp.165–174.
- Stolker, A.A. et al., 2008. Comprehensive screening and quantification of veterinary drugs in milk using UPLC-ToF-MS. *Analytical and Bioanalytical*

Chemistry, 391, pp.2309–2322.

Straley, B. et al., 2006. Public health significance of antimicrobial-resistant gram-negative bacteria in raw bulk tank milk. *Foodborne Pathogens and Disease*, 3(3), pp.222–33.

Stubbings, G. & Bigwood, T., 2009. The development and validation of a multiclass liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) procedure for the determination of veterinary drug residues in animal tissue using a QuEChERS (QUick, Easy, CHEap, Effective, Rugged and Safe) approach. *Analytica Chimica Acta*, 637, pp.68–78.

Suárez, G. et al., 2006. Changes in the aerobic vaginal bacterial mucous load and assessment of the susceptibility to antibiotics after treatment with intravaginal sponges in anoestrous ewes. *Small Ruminant Research*, 663, pp.39–43.

Sundrum, A., 2001. Organic livestock farming: A critical review. *Livestock Production Science*, 67, pp.207–215.

Sundset, M., 2009. Molecular diversity of the rumen microbiome of Norwegian reindeer on natural summer pasture. *Microbial Ecology*, 57, pp.335–348.

Tenhagen, B.-A. et al., 2014. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in cattle food chains-prevalence, diversity, and antimicrobial resistance in Germany. *Journal of Animal Science*, 92, p.2741–2751.

The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products Veterinary Medicines Evaluation Unit, 1999. Antibiotic Resistance in the European Union Associated with Therapeutic Use of Veterinary Medicines. *Report and Qualitative Risk Assessment by the Committee for Veterinary Medicinal Products*, (July), p.34.

Toledo, P., Andrén, A. & Björck, L., 2002. Composition of raw milk from sustainable production systems. *International Dairy Journal*, 12, pp.75–80.

Tollefson, L. & Miller, M.A., 2000. Antibiotic use in food animals: controlling

- the human health impact. *Journal of AOAC INTERNATIONAL*, 83, p.245–254.
- Ürkek, B. et al., 2017. Prevalence and comparing of some microbiological properties, somatic cell count and antibiotic residue of organic and conventional raw milk produced in Turkey. *Korean Journal for Food Science of Animal Resources*, 37(2).
- Verbeke, W.A.J. & Viaene, J., 2000. Ethical Challenges for Livestock Production: Meeting Consumer Concerns about Meat Safety and Animal Welfare. *Journal of Agricultural and Environmental Ethics*, 12(2), pp.141–151.
- Wang, J., Leung, D. & Butterworth, F., 2005. Determination of five microlide antibiotic residues in eggs using liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 53, pp.1857–1865.
- Wang, K. et al., 2017. A Simple and Fast Extraction Method for the Determination of Multiclass Antibiotics in Eggs Using LC-MS/MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65(24), pp.5064–5073. Available at: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/acs.jafc.7b01777>.
- Webster, A.J.F., 2001. Farm Animal Welfare: The Five Freedoms and the Free Market. *The Veterinary Journal*, 161, pp.229–37.
- Van De Weerd, H.A., Keatinge, R. & Roderick, S., 2009. A review of key health- related welfare issues in organic poultry production. *World's Poultry Science Journal*, 67(4), pp.649–684.
- Welkie, D., Stevenson, D. & Weimer, P., 2010. ARISA analysis of ruminal bacterial community dynamics in lactating dairy cows during the feeding cycle. *Anaerobe*, 16, pp.94–100.
- Williams, C.M., 2002. Nutritional quality of organic food: Shades of grey or shades of green? *The Proceedings of the Nutrition Society*, 61, pp.19–24.
- Wong, A. et al., 2006. Fatty acid composition of dairy products derived from

- certified organic and conventional agricultural methods. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*, 15(Suppl.), p.139.
- Worthington, V., 2001. Nutritional quality of organic versus conventional fruits, vegetables, and grains. *Journal of Alternative and Complementary Medicine*, 7, pp.161–173.
- Yamaguchi, T. et al., 2015. Antibiotic residue monitoring results for pork, chicken, and beef samples in Vietnam in 2012-2013. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(21), pp.5141–5145.
- Zanoli, R. & Naspetti, S., 2002. Consumer motivations in the purchase of organic food: A means-end approach. *British Food Journal*, 104, pp.643–653.
- Zeng, S., Escobar, E. & Brown-Crowder, I., 1996. Evaluation of screening tests for detection of antibiotics in goat milk. *Small Ruminant Research*, 21, pp.155–160.
- Zhan, J. et al., 2012. Generic and rapid determination of veterinary drug residues and other contaminants in raw milk by ultra performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 906, pp.48–57.
- Zhang, H. et al., 2007. Development of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Seven Sulfonamide Residues and Investigation of Matrix Effects from Different Food Samples. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 55, pp.2079–2084.
- Zhao, X. et al., 2007. Consumer sensory analysis of organically and conventionally grown vegetables. *Journal of Food Science*, 72, pp.87–91.

6.2. ΝΟΜΟΘΕΣΙΑ

Κανονισμός (Ε.Ε.) αριθ. 37/2010 της επιτροπής της 22ας Δεκεμβρίου 2009, σχετικά με φαρμακολογικά δραστικές ουσίες και την ταξινόμησή τους όσον αφορά τα ανώτατα όρια καταλοίπων στα τρόφιμα ζωικής προέλευσης.

Κανονισμός (Ε.Κ.) αριθ. 1831/2003 του ευρωπαϊκού κοινοβουλίου και του Συμβουλίου της 22ας Σεπτεμβρίου 2003 για τις πρόσθετες ύλες που χρησιμοποιούνται στη διατροφή των ζώων.

Κανονισμός (Ε.Κ.) αριθ. 889/2008 της επιτροπής της 5ης Σεπτεμβρίου 2008 σχετικά με τη θέσπιση λεπτομερών κανόνων εφαρμογής του κανονισμού (ΕΚ) αριθ. 834/2007 του Συμβουλίου για τη βιολογική παραγωγή και την επισήμανση των βιολογικών προϊόντων όσον αφορά τον βιολογικό τρόπο παραγωγής, την επισήμανση και τον έλεγχο των προϊόντων.

Commission Regulation (EC) No 165/2010 of 26 February 2010 amending Regulation (EC) No 1881/2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs as regards aflatoxins. Official Journal of the European Union, L50/8, 27 Feb 2010.

Commission Regulation (EC) No 1181/2002 of 1 July 2002 L 172, 13.

Commission Regulation (EC) No 889/2008 of 5 September 2008.

Council Decision 2002/657 from Directive 96/23, Official Journal of the European Union, L 221 (2002) 8.

Council Directive 96/23/EC on measures to monitor certain substances and residues thereof in live animals and animal products and repealing Directives 85/358/EEC and 86/469/EEC and Decisions 89/ 187/EEC and 91/664/EEC. Official Journal of the European Communities 1996, L 125/10– 32.

European Commission (2010) Commission regulation (EU) No. 37/2010 of 22 December 2009: on pharmacologically active substances and their classification regarding maximum residue limits in foodstuffs of animal origin. Official Journal of the European Union 1–72.

European Commission (2007), Document No. SANCO/3131/2007, “Method Validation and Quality Control Procedures for Pesticides Residues Analysis in Food and Feed”.

European Union (EU) (1999a). Directive 1999/74/EC, July 19, 1999, Council. Official Journal of the European Communities, L203, 53–57.

European Union (EU) (2003). Regulation (EC) No. 2295/2003, December 23, 2003, Council. Official Journal of the European Communities, L340, 16–34.

Food and Agricultural Organization of the United Nations. Statistical Databases (FAOSTAT) (2012). Available from: <http://faostat.fao.org>.

Food and Agricultural Organization of the United Nations. Committee on Agriculture. Organic Agriculture (FAO) (1999).

www.fao.org/unfao/bodies/coag/Coag15/X0075E.htm#P86_4004 Accessed 10.10.17.

6.3. ΔΙΑΔΙΚΤΥΟ

Animal Health Institute (AHI), 2002. Available from: www.a-hi.org/

European Food Information Council (EUFIC). Available from: www.eufic.org.

European Egg Processors Association (EEPA). Available from: www.eepa.info (accessed 29.10.2017).

European Food Information Council (EUFIC). Available from: www.eufic.org.

National Agricultural Statistics Service (NASS), 2002. Available from: www.usda.gov/nass

Rapid Alert System for Food and Feed, Available from: <http://ec.europa.eu/food/food/rapidalert/indexen.htm> (accessed 29.10.2017).

Rice, D., Straw, B., 1996. Use of animal drugs in livestock management, University of Nebraska. Cooperative Extension University of Nebraska, Lincoln, Nebraska. Available from: www.ianr.unl.edu/pubs/animaldisease/g1093.htm

Union of Concerned Scientist (UCS), 2001. Hogging it!: Estimates of antimicrobial abuse in livestock. Available from: www.ucsusa.org/food_and_environment/antibiotic_resistance/index, p. 4.