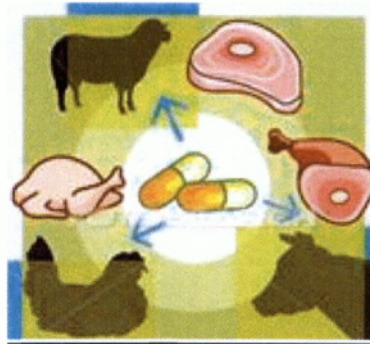


**ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ ΚΑΛΑΜΑΤΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΡΓΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ**



**«ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΥΠΟΛΕΙΜΜΑΤΩΝ ΣΤΡΕΠΤΟΜΥΚΙΝΗΣ,
ΤΕΤΡΑΚΥΚΛΙΝΩΝ ΚΑΙ ΣΟΥΛΦΟΝΑΜΙΔΩΝ ΣΕ ΝΩΠΟ ΚΡΕΑΣ»**

**ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ
ΚΩΣΤΟΠΟΥΛΟΥ ΘΑΛΕΙΑ-ΜΑΡΙΑ**



ΚΑΛΑΜΑΤΑ

2010

**ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ ΚΑΛΑΜΑΤΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΡΓΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ**

**«ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΥΠΟΛΕΙΜΜΑΤΩΝ
ΣΤΡΕΠΤΟΜΥΚΙΝΗΣ, ΤΕΤΡΑΚΥΚΛΙΝΩΝ ΚΑΙ
ΣΟΥΛΦΟΝΑΜΙΔΩΝ ΣΕ ΝΩΠΟ ΚΡΕΑΣ»**

**ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ
ΚΩΣΤΟΠΟΥΛΟΥ ΘΑΛΕΙΑ-ΜΑΡΙΑ**

ΚΑΛΑΜΑΤΑ

2010

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Για την εκπόνηση της πτυχιακής μου μελέτης συνέβαλλαν κάποιοι άνθρωποι που χωρίς την πολύτιμη βοήθειά τους δεν θα μπορούσα να την ολοκληρώσω. Θα ήθελα λοιπόν να ευχαριστήσω τα μέλη του Εργαστηρίου Ελέγχου Καταλοίπων Τροφίμων Ζωικής Προέλευσης του Ινστιτούτου Υγιεινής Τροφίμων του Υπουργείου Αγροτικής Ανάπτυξης & Τροφίμων Αθηνών, στο οποίο έλαβαν χώρα οι εργαστηριακές αναλύσεις της πτυχιακής μου μελέτης. Τις πιο ειλικρινείς μου ευχαριστίες θα ήθελα να εκφράσω στην κ. Μ. Παντελιά επιβλέπουσα αναλύτρια του εργαστηρίου, για την πολύτιμη βοήθειά της σε όλες τις πειραματικές αναλύσεις αλλά και για την όλη υποστήριξή της, τεχνική και ηθική καθ' όλη τη διάρκεια της πτυχιακής μου εργασίας. Η προθυμία και υπομονή που έδειξε ήταν ιδιαίτερα σημαντική για μένα.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω την κ. Μαρίνα Παπαδέλλη επιβλέπουσα καθηγήτρια της πτυχιακής μου μελέτης η οποία αποτέλεσε πολύτιμο συνεργάτη και σύμβουλό μου κατά τη διάρκεια της συγγραφής και διόρθωσης της παρούσας εργασίας.

Ευχαριστώ, τέλος, την οικογένειά μου για την ψυχολογική υποστήριξη και την υπομονή τους μέχρι την κατάθεση και παρουσίαση της παρούσας μελέτης.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

| | |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| ΠΕΡΙΛΗΨΗ | 5 |
| ABSTRACT | 6 |
| 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ | 7 |
| 1.1. Το κρέας ως κεντρικό σημείο διατροφής του ανθρώπου..... | 7 |
| 1.2. Ο ορισμός του κρέατος και της ποιότητας αυτού..... | 9 |
| 1.3. Ποιότητα ζωοτροφών και η συμβολή της βόσκησης στην παραγωγή ποιοτικού κρέατος..... | 10 |
| 2. ΧΡΗΣΗ ΚΤΗΝΙΑΤΡΙΚΩΝ ΦΑΡΜΑΚΩΝ | 13 |
| 2.1. Αντιμικροβιακοί Παράγοντες..... | 13 |
| 2.2. Αντιμικροβιακοί Παράγοντες ως αυξητικοί παράγοντες στις ζωοτροφές | 14 |
| 2.2.1. Τρόποι και λόγοι προσθήκης αντιβιοτικών ως αυξητικών παραγόντων στις ζωοτροφές..... | 14 |
| 2.2.2. Αρνητικές συνέπειες από την προσθήκη αντιβιοτικών ως αυξητικών παραγόντων στις ζωοτροφές..... | 16 |
| 2.3. Ταξινόμηση αντιμικροβιακών ουσιών..... | 18 |
| 2.3.1. Τετρακυκλίνες..... | 18 |
| Μηχανισμός δράσης..... | 19 |
| 2.3.2. Αμινογλυκοσίδες (Στρεπτομυκίνη)..... | 20 |
| Μηχανισμός δράσης | 20 |
| 2.3.3. Σουλφοναμίδες..... | 21 |
| Κατάταξη Σουλφοναμιδών..... | 22 |
| Μηχανισμός δράσης..... | 22 |
| 3. ΥΠΟΛΕΙΜΜΑΤΑ ΚΤΗΝΙΑΤΡΙΚΩΝ ΦΑΡΜΑΚΩΝ ΣΤΟ ΚΡΕΑΣ | 23 |
| 3.1. Επίδραση των καταλοίπων κτηνιατρικών φαρμάκων στην ποιότητα και ασφάλεια κρέατος..... | 24 |
| 3.2. Νομοθεσία που οριοθετεί την παρουσία αντιβιοτικών στο κρέας..... | 25 |
| 4. ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΩΝ ΣΕ ΝΩΠΟ ΚΡΕΑΣ | 28 |
| 4.1. Δοκιμή Τρυβλίων Petri..... | 30 |
| 4.1.1. Ανάλυση για τετρακυκλίνες..... | 30 |

| | |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 4.1.2. Ανάλυση για αμινογλυκοσίδες (στρεπτομυκίνη)..... | 31 |
| 4.1.3. Ανάλυση για σουλφοναμίδες..... | 31 |
| 4.2. Ραδιοανοσολογική μέθοδος Charm II..... | 32 |
| 4.2.1. Περιγραφή μηχανήματος Charm II..... | 32 |
| 4.2.2. Μεθοδολογία για ανίχνευση Αμινογλυκοσιδών (Στρεπτομυκίνης)..... | 33 |
| 4.2.3. Μεθοδολογία για ανίχνευση Τετρακυκλινών..... | 34 |
| 4.2.4. Μεθοδολογία για ανίχνευση Σουλφοναμιδών..... | 35 |
| 5. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΩΝ ΣΕ | |
| ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΝΩΠΟΥ ΚΡΕΑΤΟΣ | 36 |
| 5.1. Αποτελέσματα μικροβιολογικής μεθόδου ανίχνευσης καταλοίπων αντιβιοτικών σε νωπό κρέας (Δοκιμή Τρυβλίων Petri)..... | 36 |
| 5.2. Αποτελέσματα της ραδιοανοσολογικής μεθόδου ανίχνευσης αντιβιοτικών σε νωπό κρέας (μέθοδος Charm II) | 37 |
| 6. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ | 38 |
| 7. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ | 41 |

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η παρούσα εργασία αναφέρεται στην ανίχνευση υπολειμμάτων αντιβιοτικών και συγκεκριμένα στην ανίχνευση στρεπτομυκίνης, τετρακυκλινών και σουλφοναμιδών σε νωπό κρέας. Αρχικά επισημαίνεται η στενή σχέση του ανθρώπου με το κρέας και προσδιορίζονται οι προδιαγραφές που αυτό πρέπει να έχει ώστε να ανταποκρίνεται στις καταναλωτικές προσδοκίες.

Στη συνέχεια αναλύονται οι λόγοι που επιβάλλουν την χρήση των αντιμικροβιακών παραγόντων οι οποίοι χρησιμοποιούνται είτε για θεραπευτικούς σκοπούς, είτε προληπτικά ως μέσα πρόληψης λοιμώξεων, είτε ως αυξητικοί παράγοντες. Ακόμη αναφέρονται τα θετικά και τα αρνητικά αποτελέσματα αυτών και γίνεται μία ταξινόμηση με κριτήριο την αντιμικροβιακή τους δράση. Παρουσιάζεται ο μηχανισμός δράσης των τετρακυκλινών, των σουλφοναμιδών και των αμινογλυκοσιδών. Παρακάτω επισημαίνονται οι επιπτώσεις των καταλοίπων κτηνιατρικών φαρμάκων στην ποιότητα και ασφάλεια του κρέατος.

Η παρουσία αντιβιοτικών σε κάθε ιστό οριοθετείται από νομοθεσία, η οποία αναφέρεται στην παρούσα εργασία, και σύμφωνα με σχετικό κανονισμό της Ευρωπαϊκής Ένωσης (Ε.Ε.) πρέπει να διασφαλίζεται το υψηλότερο επίπεδο προστασίας του καταναλωτή, των ζώων αλλά και του περιβάλλοντος.

Ακόμη αναλύονται οι μέθοδοι ανίχνευσης αντιβιοτικών σε νωπό κρέας από διαπιστευμένα εργαστήρια και συγκεκριμένα η Δοκιμή Τρυβλίων Petri και η Ραδιοανοσολογική Μέθοδος CHARM II. Τέλος, παρατίθενται τα αποτελέσματα των παραπάνω μεθόδων όταν εφαρμόστηκαν στο Εργαστήριο Ελέγχου Καταλοίπων Τροφίμων Ζωϊκής Προέλευσης στο Ινστιτούτο Υγιεινής Τροφίμων Αθηνών και ορίζονται οι προϋποθέσεις εφαρμογής τους.

ABSTRACT

The present study refers to the detection methods applied for the presence inspection of residues of the antibiotics Streptomycin, Tetracyclines and Sulfonamides in fresh meat. The narrow relation of man with the meat is analyzed and the specifications that the latter should accomplish in order to correspond to the consumers expectations are determined.

The reasons that livestock require the use of antimicrobials as therapeutic agents, or for the prevention of infections, or as growth factors, are investigated. Furthermore, the positive and negative consequences by the use of antimicrobials in livestock are indicated and the antimicrobials are classified according to their mode of action. The mode of action of Aminoglycosides (Streptomycin), Tetracyclines and Sulfonamides is analyzed as well as the effects of residues of veterinary medicines in the quality and safety of meat.

The presence of antibiotics in each tissue is delimited by relative legislation which is mentioned in this study. According to European Union regulation, the highest protection level of consumer, animals and environment must be ensured.

Finally, the microbiological method (Petri dishes) as well as the radioimmunoassay (CHARM II) used for the detection of Aminoglycosides (Streptomycin), Tetracyclines and Sulfonamides in fresh meat by the certified "Laboratory of Residues Control of Animal Origin Foods" of the Food Hygiene Institute of Athens, are demonstrated. The results obtained by the analysis of several meat samples analyzed in the above Laboratory are cited and investigated.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. Το κρέας ως κεντρικό σημείο στη διατροφή του ανθρώπου

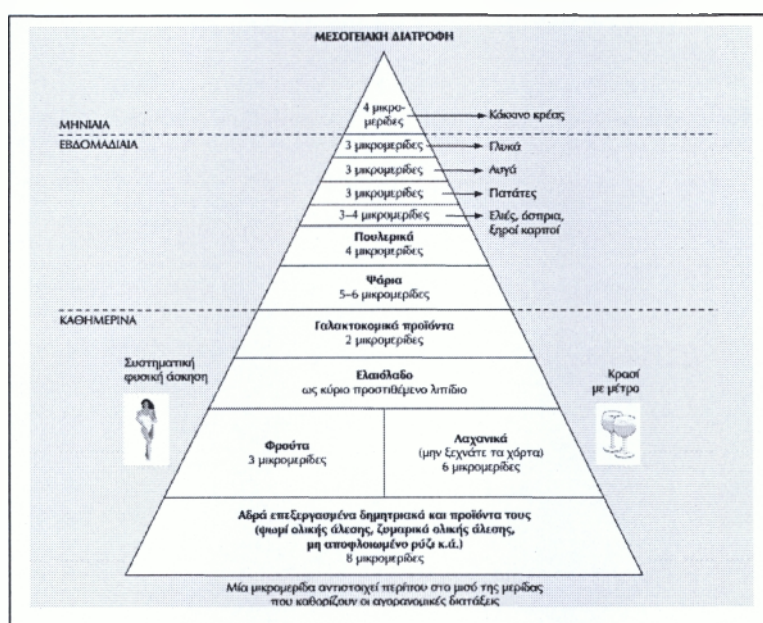
Το κρέας αποτελεί το κύριο μέρος μιας φυσιολογικής μονάδας του οικοσυστήματός μας που δεν είναι άλλη από τον ζωντανό ζωικό οργανισμό. Τον ζωντανό αυτό οργανισμό η δημιουργός δύναμη του σύμπαντος τον προέβλεψε, τον δημιούργησε και τον έθεσε στη διάθεση του ανθρώπινου γένους, για να καλύψει τις ανάγκες του σε εργασία και σε πολύτιμα και αναντικατάστατα αγαθά. Φυσικά η θεωρία αυτή δεν ισχύει μόνο για τα ζώα και το κρέας αλλά και για σωρεία άλλων ειδών ζωικής και φυτικής προέλευσης. Για να μιλήσει όμως κανείς για το κρέας και τις σχέσεις του με τον ανθρώπινο οργανισμό πρέπει να ανατρέξει στα βάθη των αιώνων για να διερευνήσει πώς αναπτύχθηκαν και πώς εξελίχθηκαν οι σχέσεις ανθρώπου-ζώων και κυρίως πώς εξελίχθηκε η διατροφή του και η κατανάλωση κρέατος.

Το ερώτημα εάν ο άνθρωπος γεννήθηκε σαρκοφάγος ή φυτοφάγος, ταλάνισε και ταλανίζει ακόμα τους ειδικούς χωρίς να μπορεί να δοθεί ακόμα μια απόλυτα πειστική απάντηση. Καθώς εξελίχθηκε ο άνθρωπος άρχισε να επιλέγει την τροφή του -με βάση το ένστικτό του- και να διευρύνει την ποικιλία των καταναλισκόμενων τροφίμων, περιοριζόμενος πάντα σε αυτά που εύρισκε στο άμεσο περιβάλλον του. Αξιοποιούσε πάντα ό,τι του προσέφερε η γύρω φύση. Για να κορέσει την πείνα του επέλεγε, πάντα ενστικτωδώς και με κριτήριο την ήσσονα προσπάθεια, τις τροφές εκείνες που του παρείχαν την περισσότερη ενέργεια και τα καλύτερα δομικά στοιχεία για τον οργανισμό του. Αυτά ήταν καρποί, άλλες φυτικές τροφές και σάρκες ζώων και αλιευμάτων. Αργότερα η ανακάλυψη της φωτιάς, αναμφίβολα, βοήθησε στην αύξηση κατανάλωσης κρέατος.

Με την πάροδο εκατομμυρίων ετών, η παραπέρα εξέλιξη του ανθρώπου συνεχίστηκε όπως και η διατροφή του. Τις πρωτόγονες μορφές κυνηγιού και της αλιείας διαδέχθηκε η εξημέρωση των ζώων μετατρέποντας πολλά από αυτά σε κατοικίδια με κύριο σκοπό την απόκτηση πρώτης ύλης για την τέλεση θυσιών και δευτερευόντως για την υλοποίηση γεωργικών εργασιών. Η πρωτόγονη μορφή διατήρησης οικόσιτων ζώων, με την πάροδο χιλιετηρίδων και τη συνεχή βελτίωσή τους έφθασε στη σημερινή μορφή βιομηχανικής εκτροφής των κρεοπαραγωγικών ζώων. Τα είδη ζώων τα οποία ενστικτωδώς επέλεξε ο πρωτόγονος άνθρωπος για τη

διατροφή του, είναι τα ίδια που και σήμερα χρησιμοποιούνται. Φαίνεται λοιπόν, ότι ο άνθρωπος, δεν υπήρξε ποτέ μόνο φυτοφάγος ή μόνο κρεατοφάγος αλλά παμφάγος.

Στη σύγχρονη εποχή, όσο και αν ερευνησουμε, δε θα βρούμε καμία διαίτα που να μη περιλαμβάνει κρέας ή προϊόντα κρέατος (Γεωργάκης και Γεωργάκη 2008). Η κατανάλωση κρέατος περιλαμβάνεται στην διατροφική πυραμίδα της **Εικόνας 1**, η οποία παραθέτει τις διατροφικές συστάσεις κατά την διάρκεια μιας ημέρας όπως προτάθηκε από το Υπουργείο Γεωργίας των Η.Π.Α. (United States Department of Agriculture, USDA) το 1992.



Εικόνα 1. Διατροφική πυραμίδα (Γεωργάκης και Γεωργάκη 2008).

Η παραπάνω πυραμίδα αποτελεί μια νέα προσέγγιση για τη διαχείριση της διατροφής του ανθρώπου, η οποία αντικαθιστά την παλαιότερη βασική προσέγγιση των τεσσάρων (ή πέντε) ομάδων τροφίμων. Η διαφορά της νεότερης τροφικής πυραμίδας από την παλιά είναι ότι χωρίζεται η ομάδα των φρούτων και των λαχανικών σε 2 διαφορετικές ομάδες. Οι νέες ομάδες τροφίμων οργανώνονται στη μορφή μιας πυραμίδας η βάση της οποίας αναφέρεται σε τρόφιμα που θα πρέπει να καταναλώνονται πολύ συχνά και η κορυφή σε τρόφιμα που θα πρέπει να καταναλώνονται σπάνια, με τα υπόλοιπα τρόφιμα να καταλαμβάνουν τις ενδιάμεσες θέσεις (Υπουργείο Αγροτικής Ανάπτυξης 2004). Οι θεμελιώδεις ιδέες πίσω από την προσέγγιση της διατροφής με οδηγούς τις διατροφικές πυραμίδες είναι: κάποιος πρέπει να τρώει ποικιλία τροφίμων και ειδικότερα συνίσταται να επιλέγει μια

διατροφή με αφθονία λαχανικών, φρούτων και προϊόντων σιταριού, όπως δείχνει και η ισορροπημένη πυραμίδα διατροφής του USDA της εικόνας 1.

1.2. Ο ορισμός του κρέατος και της ποιότητας αυτού

Τελικά τι χαρακτηρίζεται ως κρέας; Ο κανονισμός 853/2004, της Ε.Ε. ορίζει ότι «Κρέας είναι τα εδώδιμα μέρη (περιλαμβανομένου και του αίματος) των οικόσιτων βοοειδών, βουβαλοειδών, χοίρων, αιγοπροβάτων, πουλερικών, άγριων και εκτρεφόμενων μικρών και μεγάλων θηραμάτων».

Τις τελευταίες δεκαετίες παρατηρείται αυξημένη παραγωγικότητα των κρεοπαραγωγικών ζώων, με αποτέλεσμα τη μείωση του κόστους παραγωγής και κατά συνέπεια της τιμής διάθεσής του στον καταναλωτή. Το γεγονός αυτό σε συνδυασμό με τη βελτίωση του βιοτικού επιπέδου των καταναλωτών, προκάλεσε αύξηση της καταναλισκόμενης ποσότητας κρέατος. Στην αυξημένη κατανάλωση κτηνοτροφικών προϊόντων, γενικότερα, σε συνδυασμό με τον σύγχρονο τρόπο ζωής και διατροφής του ανθρώπου, αποδίδεται ένας αριθμός σύγχρονων ασθενειών όπως είναι ο διαβήτης, οι καρκίνοι, οι καρδιοπάθειες, η παχυσαρκία, η υπέρταση κ.α. Ο καταναλωτής σήμερα, περισσότερο από ποτέ, δίνει ιδιαίτερη βαρύτητα στην ασφάλεια και την ποιότητα του κρέατος, δείχνοντας ενδιαφέρον ταυτόχρονα για την ιχνηλασιμότητα, την επίδραση του παραγωγικού συστήματος στο περιβάλλον και την ευζωία των εκτρεφόμενων ζώων.

Ασφαλές θεωρείται το προϊόν που δεν παρουσιάζει καμία επιμόλυνση, η οποία συχνά αποδίδεται σε εξωτερικούς παράγοντες που έχουν σχέση με την παραγωγική διαδικασία.

Η ποιότητα του κρέατος είναι μία σύνθετη ιδιότητα που επηρεάζεται από πολλούς παράγοντες π.χ. φυσιολογικούς, διατροφικούς, διαχείρισης του ζώου, διαχείρισης του σφαγείου, επεξεργασίας και τυποποίησης κρέατος και καθορίζεται ανάλογα με το γεωγραφικό και ανθρώπινο περιβάλλον, το κοινωνικοοικονομικό προφίλ των καταναλωτών, την ηλικία, τις παραδόσεις κ.α. Ποιότητα κρέατος είναι το σύνολο των χαρακτηριστικών, ιδιοτήτων και παραμέτρων που επιτρέπουν τον διαχωρισμό του και καθορίζουν το βαθμό αποδοχής του από τον καταναλωτή. Η αποδοχή αυτή εξαρτάται από τον βαθμό ικανοποίησης των απαιτήσεων, των αναγκών και των προσδοκιών του καταναλωτή. Ένας ευρύτερος ορισμός της ποιότητας περιλαμβάνει όλα εκείνα τα χαρακτηριστικά ενός προϊόντος που αξιολογούνται από τον καταναλωτή. Με λίγα λόγια είναι μια πολυπαραγοντική έννοια που περιλαμβάνει ασφάλεια, ιδιότητες

διατροφικές και αισθήσεων, ιχνηλασιμότητα ή ακόμα και κοινωνικές ευαισθησίες (π.χ. ενδιαφέρον για το περιβάλλον, την ευζωία κ.α.). Γενικότερα οι προσδοκίες των καταναλωτών ως προς την ποιότητα, εξαρτώνται από το εισόδημα, τη χώρα, την κουλτούρα, την ηλικία, τις συνήθειες κ.α. Τελικά, σήμερα ο καταναλωτής επιζητά κρέας υγιεινό, με περισσότερη σάρκα και λιγότερο λίπος, υγιεινό, με ικανοποιητικές οργανοληπτικές ιδιότητες, που να επηρεάζει θετικά την υγεία του ή να συμβάλει, κατά το δυνατόν, στην πρόσληψη των πιο σημαντικών και διαδεδομένων ασθενειών (Ζέρβας 2008).

1.3. Ποιότητα ζωοτροφών και η συμβολή της βόσκησης στην παραγωγή ποιοτικού κρέατος

Στις αναπτυγμένες χώρες ο άνθρωπος είναι αυτός που ελέγχει και καθορίζει όλες τις παραμέτρους παραγωγής των ζωικών προϊόντων, όπως είναι το είδος του εκτρεφόμενου ζώου, ο χώρος και οι συνθήκες εκτροφής του καθώς και η διατροφή του. Από τα μέσα του περασμένου αιώνα μέχρι σχεδόν και το τέλος του ο κύριος στόχος ήταν η αύξηση παραγωγής ζωικών προϊόντων μέσω της γενετικής βελτίωσης των ζώων και της προαγωγής της επιστήμης της διατροφής χωρίς όμως πάντοτε να δίνεται προσοχή στις ενδεχόμενες επιπτώσεις στο περιβάλλον. Αποτέλεσμα αυτού ήταν η 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 οδηγούσαν σε σταδιακή υποβάθμισή του. Στην προσπάθεια αυτή και για τη μεγιστοποίηση της παραγωγής, χρησιμοποιήθηκαν και διάφορα πρόσθετα ζωοτροφών, τα οποία ωστόσο αποδείχτηκε ότι είχαν αρνητικές επιπτώσεις τόσο στη υγεία των ζώων όσο και σε αυτή των καταναλωτών ζωικών προϊόντων (π.χ. αντιβιοτικά ως αυξητικοί παράγοντες) (Φεγγερός 2008).

Σήμερα, και υπό την πίεση διαφόρων διατροφικών ατυχημάτων και των διαπιστωμένων κινδύνων που διατρέχει το περιβάλλον γενικότερα, έχει μεγιστοποιηθεί το ενδιαφέρον όλης 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 ενδεδειγμένων 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. Γενικότερα, η ποιότητα των ζωοτροφών επηρεάζεται από πάρα πολλούς παράγοντες και η διαφύλαξή τους απαιτεί ιδιαίτερη προσοχή. Γι' αυτό πρέπει να εφαρμόζονται κατά την παραγωγική διαδικασία συστηματικοί κανόνες ελέγχου, ώστε τα παραγόμενα προϊόντα να έχουν, με τη σειρά τους την καλύτερη δυνατή ποιότητα. Η βελτίωση της ποιότητας των ζωοτροφών μπορεί να επιτευχθεί είτε με την κατάλληλη τεχνολογική επεξεργασία, είτε με τη χρήση πρόσθετων υλών των ζωοτροφών (Φεγγερός 2008).

Η γενικότερη στρόφη των καταναλωτών προς τα ποιοτικά προϊόντα είναι γεγονός στη σημερινή εποχή. Ο χαρακτηρισμός των προϊόντων ως ποιοτικά περιέχει ένα ευρύ φάσμα χαρακτηριστικών και στη βάση αυτών διαφέρει 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 για να περιγράψει στοιχεία του ζωικού προϊόντος που αφορούν στον τρόπο εκτροφής του ζώου, στην προέλευση του προϊόντος, στην ευζωία των ζώων, στη συμβολή σε ένα υγιεινό πρότυπο διατροφής των καταναλωτών και στην προσαρμογή σε δεδομένο πρότυπο διαβίωσής τους. Η παραγωγή κρέατος από τα «ζώα που βοσκούν» καλύπτει τις περισσότερες από αυτές τις απαιτήσεις και αποτελεί ένα σημαντικό στόχο για την ζωική παραγωγή σήμερα (Χατζηγεωργίου 2008).

Η αυτοφυής και η καλλιεργούμενη φυτική ύλη που μπορεί να βοσκηθεί από τα κτηνοτροφικά ζώα αποτελείται από το «πράσινο» τμήμα των φυτών και περιέχει στην ξηρή της ουσία υδατάνθρακες, πρωτεΐνες, ανόργανα στοιχεία, λίπη, βιταμίνες, και μια σειρά από άλλες ουσίες οι οποίες καλούνται συνολικά δευτερογενείς μεταβολίτες. Η πρώτη ομάδα των ουσιών καλύπτει βασικές θρεπτικές ανάγκες των οργανισμών που τρέφονται από βοσκήσιμη ύλη. Οι ουσίες που κατατάσσονται στους δευτερογενείς μεταβολίτες απαντώνται τις περισσότερες φορές σε ίχνη. Οι ουσίες αυτές κατατάσσονται στις φαινόλες, τις ταννίνες, τις αλδεΐδες, άλατα κ.λπ. και το αποτέλεσμα της κατανάλωσής τους είναι είτε η δράση επί των βοσκόντων ζώων, είτε ο εμπλουτισμός των ιστών του ζώου με αυτές και κατά συνέπεια και των προϊόντων του. Λόγω της υψηλότερης τιμής που απολαμβάνουν τα ποιοτικά προϊόντα, αλλά και λόγω της σημαντικής απόστασης που συχνά χωρίζει τον παραγωγό από τον καταναλωτή, προκύπτει η αναγκαιότητα πιστοποίησης των προϊόντων αυτών. Η

ύπαρξη ενός συστήματος πιστοποίησης με ελεγκτές δεν είναι πάντα σε θέση να διαβεβαιώσει τον καταναλωτή. Η δυνατότητα της εργαστηριακής επιβεβαίωσης της πιστοποίησης μέσω των ελεγκτών ενισχύει σημαντικά την αναγνωρισιμότητα των προϊόντων. Τα βασικά χαρακτηριστικά του κρέατος (λίπος, πρωτεΐνες, ανόργανα στοιχεία, βιταμίνες, κ.λπ.), σε συνδυασμό με τα δευτερεύοντα χαρακτηριστικά του, όπως το περιεχόμενο σε λιπαρά οξέα, τερπένια, φαινολικές ουσίες, αλδεϋδες κ.λπ. μπορούν να επιβεβαιώσουν εργαστηριακά την προέλευση του προϊόντος (Χατζηγεωργίου 2008).

Η ανάγκη για την χάραξη της κατάλληλης στρατηγικής για ορθολογική άσκηση της γεωργικής δραστηριότητας με πολλαπλούς στόχους, γίνεται πιο επιτακτική για τις περιοχές της χώρας που παρουσιάζουν προβλήματα διαρθρωτικά, κοινωνικά, οργανωτικά και οικονομικά (Χατζηγεωργίου 2008). Οι κάτοικοι των περιοχών αυτών ασχολούνται κατά βάση με την κτηνοτροφία, που αποτελεί σημαντικό κλάδο για την Εθνική Οικονομία. Τόσο η κατοχύρωση προϊόντων ονομασίας προελεύσεως, όσο και γενικότερα η παραγωγή πιστοποιημένων προϊόντων, μπορεί να εξασφαλίσει στους κατοίκους αυτών των περιοχών ικανοποιητικό και σταθερό εισόδημα και να προσφέρει στην αγορά πολύτιμα παραδοσιακά προϊόντα διατροφής, υψηλής και βιολογικής και γαστρονομικής αξίας. Η διατροφή αποτελεί τον κυριότερο παράγοντα διαμόρφωσης της ποιότητας των ζωικών προϊόντων, γιατί επηρεάζει την σύστασή τους όχι μόνο στη βάση των ζωοτροφών που καταναλώνονται αλλά και μέσω της προέλευσης αυτών συνδέοντας τα προϊόντα με τον τόπο καταγωγής τους. Το σύστημα διατροφής μπορεί αφενός να αξιοποιηθεί ευκολότερα από κάθε άλλο παράγοντα και αφ' ετέρου να αποδώσει άμεσα αποτελέσματα. Επιπλέον η διατροφή αντιπροσωπεύει ποσοστό που κυμαίνεται από 50 έως 90% του παραγωγικού κόστους για κάθε μονάδα παραγόμενου προϊόντος και κατ' αυτή την έννοια αποτελεί την κυριότερη φροντίδα του κτηνοτρόφου κατά την διαχείριση της εκμετάλλευσης. Κατά συνέπεια ο κτηνοτρόφος θα πρέπει να επιλέξει και να εφαρμόσει το σύστημα εκείνο όπου ο βαθμός εντατικοποίησης δεν υπονομεύει την ποιότητα των προϊόντων. Η ποιότητα αυτή θα πρέπει να υπερβαίνει την κλασσική ποιότητα και να στοχεύει σε πιστοποιημένα προϊόντα με γευστική ακεραιότητα και ιδιότητες ευεργετικές για την υγεία του σύγχρονου καταναλωτή (Χατζηγεωργίου 2008).

2. ΧΡΗΣΗ ΚΤΗΝΙΑΤΡΙΚΩΝ ΦΑΡΜΑΚΩΝ

Τα αντιβιοτικά χρησιμοποιήθηκαν αρχικά ως κτηνιατρικά φάρμακα για την θεραπεία της μαστίτιδας όπου εμφανίστηκε αρχικά σε αγελάδες. Η ανάγκη για αντιβιοτικά ποικίλλει ανάλογα με το είδος του ζώου και ανάλογα με τις διάφορες κουλτούρες που επικρατούν ανά τον κόσμο με αποτέλεσμα αυτές να επηρεάζουν το εμπόριο καθώς και τους λόγους για τους οποίους έχουμε στην κατοχή μας κάποια ζώα. Η παραγωγή ζωικού κεφαλαίου στις ανεπτυγμένες χώρες έχει αλλάξει τα τελευταία τριάντα χρόνια (Johnston 2001).

Από τα κτηνιατρικά φάρμακα ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν οι αντιμικροβιακοί παράγοντες που χρησιμοποιούνται ατομικά σε κάθε ζώο κατά τη θεραπευτική αγωγή ή ομαδικά για προληπτικούς λόγους με την τροφή ή το νερό και με σκοπό τη βελτίωση των αποδόσεων (ανάπτυξη, αύξηση βάρους, αύξηση παραγωγής γάλακτος και παραγωγής αβγών) (FAA-MAF 2000).

2.1. Αντιμικροβιακοί παράγοντες

Οι αντιμικροβιακοί παράγοντες (αντιμικροβιακά) είναι βιοσυνθετικές, συνθετικές ή ημισυνθετικές ουσίες που σε χαμηλές συγκεντρώσεις εκδηλώνουν μικροβιοκτόνο ή μικροβιοστατική δράση. Η πρώτη ουσία στην οποία αποδόθηκαν αντιμικροβιακές ιδιότητες είναι 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, όταν χορηγήθηκε σε ζώα με λοίμωξη από αιμολυτικό στρεπτόκοκκο. Αργότερα διαπιστώθηκε ότι η προντοζίνη στον οργανισμό του ζώου μεταβολιζόταν σε σουλφανιλαμίδα, η οποία εκδήλωνε την αντιμικροβιακή δράση. Όπως είναι γνωστό, η σουλφανιλαμίδα 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 πηγής δραστικών ουσιών εναντίον λοιμωδών ασθενειών, θα πρέπει να ήταν γνωστή από την αρχαιότητα (Μουζούρας 1996).

Τα αντιβιοτικά χορηγούνται στα ζώα είτε για θεραπευτικούς σκοπούς, είτε προληπτικά ως μέσα πρόληψης λοιμώξεων, είτε ως αυξητικοί παράγοντες. Το 1996 περίπου 10.200 τόνοι αντιβιοτικά χρησιμοποιήθηκαν στην Ε.Ε. Από την ποσότητα των αντιμικροβιακών παραγόντων που χρησιμοποιούνται ετησίως στην Ε.Ε., ένα ποσοστό 50% χορηγείται στα ζώα. Από την συνολική ποσότητα αντιβιοτικών που χορηγούνται στα ζώα, ποσοστό 30%, χρησιμοποιούνται ως προσθετικά των ζωοτροφών, με μεγάλες διαφορές μεταξύ των κρατών. Στις Η.Π.Α., από την ποσότητα των 22.650 τόνων αντιβιοτικών που χρησιμοποιούνται ετησίως, ποσοστό 20% χορηγείται στα ζώα για θεραπευτικούς σκοπούς και το υπόλοιπο ως προσθετικοί παράγοντες των ζωοτροφών (Στέρης και Ιωσηφίδου 1996).

2.2. Αντιμικροβιακοί παράγοντες ως αυξητικοί παράγοντες στις ζωοτροφές

Σημαντικός παράγοντας ο οποίος επηρεάζει την ασφάλεια των προϊόντων κρέατος, είναι η σύσταση του σιτηρεσίου των ζώων. Συστατικά όπως οι διοξίνες, τα βαρέα μέταλλα, τα υπολείμματα φυτοφαρμάκων και τα υπολείμματα κτηνιατρικών φαρμάκων βρίσκονται στο περιβάλλον και ανιχνεύονται στις πρώτες ύλες των σιτηρεσίων των ζώων. Ανάλογα με τα φυσικοχημικά τους χαρακτηριστικά αυτά μεταβολίζονται σε φυσικά προϊόντα, τα οποία δεν είναι επικίνδυνα για την τροφική αλυσίδα (τα περισσότερα κτηνιατρικά φάρμακα και προσθετικά). Ωστόσο, άλλα συστατικά, όπως οι διοξίνες και οι μυκοτοξίνες, παραμένουν στο ζωικό οργανισμό και μεταφέρονται στα παραγόμενα προϊόντα. Τα βαρέα μέταλλα όπως κάδμιο, μόλυβδος, υδράργυρος κ.ά. δε μεταβολίζονται καθόλου και συσσωρεύονται στους ζωικούς ιστούς (Σιμιτζής και συν. 2008).

2.2.1. Τρόποι και λόγοι προσθήκης αντιβιοτικών ως αυξητικών παραγόντων στις ζωοτροφές

Η χρησιμοποίηση των αντιβιοτικών ως αυξητικών παραγόντων στη διατροφή των ζώων ήταν αναμφίβολα ευεργετική, για τη βελτίωση των αποδόσεών τους και την πρόληψη των ασθενειών. Ο όρος «αντιβιοτικός αυξητικός παράγοντας» περιγράφει οποιοδήποτε φάρμακο το οποίο θανατώνει ή αναστέλλει τα βακτήρια και εφαρμόζεται σε δόση χαμηλότερη από την θεραπευτική. Η χρήση των αντιβιοτικών για την ενίσχυση της αύξησης (αυξητικός παράγοντας) έχει προκύψει με την εντατικοποίηση

της εκτροφής των ζώων. Οι μολυσματικοί παράγοντες μειώνουν την αποδοτικότητα της εκτροφής των ζώων για την παραγωγή κρέατος και για το λόγο αυτό η χορήγηση αντιβιοτικών και των αντιμικροβιακών παραγόντων σε δόσεις μικρότερες από τις θεραπευτικές, παρουσιάζεται αποτελεσματική. Η χρήση των αντιβιοτικών αυξητικών παραγόντων αποτελεί ένα μεγάλο πρόβλημα των εντατικών μεθόδων εκτροφής ζώων. Τα προβλήματα που προκαλούνται από τη χρήση των αντιβιοτικών είναι μεγάλα και εμφανίζονται κυρίως στις ανεπτυγμένες παρά στις αναπτυσσόμενες χώρες (Hughes and Heritage 2002).

Σύμφωνα με το Εθνικό Γραφείο Υγείας των Ζώων της Μεγάλης Βρετανίας (NAOH 2001), οι αντιβιοτικοί αυξητικοί παράγοντες χρησιμοποιούνται προκειμένου να βοηθήσουν τα ζώα να χωνέψουν την τροφή τους πιο αποτελεσματικά έτσι ώστε να επωφεληθούν και να αναπτυχθούν σε ισχυρές και υγιείς μονάδες. Αν και ο μηχανισμός ο οποίος υποστηρίζει τη δράση τους είναι ασαφής, θεωρείται ότι τα αντιβιοτικά καταστέλλουν τους ευαίσθητους πληθυσμούς βακτηριδίων στο εντερικό σύστημα των ζώων. Έχει υπολογιστεί ότι τουλάχιστον ποσοστό 6% της καθαρής ενέργειας στη διατροφή των χοίρων θα μπορούσαν να χαθούν λόγω της μικροβιακής ζύμωσης στο έντερο (Jensen 1998). Εάν καταστεί δυνατός ο καλύτερος έλεγχος του πληθυσμού των μικροβίων, τότε είναι πιθανό η χαμένη αυτή ενέργεια να οδηγήσει σε πιο αποδοτική ανάπτυξη (Hughes and Heritage 2002).

Σύμφωνα με τους Thomke and Elwinger (1998), η έκκριση κυτοκινών λόγω αντίδρασης του ανοσοποιητικού συστήματος του ζώου μπορεί να ενισχύσει την έκκριση καταβολικών ορμονών οι οποίες με τη σειρά τους μπορεί να μειώσουν τη μυϊκή μάζα. Κατά συνέπεια, μείωση των γαστρεντερικών μολύνσεων θα οδηγούσε στην αύξηση βάρους των μυών. Δεν υπάρχει καμία αμφιβολία ότι οι αυξητικοί παράγοντες είναι αποτελεσματικοί, σύμφωνα με τους Prescott and Baggot (1993), εντούτοις, τα αποτελέσματα αυτών ήταν πιο εμφανή σε ζώα που αναπτύχθηκαν σε ανθυγιεινούς χώρους.

Η χρήση των αντιβιοτικών ως αυξητικών παραγόντων γίνεται με την προσθήκη τους στις ζωοτροφές σε χαμηλές δοσολογίες λόγω του ότι θεωρείται ότι βελτιώνουν την ποιότητα του προϊόντος μειώνοντας το ποσοστό λίπους στο κρέας και αυξάνοντας την περιεκτικότητά του σε πρωτεΐνες (Hughes and Heritage 2002).

Στα οφέλη που προκύπτουν από τη χρήση των αντιβιοτικών περιλαμβάνεται επίσης ο έλεγχος παθογόνων μικροοργανισμών όπως είναι τα βακτήρια των γενών *Salmonella* και *Campylobacter*, καθώς και το είδος *Escherichia coli*, αλλά και

διάφορα είδη Εντεροκόκκων (Hughes and Heritage 2002). Πιο συγκεκριμένα οι τροφές που απαρτίζουν το σιτηρέσιο των ζώων είναι συχνά μολυσμένες με μικροοργανισμούς, γεγονός που επηρεάζει την ποιότητα και την ασφάλεια του παραγόμενου κρέατος. Συνηθέστερη πηγή κινδύνου αποτελεί το μικρόβιο *Salmonella* spp. σε σιτηρέσια που προορίζονται για πτηνά και χοίρους. Γενικά, τα πρωτεϊνικά συστατικά των ζωοτροφών, όπως τα ελαιούχα σπέρματα (π.χ. σόγια) και οι ζωοτροφές ζωικής προέλευσης, είναι οι κατηγορίες οι οποίες είναι πιο ευαίσθητες σε μικροβιακές μολύνσεις, χωρίς όμως να έχει διαπιστωθεί πλήρως αν η σύσταση του σιτηρεσίου επηρεάζει το μετέπειτα βαθμό μόλυνσης των ζωικών ιστών και των προϊόντων. Παράγοντες, που επηρεάζουν το μικροβιακό φορτίο στις ζωοτροφές, αποτελούν επίσης τα πτηνά και τα τρωκτικά, που πιθανόν να υπάρχουν στους χώρους παρασκευής των ζωοτροφών (EFSA 2008). Ωστόσο, μέσω διαφόρων χειρισμών μπορούν να ελεγχθούν τα επίπεδα των παθογόνων μικροοργανισμών στις ζωοτροφές. Για παράδειγμα, η θερμική τους επεξεργασία αλλά και ζύμωσή τους έχει αποτέλεσμα τη μείωση του μικροβιακού τους φορτίου. Από την άλλη, η χρησιμοποίηση προβιοτικών ή μιγμάτων αιθέριων ελαίων επιδρά και αυτή δυσμενώς στην ανάπτυξη των παθογόνων μικροοργανισμών, αφού αναστέλλει την προσκόλλησή τους στο επιθήλιο του εντέρου (Nortung and Buncic 2008).

2.2.2. Αρνητικές συνέπειες από την προσθήκη αντιβιοτικών ως αυξητικών παραγόντων στις ζωοτροφές

Η συνεχής χορήγηση χαμηλών συγκεντρώσεων αντιβιοτικών, είναι γνωστό λοιπόν ότι αυξάνει την αξιοποίηση της τροφής και τον ρυθμό αύξησης βάρους, και μειώνει τα νοσήματα που σχετίζονται με το στρες μεταφοράς στα παραγωγικά ζώα (Στέρης και Ιωσηφίδου 1996).

Η χρήση και κατάχρηση των αντιβιοτικών στην ιατρική και κτηνιατρική πράξη οδήγησε στην αύξηση της συγκέντρωσής τους στο φυσικό περιβάλλον. Αυτό διευκόλυνε την ανάπτυξη ανθεκτικότητας τόσο στα παθογόνα όσο και στα μη παθογόνα βακτήρια. Η διαρκής και η συχνότερη παρουσία ανθεκτικών μικροβίων στα ρέοντα απόβλητα, στους υπονόμους, στο χώμα και σε άλλες δεξαμενές μικροβίων του περιβάλλοντος, συνιστά μια τεράστια πηγή ανθεκτικών μικροβίων, όπου η ανθεκτικότητα μπορεί να μεταφερθεί σε ανθρώπους και σε ζώα.

Είναι σαφές ότι η χρήση των αντιβιοτικών στα ζώα και τον άνθρωπο, μπορεί να οδηγήσει στην επιλογή ανθεκτικών βακτηριακών πληθυσμών. Σε χώρες χωρίς

ιδιαίτερη επαγρύπνηση στη χρήση των αντιβιοτικών στα παραγωγικά ζώα, έχει διαπιστωθεί μία θετική συσχέτιση μεταξύ του χρόνου έναρξης της χρήσης ενός αντιβιοτικού σ' αυτά, και της αύξησης της ανθεκτικότητας. Η χρήση των αντιβιοτικών στα παραγωγικά ζώα αποτελεί αντικείμενο συζητήσεων και είναι θέμα αμφιλεγόμενο. Η πρώτη άποψη υποστηρίζει ότι η αντιβιοαντοχή μεταφέρεται από τα ζώα στον άνθρωπο με ενδεχόμενες σημαντικές επιπτώσεις και κατά συνέπεια πρέπει να ληφθούν μέτρα. Η άλλη θεωρεί ότι η δυνατότητα αυτής της μεταφοράς είναι ελάχιστη ή ανύπαρκτη (Στέρης και Ιωσηφίδου 1996).

Ωστόσο, έντονη αμφισβήτηση σχετικά με την χρήση των αυξητικών παραγόντων για τα ζώα που προορίζονται για την παραγωγή κρέατος, αποδίδεται κυρίως στο γεγονός ότι η κατάχρηση αντιβιοτικών για μια χρονική περίοδο μπορεί να οδηγήσει στην ανάπτυξη βακτηριακών πληθυσμών ανθεκτικών στα αντιβιοτικά (Hughes and Heritage, 2002). Μελέτες δείχνουν ότι η πρακτική της συνεχούς χορήγησης χαμηλών συγκεντρώσεων αντιβιοτικών είναι πιθανό να οδηγήσει στην επιτάχυνση της ανάπτυξης ανθεκτικών βακτηρίων, τα οποία μπορούν να μολύνουν τους ανθρώπους. Οι πιθανές συνέπειες στην αντιμικροβιακή θεραπεία του ανθρώπου, περιπλέκονται από το γεγονός πως δεν είναι απαραίτητη η απ' ευθείας μεταφορά του ίδιου του βακτηρίου από τα ζώα στον άνθρωπο. Τα βακτήρια είναι ικανά να διασπείρουν τις γενετικές πληροφορίες που προσδιορίζουν την αντιβιο-αντοχή είτε σε βακτήρια του ίδιου γένους, είτε σε βακτήρια που ανήκουν σε διαφορετικά είδη ή γένη. Μεταφορά της αντοχής συμβαίνει, επίσης και μεταξύ Gram + και Gram - βακτηρίων. Ακόμα και αν ένα βακτήριο, που περνά από τον πεπτικό σωλήνα, παραμένει μέσα στο έντερο για μικρό χρονικό διάστημα, έχει την ικανότητα να μεταφέρει τα γονίδια ανθεκτικότητας στην εγκατεστημένη μικροχλωρίδα, η οποία λειτουργεί ως δεξαμενή αυτών των γονιδίων για τα παθογόνα βακτήρια (Στέρης και Ιωσηφίδου 1996).

Τελικά, όπως θα αναφερθεί και στη συνέχεια, με την θέσπιση ευρωπαϊκού κανονισμού απαγορεύτηκε εντελώς η χρήση των αντιβιοτικών στις ζωοτροφές (Hughes and Heritage 2002). Εξαιτίας του κινδύνου για τη δημόσια υγεία από την αυξανόμενη ανθεκτικότητα των παθογόνων μικροοργανισμών στα αντιβιοτικά, και την συσσώρευση υπολειμμάτων αντιβιοτικών στα ζωικά προϊόντα και στο περιβάλλον, απαγορεύτηκε η χρησιμοποίησή τους ως αυξητικούς παράγοντες στην Ε.Ε. με τον Κανονισμό (ΕΚ) 1831/2003 (με χρόνο εφαρμογής την 1/1/2006), ενώ υπάρχει αυξανόμενη πίεση για την απομάκρυνσή τους σε παγκόσμιο επίπεδο (Σιμιτζής και συν. 2008). Ως αποτέλεσμα έχουν μειωθεί σημαντικά οι περιπτώσεις

ανάπτυξης ανθεκτικών στελεχών μικροοργανισμών που θέτουν σε κίνδυνο τη δημόσια υγεία του καταναλωτή (Kan and Meijer 2007), αν και υπάρχουν περιπτώσεις, όπου ανιχνεύονται υπολείμματα αντιβιοτικών σε ζωοτροφές, με χαρακτηριστικό παράδειγμα τη χλωραμφενικόλη (Σιμιτζής και συν. 2008).

Οι Casewell *et al.* (2003) υποστηρίζουν ότι η απαγόρευση κάποιων αυξητικών παραγόντων που είχε επιβληθεί σε κάποιες Ευρωπαϊκές χώρες προγενέστερα του Κανονισμού 1831/2003, είχε μάλλον αρνητικές επιπτώσεις στη δημόσια υγεία διότι μειώθηκε η συνολική χρήση των αντιβιοτικών στα ζώα, αυξήθηκε όμως η χρήση των αντιβιοτικών για θεραπευτική χρήση καθώς οι αυξητικοί παράγοντες έχουν και προληπτική δράση. Σύμφωνα με την Αμερικανική Εταιρεία Μικροβιολογίας οι αντιμικροβιακές ουσίες που χρησιμοποιούνται θεραπευτικά στον άνθρωπο, δεν πρέπει να χορηγούνται στα ζώα ως προσθετικά ζωοτροφών (Heilig *et al.* 2002).

2.3. Ταξινόμηση αντιμικροβιακών ουσιών

Οι αντιμικροβιακές ουσίες μπορούν να ταξινομηθούν σε διάφορες ομάδες με βάση τις φυσικοχημικές τους ιδιότητες, την αντιμικροβιακή τους δράση, το μηχανισμό δράσης τους κ.λπ.

Ενδιαφέρον παρουσιάζει η ταξινόμηση των αντιμικροβιακών ουσιών σε βακτηριοκτόνες (θανάτωση-καταστροφή βακτηρίων) και σε βακτηριοστατικές (αναστολή ανάπτυξης βακτηρίων). Στον Πίνακα 1 παρατίθενται κάποιες βακτηριοστατικές και βακτηριοκτόνες αντιμικροβιακές ουσίες.

Πίνακας 1. Ομαδοποίηση διαφόρων αντιμικροβιακών ουσιών.

| ΒΑΚΤΗΡΙΟΚΤΟΝΑ | ΒΑΚΤΗΡΙΟΣΤΑΤΙΚΑ |
|------------------------------|------------------------|
| Πενικιλίνες | Μακρολίδια |
| Αμινογλυκοσίδες | Τετρακυκλίνες |
| Τριμεθοπρίμη + Σουλφαδιαζίνη | Σουλφοναμίδες |

Πηγή: Μουζούρας 1996.

2.3.1. Τετρακυκλίνες

Οι τετρακυκλίνες είναι αντιμικροβιακοί παράγοντες με ευρύ φάσμα δράσης. Η ονομασία τετρακυκλίνη ανήκει στην ξεχωριστή ημισυνθετική ουσία τετρακυκλίνη (tetracycline), που έδωσε και το όνομα σε ολόκληρη την ομάδα. Οι πρώτες φυσικές τετρακυκλίνες ήταν η οξυτετρακυκλίνη (oxytetracycline) και η χλωροτετρακυκλίνη

(chlorotetracycline). Όλες οι τετρακυκλίνες είναι αμφοτερικές ουσίες. Σχηματίζουν εύκολα άλατα τόσο με οξέα όσο και με βάσεις. Είναι ασταθείς σε υδατικά διαλύματα ιδιαίτερα σε υψηλές τιμές pH (7.0-8.5). Οι τετρακυκλίνες περιλαμβάνουν οκτώ συγγενή αντιβιοτικά που παράγονται από το γένος *Streptomyces*, αν και υπάρχουν και ημισυνθετικές τετρακυκλίνες.

Γενικά διαλύονται δύσκολα σε νερό. Όλες οι τετρακυκλίνες σχηματίζουν σταθερά δυσδιάλυτα σύμπλοκα (χηλικές ενώσεις) με τα μεταλλικά ιόντα ασβέστιο, μαγνήσιο, σίδηρο, γεγονός το οποίο μειώνει αισθητά την απορρόφησή τους από τον εντερικό σωλήνα, σε περίπτωση ταυτόχρονης χορήγησής τους με την τροφή στην οποία περιέχεται αυξημένη ποσότητα των ιόντων αυτών. Οι φυσικοχημικές ιδιότητες των τετρακυκλινών επιτρέπουν την παρασκευή πολλών φαρμακευτικών μορφών όπως ενέσιμων διαλυμάτων, καψουλών, υδατοδιαλυτής σκόνης, αλοιφών κ.α. (Μουζούρας 1996). Στον **Πίνακα 2** παρουσιάζονται διάφορες φυσικές και ημισυνθετικές τετρακυκλίνες.

Πίνακας 2. Παραδείγματα τετρακυκλινών

| ΦΥΣΙΚΕΣ ΤΕΤΡΑΚΥΚΛΙΝΕΣ | ΗΜΙΣΥΝΘΕΤΙΚΕΣ ΤΕΤΡΑΚΥΚΛΙΝΕΣ |
|---------------------------------------------------------|------------------------------------|
| Οξυτετρακυκλίνη (Oxytetracycline) | Τετρακυκλίνη (Tetracycline) |
| Χλωροτετρακυκλίνη (Chlorotetracycline) | Δοξυκυκλίνη (Doxycycline) |
| Διμεθυλχλωροτετρακυκλίνη (Dimethylchlortetracycline) | Μετακυκλίνη (Methacycline) |

Πηγή: Μουζούρας 1996.

Μηχανισμός δράσης

Οι τετρακυκλίνες είναι βακτηριοστατικά αντιμικροβιακά ευρέως φάσματος. 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 αυτή αναπτύσσεται με μηχανισμούς που παρεμποδίζουν την είσοδο των αντιμικροβιακών αυτών ουσιών στο κυτταρόπλασμα. Γενικότερα αυτές οι αντιμικροβιακές ουσίες 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 and Smulders 2004).

2.3.2. Αμινογλυκοσίδες (Στρεπτομυκίνη)

Η ομάδα αυτή περιλαμβάνει αντιμικροβιακούς παράγοντες με παραπλήσια χημικά, αντιμικροβιακά και φαρμακοκινητικά χαρακτηριστικά. Χημικώς, αποτελούνται από αμινοσάκχαρα που συνδέονται μεταξύ τους με γλυκοζιτικό δεσμό. Απορροφώνται ελάχιστα από το έντερο. Χορηγούνται παρεντερικά, συνήθως ενδομυϊκά. Οι αμινογλυκοσίδες διακρίνονται σε περιορισμένου φάσματος και ευρέως φάσματος όπως φαίνεται στον **Πίνακα 3**.

Πίνακας 3. Παραδείγματα αμινογλυκοσιδών

| ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΕΝΟΥ ΦΑΣΜΑΤΟΣ | ΕΥΡΕΩΣ ΦΑΣΜΑΤΟΣ |
|--------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------|
| <i>Δραστικές έναντι Gram αρνητικών βακτηρίων</i> | <i>Δραστικές έναντι Gram θετικών και Gram αρνητικών βακτηρίων</i> |
| Streptomycin (Στρεπτομυκίνη) | Spectinomycin (Σπεκτινομυκίνη) |
| Dihydrostreptomycin (Διωδροστρεπτομυκίνη) | Neomycin (Νεομυκίνη) |
| | Kanamycin (Καναμυκίνη) |

Πηγή: Μουζούρας 1996.

Μηχανισμός δράσης

Οι αμινογλυκοσίδες είναι βακτηριοκτόνα αντιμικροβιακά. Δρουν εντός του βακτηριακού κυττάρου αναστέλλοντας την πρωτεϊνόςύνθεση από τα ριβοσώματα. Για να δράσουν οι αμινογλυκοσίδες πρέπει να εισχωρήσουν στο βακτηριακό κύτταρο και να συνδεθούν με την ριβοσωμική μεμβράνη. Λόγω της φτωχής τους διεισδυτικής ικανότητας η διείσδυσή τους στο βακτηριακό κύτταρο με απλή διάχυση είναι αδύνατη. Το πέρασμα των αμινογλυκοσιδών δια μέσου της κυτταρικής μεμβράνης γίνεται με ενεργό μεταφορά. Απαιτείται δηλαδή κατανάλωση ενέργειας.

Σε ιστούς με χαμηλή συγκέντρωση οξυγόνου, η μεταφορά τους στο βακτηριακό κύτταρο περιορίζεται. Αυτό εξηγεί και το γεγονός ότι τα περισσότερα αναερόβια βακτήρια είναι ανθεκτικά στη δράση των αμινογλυκοσιδών. Παράγοντες όπως η οσμωτική πίεση, το pH και η παρουσία κατιόντων ασβεστίου και μαγνησίου, επηρεάζουν τη μεταφορά τους δια μέσω της βακτηριακής κυτταρικής μεμβράνης.

Στην κατηγορία των αμινογλυκοσιδών ανήκει μεταξύ άλλων και η Στρεπτομυκίνη η οποία έχει στενό φάσμα δράσης. Είναι ιδιαίτερα δραστική έναντι των Gram αρνητικών βακτηρίων όπως *Salmonella* spp, *Escherichia coli* και θεωρείται ότι είναι πολύ δραστική έναντι του Μυκοβακτηριδίου της φυματίωσης αλλά και μερικών σταφυλόκοκκων. Όσον αφορά την μικροβιακή αντίσταση έναντι της στρεπτομυκίνης, αναπτύσσεται σχετικά εύκολα και σε σχετικά αυξημένη συχνότητα από τα ευαίσθητα σε αυτήν βακτήρια. Ο συνδυασμός της στρεπτομυκίνης με τις πενικιλίνες μειώνει αισθητά την πιθανότητα εμφάνισης ανθεκτικών στελεχών.

Σε αντίθεση με ό,τι συμβαίνει με τη στρεπτομυκίνη η εμφάνιση ανθεκτικών στελεχών έναντι των υπολοίπων αμινογλυκοσιδών είναι σπανιότερη. Όταν συμβαίνει αυτό οφείλεται στη σύνθεση ειδικών ενζύμων τα οποία τροποποιούν τις αμινογλυκοσίδες, με αποτέλεσμα την απώλεια της αντιμικροβιακής τους δράσης. Η αύξηση της συγκέντρωσης των δισθενών κατιόντων ασβεστίου και μαγνησίου στο υπόστρωμα αυξάνει την αντίσταση κάποιων ψευδομονάδων στη δράση των αμινογλυκοσιδών. Τέλος, διαπιστώνεται ότι το χαμηλό pH σε όξινα ούρα και σε αποστήματα αυξάνει τη βιωσιμότητα των μικροοργανισμών έναντι των αμινογλυκοσιδών (Μουζούρας 1996).

2.3.3. Σουλφοναμίδες

Οι σουλφοναμίδες είναι αποτελεσματικές ενάντια σε ένα ευρύ φάσμα βακτηρίων τόσο Gram θετικών όσο και Gram αρνητικών (Hilbert and Smulders 2004). Οι αντιμικροβιακές ιδιότητες των σουλφοναμιδών ανακαλύφθηκαν το 1935 μέσω της εξέτασης ενός μεγάλου αριθμού χρωστικών ουσιών που περιείχαν τη σουλφοναμιδική ομάδα (SO_2NH_2). Η σουλφανιλαμίδα είναι η απλούστερη σουλφοναμίδα και αποτελεί τη βασική σουλφοναμιδική ρίζα από την οποία ξεκίνησε η σύνθεση χιλιάδων συνθετικών παράγωγων. Από το μεγάλο αυτό αριθμό σουλφοναμιδών λιγότερες από ογδόντα βρήκαν θεραπευτική χρήση στην κτηνιατρική. Οι σουλφοναμίδες συμπεριφέρονται σαν ασθενή οργανικά οξέα και διαλύονται καλύτερα σε αλκαλικό παρά σε όξινο περιβάλλον (Μουζούρας 1996).

Κατάταξη Σουλφοναμιδών

Οι σουλφοναμίδες, ενώ έχουν ουσιαστικά το ίδιο αντιμικροβιακό φάσμα, διαφέρουν μεταξύ τους ως προς ορισμένες φαρμακοκινητικές ιδιότητες. Κυρίως ως προς την ημιπερίοδο αποβολής, δηλαδή το χρόνο που απαιτείται από τη στιγμή χορήγησής τους μέχρι την πτώση του επιπέδου τους στο αίμα κατά το ήμισυ (χρόνος ημίσειας ζωής). Η ιδιότητα αυτή αποτελεί τη βάση για την κατάταξη των απορροφίσιμων από το έντερο σουλφοναμιδών σε σουλφοναμίδες βραχείας και παρατεταμένης δράσης. Με βάση το βαθμό απορρόφησης από τον εντερικό σωλήνα οι σουλφοναμίδες διακρίνονται σε διασυστημικής δράσης (χορηγούμενες σε περιπτώσεις γενικών λοιμώξεων) και σε σουλφοναμίδες χορηγούμενες επί λοιμώξεων του γαστρεντερικού. Τέλος, αυτές χρησιμοποιούνται και για τοπική χρήση (Μουζούρας 1996).

Μηχανισμός δράσης

Η αντιμικροβιακή δράση των σουλφοναμιδών βασίζεται στην ανταγωνιστική τους δράση έναντι του παρα-αμινοβενζοϊκού οξέος (PABA). Τα μικροβιακά κύτταρα χρησιμοποιούν το PABA για να συνθέτουν το φολικό οξύ, το οποίο είναι ενδιάμεσος μεταβολίτης στη σύνθεση των πουρινικών βάσεων και κατ' επέκταση των πρωτεϊνών. Η ανάσχεση της βιοσύνθεσης του φολικού οξέος οδηγεί στην ανάσχεση πολλαπλασιασμού των μικροβίων. Οι σουλφοναμίδες είναι βακτηριοστατικές ουσίες και όχι βακτηριοκτόνες. Εξαιτίας αυτού του γεγονότος οι σουλφοναμίδες είναι αποτελεσματικότερες όταν χορηγούνται στην οξεία φάση μιας λοίμωξης, όταν δηλαδή τα παθογόνα μικρόβια βρίσκονται σε φάση έντονου πολλαπλασιασμού. Ο μηχανισμός δράσης των σουλφοναμιδών εξηγεί το γεγονός ότι από τη στιγμή της χορήγησής τους μέχρι την εμφάνιση θεραπευτικού αποτελέσματος χρειάζεται να παρέλθει κάποιο χρονικό διάστημα (λανθάνουσα περίοδος). Ο χρόνος αυτός οφείλεται στο γεγονός, ότι τα βακτηριακά κύτταρα εκμεταλλεύονται τα ήδη υπάρχοντα αποθέματα φολικού οξέος. Η βακτηριοστατική δράση αρχίζει αφού εξαντληθούν τα αποθέματα αυτά. Για την εκδήλωση πλήρους βακτηριοστατικής δράσης, οι σουλφοναμίδες πρέπει να βρίσκονται σε υψηλές συγκεντρώσεις στα υγρά του σώματος. Γι' αυτό είναι απαραίτητη η έναρξη της σουλφοναμιδικής θεραπείας με υψηλές δόσεις που εξασφαλίζουν υψηλές συγκεντρώσεις στο αίμα και στους ιστούς.

Ο μηχανισμός εμφάνισης ανθεκτικών μικροβίων έναντι σουλφωναμιδών βασίζεται στην εμφάνιση στελεχών, ικανών να παράγουν μεγαλύτερες ποσότητες π-αμινοβενζοϊκού οξέος. Το γεγονός αυτό οδηγεί στην ανάγκη χρήσης υψηλότερων δόσεων σουλφωναμιδών. Έχει αποδειχθεί πειραματικά ότι η εμφάνιση ανθεκτικών στελεχών διευκολύνεται από τη χρήση χαμηλών δόσεων σουλφωναμιδών που δεν εξασφαλίζουν θεραπευτικές συγκεντρώσεις στο αίμα. Γι' αυτό η μικροβιακή θεραπεία με σουλφωναμίδες πρέπει να αρχίζει όσο το δυνατό νωρίτερα και με σχετικά υψηλή αρχική δόση (δόση εφόδου). Επίσης ο συνδυασμός 2 ή 3 σουλφωναμιδών μειώνει σημαντικά την πιθανότητα εμφάνισης αντοχής (Μουζούρας 1996).

3. ΥΠΟΛΕΙΜΜΑΤΑ ΚΤΗΝΙΑΤΡΙΚΩΝ ΦΑΡΜΑΚΩΝ ΣΤΟ ΚΡΕΑΣ

Τα υπολείμματα χημικών ουσιών στα τρόφιμα, καλύπτουν μία πολύ ευρεία ομάδα διαφορετικών ουσιών, που περιλαμβάνουν για παράδειγμα φυσικές τοξίνες (π.χ. μυκοτοξίνες), αγροχημικά, κτηνιατρικά φάρμακα (π.χ. αντιβιοτικά που έχουν χορηγηθεί για την αντιμετώπιση ασθενειών ή έχουν προστεθεί στις ζωοτροφές ως αυξητικοί παράγοντες), περιβαλλοντικοί και βιομηχανικοί ρύποι (π.χ. διοξίνες) καθώς και χημικές ουσίες που προκύπτουν από την επεξεργασία και τη συσκευασία των τροφίμων (Croubels *et al.* 2004).

Η πληθώρα των κτηνιατρικών φαρμάκων και οι ποσότητες οι οποίες χρησιμοποιούνται στην κτηνιατρική πρακτική δημιουργούν αυξημένες συγκεντρώσεις καταλοίπων στον οργανισμό των παραγωγικών ζώων με αποτέλεσμα την εμφάνισή τους σε τέτοια επίπεδα ώστε πολλές φορές να ξεπερνάνε και τα νομοθετημένα ασφαλή όρια. Η Ευρωπαϊκή Αρχή για την Ασφάλεια των Τροφίμων καθιέρωσε εγκρίσεις ώστε να υπάρχει η διαβεβαίωση της πλήρους απουσίας από την αγορά εκείνων από τα προσθετικά τα οποία αποτελούν κίνδυνο για την υγεία των ανθρώπων, των ζώων και των φυτών. Όταν όμως διαπιστωθεί η παρουσία κάποιου κινδύνου τότε εφαρμόζεται επείγουσα παρέμβαση με την «αρχή προφύλαξης» για την προστασία του ανθρώπου, των ζώων και των φυτών αλλά και του περιβάλλοντος (Τυρπένος 2008).

Στη χρήση κτηνιατρικών φαρμάκων περιλαμβάνονται συγκεκριμένες διαδικασίες όπως είναι η απορρόφηση, η κατανομή, η βιοαποικοδόμηση και η απέκκρισή τους σε συνάρτηση με το χρόνο ενώ υπάρχει και η έννοια του χρόνου αναμονής. Ο τελευταίος είναι ο χρόνος ο οποίος παρέρχεται μεταξύ της τελευταίας χορήγησης κτηνιατρικών φαρμάκων στο παραγωγικό ζώο και της παραγωγής τροφίμων με τη διαβεβαίωση ότι τα τρόφιμα που προέρχονται από το συγκεκριμένο ζώο δεν περιέχουν κατάλοιπα σε

συγκεντρώσεις οι οποίες ξεπερνούν τα Ανώτατα Όρια Καταλοίπων (ΑΟΚ) στα τρόφιμα (Maximum Residue Limit, MRL) (European Commission 2001). Εάν δεν τηρηθεί ο χρόνος αναμονής, δύναται ποσότητες των χημικών ουσιών να μην προλαβαίνουν να αποβληθούν από τον οργανισμό, και να παραμένουν στους ιστούς του ζώου δημιουργώντας «κατάλοιπα». Αυτά αποτελούν έναν εν δυνάμει κίνδυνο για τον καταναλωτή γιατί είναι ό,τι απομένει από τα φάρμακα που χορηγήθηκαν, είτε άμεσα στα παραγωγικά ζώα για θεραπευτικούς λόγους ή για πρόληψη ασθενειών ή παράνομα ως αυξητικοί παράγοντες, είτε έλαβαν έμμεσα τα ζώα κατά τη βοσκή στους αγρούς καταναλώνοντας τροφές επιβαρυνμένες με προϊόντα φυτοπροστασίας και άλλες χημικές ουσίες (Τυρπένος 2008).

3.1. Επίδραση των καταλοίπων κτηνιατρικών φαρμάκων στην ποιότητα και ασφάλεια του κρέατος

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω (παράγραφος 2.2.2.) πριν την εφαρμογή του Κανονισμού (ΕΚ) 1831/2003, στις χώρες της Ε.Ε. αντιβιοτικά προστίθεντο σε χαμηλές δοσολογίες στις ζωοτροφές ως αυξητικοί παράγοντες. Ωστόσο, σύμφωνα με τον Lone (1997) τα περισσότερα από τα φάρμακα που χρησιμοποιούνται ως αυξητικοί παράγοντες έχουν αρνητικές επιπτώσεις στην ποιότητα του κρέατος. Συγκεκριμένα το κρέας τείνει να είναι σκληρότερο λόγω της αυξημένης παραγωγής συνδετικού ιστού καθώς και αυξημένης συμμετοχής του κολλαγόνου σε αυτόν. Ένας άλλος παράγοντας που συνδέεται με την αυξημένη σκληρότητα του κρέατος είναι η ανασταλτική δράση την οποία οι ουσίες αυτές μπορούν να ασκήσουν ενάντια στις πρωτεάσες των μυών οι οποίες είναι ένζυμα που προκαλούν την διάσπαση των πρωτεϊνών του κρέατος μετά τη σφαγή του ζώου (Moloney *et al.* 1991). Από την άλλη πλευρά, άλλα ενδογενή ένζυμα, όπως για παράδειγμα η λιπάση, φαίνεται να ενεργοποιείται με αποτέλεσμα την εμφάνιση υψηλού ρυθμού λιπόλυσης (Brockman and Laarveld 1986, Duquette and Muir 1985). Αυτό έχει ως αποτέλεσμα μία μείωση στην λιποπεριεκτικότητα του κρέατος που συνδέεται με υποβάθμιση του αρώματος αυτού αλλά και της χυμώδους υφής του.

Όσον αφορά την επίδραση των υπολειμμάτων κτηνιατρικών φαρμάκων στην ασφάλεια του κρέατος καθώς και των τροφίμων ζωικής προέλευσης μπορεί να είναι ιδιαίτερα δυσμενής για την υγεία του καταναλωτή λόγω της τοξικότητάς τους. Στην πραγματικότητα η Ευρωπαϊκή Αρχή Ασφάλειας των Τροφίμων έχει εκφράσει πρόσφατα μία άποψη σχετικά με την επίδραση των υπολειμμάτων ορμονών στο κρέας

σύμφωνα με την οποία υπάρχουν στοιχεία που συσχετίζουν την εμφάνιση ορμονοεξαρτώμενων καρκίνων με την κατανάλωση κόκκινου κρέατος (EFSA 2007).

Επιπλέον, πρόσφατη έρευνα έδειξε ότι από την κατανάλωση αρνιού και βόειου κρέατος που περιείχε υπολειμμάτα του φαρμάκου clenbuterol ασθένησαν 50 άτομα με τοξίκωση, τα συμπτώματα της οποίας ήταν ταχυκαρδία, ναυτία, πονοκέφαλος και ίλιγγος (Barbosa *et al.* 2005). Άλλες σημαντικές συνέπειες που προκύπτουν κυρίως από την παρουσία υπολειμμάτων αντιβιοτικών, αφορούν αλλεργικές αντιδράσεις καθώς και δημιουργία και επιλογή ανθεκτικών στελεχών βακτηρίων που θα μπορούσαν να περάσουν στον άνθρωπο μέσω της τροφικής αλυσίδας (Butaye *et al.* 2001). Επιπλέον η κατανάλωση αντιμικροβιακών υπολειμμάτων ακόμα και σε ίχνη μέσω των τροφίμων ζωικής προέλευσης μπορεί να έχει συνέπειες στην ανθρώπινη εντερική μικροχλωρίδα, που αποτελεί ένα σημαντικό συστατικό τη ανθρώπινης φυσιολογίας. Αυτή η μικροχλωρίδα λειτουργεί αφενός μεν ως εμπόδιο ενάντια στην αποίκιση του γαστρεντερικού συστήματος από παθογόνα βακτήρια (Vollard and Clasener 1994) αφετέρου δε διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην πέψη των τροφίμων (Cerniglia & Kotarski 1999). Με βάση τα παραπάνω, τα τρόφιμα ζωικής προέλευσης πρέπει να ελέγχονται για την παρουσία υπολειμμάτων από κτηνιατρικά φάρμακα (Reig and Toldrà 2008).

3.2. Νομοθεσία που οριοθετεί την παρουσία αντιβιοτικών στο κρέας

Η συνήθης διαδικασία που ακολουθείται για την αξιολόγηση της ασφάλειας των χημικών προσμίξεων που υπάρχουν στα τρόφιμα που προορίζονται για ανθρώπινη κατανάλωση, είναι μέσω του καθορισμού της Ημερήσιας Επιτρεπόμενης Δόσης (HEΔ) για κάθε μια από αυτές τις χημικές ουσίες, η οποία εκφράζεται σε mg/άτομο/ημέρα (θεωρείται ότι το άτομο ζυγίζει περίπου 60 kg). Ως HEΔ ορίζεται η ανώτατη ημερήσια ποσότητα της συγκεκριμένης χημικής ουσίας που μπορεί να ληφθεί από τον καταναλωτή χωρίς να είναι επιβλαβής γι' αυτόν. Από την HEΔ προκύπτει και το Ανώτατο Όριο Καταλοίπου (ΑΟΚ) στα τρόφιμα (Maximum Residue Limit, MRL) που εκφράζεται σε mg/kg τροφίμου. Στις Ηνωμένες Πολιτείες οι συγκεντρώσεις υπολειμμάτων που κρίνονται ασφαλείς για την ανθρώπινη κατανάλωση, θέτονται από τον Οργανισμό Φαρμάκων και Τροφίμων (FDA). Στην Ε.Ε., η ασφάλεια και η αξιολόγηση των υπολειμμάτων πραγματοποιούνται από την επιτροπή την αρμόδια για τα κτηνιατρικά φάρμακα (Croubels *et al.* 2004). Στο

πλαίσιο αυτό έχουν οριστεί από την Ε.Ε. τα MRLs για τα κτηνιατρικά φάρμακα τα οποία εκφράζονται σε mg/kg νοπού προϊόντος.

Ο κανονισμός 2377/90 αναφέρεται στον καθορισμό των ΑΟΚ διαφόρων κτηνιατρικών φαρμάκων στα τρόφιμα ζωικής προέλευσης. Σύμφωνα με τον παραπάνω κανονισμό ως ΑΟΚ ορίζεται η μέγιστη συγκέντρωση η οποία προκύπτει μετά τη χρήση ενός κτηνιατρικού φαρμακευτικού προϊόντος εκφραζόμενη σε mg/kg στο νοπό προϊόν και η οποία μπορεί να είναι αποδεκτή από την Ε.Ε. ως νόμιμα επιτρεπόμενη ή αποδεκτή μέσα ή πάνω στο τρόφιμο. Επισημαίνεται ότι ο κανονισμός εκδόθηκε όχι μόνο για να διασφαλιστεί η ποιότητα των τροφίμων και η υγεία των καταναλωτών αλλά και για να διευκολυνθεί η διακίνηση των τροφίμων ζωικής προέλευσης στην Ε.Ε. (Κανονισμός (ΕΟΚ) 2377/90, Επίσημη Εφημερίδα της Ε.Ε).

Ο Κανονισμός (ΕΚ) 1831/2003 της Ε.Ε. αναφέρεται στις πρόσθετες ύλες που χρησιμοποιούνται στη διατροφή των ζώων. Στις ζωοτροφές προστίθενται αντιβιοτικά και διάφορες χημικές ουσίες με σκοπό ή την θεραπεία ασθενειών των ζώων ή την επιτάχυνση και την προώθηση ανάπτυξης των υγιών ζώων (αυξητικοί παράγοντες).

Σύμφωνα με τον κανονισμό αυτό προβλέπεται η σταδιακή κατάργηση της κυκλοφορίας και της χρήσης των αντιβιοτικών που είναι εγκεκριμένα ως προσθετικά. Σκοπός του παρόντος κανονισμού είναι να καθοριστεί κοινοτική διαδικασία χορήγησης άδειας για τη διάθεση στην αγορά και τη χρήση πρόσθετων υλών ζωοτροφών, καθώς και να θεσπιστούν κανόνες για την εποπτεία και την επισήμανση των πρόσθετων υλών ζωοτροφών ώστε να δημιουργηθεί η βάση για την εξασφάλιση υψηλού επιπέδου προστασίας της ανθρώπινης υγείας και της καλής διαβίωσης των ζώων, του περιβάλλοντος και των συμφερόντων των χρηστών και των καταναλωτών όσον αφορά τις πρόσθετες ύλες ζωοτροφών, ενώ ταυτόχρονα εξασφαλίζεται και η αποτελεσματική λειτουργία της εσωτερικής αγοράς.

Η αποτελεσματικότητα των πρόσθετων υλών εξαρτάται από πολλούς παράγοντες όπως είναι ο τύπος πέψης και η ηλικία του ζώου, η τελική σύνθεση του σιτηρεσίου και η συγκέντρωση των πρόσθετων σε αυτό, το περιβάλλον της εκτροφής και η συνολική διαχείριση της μονάδας εκτροφής των ζώων (Μουντζούρης 2008).

Ως «πρόσθετες ύλες ζωοτροφών» ορίζονται οι ουσίες, οι μικροοργανισμοί ή τα παρασκευάσματα, πλην των πρώτων υλών ζωοτροφών και των προμειγμάτων, που προστίθενται σκόπιμα στις ζωοτροφές ή στο νερό προκειμένου να πραγματοποιηθούν κάποιες λειτουργίες, όπως για παράδειγμα να ικανοποιεί τις διατροφικές ανάγκες των ζώων. Ως «αντιβιοτικό» ορίζεται το αντιμικροβιακό που παράγεται ή προέρχεται από

έναν μικροοργανισμό, το οποίο καταστρέφει ή εμποδίζει τον πολλαπλασιασμό άλλων μικροοργανισμών (Κανονισμός (ΕΚ) 1831/2003, Επίσημη Εφημερίδα της Ε.Ε).

Τα ανώτατα όρια καταλοίπων στα τρόφιμα ζωικής προέλευσης ορίζονται από τον κανονισμό 2377/90 της Ε.Ε. ο οποίος έχει αντικατασταθεί από έναν καινούριο κανονισμό τον 37/2010 της Ε.Ε. Σύμφωνα με τον Κανονισμό αυτόν τα ΑΟΚ για την Στρεπτομυκίνη, τις Σουλφοναμίδες, και την Τετρακυκλίνη, είναι αυτά που αναφέρονται στον **Πίνακα 4**.

Πίνακας 4. Ανώτατα Ορια Καταλοίπων (ΑΟΚ) για την Στρεπτομυκίνη, τις Σουλφοναμίδες και την Τετρακυκλίνη όπως ορίζονται από τον κανονισμό 37/2010 της Ε.Ε.

| Φαρμακολογικός δραστική ουσία | Δείκτης | Ζωϊκά είδη | ΑΟΚ | Ιστοί | Θεραπευτική ταξινόμηση |
|-------------------------------|--------------------------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------------------------------|-----------------------------------------|-----------------------------------------------------------|
| Σουλφοναμίδες | Μητρικό φάρμακο | Όλα τα είδη παραγωγής τροφίμων | 100 µg/kg 100 µg/kg 100 µg/kg 100 µg/kg | Μύες Λιπ. Ιστός Ήπαρ Νεφροί | Φάρμακα κατά των λοιμώξεων και χημειοθεραπευτικά φάρμακα. |
| | | Βοειδή, Πρόβατα, Αίγες | 100 µg/kg | Γάλα | |
| Στρεπτομυκίνη | Στρεπτομυκίνη | Όλα τα μηρυκαστικά, χοίροι, κουνέλια. | 500 µg/kg 500 µg/kg 500 µg/kg 1000 µg/kg | Μύες Λιπώδης Ιστός Ήπαρ Νεφροί | Φάρμακα κατά των λοιμώξεων/ Αντιβιοτικά |
| Τετρακυκλίνη | Άθροισμα του μητρικού φαρμάκου και του 4-επιμέρους του | 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 |

Πηγή: Επίσημη Εφημερίδα της Ευρωπαϊκής Εφημερίδας (2010).

4. ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΩΝ ΣΕ ΝΩΠΟ ΚΡΕΑΣ

Για την ανίχνευση της παρουσίας υπολειμμάτων κτηνιατρικών φαρμάκων στο κρέας εφαρμόζεται εργαστηριακός έλεγχος. Ως «εργαστηριακός έλεγχος» ορίζεται η επιστημονική διεξαγωγή διαφόρων δραστηριοτήτων (δοκιμών, μετρήσεων, διακριβώσεων) από εξειδικευμένο για το σκοπό αυτό επιστημονικό και τεχνικό προσωπικό πάνω σε ένα δείγμα υλικού, με τη χρησιμοποίηση ειδικού και κοινού μηχανολογικού εξοπλισμού και με σκοπό την έκδοση επικυρωμένου αποτελέσματος (Τυρπένος 2008).

Η χρήση ουσιών με αντιμικροβιακή δράση σε ζωντανά ζώα και σε ζωικά προϊόντα, πρέπει να ελέγχεται σύμφωνα με την κοινοτική και εθνική νομοθεσία. Αυτή η νομοθεσία της Ε.Ε. επιβάλλει την κατάρτιση εθνικών προγραμμάτων ελέγχου καταλοίπων σύμφωνα με συγκεκριμένες διαδικασίες δειγματοληψίας. Εντούτοις, τα αρμόδια εργαστήρια για τον έλεγχο υπολειμμάτων-καταλοίπων συχνά αντιμετωπίζουν ένα αξιοσημείωτο αριθμό δειγμάτων για την ανίχνευση μεγάλου εύρους καταλοίπων-ουσιών που πρέπει να ερευνώνται σε σύντομο χρονικό διάστημα και αυτό είναι δύσκολο. Η εφαρμογή απλών και γρήγορων μεθόδων ελέγχου για την παρουσία καταλοίπων κρίνεται απαραίτητη για έναν αποτελεσματικό έλεγχο των δειγμάτων (Reig and Toldrà 2008).

Για τη δειγματοληψία και τον έλεγχο καταλοίπων στα ζώα και τα προϊόντα τους, η ανάλυση πρέπει να γίνεται αποκλειστικά από εργαστήρια τα οποία έχουν εγκριθεί από την αρμόδια εθνική αρχή για τον επίσημο έλεγχο καταλοίπων. Τα εργαστήρια αυτά θα πρέπει να είναι διαπιστευμένα σύμφωνα με το ISO 17025 και θα πρέπει να αποδεικνύουν την καταλληλότητά τους με ικανή και επιτυχή συμμετοχή σε διεργαστηριακές δοκιμές οι οποίες διοργανώνονται από τα εθνικά ή κοινοτικά εργαστήρια αναφοράς ή από κατάλληλους εξωτερικούς φορείς.

Ο όρος *Διαπίστευση* αφορά στη διαδικασία αναγνώρισης από εξουσιοδοτημένο σώμα, ότι ένας φορέας έχει την επάρκεια να διεξάγει καθορισμένες δραστηριότητες. Με την διαπίστευση τεκμηριώνεται η αξιοπιστία της προσφερόμενης σε κάθε περίπτωση υπηρεσίας και αξιολογείται η τεχνική επάρκεια προσωπικού και υποδομής για τη διεξαγωγή καθοριζόμενων δραστηριοτήτων. Η λειτουργία διαπιστευμένων εργαστηρίων στηρίζει την ελεύθερη διακίνηση προϊόντων, πέρα από τα εθνικά σύνορα και ο κατασκευαστής ο οποίος διακινεί τα προϊόντα του προς τον ευρωπαϊκό χώρο αλλά και πέρα από αυτό μπορεί να τεκμηριώσει την ποιοτική του επάρκεια με το

πιστοποιητικό εργαστηριακού ελέγχου. Αυτό γίνεται αποδεκτό χωρίς πρόσθετο εργαστηριακό έλεγχο στη χώρα προορισμού μόνο αν το εργαστήριο που έχει εκδώσει το πιστοποιητικό αυτό είναι διαπιστευμένο για τη συγκεκριμένη εργασία από το πιστοποιημένο και αναγνωρισμένο φορέα χορήγησης της διαπίστευσης όπως είναι και το Εθνικό Συμβούλιο Διαπίστευσης στην Ελλάδα (Τυπένος 2008).

Παρακάτω περιγράφονται οι δύο κύριες εργαστηριακές μέθοδοι που εφαρμόζονται για την ανίχνευση υπολειμμάτων αντιβιοτικών σε κρέας στο Εργαστήριο Ελέγχου Καταλοίπων Τροφίμων Ζωϊκής Προέλευσης στο Ινστιτούτο Υγιεινής Τροφίμων Αθηνών, το οποίο είναι διαπιστευμένο κατά ISO 17025, για την ανάλυση χημικών μεθόδων προσδιορισμού καταλοίπων ουσιών, σύμφωνα με το Εθνικό Πρόγραμμα Ελέγχου Καταλοίπων.

Η αναλυτική μεθοδολογία για τον προσδιορισμό καταλοίπων-ουσιών, την επιβεβαίωση και τον εργαστηριακό έλεγχό τους περιγράφεται σε κοινοτική νομοθεσία (Απόφαση 657/2002/ΕΚ). Αυτή η Απόφαση περιλαμβάνει ειδικά κριτήρια για την ερμηνεία των αποτελεσμάτων του επίσημου εργαστηριακού ελέγχου και στοιχεία για τον έλεγχο της αξιοπιστίας των μεθόδων.

Οι διαπιστευμένες και επικυρωμένες σύμφωνα με την Απόφαση 657/2002/ΕΚ, χημικές μέθοδοι που αναφέρονται και στο πεδίο διαπίστευσης για το Ινστιτούτο Υγιεινής Τροφίμων Αθηνών, είναι:

1. Θυρεοστατικά (6 ουσίες) σε ούρα από ζώα,
2. Β-αγωνιστές (16 ουσίες) σε ζωικό ιστό,
3. Β-αγωνιστές (16 ουσίες) σε ούρα, νερό,
4. Ηρεμιστικά (7 ουσίες) σε ζωικούς ιστούς,
5. Σουλφοναμίδες (10 ουσίες) σε ζωικό ιστό,
6. Σουλφοναμίδες (7 ουσίες) σε γάλα,
7. Σουλφοναμίδες (8 ουσίες) σε αυγά,
8. Τετρακυκλίνες (4 ουσίες) σε ζωικό ιστό,
9. Κινολόνες (7 ουσίες) σε μυϊκό ιστό,
10. Πράσινο του Μαλαχίτη και κρυσταλλικό του ιώδους σε ψάρια,
11. Μόλυβδο σε τρόφιμα ζωϊκής προέλευσης & προϊόντα τους,
12. Κάδμιο σε νεφρό, κρέας και ήπαρ,
13. Κάδμιο σε ιχθυηρά και προϊόντα αυτών,
14. Υδράργυρο σε ιχθυηρά και προϊόντα αυτών,
15. Αμινογλυκοσίδες (Στρεπτομυκίνη) σε ζωικό ιστό.

4.1. Δοκιμή Τρυβλίων Petri

Δειγματοληψία: Τα δείγματα τα οποία εξετάζονται παραλαμβάνονται συσκευασμένα σε ξεχωριστή σακούλα το καθένα πάνω στην οποία καταγράφεται ο κωδικός αριθμός του δείγματος, το είδος αυτού αλλά και η ημερομηνία δειγματοληψίας. Το κάθε δείγμα είναι σφραγισμένο αεροστεγώς και μεταφέρονται στο εργαστήριο ανάλυσης μέσα σε ισοθερμικά δοχεία με πάγο. Αφού παραληφθούν από το εργαστήριο αποθηκεύονται σε θερμοκρασία -18°C μέχρι τη στιγμή της ανάλυσης.

Προεργασία για την εξέταση: Την προηγούμενη μέρα πριν την εξέταση γίνεται προετοιμασία των θρεπτικών υποστρωμάτων και των μητρικών διαλυμάτων των αντιβιοτικών. Παράλληλα γίνεται εμβολιασμός των βακτηρίων *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis* και *Bacillus stearothermophilus* σε κατάλληλο θρεπτικό υλικό και ακολουθεί επώαση στις κατάλληλες συνθήκες.

Μέθοδος: Η μέθοδος που εφαρμόζεται λέγεται Δοκιμή Τρυβλίων Petri και πρόκειται για μία μικροβιολογική απεικονιστική μέθοδο τρυβλίων Petri η οποία στηρίζεται στον ενοφθαλμισμό θρεπτικών υποστρωμάτων με μικροβιολογικά στελέχη και στην ακόλουθη τοποθέτηση των δειγμάτων πάνω στην επιφάνεια αυτών των ενοφθαλισμένων υποστρωμάτων. Επιπροσθέτως στο κέντρο κάθε τρυβλίου Petri τοποθετείται ένας δίσκος εμποτισμένος με πρότυπο διάλυμα αντιβιοτικού, το οποίο και αποτελεί το μάρτυρα στην εξέταση. Τα τρυβλία Petri επωάζονται σε κατάλληλη θερμοκρασία για 24 ώρες. Σε περίπτωση που το δείγμα είναι θετικό παρουσιάζει περιμετρικά ένα δακτύλιο αναστολής με ακτίνα μεγαλύτερη των 2 χιλιοστών, ενώ στο κέντρο κάθε τρυβλίου Petri το πρότυπο διάλυμα θα πρέπει να έχει δώσει ζώνη αναστολής με ακτίνα μεγαλύτερη των 6 χιλιοστών. Παρακάτω ακολουθεί αναλυτικά η περιγραφή της εξέτασης για κάθε ομάδα αντιβιοτικών (Community Reference Laboratory of AFSSA-FOUGERES at France 2007).

4.1.1. Ανάλυση για Τετρακυκλίνες

Για την ανίχνευση αντιβιοτικών της ομάδας των τετρακυκλινών χρησιμοποιείται ως μικροοργανισμός μάρτυρας το ευαίσθητο βακτήριο *Bacillus cereus*, το οποίο ενοφθαλμίζεται σε κατάλληλο θρεπτικό υπόστρωμα δοκιμασίας με pH 6 που είναι αφυδατωμένο υπόστρωμα αναφοράς 10663 της εταιρείας MERCK ή ισοδύναμο το

οποίο αποτελείται από τα ακόλουθα συστατικά: peptone from casein 3.45 g/l, peptone from meat 3.45 g/l, sodium chloride 5.1 g/l, agar-agar 13.0 g/l. Από το ενοφθαλμισμένο αυτό υλικό μεταφέρονται 5 ml σε κάθε τρυβλίο Petri δημιουργώντας τόσα τρυβλία όσα χρειαζόμαστε κάθε φορά (ανάλογα με τον αριθμό των υπό εξέταση δειγμάτων) και αφήνεται να στερεοποιηθεί. Στη συνέχεια από κάθε δείγμα κόβονται με ειδικό διατρητικό 2 δίσκοι πάχους 2 mm και διαμέτρου 8mm και τοποθετούνται εκ διαμέτρου αντίθετα σε ένα από τα παραπάνω τρυβλία Petri. Στο κέντρο αυτού του τρυβλίου τοποθετείται ένας δίσκος από διηθητικό χαρτί διαμέτρου 6 mm, ο οποίος διαποτίζεται με 30 µl πρότυπου διαλύματος χλωροτετρακυκλίνης τελικής συγκέντρωσης 200 µg/l, που προήλθε με κατάλληλες αραιώσεις από το μητρικό διάλυμα του αντιβιοτικού συγκέντρωσης 50 mg ενεργούς ουσίας σε 50 ml απεσταγμένο νερό και προετοιμάστηκε την προηγούμενη της ανάλυσης ημέρα. Το κάθε τρυβλίο επωάζεται σε κλίβανο 30 °C για 24 ώρες. Την επόμενη μέρα το δείγμα ελέγχεται και κρίνεται αν είναι θετικό ή αρνητικό (Community Reference Laboratory of AFSSA-FOUGERES at France 2007).

4.1.2. Ανάλυση για Αμινογλυκοσίδες (Στρεπτομυκίνη)

Για την ανίχνευση αντιβιοτικών της ομάδας των αμινογλυκοσιδών χρησιμοποιείται ως μικροοργανισμός μάρτυρας το ευαίσθητο βακτήριο *Bacillus subtilis*, ο οποίος ενοφθαλμίζεται θρεπτικό υπόστρωμα Antibiotic Medium 11 με pH 7.2 που περιέχει τα ακόλουθα συστατικά: beef extract 1.5 g/l, yeast extract 3 g/l, peptone 6 g/l, agar 15 g/l, dextrose 1 g/l, pancreatic digest of casein 1g/l. Ακολουθείται η ίδια διαδικασία που περιγράφηκε για την ανίχνευση των τετρακυκλινών. Το πρότυπο διαλύματος αμινογλυκοσίδης είναι διάλυμα στρεπτομυκίνης τελικής συγκέντρωσης 2000 µg/l, που προήλθε με κατάλληλες αραιώσεις από το μητρικό διάλυμα του αντιβιοτικού συγκέντρωσης 50 mg ενεργούς ουσίας σε 50 ml απεσταγμένο νερό. Οι συνθήκες επώασης είναι 30 °C για 24 ώρες (Community Reference Laboratory of AFSSA-FOUGERES at France 2007).

4.1.3. Ανάλυση για Σουλφοναμίδες

Για την ανίχνευση αντιβιοτικών της ομάδας των σουλφοναμιδών χρησιμοποιείται ως μικροοργανισμός μάρτυρας το ευαίσθητο βακτήριο *Bacillus stearothermophilus*, ο οποίος ενοφθαλμίζεται σε θρεπτικό υπόστρωμα Diagnostic Sensitive Test Agar (DST)

με pH 7.4 και με συνταγή: proteose peptone 10 g/lit, realinfluxion solids 10 g/lit, glucose 2 g/lit, sodium chloride 3 g/lit, Na₂HPO₄ 2g/lit, sodium acetate 1 g/lit, aneurine 0.00002g/lit, adenine sulphate 6.01 g/lit, guanini hydrochloride 0.01 g/lit, xanthine 0.01 g/lit, urasil 0.01 g/lit, agar 12 g/lit, ενώ στο ίδιο υπόστρωμα προστίθεται και 1% διάλυμα τριμεθοπρίμης (απαραίτητη για την ενεργοποίηση της σουλφοναμίδης). Η διαδικασία που ακολουθείται είναι η ίδια με αυτή που περιγράφηκε παραπάνω. Το πρότυπο διαλύματος σουλφοναμίδης είναι διάλυμα σουλφαμεθαζίνης τελικής συγκέντρωσης 1000 µg/lit, που προήλθε με κατάλληλες αραιώσεις από το μητρικό διάλυμα του αντιβιοτικού συγκέντρωσης 50 mg ενεργούς ουσίας σε 50 ml απεσταγμένο νερό. Οι συνθήκες επώασης είναι 55 °C για 24 ώρες (Community Reference Laboratory of AFSSA-FOUGERES at France 2007).

4.2. Ραδιοανοσολογική μέθοδος Charm II

Η μέθοδος αυτή εφαρμόζεται για την ανίχνευση στρεπτομυκίνης, τετρακυκλινών και σουλφοναμιδών σε ιστό κρέατος και στηρίζεται στη χρήση δύο ανιχνευτών: ο ένας είναι το αντίστοιχο αντιβιοτικό (στρεπτομυκίνη ή τετρακυκλίνη ή σουλφοναμίδα) σημασμένο με [³H] (τρίτιο) και ο άλλος είναι ένας δεσμευτικός ανιχνευτής δηλαδή ένα μικροβιακό κύτταρο με ειδικούς υποδοχείς για το κάθε αντιβιοτικό. Όταν ο δεσμευτικός ανιχνευτής προστεθεί σε ένα δείγμα που περιέχει το αντίστοιχο αντιβιοτικό (στρεπτομυκίνη ή τετρακυκλίνη ή σουλφοναμίδα), το κατάλοιπο αυτό συνδέεται με τους υποδοχείς που είναι προσκολλημένοι στο μικροβιακό κύτταρο (δεσμευτικός ανιχνευτής). Αυτό αποτρέπει στη συνέχεια το σημασμένο με [³H] αντιβιοτικό να συνδεθεί σε αυτούς τους υποδοχείς. Κατά συνέπεια, όσο περισσότερο σημασμένο με [³H] αντιβιοτικό δεσμευτεί στους υποδοχείς, τόσο μικρότερη είναι η συγκέντρωση αυτού του αντιβιοτικού στο δείγμα (Charm Sciences Inc 2006).

4.2.1. Περιγραφή Μηχανήματος CHARM II

Το μηχάνημα το οποίο κάνει την μέτρηση για την ανίχνευση αντιβιοτικών είναι το CHARM II μοντέλο 7600 (Εικόνα 2). Ο αναλυτής αυτός διαθέτει μία ειδική εσοχή στην οποία τοποθετείται ειδικό γυάλινο φυαλίδιο που περιέχει το εκχυλισμένο προς ανάλυση τελικό δείγμα. Μόλις τοποθετήσουμε το τελικό δείγμα στην εσοχή επιλέγουμε τον κατάλληλο κωδικό που αντιστοιχεί σε κάθε ομάδα αντιβιοτικού και περιμένουμε να πραγματοποιήσει το μηχάνημα 60 μετρήσεις του ενός δευτερολέπτου

μέχρι να μας δώσει το τελικό αποτέλεσμα. Αν δηλαδή το δείγμα μας περιέχει ή όχι κάποιο αντιβιοτικό.



Εικόνα 2. Φωτογραφία του αναλυτή CHARM II μοντέλο 7600 που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία για τη ραδιοανοσολογική ανίχνευση στρεπτομυκίνης, τετρακυκλινών και σουλφοναμιδών σε κρέας.

Η τιμή που καθορίζει αν το δείγμα είναι θετικό ή αρνητικό ορίζεται από την τιμή αναφοράς (control point) που προσδιορίζεται σύμφωνα με οδηγίες που συνοδεύουν κάθε kit. Δηλαδή η τιμή αναφοράς είναι το όριο απόφασης για την κανονικότητα ή όχι ενός δείγματος.

Αν το αποτέλεσμα είναι πάνω από την τιμή αναφοράς το δείγμα μας είναι αρνητικό ενώ αν είναι κάτω από εκείνη το δείγμα μας είναι θετικό και οδηγείται για επιβεβαίωση με χημική μέθοδο (υγρή χρωματογραφία).

4.2.2. Μεθοδολογία για ανίχνευση Αμινογλυκοσιδών (Στρεπτομυκίνης)

Χρησιμοποιείται κατάλληλο kit για ανίχνευση στρεπτομυκίνης σε ιστό, της εταιρείας Charm Sciences Inc. Λαμβάνονται 10 g κρέατος και τοποθετούνται σε σακούλα stomacher. Από το δείγμα αφαιρείται το λίπος γιατί μπορεί να δημιουργήσει παρεμβολές στη διαδικασία. Προστίθενται 30 ml MSU extraction buffer (παρέχεται έτοιμο με το kit) στη σακούλα stomacher που περιέχει τα 10 γραμμάρια ιστού και το περιεχόμενο ομογενοποιείται στη συσκευή stomacher για 2 λεπτά. Στη συνέχεια, μεταφέρεται το υλικό της σακούλας στο κατάλληλα σημασμένο φιαλίδιο φυγοκέντρησης το οποίο στη συνέχεια τοποθετείται σε υδατόλουτρο 80 °C για 30 λεπτά. Ακολούθως, το φιαλίδιο τοποθετείται σε κρύο νερό για 10 λεπτά και ακολουθεί φυγοκέντρηση σε 3300 στροφές/λεπτό για 10 λεπτά. Λαμβάνονται 5 ml από το υπερκείμενο διάλυμα, τοποθετούνται σε γυάλινο φιαλίδιο και ελέγχεται το pH το οποίο πρέπει να είναι 7-7.5. Διαφορετικά αυτό διορθώνεται με την προσθήκη του

διαλύματος M2 buffer το οποίο παρέχεται στο κιτ. Με τη διαδικασία αυτή λαμβάνεται το εκχύλισμα του υπό εξέταση δείγματος.

Με το πίσω μέρος ενός μολυβιού ωθείται το ένα λευκό δισκίο (χάπι) που περιέχεται στο κιτ (και είναι ο μικροβιακός ανιχνευτής) σε ένα άδειο γυάλινο ειδικό φιαλίδιο, προστίθενται 300 μl δισαπεσταγμένου νερού και διαλύεται το χάπακι στον ανακινητή (vortex) για 10 δευτερόλεπτα. Κατόπιν προστίθενται 2 ml εκχυλίσματος δείγματος στο φιαλίδιο και ανακινείται καλά. Επωάζεται στους 35 °C για 2 λεπτά. Με το πίσω μέρος ενός μολυβιού ωθείται και το *πράσινο* δισκίο (το οποίο είναι το αντιβιοτικό σημασμένο με τρίτιο) στο γυάλινο φιαλίδιο. Ανακινείται για 10 δευτερόλεπτα στον ανακινητή (vortex) και επωάζεται στους 35 °C για 2 λεπτά. Ακολουθεί φυγοκέντρηση σε 3300 στροφές/λεπτό για 3 λεπτά. Απορρίπτεται αμέσως το υπερκείμενο υγρό, προστίθενται 300 μl νερού και ακολουθεί ανακίνηση. Κατόπιν προστίθενται 3 ml από το ειδικό υγρό σπινθηρισμού (scintillation fluid) και ανακινούμε. Το φιαλίδιο με το δείγμα τοποθετείται στον αναλυτή CHARM II και καταγράφεται η μέτρηση σπινθηρισμού (scintillation counts). Παρατηρείται αν το δείγμα είναι θετικό ή αρνητικό συγκρίνοντας το με την τιμή αναφοράς (control point) που δίνεται για το πράσινο δισκίο από την κατασκευάστρια εταιρεία. Εάν η μέτρηση του δείγματος είναι μεγαλύτερη από αυτή της τιμή αναφοράς, το δείγμα θεωρείται αρνητικό και αντίστροφα (Charm Sciences Inc 2006).

4.2.3. Μεθοδολογία για Ανίχνευση Τετρακυκλινών

Χρησιμοποιείται κατάλληλο κιτ για ανίχνευση Τετρακυκλινών σε ιστό, της εταιρείας Charm Sciences Inc. Λαμβάνονται 10 gr κρέατος και τοποθετούνται σε σακούλα stomacher. Από το δείγμα αφαιρείται το λίπος γιατί μπορεί να δημιουργήσει παρεμβολές στη διαδικασία. Προστίθενται 30 ml MSU extraction buffer στη σακούλα stomacher που περιέχει τα 10 γραμμάρια ιστού και το περιεχόμενο ομογενοποιείται στη συσκευή stomacher για 2 λεπτά. Στη συνέχεια, μεταφέρεται το υλικό της σακούλας στο κατάλληλα σημασμένο φυγοκεντρικό φιαλίδιο το οποίο στη συνέχεια τοποθετείται σε υδατόλουτρο 80 °C για 45 λεπτά. Ακολούθως, το φιαλίδιο τοποθετείται σε κρύο νερό για 10 λεπτά και ακολουθεί φυγοκέντρηση σε 3300 στροφές/λεπτό για 10 λεπτά. Λαμβάνονται 5 ml από το υπερκείμενο διάλυμα, τοποθετούνται σε γυάλινο φιαλίδιο και ελέγχεται το pH το οποίο πρέπει να είναι 7-7.5. Διαφορετικά αυτό διορθώνεται με την προσθήκη του διαλύματος M2 buffer το

οποίο παρέχεται στο κιτ. Με τη διαδικασία αυτή λαμβάνεται το εκχύλισμα του υπό εξέταση δείγματος.

Με το πίσω μέρος ενός μολυβιού ωθείται το λευκό δισκίο (χαπί) που περιέχεται στο κιτ (και είναι ο μικροβιακός ανιχνευτής) σε ένα άδειο γυάλινο ειδικό φιαλίδιο, προστίθενται 300 μl δισαπεσταγμένου νερού και διαλύεται το χαπάκι στον ανακινητή (vortex) για 10 δευτερόλεπτα. Κατόπιν προστίθενται 4 ml εκχυλίσματος δείγματος στο φιαλίδιο και ανακινείται καλά. Με το πίσω μέρος ενός μολυβιού ωθείται και το πορτοκαλί δισκίο (το οποίο είναι το αντιβιοτικό σημασμένο με τρίτιο) στο γυάλινο φιαλίδιο. Ανακινείται για 10 δευτερόλεπτα στον ανακινητή (vortex) και επωάζεται στους 35 °C για 5 λεπτά. Ακολουθεί φυγοκέντρηση σε 3300 στροφές/λεπτό για 5 λεπτά. Απορρίπτεται αμέσως το υπερκείμενο υγρό, προστίθενται 300 μl νερού και ακολουθεί ανακίνηση. Κατόπιν προστίθενται 3 ml από το ειδικό υγρό σπινθηρισμού (scintillation fluid) και ανακινούμε. Το φιαλίδιο με το δείγμα τοποθετείται στον αναλυτή CHARM II και καταγράφεται η μέτρηση σπινθηρισμού (scintillation counts). Παρατηρείται αν το δείγμα είναι θετικό ή αρνητικό συγκρίνοντας το με την τιμή αναφοράς (control point) που δίνεται από την κατασκευάστρια εταιρεία. Εάν η μέτρηση του δείγματος είναι μεγαλύτερη από αυτή της τιμής αναφοράς, το δείγμα θεωρείται αρνητικό και αντίστροφα (Charm Sciences Inc 2006).

4.2.4. Μεθοδολογία για ανίχνευση Σουλφοναμιδών

Χρησιμοποιείται κατάλληλο κιτ για ανίχνευση Τετρακυκλινών σε ιστό, της εταιρείας Charm Sciences Inc. Λαμβάνονται 10 gr κρέατος και τοποθετούνται σε σακούλα stomacher. Από το δείγμα αφαιρούμε το λίπος γιατί μπορεί να δημιουργήσει παρεμβολές στη διαδικασία. Προστίθενται 30 ml MSU extraction buffer στη σακούλα stomacher που περιέχει τα 10 γραμμάρια ιστού και το περιεχόμενο ομογενοποιείται στη συσκευή stomacher για 2 λεπτά. Στη συνέχεια, μεταφέρεται το υλικό της σακούλας στο κατάλληλα σημασμένο φυγοκεντρικό φιαλίδιο το οποίο στη συνέχεια τοποθετείται σε υδατόλουτρο 80 °C για 45 λεπτά. Ακολούθως, το φιαλίδιο τοποθετείται σε κρύο νερό για 10 λεπτά και ακολουθεί φυγοκέντρηση σε 3300 στροφές/λεπτό για 10 λεπτά. Λαμβάνονται 4 ml από το υπερκείμενο διάλυμα, τοποθετούνται σε γυάλινο φιαλίδιο και ελέγχεται το pH το οποίο πρέπει να είναι 7-7.5. Διαφορετικά αυτό διορθώνεται με την προσθήκη του διαλύματος M2 buffer το οποίο παρέχεται στο κιτ. Με τη διαδικασία αυτή λαμβάνεται το εκχύλισμα του υπό εξέταση δείγματος.

Με το πίσω μέρος ενός μολυβιού ωθείται το λευκό δισκίο (χάπι) που περιέχεται στο κιτ (και είναι ο μικροβιακός ανιχνευτής) σε ένα άδειο γυάλινο ειδικό φιαλίδιο, προστίθενται 300 μl διαπεσταγμένου νερού και διαλύεται το χαπάκι στον ανακινητή (vortex) για 10 δευτερόλεπτα. Κατόπιν προστίθενται 4 ml εκχυλίσματος δείγματος στο φιαλίδιο και ανακινείται καλά. Με το πίσω μέρος ενός μολυβιού ωθείται και το ρόζ δισκίο (το οποίο είναι το αντιβιοτικό σημασμένο με τρίτιο) στο γυάλινο φιαλίδιο. Ανακινείται για 10 δευτερόλεπτα στον ανακινητή (vortex) και επωάζεται στους 65 °C για 3 λεπτά. Ακολουθεί φυγοκέντρωση σε 3300 στροφές/λεπτό για 3 λεπτά. Απορρίπτεται αμέσως το υπερκείμενο υγρό, προστίθενται 300 μl νερού και ακολουθεί ανακίνηση. Κατόπιν προστίθενται 3 ml από το ειδικό υγρό σπινθηρισμού (scintillation fluid) και ανακινούμε. Το φιαλίδιο με το δείγμα τοποθετείται στον αναλυτή CHARM II και καταγράφεται η μέτρηση σπινθηρισμού (scintillation counts). Παρατηρείται αν το δείγμα είναι θετικό ή αρνητικό συγκρίνοντας το με την τιμή αναφοράς (control point) που δίνεται από την κατασκευάστρια εταιρεία. Εάν η οπτική πυκνότητα του δείγματος είναι μεγαλύτερη από αυτή την τιμή αναφοράς, το δείγμα θεωρείται αρνητικό και αντίστροφα (Charm Sciences Inc 2006).

5. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΩΝ ΣΕ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΝΩΠΟΥ ΚΡΕΑΤΟΣ

Κατά την εξάμηνη πρακτική μου άσκηση στο Εργαστήριο Ελέγχου Καταλοίπων Τροφίμων Ζωϊκής Προέλευσης εξετάστηκαν 256 δείγματα ως προς την παρουσία σε αυτά των αντιβιοτικών στρεπτομυκίνη, τετρακυκλίνες και σουλφοναμίδες. Τα δείγματα αυτά προέρχονταν από κρέας (βόειο και χοιρινό), νεφρά, κοτόπουλο, γάλα, ψάρια, γαρίδες και σουρίμι. Τα 65 από αυτά τα δείγματα προέρχονταν από νωπό κρέας (τα 50 αφορούσαν βόειο και χοιρινό κρέας και τα 15 κοτόπουλο) και προέρχονταν από περιοχές της Ελλάδας όπως είναι η Χαλκιδική, το Ηράκλειο Κρήτης, η Αιτωλοακαρνανία, η Καρδίτσα, η Λάρισα, η Καβάλα, η Ρόδος, τα Μέγαρα, η Κομοτηνή, τα Ιωάννινα και η Χίος.

5.1. Αποτελέσματα μικροβιολογικής μεθόδου ανίχνευσης καταλοίπων αντιβιοτικών σε νωπό κρέας (Δοκιμή Τρυβλίων Petri)

Από τα 65 δείγματα νωπού κρέατος που εξετάστηκαν, τα 47 δείγματα ήταν αρνητικά στην ύπαρξη οποιασδήποτε ομάδας αντιμικροβιακής ουσίας (αντιβιοτικού)

που ανιχνεύει η μέθοδος τρυβλίων Petri που περιγράφηκε παραπάνω, δηλαδή τις αμινογλυκοσίδες (στρεπτομυκίνη), τετρακυκλίνες και σουλφοναμίδες. Τα 18 δείγματα ήταν ύποπτα (θετικά στο screening με τα τρυβλία Petri) για την παρουσία κάποιου από τα παραπάνω αντιβιοτικά. Στον **Πίνακα 5** παρατίθενται τα αποτελέσματα ανίχνευσης καταλοίπων αντιβιοτικών (Αμινογλυκοσίδες, Τετρακυκλίνες, Σουλφοναμίδες) που ελήφθησαν από τα 65 δείγματα νοπού κρέατος με τη μέθοδο Δοκιμής Τρυβλίων Petri.

Πίνακας 5. Αποτελέσματα Δοκιμής Τρυβλίων Petri σε δείγματα νοπού κρέατος.

| Αμινογλυκοσίδες (Στρεπτομυκίνη) | Τετρακυκλίνες | Σουλφοναμίδες |
|------------------------------------|----------------------|----------------------|
| Σύνολο δειγμάτων 65 | Σύνολο δειγμάτων 65 | Σύνολο δειγμάτων 65 |
| 61 δείγματα αρνητικά | 62 δείγματα αρνητικά | 54 δείγματα αρνητικά |
| 4 δείγματα θετικά | 3 δείγματα θετικά | 11 δείγματα θετικά |

5.2. Αποτελέσματα της ραδιοανοσολογικής μεθόδου ανίχνευσης αντιβιοτικών σε νοπού κρέας (μέθοδος Charm II)

Από τα 18 δείγματα κρέατος τα οποία ανιχνεύτηκαν θετικά σε κάποιο αντιβιοτικό με τη δοκιμή τρυβλίων Petri (μικροβιολογική μέθοδος), τα 12 βρέθηκαν αρνητικά με τη μέθοδο CHARM II που ακολούθησε και τα 6 δείγματα βρέθηκαν θετικά στο αντίστοιχο αντιβιοτικό. Στον **Πίνακα 6** παρατίθενται τα αποτελέσματα ανίχνευσης καταλοίπων αντιβιοτικών (Αμινογλυκοσίδες, Τετρακυκλίνες, Σουλφοναμίδες) που ελήφθησαν στα δείγματα κρέατος με τη μέθοδο Charm II.

Πίνακας 6. Αποτελέσματα δοκιμής Charm II σε δείγματα νοπού κρέατος που έδωσαν θετικό αποτέλεσμα με τη μέθοδο δοκιμής των τρυβλίων Petri.

| Αμινογλυκοσίδες (Στρεπτομυκίνη) | Τετρακυκλίνες | Σουλφοναμίδες |
|------------------------------------|---------------------|---------------------|
| Σύνολο δειγμάτων 4 | Σύνολο δειγμάτων 3 | Σύνολο δειγμάτων 11 |
| 2 δείγματα αρνητικά | 2 δείγματα αρνητικά | 8 δείγματα αρνητικά |
| 2 δείγματα θετικά | 1 δείγμα θετικό | 3 δείγματα θετικά |

6. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Σύμφωνα με τα όσα αναφέρθηκαν στην παρούσα εργασία, τα αντιβιοτικά χρησιμοποιούνται στην ζωική παραγωγή είτε για θεραπευτικούς σκοπούς, είτε για προληπτικούς λόγους με την τροφή ή το νερό ως μέσα πρόληψης λοιμώξεων, είτε αποσκοπώντας στην βελτίωση των αποδόσεων όπως παράδειγμα, για ανάπτυξη και αύξηση βάρους. Η χρησιμοποίηση των αντιβιοτικών ως αυξητικών παραγόντων στη διατροφή των ζώων ήταν ευεργετική, για τη βελτίωση των αποδόσεών τους και την πρόληψη των ασθενειών. Με την χρήση των αντιβιοτικών ελέγχονται παθογόνοι μικροοργανισμοί όπως είναι βακτήρια των γενών *Salmonella* και *Campylobacter* καθώς και το είδος *Escherichia coli*, αλλά και διάφορα είδη Εντεροκόκκων.

Οι αντιβιοτικοί αυξητικοί παράγοντες χρησιμοποιούνται προκειμένου να βοηθήσουν τα ζώα να χωνέψουν την τροφή τους πιο αποτελεσματικά έτσι ώστε να επωφεληθούν και να αναπτυχθούν σε ισχυρές και υγιείς μονάδες. Η χρήση αυτών γίνεται με την προσθήκη τους στις ζωοτροφές σε χαμηλές δοσολογίες βελτιώνοντας την ποιότητα του παραγόμενου προϊόντος αυξάνοντας την περιεκτικότητά του σε πρωτεΐνες.

Ωστόσο, η χρήση και η κατάχρηση αντιβιοτικών για ένα ορισμένο χρονικό διάστημα μπορεί να οδηγήσει στην ανάπτυξη βακτηριακών πληθυσμών ανθεκτικών στα αντιβιοτικά και έτσι μπορεί να δημιουργηθούν ανθεκτικά βακτήρια, τα οποία είναι πιθανό να μολύνουν τους ανθρώπους. Εξαιτίας του κινδύνου για τη δημόσια υγεία που προκύπτει από τη συνεχή ανάπτυξη παθογόνων βακτηρίων απαγορεύτηκε η χρησιμοποίησή τους ως αυξητικοί παράγοντες στην Ε.Ε. Σύμφωνα με τον κανονισμό (ΕΚ) 1831/2003 η Ε.Ε. προέβλεπε τη σταδιακή κατάργηση, μέχρι την 1/1/2006, της χρήσης αντιβιοτικών ως αυξητικοί παράγοντες στις ζωοτροφές, προκειμένου να διασφαλιστεί υψηλότερο επίπεδο προστασίας του καταναλωτή, των ζώων αλλά και του περιβάλλοντος.

Παρά το γεγονός της απαγόρευσης χρήσης των αντιβιοτικών ως αυξητικών παραγόντων στις ζωοτροφές, πολλές φορές αυτά συνεχίζουν να χρησιμοποιούνται από τους παραγωγούς ως πρόσθετα στις ζωοτροφές. Επιπροσθέτως, η χρήση τους για θεραπευτικούς σκοπούς δεν εφαρμόζεται πάντοτε με τήρηση του απαραίτητου χρόνου αναμονής πριν τη σφαγή του ζώου. Αποτέλεσμα των παραπάνω είναι η συχνή εμφάνιση αυξημένων συγκεντρώσεων καταλοίπων στο κρέας, οι οποίες ξεπερνούν τα νομοθετημένα ασφαλή όρια που έχουν οριστεί από την Ε.Ε. (Κανονισμός 37/2010).

Για την ανίχνευση και τον ποσοτικό προσδιορισμό υπολειμμάτων αντιβιοτικών σε κρέας εφαρμόζεται εργαστηριακός έλεγχος. Η νομοθεσία της Ε.Ε. επιβάλλει την κατάρτιση εθνικών προγραμμάτων ελέγχου καταλοίπων σύμφωνα με συγκεκριμένες διαδικασίες δειγματοληψίας. Για τη δειγματοληψία και τον έλεγχο καταλοίπων σε ζώοντα ζώα και τα προϊόντα αυτών, η ανάλυση πρέπει να γίνεται αποκλειστικά από εργαστήρια τα οποία έχουν εγκριθεί από την αρμόδια αρχή για τον επίσημο έλεγχο καταλοίπων. Τα εργαστήρια αυτά θα πρέπει να είναι διαπιστευμένα σύμφωνα με το ISO 17025. Ο όρος διαπίστευση αφορά στη διαδικασία αναγνώρισης από εξουσιοδοτημένο σώμα, ότι ένα εργαστήριο έχει την επάρκεια να διεξάγει καθορισμένες δραστηριότητες. Με την διαπίστευση τεκμηριώνεται η αξιοπιστία της προσφερόμενης υπηρεσίας και αξιολογείται η τεχνική επάρκεια προσωπικού και υποδομής για τη διεξαγωγή αποτελεσμάτων.

Στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε ανάλυση δειγμάτων νωπού κρέατος για τυχόν παρουσία των αντιβιοτικών στρεπτομυκίνη, σουλφοναμίδες και τετρακυκλίνες, με την εφαρμογή δύο μεθόδων: τη μέθοδο Δοκιμής Τρυβλίων Petri και την Ραδιοανοσολογική μέθοδο Charin II. Οι αναλύσεις αυτές έλαβαν χώρα στο Εργαστήριο Ελέγχου Καταλοίπων Τροφίμων Ζωϊκής Προέλευσης (το οποίο είναι διαπιστευμένο σύμφωνα με το ISO 17025) στο Ινστιτούτο Υγιεινής Τροφίμων Αθηνών, κατά τη διάρκεια εκπόνησης της πρακτικής μου εξάσκησης στο παραπάνω εργαστήριο. Η ομάδα αντιβιοτικών η οποία ανιχνεύτηκε στα περισσότερα δείγματα νωπού κρέατος που εξετάστηκαν είναι αυτή των Σουλφοναμιδών (3 θετικά δείγματα στο σύνολο των 65 δειγμάτων που εξετάστηκαν) και ακολουθούν οι ομάδες των Αμινογλυκοσιδών (Στρεπτομυκίνη) (2 δείγματα) και των Τετρακυκλινών (1 δείγμα).

Η παρουσία αυτών των καταλοίπων μπορεί να οφείλεται στη μη τήρηση των χρόνων αναμονής που πρέπει να μεσολαβεί προτού τα ζώα οδηγηθούν για σφαγή. Γνωρίζουμε άλλωστε ότι συνηθίζεται στην καθημερινή πρακτική να χρησιμοποιούνται σκευάσματα σουλφοναμιδών ή τετρακυκλινών μόνα τους ή σε συνδυασμό με άλλες ουσίες, για την αντιμετώπιση αναπνευστικών και πεπτικών νοσημάτων προληπτικά ή θεραπευτικά. Σε περίπτωση που η χρήση τους γίνεται αλόγιστη και δεν τηρούνται οι χρόνοι αναμονής, είναι λογικό να έχουμε αυξημένα ποσοστά θετικών δειγμάτων σε ιστούς όπως το κρέας. Γι' αυτό το λόγο είναι σημαντικό να τηρούνται από τους παραγωγούς και αρμόδιους κτηνιάτρους, παράγοντες όπως είναι η συνταγογράφηση των κτηνιατρικών φαρμάκων, η σωστή δοσολογία αυτών, η τήρηση των οδηγιών δειγματοληψίας όπως αυτές ορίζονται στην

περί καταλοίπων νομοθεσία, η σωστή σφράγιση-συντήρηση των δειγμάτων και η έγκαιρη αποστολή τους στα εργαστήρια. Τα παραπάνω συμβάλλουν αφενός στην παραγωγή ασφαλών τροφίμων και αφετέρου στην έκδοση ορθών αποτελεσμάτων (Μεθενίτου και συν. 2008).

7. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Ελληνική βιβλιογραφία

- Γεωργάκης Σ., Γεωργάκη-Σχιζονίκα Α. (2008) Το κρέας ως κεντρικό σημείο διατροφής του ανθρώπου. Πρακτικά 1^{ου} Πανελληνίου Συνεδρίου για το Κρέας και τα Προϊόντα του, Αθήνα, σ. 101-103.
- Ζέρβας Γ. (2008) Η συμβολή της διατροφής στην παραγωγή κρέατος υψηλής ποιότητας. Πρακτικά 1^{ου} Πανελληνίου Συνεδρίου για το Κρέας και τα Προϊόντα του, Αθήνα, σ. 173-174.
- Μεθενίτου Γ., Παντελιά Μ., Μαλισιόβα Ε., Σκαφίδας Δ. (2008) Διερεύνηση παρουσίας αντιμικροβιακών παραγόντων σε τρόφιμα ζωικής προέλευσης από αναλύσεις που πραγματοποιήθηκαν στο Εθνικό Εργαστήριο Αναφοράς για τους αντιμικροβιακούς παράγοντες. Πρακτικά 1^{ου} Πανελληνίου Συνεδρίου για το Κρέας και τα Προϊόντα του, Αθήνα, σ. 402.
- Μουζούρας Σ. Γ. (1996) Κτηνιατρική Φαρμακολογία. Εκδόσεις Sawas Mouzouras, Αθήνα.
- Μουντζούρης Κ. (2008) Ο ρόλος των πρόσθετων υλών στη διατροφή των ζώων για τη βελτίωση των αποδόσεων και της ασφάλειας του παραγόμενου κρέατος. Πρακτικά 1^{ου} Πανελληνίου Συνεδρίου για το Κρέας και τα Προϊόντα του, Αθήνα, σ. 29,31.
- Σιμιτζής Π., Μπουλής Α., Δαρζέντα Ε., Αποστολάκη Ε. (2008) Υγιεινές ζωοτροφές- Ασφαλές κρέας. Από ποιους παράγοντες επηρεάζεται η μεταξύ τους σχέση; Πρακτικά 1^{ου} Πανελληνίου Συνεδρίου για το Κρέας και τα Προϊόντα του, Αθήνα, σ. 43.
- Στέρης Ι.Β και Ιωσηφίδου Γ.Ε. (2004). Η συμβολή της διατροφής στην παραγωγή κρέατος υψηλής ποιότητας,. Πρακτικά 3^{ου} Πανελληνίου Συμποσίου Υγιεινής και Τεχνολογίας Τροφίμων, Αθήνα, σ. 380-381.
- Τυρπένου Α.Ε. (2008) Ποιότητα κρέατος και κατάλοιπα. Πρακτικά 1^{ου} Πανελληνίου Συνεδρίου για το Κρέας και τα Προϊόντα του, Αθήνα, σ. 426-430.

Υπουργείο Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων, Διεύθυνση Αγροτικής Οικιακής Οικονομίας (2004). Μεσογειακή Διατροφή, Αθήνα.

Φεγγερός Κ. (2008). Ποιότητα ζωοτροφών και παραγωγή ζωικών προϊόντων. Πρακτικά 1^{ου} Πανελληνίου Συνεδρίου για το Κρέας και τα Προϊόντα του, σ. 21-23, Αθήνα.

Χατζηγεωργίου Ι. (2008). Η συμβολή της βόσκησης στην παραγωγή ποιοτικού κρέατος. Πρακτικά 1^{ου} Πανελληνίου Συνεδρίου για το Κρέας και τα Προϊόντα του, σ. 25-27. Αθήνα.

Ξένη βιβλιογραφία

Barbosa J., Cruz C., Martins J., Silvia J.M., Neves C., Alves C., Ramos F., Da Silveira M.I., (2005). Food poisoning by clenbuterol in Portugal. Food Additives and Contaminants, 22: 563-566.

Brockman R. P., & Laarveld R., (1986). Hormonal regulation of metabolism in ruminants. Review. Livestock and Production Science, 14: 313-317.

Butaye P., Devriese L.A. & Haesebrouck F., (2001). Differences in antibiotic resistance patterns of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* strains isolated from farm and pet animals. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 45: 1374-1378.

Casewell M., Sriis C., Marco E., McMullin P., Philips I., (2003). The European Ban on growth-promoting antibiotic and emerging consequences for human and animal health, 52: 159-161.

Cerniglia C. E., & Kotarski S., (1999). Evaluation of veterinary drug residues in food for their potential to affect human intestinal microflora. Regulatory Toxicology and Pharmacology, 29: 238-261.

Charm Sciences Inc (2006) Πιστοποιητικά Ανάλυσης ISO της εταιρείας Charm Sciences Inc και συνοδευτικά έγγραφα.

Community Reference Laboratory of AFSSA-FOUGERES, (2007). Microbiological screening method for the detection of antimicrobials, France.

Croubels S., Daeseleire E., De Baere S., De Backer P., Courteyn D., (2004). Feed and Drugs Residues. Encyclopedia of Meat Sciences, 1172-1187.

- Duquette P.F. & Muir L.A., (1985). Effect of the b-adrenergic agonists isoproterenol, clenbuterol, L-640,033 and BRL 35135 on lipolysis and lipogenesis in rat adipose tissue in vitro. *Journal of Animal Science*, 61: 265.
- EFSA (2007). Opinion of the scientific panel on contaminants in the food chain on a request from the European Commission related to hormone residues in bovine meat and meat products. *The EFSA Journal*, 510: 1-62.
- EFSA (2008). Microbiological risk assessment in feedingstuffs for food-producing animals. *The EFSA Journal*, 720: 1-84.
- FAA-MAF (2000). Review of Animal health antibiotic products and their potential for contributing to the development of antibiotic resistance strains of human bacterial pathogens. Information paper. Agricultural Compounds and Veterinary Medicines Group. Food Assurance Authority. Ministry of Agriculture and Forestry. New Zealand.
- Heilig S., Lee P., Breslow L, (2002). Curtailing antibiotic use in Agriculture, 176: 9-11.
- Hilbert F. and Smulders F.J.M., (2004). Antibiotics/Resistance in Food-Borne Pathogens. *Encyclopedia of Meat Science*, 38-43.
- Hughes P. and Heritage J., (2002). Antibiotic growth promoters in food animals. *Assessing quality and safety of animal*, 129-130.
- Jensen B.B., (1998). The impact of feed additives on the microbial ecology of the gut in young pigs. *Journal of Animal and Feed Sciences*, 45-64.
- Johnston A.M., (2001). Animals and antibiotics. *International Journal of Antimicrobial Agents* 18, 291.
- Kan C.A. and Meijer G.A.L., (2007). The risk of contamination of food with toxic substances present in animal feed. *Animal Feed Science and Technology* 133: 84-108.
- Lone K.P., (1997). Natural sex steroids and their xenobiotic analogs in animal production : Growth, carcass quality, pharmacokinetics, metabolism, mode of action, residues, methods and epidemiology. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 37: 93-209.
- Moloney A., Allen P., Joseph R. & Tarrant V., (1991). Influence of beta-adrenergic agonists and similar compounds on growth. In A. M. Pearson & T. R. Dutson (Eds.), *growth regulation in farm animals* (pp. 455-513). London: Elsevier Applied Science.

- NOAH (National Office of Animal Health) (2001). Antibiotics for animals. <http://www.noah.co.uk/issues/antibiotics.htm>. Τελευταία επίσκεψη 6/6/2010.
- Norrung B and Buncic S., (2008). Microbial safety of meat in the European Union. *Meat Science* 78: 14-24.
- Prescott J.F. and Baggot J.D., (1993). *Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine*, 2nd edition, Iowa State University Press, pp 564-565.
- Reig M. and Todra F., (2007). Veterinary Drug residues in meat: Concerns and rapid methods for detection. *Encyclopedia of Meat Sciences*, 60-61.
- Thomke S., and Elwinger K., (1998). Growth promotants in feeding pigs and poultry ii; mode of action of antibiotic growth promotants. *Annales de Zootechnie*, 47: 153-167.
- Vollard E. J., & Clasener H.A.L., (1994). Colonization resistance. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 38: 409-414.

Νομοθετήματα

- Κανονισμός (ΕΟΚ) Αριθ. 2377/1990. Απόφαση του συμβουλίου για τη θέσπιση κοινοτικής διαδικασίας για τον καθορισμό ανωτάτων ορίων καταλοίπων κτηνιατρικών φαρμάκων στα τρόφιμα ζωικής προέλευσης. EL224, 26/06/1990.
- Απόφαση 657/2002/ΕΚ. Απόφαση επιτροπής για εφαρμογή της οδηγίας 96/23/ΕΚ του συμβουλίου σχετικά με την επίδοση των αναλυτικών μεθόδων και την ερμηνεία των αποτελεσμάτων EL 221, 12/08/2002.
- Κανονισμός (ΕΚ) Αριθ. 1831/2003. Απόφαση του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου σχετικά με τις πρόσθετες ύλες που χρησιμοποιούνται στην διατροφή ζώων L268/29, 22/09/2003.
- Κανονισμός (ΕΚ) Αριθ. 853/2004. Απόφαση του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου σχετικά με τον καθορισμό ιδικών κανόνων υγιεινής για τα τρόφιμα ζωικής προέλευσης L 139/55, 29/04/2004.
- Κανονισμός (ΕΚ) Αριθ. 37/2010. Απόφαση του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και της επιτροπής σχετικά με τις φαρμακολογικώς δραστικές ουσίες και την ταξινόμησή τους όσον αφορά τα ανώτατα όρια καταλοίπων στα τρόφιμα ζωικής προέλευσης L15/1, 22/12/2009.

European Commission, (2001). Establishment of maximum residue limits (MRLs) for residues of veterinary medicinal products in foodstuffs of animal origin .Volume 8. Notice to Applicants and note for Guidance. European Commission Enterprise Directorate- General.F2/AW D (2001) - Final.