



**ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ**  
**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΔΥΤΙΚΗΣ ΑΤΤΙΚΗΣ**

**«Αντιμικροβιακές ουσίες στο αγελαδινό και αιγοπρόβειο γάλα- Ένα πρόβλημα δημόσιας υγείας»**

**Καβουκλή Σταυρούλα-Γεωργία 15034, Καρδιόλακα Αικατερίνη 15036**

**Επιβλέπων Καθηγητής: Αντωνόπουλος Διονύσιος**

**ΑΘΗΝΑ 2021**



**DEPARTMENT OF SCIENCE AND FOOD TECHNOLOGY**  
**UNIVERSITY OF WEST ATTICA**

**« Antimicrobials in cow's , sheep's and goat's milk- A public health problem»**

**Kavoukli Stavroula-Georgia 15034, Kardiolaka Aikaterini 15036**

**Supervisor: Antonopoulos Dionysis**

**ATHENS 2021**

**ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ : ΑΝΤΩΝΟΠΟΥΛΟΣ ΔΙΟΝΥΣΙΟΣ**

**ΜΕΛΟΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ : ΧΟΥΧΟΥΛΑ ΔΗΜΗΤΡΑ**

**ΜΕΛΟΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ : ΣΤΕΦΑΝΟΥ ΒΑΛΕΝΤΙΝΑ**

## ΔΗΛΩΣΗ ΣΥΓΓΡΑΦΕΑ ΠΤΥΧΙΑΚΗΣ/ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Ο/η κάτωθι υπογεγραμμένος/η Καβουκλή Σταυρούλα-Γεωργία του Σακελλάριου, με αριθμό μητρώου 15034 φοιτητής/τρια του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής της Σχολής Επιστημών Τροφίμων του Τμήματος Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων, δηλώνω υπεύθυνα ότι:

«Είμαι συγγραφέας αυτής της πτυχιακής/διπλωματικής εργασίας και ότι κάθε βοήθεια την οποία είχα για την προετοιμασία της είναι πλήρως αναγνωρισμένη και αναφέρεται στην εργασία. Επίσης, οι όποιες πηγές από τις οποίες έκανα χρήση δεδομένων, ιδεών ή λέξεων, είτε ακριβώς είτε παραφρασμένες, αναφέρονται στο σύνολό τους, με πλήρη αναφορά στους συγγραφείς, τον εκδοτικό οίκο ή το περιοδικό, συμπεριλαμβανομένων και των πηγών που ενδεχομένως χρησιμοποιήθηκαν από το διαδίκτυο. Επίσης, βεβαιώνω ότι αυτή η εργασία έχει συγγραφεί από μένα αποκλειστικά και αποτελεί προϊόν πνευματικής ιδιοκτησίας τόσο δικής μου, όσο και του Ιδρύματος.

Παράβαση της ανωτέρω ακαδημαϊκής μου ευθύνης αποτελεί ουσιώδη λόγο για την ανάκληση του πτυχίου μου».

Ο/Η Δηλών/ούσα



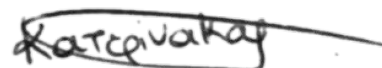
## ΔΗΛΩΣΗ ΣΥΓΓΡΑΦΕΑ ΠΤΥΧΙΑΚΗΣ/ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Ο/η κάτωθι υπογεγραμμένος/η Καρδιόλακα Αικατερίνη του Δημητρίου, με αριθμό μητρώου 15036 φοιτητής/τρια του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής της Σχολής Επιστημών Τροφίμων του Τμήματος Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων, δηλώνω υπεύθυνα ότι:

«Είμαι συγγραφέας αυτής της πτυχιακής/διπλωματικής εργασίας και ότι κάθε βοήθεια την οποία είχα για την προετοιμασία της είναι πλήρως αναγνωρισμένη και αναφέρεται στην εργασία. Επίσης, οι όποιες πηγές από τις οποίες έκανα χρήση δεδομένων, ιδεών ή λέξεων, είτε ακριβώς είτε παραφρασμένες, αναφέρονται στο σύνολό τους, με πλήρη αναφορά στους συγγραφείς, τον εκδοτικό οίκο ή το περιοδικό, συμπεριλαμβανομένων και των πηγών που ενδεχομένως χρησιμοποιήθηκαν από το διαδίκτυο. Επίσης, βεβαιώνω ότι αυτή η εργασία έχει συγγραφεί από μένα αποκλειστικά και αποτελεί προϊόν πνευματικής ιδιοκτησίας τόσο δικής μου, όσο και του Ιδρύματος.

Παράβαση της ανωτέρω ακαδημαϊκής μου ευθύνης αποτελεί ουσιώδη λόγο για την ανάκληση του πτυχίου μου».

Ο/Η Δηλών/ούσα



## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το γάλα αποτελεί σημαντικό στοιχείο στην διατροφή του ανθρώπου από πολύ παλιά και συνέβαλε σημαντικά στην επιβίωση και στην υγεία του. Οι συνθήκες διαβίωσης, η διατροφή, και η υγεία των γαλακτοφόρων ζώων επηρεάζουν την υγιεινή κατάσταση του γάλακτος και το επιμολύνουν με ανεπιθύμητες ουσίες που προκαλούν προβλήματα στην υγεία του καταναλωτή. Τα αντιβιοτικά αποτελούν έναν ανεπιθύμητο εξωγενή αντιμικροβιακό παράγοντα που μπορεί να μολύνει το γάλα. Χρησιμοποιούνται για την θεραπεία διαφόρων ασθενειών των ζώων με σημαντικότερη αυτή της μαστίτιδας. Μετά την χορήγηση του αντιβιοτικού στο ζώο, ένα μέρος από αυτό εκκρίνεται στο γάλα. Η παρουσία τους στο γάλα δημιουργεί τεράστια προβλήματα στην παρασκευή ζυμωμένων γαλακτοκομικών προϊόντων, αλλεργίες σε ευαίσθητες ομάδες ανθρώπων σε ορισμένα αντιβιοτικά καθώς και μεταλλάξεις σε παθογόνα στελέχη μικροοργανισμών. Με την εκπαίδευση και ενημέρωση των κτηνοτρόφων για την λελογισμένη χρήση αντιβιοτικών, την συνεχή παρακολούθηση από των ζώων κτηνιάτρους, τους συνεχείς ελέγχους της βιομηχανίας στο νωπό γάλα και των κρατικών φορέων στα τελικά προϊόντα, έχει μειωθεί σημαντικά η παρουσία αντιβιοτικών στο γάλα και κατ' επέκταση στα γαλακτοκομικά προϊόντα. Τα τελευταία χρόνια το νομοθετικό πλαίσιο έχει μεριμνήσει για τα κατάλοιπα αντιβιοτικών στα γαλακτοκομικά προϊόντα. Έτσι έχουν θεσπιστεί κατάλληλοι νόμοι και κανονισμοί που ορίζουν τα ανώτατα όρια καταλοίπων αντιβιοτικών που μπορεί να βρεθούν σε αυτά. Παρόλα αυτά, το πρόβλημα με την ύπαρξη των αντιβιοτικών στην τροφική αλυσίδα συνεχίζει να είναι σοβαρό, καθώς μέσω της κατανάλωσης τους μεταφέρονται στον άνθρωπο ανθεκτικά στελέχη μικροοργανισμών σε αντιβιοτικά που κρίνονται σημαντικά για την καταπολέμηση ασθενειών του ανθρώπου, μεταξύ άλλων προβλημάτων που προκαλεί η κατανάλωση τους. Στην παρούσα εργασία γίνεται εκτενής αναφορά στις αντιμικροβιακές ουσίες που χρησιμοποιούνται στην κτηνοτροφία, στους λόγους χορήγησης του στα ζώα της γαλακτοπαραγωγής, οι δυσμενείς επιπτώσεις τους για τον άνθρωπο και την οικονομία και τέλος, παρατίθενται οι μέθοδοι ανίχνευσης τους στο γάλα.

**Λέξεις κλειδιά: γάλα, αντιβιοτικά, μαστίτιδα, υγεία, καταναλωτής, βακτήριο, παθογόνα, ανθεκτικότητα, ανθεκτικά στελέχη, ανίχνευση**

## **ABSTRACT**

Milk has been an important element in human nutrition for a long time and has contributed significantly to human survival and health. The nutritional, living and health conditions of dairy animals affect its health and contaminate milk with undesirable substances that cause problems for the health of the consumer. Antibiotics are an exogenous antimicrobial agent that can contaminate milk. They are used to treat various animal diseases, with the most important of them to be the mastitis. After the grant of the antibiotic to the animal, part of it is excreted in milk. Their presence in milk creates huge problems in the manufacture of fermented dairy products, allergies to sensitive groups of people as well as mutations in pathogenic strains of microorganisms. With the training and information of farmers on the rational use of antibiotics, the continuous monitoring by animal veterinarians, the continuous controls of industry in raw milk and government bodies on products, the presence of antibiotics in milk and dairy products has been significantly reduced. In recent years the legislative framework has taken care of antibiotic residues in dairy products. Appropriate laws and regulations have thus been put in place, to set the maximum residue limits for antibiotics found in dairy products. However, the problem with the presence of antibiotics in the food chain continues to be serious, as resistant strains of microorganisms, to antibiotics that are considered important for the fight against human diseases are transferred to humans, among other problems caused by their consumption. In this specific thesis, an extensive report is made on the antimicrobials used in animal farming, the reason why they are given to animals, their unpropitious effects they have in humans and economy and finally , are presented the methods of detecting them in milk.

**Key words: antibiotics, mastitis, consumers, milk, health, bacteria, pathogens, durability, durable strains, detection**

## Πίνακας περιεχομένων

1. ΓΑΛΑ .....	14
1.1 ΟΡΙΣΜΟΣ .....	14
1.2 ΙΣΤΟΡΙΑ.....	14
1.3 ΤΟ ΓΑΛΑ ΩΣ ΤΡΟΦΙΜΟ.....	15
1.4 ΒΙΟΣΥΝΘΕΣΗ ΚΑΙ ΕΚΚΡΙΣΗ .....	16
1.5 ΣΥΣΤΑΣΗ ΚΑΙ ΔΟΜΗ .....	17
1.5.1 Νερό .....	18
1.5.2 Λακτόζη ή γαλακτοσάκχαρο.....	18
1.5.3 Λίπος .....	18
1.5.4 Πρωτεΐνες.....	18
1.5.5 Άλατα .....	19
1.5.6 Άλλοι υδατάνθρακες.....	19
1.5.7 Ιχνοστοιχεία.....	19
1.5.8 Βιταμίνες .....	19
1.5.9 Ένζυμα.....	20
1.6 ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΟΥ ΕΠΗΡΕΑΖΟΥΝ ΤΗΝ ΧΗΜΙΚΗ ΣΥΣΤΑΣΗ ΤΟΥ ΓΑΛΑΚΤΟΣ .....	21
1.7 ΕΙΔΗ ΓΑΛΑΚΤΟΣ ΒΑΣΕΙ ΠΡΟΕΛΕΥΣΗΣ ΤΟΥ .....	21
1.7.1 Αγελαδινό γάλα .....	22
1.7.2 Πρόβειο γάλα .....	25
1.7.3 Κατσικίσιο γάλα.....	28
1.8 ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑ ΝΩΠΟΥ ΓΑΛΑΚΤΟΣ .....	29
2. ΜΑΣΤΙΤΙΔΑ .....	32
2.1 ΟΡΙΣΜΟΣ .....	32
2.2 ΤΑΞΙΝΟΜΙΣΗ ΔΙΑΦΟΡΩΝ ΤΥΠΩΝ ΜΑΣΤΙΤΙΔΑΣ .....	33
2.3 ΜΑΣΤΙΚΕΣ ΠΛΗΓΕΣ ΠΟΥ ΠΡΟΚΑΛΟΥΝ ΜΑΣΤΙΤΙΔΕΣ .....	34
2.3.1 Μαστικές πληγές από βακτήρια.....	34
2.3.2 Μαστίτιδες που προκαλούνται από μύκητες .....	35
2.3.3 Μαστικές πληγές που προκαλούνται από τραυματισμούς.....	36
2.3.4 Συνδυασμός τραυματικών και μολυσματικών μαστικών πληγών .....	36
2.3.5 Μαστικές πληγές που δε συναντώνται συχνά.....	36
2.4 ΜΕΤΑΒΟΛΕΣ ΓΑΛΑΚΤΟΚΟΜΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ, ΓΑΛΑΚΤΟΣ ΚΑΙ ΜΑΣΤΟΥ .....	37
2.5 ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑ ΤΩΝ ΑΓΕΛΑΔΩΝ ΣΤΗΝ ΜΑΣΤΙΤΙΔΑ .....	38
2.6 ΜΑΣΤΙΤΙΔΑ ΤΩΝ ΑΙΓΟΠΡΟΒΑΤΩΝ.....	38



2.7 ΜΕΘΟΔΟΙ ΔΙΑΓΝΩΣΗΣ .....	39
2.7.1 Γενικά .....	39
2.7.2 Δοκιμή της Καλιφόρνιας (California Mastitis Test –CMT) ή δοκιμή Schalm .....	40
2.7.3 Προσδιορισμός Χλωρίου .....	41
2.8 ΣΥΝΕΠΕΙΕΣ ΜΑΣΤΙΤΙΔΑΣ .....	41
3. ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ .....	43
3.1 ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΤΩΝ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΩΝ.....	43
3.2 ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΔΡΑΣΗΣ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΩΝ .....	45
3.3 ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ ΚΑΙ ΚΤΗΝΟΤΡΟΦΙΑ .....	46
3.3.1 Κατηγορίες αντιβιοτικών που χρησιμοποιούνται στα παραγωγικά ζώα .....	46
3.4 ΚΑΤΗΓΟΡΙΕΣ ΚΑΙ ΔΡΑΣΕΙΣ ΔΙΑΦΟΡΩΝ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΩΝ .....	47
3.4.1 ΒΗΤΑ ΛΑΚΤΑΜΕΣ – ΒΕΤΑ LACTAM.....	47
3.4.2. ΠΕΠΤΙΔΙΑ – PEPTIDE ANTIBIOTICS .....	49
3.4.3 ΤΕΤΡΑΚΥΚΛΙΝΕΣ .....	49
3.4.4 ΑΜΙΝΟΓΛΥΚΟΣΙΔΕΣ (ΣΤΡΕΠΤΟΜΥΚΙΝΗ).....	50
3.4.5 ΣΟΥΛΦΟΝΑΜΙΔΕΣ.....	52
3.4.6 ΜΑΚΡΟΛΙΔΙΑ – MACROLIDES .....	53
3.5 ΛΟΓΟΙ ΧΡΗΣΗΣ ΤΩΝ ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΩΝ ΦΑΡΜΑΚΩΝ ΣΤΑ ΠΑΡΑΓΩΓΙΚΑ ΖΩΑ .....	53
3.5.1 Θεραπεία.....	53
3.5.2 Μεταφύλαξη.....	54
3.5.3 Προφύλαξη-Πρόληψη.....	55
3.5.4 Αυξητικοί παράγοντες .....	55
3.6 ΤΟ ΦΑΙΝΟΜΕΝΟ ΤΗΣ ΚΑΤΑΧΡΗΣΗΣ .....	58
3.7 ΥΠΟΛΕΙΜΜΑΤΑ ΚΤΗΝΙΑΤΡΙΚΩΝ ΦΑΡΜΑΚΩΝ ΣΤΑ ΚΤΗΝΟΤΡΟΦΙΚΑ ΠΡΟΙΟΝΤΑ .....	59
3.8 ΝΟΜΟΘΕΣΙΑ ΠΟΥ ΣΧΕΤΙΖΕΤΑΙ ΜΕ ΤΗΝ ΕΜΠΟΡΙΚΗ ΔΙΑΘΕΣΗ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΖΩΙΚΗΣ ΠΡΟΕΛΕΥΣΗΣ .....	60
3.9 Εφαρμογή του Hazard Analysis Critical Control Point (HACCP) Ανάλυση Κινδύνων & Κρίσιμα Σημεία Ελέγχου .....	62
3.10 ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ ΣΤΑ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ .....	63
3.10.1 ΑΝΘΕΚΤΙΚΑ ΣΤΕΛΕΧΗ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ .....	65
3.10.2 Μετάδοση βακτηρίων ανθεκτικών στα αντιβιοτικά στον άνθρωπο μέσω της κατανάλωσης γάλακτος.....	71
3.11 ΕΠΙΠΤΩΣΕΙΣ ΤΩΝ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΩΝ ΤΟΥ ΓΑΛΑΚΤΟΣ ΣΤΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ – ΣΤΗ ΔΗΜΟΣΙΑ ΥΓΕΙΑ .....	72
3.11.1 Οικονομικές- Τεχνολογικές επιπτώσεις .....	72

3.11.2 Επίδραση στην Δημόσια Υγεία .....	73
3.11.3 Μέτρα που πρέπει να ληφθούν .....	74
4. ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΩΝ ΟΥΣΙΩΝ ΣΤΟ ΓΑΛΛΑ .....	75
4.1 Μέθοδοι Διάχυσης .....	75
4.1.1 Μέθοδος δίσκων με <i>Bacillus stearothermophilus</i> .....	76
4.1.2 Μέθοδος δίσκων με <i>Bacillus subtilis</i> .....	78
4.1.3 Μέθοδος δίσκων με <i>Bacillus megaterium</i> .....	80
4.2 ΧΡΩΜΑΤΟΜΕΤΡΙΚΗ ΜΕΘΟΔΟΣ ΟΞΙΝΙΣΗΣ .....	83
4.3 ΑΛΛΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ .....	86
4.3.1 Delvotest® (Pater 1976; ΑΡΗΑ 2004) .....	86
4.3.2 Penzyme® και Penzymell® .....	87
4.3.3 Δοκιμές Charm®(ΑΡΗΑ 2004) .....	87
4.3.4 Δοκιμές SPOT®(Ryan και συν. 1986; ΑΡΗΑ 2004) .....	87
4.3.5 Άλλες ανοσοχημικές μέθοδοι .....	88
4.3.6. Ενζυμική ανοσολογική μέθοδος ELISA.....	88
4.4 ΕΡΕΥΝΑ.....	92
4.4.1 ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΒΕΝΖΥΛΟΠΕΝΙΚΙΛΙΝΗΣ ΜΕ ΤΗΝ ΜΕΘΟΔΟ ΗΡΛC ΣΕ ΠΡΟΒΕΙΟ ΓΑΛΛΑ .	92
5.ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....	99

## ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 2.1 : Βακτηριακή οξεία μαστίτιδα αγελάδας.....	30
Εικόνα 2.2 : Φουρουλίωση σε μαστό αγελάδας από σταφυλόκοκκους ή στρεπτόκοκκους.....	32
Εικόνα 2.3 : Συσκευή Fossomatic.....	37
Εικόνα 2.4 : Δοκιμή California.....	37
Εικόνα 3.1 : <i>Penicillium notatum</i> .....	45
Εικόνα 3.2 : Καλλιέργεια του μύκητα <i>Acremonium chrysogenum</i> .....	46
Εικόνα 3.3 : Στέλεχος <i>E.coli</i> στο οπτικό μικροσκόπιο.....	63
Εικόνα 3.4 :Οι διαφορές μεταξύ του ανθεκτικού στελέχους του <i>S.aureus</i> και του ευπαθούς στην μεθικιλίνη <i>S.aureus</i> .....	64
Εικόνα 3.5 : Στέλεχος <i>Salmonella spp</i> .....	65
Εικόνα 3.6 : <i>Campylobacter jejuni</i> .....	66
Εικόνα 4.1 : Χρωματογραφήματα εκχυλισμάτων που λαμβάνονται από α) δείγμα τυφλού γάλακτος και β) δείγμα γάλακτος εμπλουτισμένο με Πενικιλίνη G έως 0,01mg.....	91
Εικόνα 4.2 : Καμπύλες συγκέντρωσης/ χρόνου : α)ενδομαστική έγχυση και β) ενδομυϊκή έγχυση.....	94

## ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1.1 : Μέση περιεκτικότητα του γάλακτος ορισμένων θηλαστικών σε βιταμίνες.....	17
Πίνακας 1.2 : Μέση χημική σύσταση του γάλακτος ζώων που χρησιμοποιούνται στην γαλακτοπαραγωγή (g/100ml).....	19
Πίνακας 1.3 : Κυριότερα λιπαρά οξέα του αγελαδινού γάλακτος.....	20
Πίνακας 1.4 : Μέση συγκέντρωση ανόργανων συστατικών (mg/l) του αγελαδινού γάλακτος.....	20
Πίνακας 1.5 : Μέση συγκέντρωση ιχνοστοιχείων στο αγελαδινό γάλα (μg/kg).....	21
Πίνακας 1.6 : Μέση συγκέντρωση βιταμινών αγελαδινού γάλακτος (μg/kg).....	21
Πίνακας 1.7 : Μέση χημική σύσταση (%) του πρόβειου γάλακτος σε σύγκριση με το αγελαδινό.....	23
Πίνακας 1.8 : Πρωτεΐνες πρόβειου γάλακτος.....	24
Πίνακας 1.9 : Μέση συγκέντρωση βιταμινών (μg/100g) και ανόργανων συστατικών (mg/l) του πρόβειου γάλακτος.....	25
Πίνακας 3.1 : Ομαδοποίηση διαφόρων αντιμικροβιακών ουσιών.....	40
Πίνακας 3.2 : Παραδείγματα αντιβιοτικών με βάση την χημική τους δομή.....	41
Πίνακας 3.3 : Παραδείγματα τετρακυκλινών.....	47
Πίνακας 3.4 : Παραδείγματα στρεπτομυκινών.....	48
Πίνακας 3.5 : Τρόπος χρήσης αντιμικροβιακών φαρμάκων στα παραγωγικά ζώα.....	54
Πίνακας 4.1 : Ευαισθησία του <i>B.stearothermophilus</i> σε ορισμένες αντιμικροβιακές ουσίες.....	73
Πίνακας 4.2 : Ευαισθησία του <i>B.subtilis</i> σε ορισμένες αντιμικροβιακές ουσίες.....	75
Πίνακας 4.3 : Ευαισθησία του <i>B.megaterium</i> σε ορισμένες αντιμικροβιακές ουσίες....	77
Πίνακας 4.4 : Ευαισθησία του <i>S.thermophilus</i> TJ σε ορισμένες αντιμικροβιακές ουσίες.....	80
Πίνακας 4.5 : Δεδομένα ανάκτησης των εμβολιασμένων δειγμάτων γάλακτος.....	92
Πίνακας 4.6 : Δεδομένα ακρίβειας για εμβολιασμένα δείγματα γάλακτος με 0,1 mg ml <sup>-1</sup> .....	92



# ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

---

## 1. ΓΑΛΑ

### 1.1 ΟΡΙΣΜΟΣ

Γάλα ονομάζεται το έκκριμα το οποίο παραλαμβάνεται από τους μαστικούς αδένες γαλακτοφόρων ζώων και προορίζεται ως τη μοναδική διατροφή του νεογέννητου θηλαστικού. Για τον άνθρωπο όμως, εξακολουθεί να συμπεριλαμβάνεται στο καθημερινό διαιτολόγιο του, είτε αυτούσιο είτε με την μορφή γαλακτοκομικών προϊόντων (τυρί, βούτυρο, γιαούρτι κ. ά ) καθ' όλη την διάρκεια της ζωής του.

Σύμφωνα με τον Κώδικα Τροφίμων και Ποτών, γάλα ονομάζεται το προϊόν εκείνο όπου είναι απαλλαγμένο από πρωτόγαλα, συλλέγεται έπειτα από άρμεγμα υγιούς γαλακτοφόρου ζώου χωρίς διακοπή που ζει και τρέφεται υγιεινά και που δεν βρίσκεται σε κατάσταση υπερκόπωσης, ενώ νωπό γάλα ονομάζεται το έκκριμα που παραλαμβάνεται από τους μαστικούς αδένες, θηλαστικών γαλακτοφόρων ζώων, όπου θα πρέπει να μην έχει θερμανθεί πάνω από 400°C, αλλά κι ούτε έχει υποστεί κάποιου είδους επεξεργασία.

Σύμφωνα με ορισμό του Οργανισμού Τροφίμων και Γεωργίας των Ηνωμένων Εθνών και του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας ( Food and Agriculture Organization of the United Nations και World Health Organization, FAO/WHO) «γάλα είναι το φυσιολογικό έκκριμα του μαστού που παίρνεται από μία ή δύο αμέλξεις χωρίς να προστεθεί ή να αφαιρεθεί τίποτε»

Ο κώδικας γάλακτος των ΗΠΑ ορίζει ως γάλα την παραλαβή εκκρίματος του μαστού, μέσω άμελης μιας ή περισσότερων υγιών αγελάδων, το οποίο είναι απαλλαγμένο από πρωτόγαλα, και το οποίο περιέχει τουλάχιστον 3,15% λίπος και 8,25 % στερεά συστατικά χωρίς λίπος.

### 1.2 ΙΣΤΟΡΙΑ

Από ιστορική άποψη , δεν είναι γνωστό πότε χρησιμοποιήθηκε το γάλα των ζώων ως τροφή για πρώτη φορά απο τους ανθρώπους. Σύμφωνα με τους O ' Mahony και Fox, η παραγωγή γάλακτος από γαλακτοφόρα ζώα (προβατίνες και αγελάδες) είχε ξεκινήσει ήδη από το 8.000 π. Χ. , και ακόμη στη Βίβλο αναφέρεται η "Γη της Επαγγελίας" ως τη γη στην οποία "ρέει μέλι και γάλα" . Θεωρείται πως με την εξημέρωση των γαλακτοπαραγωγών ζώων, ξεκίνησε σχεδόν συγχρόνως η χρησιμοποίηση του γάλακτος τους στην διατροφή του ανθρώπου. Η παρασκευή κάποιων γαλακτοπαραγωγικών προϊόντων, όπως βούτυρο, τυρί, ξινόγαλα, γιαούρτη, φαίνεται μάλιστα ότι ξεκίνησε από εκείνους τους χρόνους της

προϊστορίας. Στα πλαίσια της οικογενειακής οικονομίας, η αξιοποίηση του γάλακτος και μεταποίηση του σε άλλα προϊόντα γίνονταν με εμπειρικές μεθόδους, για χιλιετίες.

Η Γαλακτοκομία ως επιστήμη, αναπτύσσεται από τον 13<sup>ο</sup> αιώνα και μετά, και ιδιαίτερα μετά το 19<sup>ο</sup>, όπου ξεκίνησαν να αναπτύσσονται και άλλες θετικές επιστήμες, όπως η Βιοχημεία, η Χημεία και η Μικροβιολογία. Όμως, τον 20<sup>ο</sup> αιώνα, στην Γαλακτοκομία σημειώνεται αλματώδης εξέλιξη, από τεχνολογική άποψη. Κατά συνέπεια, με την ανάπτυξη της επιστήμης της Ζωοτεχνίας παράλληλα παρατηρείται αύξηση και στην παραγωγή του γάλακτος. Η αύξηση αυτή είναι εντυπωσιακά μεγάλη.

### 1.3 ΤΟ ΓΑΛΑ ΩΣ ΤΡΟΦΙΜΟ

Από τα αρχαία κιόλας χρόνια, το γάλα είχε σημαντική θέση στο διατροφολόγιο του ανθρώπου σε διαφορετικές χώρες. Είναι η μοναδική και πλήρης τροφή στα πρώτα στάδια της ζωής του νεογέννητου των θηλαστικών. Στον άνθρωπο, παρ' ότι μετά τους πρώτους μήνες της ζωής του το γάλα δεν επαρκεί για να καλύψει τις ανάγκες του σε θρεπτικά συστατικά, αποτελεί ωστόσο άριστη πηγή φωσφόρου, ασβεστίου και ορισμένων βιταμινών. Περιέχει επίσης πληθώρα άλλων θρεπτικών συστατικών όπως πρωτεΐνες, υδατάνθρακες, λίπη, ανόργανα άλατα και γι' αυτό το γάλα και τα γαλακτοκομικά προϊόντα κατέχουν σημαντικό ρόλο στην διατροφή του ανθρώπου (van Hooijdonk and K. Hettinga, 2015).

Στην παγκόσμια παραγωγή του γάλακτος, το μεγαλύτερο ποσοστό αντιπροσωπεύει το γάλα των βοοειδών (85,4%) ακολουθεί το γάλα των βουβαλιών (11,1%), έπειτα των αιγών (2,1%), των προβάτων (1,4%) και τέλος των καμήλων (0,2%). Στην παγκόσμια παραγωγή γάλακτος, η παραγωγή γάλακτος άλλων ζώων όπως άλογα και όνοι είναι μικρότερη από 0.1%. Στα περισσότερα κράτη παγκοσμίως τα ποσοστά της κατανάλωσης γάλακτος και γαλακτοκομικών προϊόντων είναι υψηλά και αυξάνονται, ιδιαίτερα στις αναπτυσσόμενες χώρες (J. Kearney, 2010, Gerosa and Skoet, 2012). Η κατανάλωση γάλακτος φαίνεται να έχει σταθεροποιηθεί με πτωτικές τάσεις σε βιομημικές χώρες τα τελευταία χρόνια, εξαιτίας της ζήτησης του καταναλωτή σε ανθρακούχα αναψυκτικά και χυμούς. Σε παγκόσμιο επίπεδο στο μέλλον προβλέπεται ότι θα υπάρξουν ανεπαίσθητες αλλαγές στην κατανάλωση των γαλακτοκομικών προϊόντων (τυρί, βούτυρο). Αυτό εμπίπτει με την αυξανόμενη ανάγκη του καταναλωτή για πιο υγιεινά και πιο φυσικά ζωικά προϊόντα. Το νωπό, μη παστεριωμένο γάλα, χαρακτηρίζεται ως ένα από τα «υγιεινά τρόφιμα-healthy foods». Από την νομοθεσία της Ευρωπαϊκής Ένωσης, το νωπό γάλα ορίζεται ως: «το έκκριμα του μαστικού αδένων των εκτρεφόμενων ζώων το οποίο δεν έχει θερμανθεί σε θερμοκρασία άνω των 40°C ή που δεν έχει υποστεί οποιαδήποτε επεξεργασία ισοδύναμου αποτελέσματος».

Σήμερα παρουσιάζεται αυξημένη κατανάλωση σε περιπτώσεις καταναλωτών που θεωρούν ότι το νωπό μη παστεριωμένο γάλα έχει ιδιαίτερες ιδιότητες και οφέλη στην υγεία, μειωμένες πιθανότητες πρόκλησης αλλεργιών, καλύτερη γεύση και παρουσιάζει υψηλή θρεπτική αξία και γεύση (Oliver et al. 2009, Claeys et al., 2014). Κάτι τέτοιο όμως δεν συμβαίνει και στον γενικό πληθυσμό, καθώς η κατανάλωση νωπού γάλακτος είναι χαμηλή. Το γεγονός αυτό έχει σαν αποτέλεσμα την κατανάλωση γάλακτος από άτομα με ιδιαίτερες

διατροφικές απαιτήσεις, όπως άτομα με ειδικές διατροφικές ανάγκες, ανοσοκατεσταλμένους ασθενείς, άτομα τρίτης ηλικίας και παιδιά. Στην Ευρώπη, η διάθεση του νωπού γάλακτος στον καταναλωτή γίνεται με πολλούς τρόπους μερικοί από τους οποίους είναι: η άμεση πώληση του στο αγρόκτημα καθώς και η πώληση μέσω αυτόματων μηχανημάτων. Στην Γαλλία, την Γερμανία, τη Δανία, την Ιταλία, το Βέλγιο, την Ιρλανδία και σε ορισμένες περιοχές του Ηνωμένου Βασιλείου, το νωπό αγελαδινό γάλα είναι δυνατόν να αγοραστεί από τον καταναλωτή με άμεση αγορά από αγροκτήματα, ενώ στην Νορβηγία, την Ισπανία και την Πολωνία η παραπάνω πώληση από τα αγροκτήματα, απαγορεύεται. Επίσης, στην Δανία, Ελλάδα, Ιρλανδία, Ισπανία, Ηνωμένο Βασίλειο και την Ολλανδία, η πώληση μέσω μηχανών αυτόματης πώλησης δεν εφαρμόζεται ή απαγορεύεται (EFSA 2015b).

Τα μέσα που χρησιμοποιήθηκαν στις Ηνωμένες Πολιτείες Αμερικής, για την προμήθεια νωπού γάλακτος από τους καταναλωτές, ήταν η άμεση πώληση γάλακτος, ή η αγορά του μέσω προγραμμάτων χρηματοδοτικής μίσθωσης και η πώληση του ως "ζωοτροφή ή τροφή για ζώα συντροφιάς". Παρ' ότι, η κατανάλωση του νωπού μη παστεριωμένου γάλακτος ή των προϊόντων που παρασκευάζονται από αυτό, ενέχει μικροβιολογικούς κινδύνους για την υγεία του καταναλωτή, το ενδιαφέρον κατανάλωσης τους αυξάνεται συνεχώς στην Ευρωπαϊκή Ένωση (EFSA 2015b) και στις Ηνωμένες Πολιτείες. Πολλές έρευνες κατέληξαν στην παρουσία τροφιμογενών παθογόνων στο νωπό γάλα προερχόμενων από δεξαμενές συγκέντρωσης και την καταγραφή επιδημιών στον άνθρωπο, λόγω της κατανάλωσης νωπού γάλακτος. Οι επιδημίες οφείλονται σε μερικά από τα ακόλουθα γένη και είδη βακτηρίων όπως είναι τα *Listeria monocytogenes*, *STEC*, *Campylobacter* και *Salmonella* spp., καθιστώντας σαφείς τις απειλές που προκαλούνται στην ανθρώπινη υγεία από την κατανάλωση νωπού γάλακτος και των προϊόντων που παρασκευάζονται από αυτό.

## 1.4 ΒΙΟΣΥΝΘΕΣΗ ΚΑΙ ΕΚΚΡΙΣΗ

Το γάλα παράγεται στους μαστούς των θηλαστικών. Το μέγεθος, το σχήμα και η ανατομία του μαστού διαφέρουν από είδος σε είδος. Στο στάδιο όπου το ζώο θα φτάσει σε σεξουαλική ωριμότητα, ο μαστός αναπτύσσεται με την επίδραση διαφόρων ορμονών, αλλά η γαλακτοπαραγωγή ξεκινά από τον πρώτο τοκετό και μετά. Ο μαστός αποτελείται από περιοχές εκκριτικού ιστού, οι οποίες περιβάλλονται από τον συνδετικό ιστό. Επίσης εκτός από τον συνδετικό ιστό, μυϊκές και νευρικές ίνες, ένα δίκτυο αιμοφόρων αγγείων από το οποίο παραλαμβάνεται το αίμα που φέρει συστατικά απαραίτητα για την σύνθεση του γάλακτος και το πλούσιο φλεβικό και λεμφοφόρο σύστημα περιβάλλουν τους αδένες. Ο εκκριτικός ιστός περιέχει μεγάλο αριθμό, πολύ μικρών σε μέγεθος κυψελών. Τα κύτταρα που παράγουν γάλα βρίσκονται περιφερειακά στο εσωτερικό τοίχωμα αυτών των κυψελών. Στο άκρο της θηλής υπάρχει ένας εκφορητικός αγωγός, ο οποίος δεν επιτρέπει στο γάλα να εξέλθει προς τα κάτω καθώς κλείνει με έναν σφιγκτήρα μυ και επιπλέον εμποδίζει τυχόν μικροοργανισμούς να εισέλθουν στον μαστό.

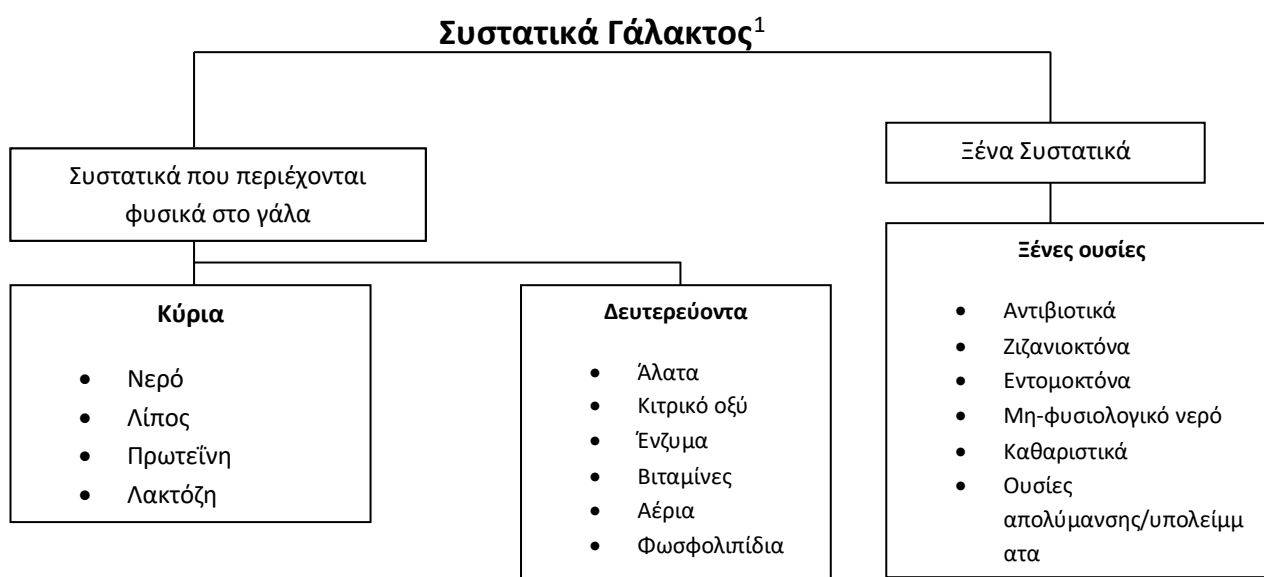


Ενώ το γάλα εκκρίνεται από τη κορυφή των κυττάρων στην κοιλότητα των κυψελών, ταυτόχρονα από τη βάση των κυττάρων εισέρχονται οι ουσίες που χρησιμοποιούνται για τη βιοσύνθεση των συστατικών του γάλακτος. Με τη συγκέντρωση του γάλακτος στις κοιλότητες των κυψελών, μικρό μέρος του γάλακτος πιεζόμενο μεταφέρεται μέσω των γαλακτοφόρων αγωγών στο μαστό. Η έκκριση γάλακτος σταματά μέσω του μηχανισμού της ενδοκυψελικής πίεσης, (εάν δεν έχει αμεληθεί το ζώο).

Η βιοσύνθεση των συστατικών του γάλακτος δεν γίνεται σε ένα μέρος του κυττάρου αλλά σε διαφορετικά. Στα μιτοχόνδρια και στο κυτοδιάλυμα παράγονται οι ενδιάμεσες ουσίες που είναι χρήσιμες για τη σύνθεση των πρωτεϊνών, του λίπους και της λακτόζης. Πριν βγουν από τα κύτταρα, οι πρωτεΐνες υφίστανται κάποιες μεταβολές και αλλαγές στο μόριο τους τις λεγόμενες μετα-μεταφραστικές μεταβολές. Μαζί με αυτές τις μεταβολές γίνεται και η δόμηση του καζεϊνικού μικκυλίου. Το μέρος που συμβαίνουν αυτές οι μεταβολές είναι το σύστημα Golgi. Εκεί γίνεται και η σύνθεση της λακτόζης που είναι υπεύθυνη για τον όγκο του γάλακτος που θα εκκριθεί. Τα κύρια συστατικά που συντίθενται στο μαστό είναι η λακτόζη και τα λιπίδια και από τις πρωτεΐνες η καζεΐνη, η α-λακταλβουμίνη και η β-λακτογλοβουλίνη. Άλλες ουσίες όπως η αλβουμίνη του ορού και οι ανοσοσφαιρίνες συντίθενται σε άλλο μέρος του σώματος και μεταφέρονται στο μαστό μέσω του αίματος.

## 1.5 ΣΥΣΤΑΣΗ ΚΑΙ ΔΟΜΗ

Η σύνθεση του γάλακτος καθορίζει τη διατροφική του αξία, την αξία του ως πρώτη ύλη για την παρασκευή τροφίμων και τα πολλά χαρακτηριστικά του. Γενικά, τα συστατικά του γάλακτος διακρίνονται σε κύρια συστατικά και δευτερεύοντα συστατικά. Η ταξινόμηση βασίζεται στη συγκέντρωσή τους στο γάλα και όχι απαραίτητα στη σπουδαιότητα τους. Τα συστατικά του γάλακτος αναλυτικά είναι τα εξής :



<sup>1</sup> Υγιεινή και Τεχνολογία του γάλακτος και των προϊόντων του, Αντώνιος Ι. Μάντης, Δημήτριος Κ. Παπαγεωργίου, Δημήτριος Ι. Φλετούρης, Απόστολος Σ. Αγγελίδης, αφοί Κυριακίδη ΕΚΔΟΣΕΙΣ Α.Ε

### 1.5.1 Νερό

Η περιεκτικότητα σε νερό στο αγελαδινό γάλα, κυμαίνεται από 85,3% έως 88,7%. Σε όλα τα είδη γάλακτος το νερό βρίσκεται σε μεγαλύτερη αναλογία σε σχέση με τα υπόλοιπα συστατικά, με εξαίρεση το γάλα ορισμένων θαλάσσιων θηλαστικών π.χ. φώκια, όπου η συγκέντρωση των λιπιδίων είναι μεγαλύτερη εκείνης του νερού. Ένα μικρό ποσοστό του νερού, χρησιμοποιείται για την ενυδάτωση της λακτόζης και των αλάτων και ένα μέρος του επίσης είναι δεσμευμένο στις πρωτεΐνες .

### 1.5.2 Λακτόζη ή γαλακτοσάκχαρο

Είναι το κυριότερο και το πιο χαρακτηριστικό σάκχαρο του γάλακτος. Εκτός από το γάλα δεν βρίσκεται πουθενά αλλού στην φύση σε αξιόλογα ποσά. Η λακτόζη συνθέτεται αποκλειστικά από τα επιθηλιακά κύτταρα του μαστού. Στην συσκευή Golgi γίνεται η βιοσύνθεση της λακτόζης, με δαπάνη της γλυκόζης, που με την κυκλοφορία του αίματος μεταφέρεται στο μαστό. Η περιεκτικότητα σε λακτόζη στο γάλα ποικίλλει από 1,0% (στο γάλα ποντικού) έως και 7,0% (στο γάλα της γυναίκας). Είναι ένας αναγωγικός δισακχαρίτης που αποτελείται από γλυκόζη και γαλακτόζη. Η λακτόζη υπάρχει σε δύο ισομερείς μορφές, την α- και β- λακτόζη. Οι μορφές αυτές διαφέρουν μεταξύ τους ως προς τις φυσικές τους ιδιότητες (όπως, διαλυτότητα, στροφική ικανότητα κ.τ.λ.) και ως προς τη γλυκύτητα.

### 1.5.3 Λίπος

Είναι ποσοτικά, το πιο ευμετάβλητο συστατικό του γάλακτος. Ο Ελληνικός Κώδικας Τροφίμων και Ποτών (Κ.Τ.Π. , 1998) δέχεται ως χαμηλότερη τιμή λίπους το 3,5%. Τα τριγλυκερίδια αποτελούν σε ποσοστό 98-99% το λίπος του γάλακτος. Το υπόλοιπο ποσοστό του λίπους αποτελείται από φωσφολιπίδια, διγλυκερίδια, καροτενοειδή, μονογλυκερίδια και οι λιποδιαλυτές βιταμίνες A, D, E και K (Haugetal 2007). Τα λιπαρά οξέα είτε συντίθενται στον μαστό είτε προέρχονται από τα γλυκερίδια του αίματος, μετά την υδρόλυση τους στο μαστό από λιποπρωτεϊνική λιπάση.

### 1.5.4 Πρωτεΐνες

Οι καζεΐνες, η λακταλβουμίνη και η λακτογλοβουλίνη, είναι τα τρία κύρια πρωτεϊνικά κλάσματα που βρίσκονται στο αγελαδινό γάλα, συνθέτονται στον μαστό και αποτελούν ποσοστό μεγαλύτερο από 90% του συνόλου. Στο γάλα απαντούν και άλλες αζωτούχες ενώσεις, εκτός από τα τρία παραπάνω πρωτεϊνικά κλάσματα, (μη πρωτεϊνικό άζωτο 5%) π.χ. κρεατινίνη, κρεατίνη, αμινοξέα, ουρία, αμμωνία κ.τ.λ. Η περιεκτικότητα πρωτεϊνών στο αγελαδινό γάλα κυμαίνεται από 2,3 έως 44% και εξαρτάται από την ατομικότητα, την φυλή, την διατροφή, την εποχή, το στάδιο της γαλακτικής περιόδου και την υγεία του ζώου. Τέλος, διακρίνονται σε δύο κύρια πρωτεϊνικά κλάσματα, τις πρωτεΐνες ορού, που αποτελούν το 0,7% και είναι διαλυτές σε pH 4,6 και θερμοκρασία 20°C και τις καζεΐνες που αποτελούν το 2,6% των συστατικών του γάλακτος και είναι αδιάλυτες σε pH 4,6.

### 1.5.5 Άλατα

Λόγω της διατήρησης της οσμωτικής πίεσης του γάλακτος, σε τιμές ίδιες με εκείνες του αίματος, η σχέση λακτόζης και αλάτων παραμένει σταθερή στα διάφορα γάλατα. Όσον αφορά την κατάσταση που βρίσκονται στο γάλα τα κυριότερα από τα άλατα, γνωρίζουμε ότι το νάτριο, κάλιο και χλώριο βρίσκονται σε μορφή ελεύθερων ιόντων, ενώ το μαγνήσιο και ασβέστιο, σε ένα μικρό ποσοστό βρίσκεται σε ιονισμένη μορφή.

### 1.5.6 Άλλοι υδατάνθρακες

Σε μικρές ποσότητες, εκτός της λακτόζης, υπάρχουν και αρκετοί μονοσακχαρίτες, ουδέτεροι ή όξινοι ολιγοσακχαρίτες καθώς και σάκχαρα δεσμευμένα με πεπτίδια ή πρωτεΐνες. Από τους μονοσακχαρίτες, η γλυκόζη και η γαλακτόζη βρίσκονται σε συγκεντρώσεις από 10-20 mg/100 ml και η μυο-ινοσιτόλη (4-5 mg/100 ml). Ακόμη, βρέθηκαν οι μονοσακχαρίτες φουκόζη, N-ακετυλογλυκοζαμίνη και N-ακέτυλο-D-νευραμινικό οξύ, κυρίως με την μορφή ολιγοσακχαριτών και γλυκοπεπτιδίων. Οι κ-καζεΐνες, οι ανοσοσφαιρίνες και οι πρωτεΐνες της μεμβράνης του λιποσφαιρίου, είναι οι πρωτεΐνες του γάλακτος που περιέχουν υδατάνθρακες.

### 1.5.7 Ιχνοστοιχεία

Ιχνοστοιχεία ονομάζονται τα στοιχεία που περιέχονται στο αγελαδινό γάλα, σε συγκεντρώσεις της τάξης των ppm (mg/kg) ή ppb (μg/kg). Είναι φυσικά συστατικά του γάλακτος, τα 14 εξ αυτών είναι απαραίτητα στην διατροφή του ανθρώπου. Η παρουσία ορισμένων στοιχείων από αυτά, είναι ενδεικτική της περιεκτικότητας τους στην τροφή του ζώου. Ο σίδηρος, ο ψευδάργυρος, ο χαλκός, το μαγγάνιο, το ιώδιο, το σελήνιο, το κοβάλτιο, το χρώμιο, το μολυβδαίνιο, το φθόριο, το αρσενικό, το πυρίτιο, το νικέλιο, και το βόριο, αποτελούν τα 14 απαραίτητα ιχνοστοιχεία στην διατροφή του ανθρώπου. Ακόμη, στο γάλα ανευρίσκεται σημαντικός αριθμός άλλων στοιχείων, όπως βρώμιο, λίθιο, στρόντιο, αλουμίνιο, μόλυβδος, βανάδιο, κασσίτερος, υδράργυρος, κάδμιο, καΐσιο και ρουβίδιο τα οποία όμως δεν είναι απαραίτητα στο ανθρώπινο διατροφολόγιο. Αρκετά από αυτά τα στοιχεία είναι τοξικά, χωρίς όμως οι περιεκτικότητές τους στο γάλα να είναι ανώτερες από τις επιτρεπόμενες τιμές.

### 1.5.8 Βιταμίνες

Σχεδόν όλες οι βιταμίνες περιέχονται στο γάλα, άλλες σε ικανοποιητική συγκέντρωση ενώ άλλες σε ίχνη. Η συγκέντρωση των βιταμινών επηρεάζεται από την διατροφή, το στάδιο γαλακτοπαραγωγής και την υγεία του ζώου. Το γάλα, είναι γνωστό ότι είναι καλή πηγή της βιταμίνης Α και των περισσότερων βιταμινών του συμπλέγματος Β. Δεν είναι καλή πηγή των βιταμινών C και E, όμως αυτές προσλαμβάνονται εύκολα από άλλα τρόφιμα. Ακόμη, η περιεκτικότητα σε βιταμίνη D δεν είναι επίσης μεγάλη, αλλά μπορεί να αναπληρωθεί από

τον οργανισμό, με περιορισμένη έκθεση του δέρματος στο ηλιακό φως, σε επαρκή ποσότητα. Η περιεκτικότητα ορισμένων βιταμινών μειώνεται κατά την επεξεργασία ή την συντήρηση του γάλακτος. Ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η βιταμίνη C, η οποία καταστρέφεται κατά την παστερίωση. Οι λιποδιαλυτές βιταμίνες (A,D,E,K), βρίσκονται στα συστατικά του λίπους στο γάλα, ενώ στην υδατινή φάση του γάλακτος, απαντώνται οι βιταμίνες B και C ( Meurant,1995).

### 1.5.9. Ένζυμα

Τα ένζυμα στο γάλα βρίσκονται σε μορφή είτε ελεύθερα ως πρωτεΐνες, είτε δεσμευμένα σε σύμπλοκα π.χ. τις λιποπρωτεΐνες. Τα κυριότερα ένζυμα από αυτά είναι: η λιπάση, η αλκαλική φωσφατάση και η πρωτεάση

Βιταμίνη	Αγελάδα	Πρόβατο	Αίγα
Βιταμίνη A (UI)	0.1-0.5	143	191
Θειαμίνη (B1)	0.04	0.07	0.04
Ριβοφλαβίνη (B2)	0.17	0.328	0.184
Νιασίνη	0.09	0.427	0.19
Βιταμίνη B6	0.06	-	0.007
Παντοθενικό οξύ	0.34	0.364	0.344
Βιοτίνη	0.003	0.0093	0.0039
Βιταμίνη B12	0.00042	0.000064	0.00007
Βιταμίνη C	2.09	0.43	0.15

**Πίνακας 1.1<sup>2</sup>:** Μέση περιεκτικότητα του γάλακτος ορισμένων θηλαστικών σε βιταμίνες (mg/100ml)

<sup>2</sup> Hartman and Dryden, 1974

## 1.6 ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΟΥ ΕΠΗΡΕΑΖΟΥΝ ΤΗΝ ΧΗΜΙΚΗ ΣΥΣΤΑΣΗ ΤΟΥ ΓΑΛΑΚΤΟΣ

Η διακύμανση της σύστασης του γάλακτος δεν είναι γνωστή σε όλο το εύρος της, αν και έχουν πραγματοποιηθεί πολλές μελέτες γύρω από αυτό το θέμα. Αυτό συμβαίνει κυρίως εξαιτίας του ότι η χημική σύσταση του γάλακτος επηρεάζεται από πάρα πολλούς παράγοντες, και επιπλέον πολλές μεταβολές της σύστασης είναι αλληλοεξαρτώμενες. Άλλωστε, η σύσταση του γάλακτος επηρεάζεται από την διακύμανση παραγόντων που εξαρτώνται σε μεγάλο βαθμό από τις πρακτικές διαχείρισης στην κτηνοτροφική εκμετάλλευση, το κλίμα, τα προγράμματα εκτροφής κτλ. Πιο συγκεκριμένα, τα συμπεράσματα που διεξάγονται σε μία περιοχή ή χώρα, δεν ισχύουν σε άλλες περιοχές.

Σημαντικές διαφορές στην αναλογία των βασικών συστατικών του, παρουσιάζονται στο αγελαδινό γάλα και σε αυτό οφείλονται παράγοντες όπως, η ατομικότητα, η φυλή, το στάδιο της γαλακτικής περιόδου, η διατροφή, η ηλικία, ο βαθμός πάχυνσης του ζώου και η υγεία, οι ασθένειες του μαστού, η θερμοκρασία του περιβάλλοντος και η εποχή.

Γενικά, οι κύριοι παράγοντες που επηρεάζουν ποσοτικά ή ποιοτικά την σύνθεση του γάλακτος είναι (Κεχαγιάς, 1997):

1. Το είδος και η φυλή του ζώου
2. Το κληρονομικό δυναμικό
3. Ο αριθμός άμελης ανά εικοσιτετράωρο
4. Ο τρόπος άμελης
5. Η περίοδος της ημέρας
6. Η σωματική, η υγιεινή κατάσταση και η ηλικία του ζώου
7. Η διάρκεια της ξηρής περιόδου
8. Η συχνότητα των τοκετών
9. Ο οργανισμός
10. Η κόπωση και η συμπεριφορά του ανθρώπου στα ζώα
11. Οι συνθήκες διατροφής
12. Η θερμοκρασία του περιβάλλοντος
13. Το στάδιο της γαλακτικής περιόδου

## 1.7 ΕΙΔΗ ΓΑΛΑΚΤΟΣ ΒΑΣΕΙ ΠΡΟΕΛΕΥΣΗΣ ΤΟΥ

Διάφορων ειδών ζώα χρησιμοποιούνται για την παραγωγή γάλακτος. Η κατανάλωση αγελαδινού γάλακτος είναι η υψηλότερη. Το μερίδιο της στην παγκόσμια παραγωγή είναι 90%. Στην συνέχεια ακολουθεί το βουβαλίσιο γάλα με 5%, το κατσικίσιο με 3% και το πρόβειο με 2%.

Στο παρελθόν, χρησιμοποιήθηκαν πολλοί τύποι γάλακτος, με εκείνο που επικρατεί σήμερα να είναι το αγελαδινό. Η αγελάδα μας παρέχει το γάλα της για την παρασκευή διαφόρων γαλακτοκομικών προϊόντων, αλλά χρησιμοποιείται κυρίως για να το πίνουμε. Με

άλλα λόγια, το γάλα που πωλείται στην αγορά προέρχεται κυρίως από αγελάδες, αντιπροσωπεύοντας το 90% της παγκόσμιας παραγωγής (Εθνική επιτροπή γάλακτος, 1983).

Η αίγα, επίσης γνωστή ως κατσίκια ή γίδα, είναι ένα από τα ζώα από τα οποία λαμβάνουμε γάλα και ονομάζονται γαλακτοφόρα ζώα. Μαζί με τα πρόβατα, θεωρείται ένα από τα πρώτα ζώα που εξημερώθηκαν. Εκτρέφονται από κτηνοτρόφους για την παραγωγή γάλακτος, κρέατος και για το τρίχωμα τους. Από το γάλα της κατσίκας παράγεται τυρί, βούτυρο, παγωτό και άλλα προϊόντα. Αξίζει να σημειωθεί ότι για άτομα τα οποία είναι αλλεργικά στο αγελαδινό γάλα, το κατσικίσιο γάλα μπορεί να αντικαταστήσει το τελευταίο.

Τα πρόβατα κατέχουν σημαντικό ρόλο στην παραγωγή γαλακτοκομικών προϊόντων, ιδίως σε χώρες της Μεσογείου και σε περιοχές της Ασίας και της Αφρικής. Είναι ένα από τα γαλακτοφόρα ζώα με μεγάλο πληθυσμό, με αποτέλεσμα να παράγει μεγάλες ποσότητες γάλακτος. Από τα πρόβατα παίρνουμε επίσης το κρέας τους και τα μαλλιά τους, όντας ο σχεδόν μοναδικός παραγωγός μαλλιού στον κόσμο (Tetra Pack Processing Systems).

Είδος ζώου	Συνολικά Στερεά	Λίπος	Καζεΐνες	Πρωτεΐνες ορού	Λακτόζη	Τέφρα
Αγελάδα	12.7	3.7	2.8	0.6	4.8	0.7
Αίγα	13.2	4.5	2.5	0.4	4.1	0.8
Πρόβατο	19.3	7.4	4.6	0.9	4.8	1.0
Βούβαλος	17.2	7.4	3.2	0.6	4.8	0.8

**Πίνακας 1.2 :** Μέση χημική σύσταση του γάλακτος ζώων που χρησιμοποιούνται στην γαλακτοπαραγωγή (g/100ml)

### 1.7.1 Αγελαδινό γάλα

Το γάλα της αγελάδας είναι μία πλήρης τροφή που μπορεί να καλύψει σχεδόν όλες τις ανάγκες του ανθρώπινου οργανισμού. Πιο συγκεκριμένα, αποτελείται από πρωτεΐνες, λακτόζη, τριγλυκερίδια, φώσφορο, ασβέστιο και βιταμίνες (B2, A και κυρίως D). Όσον αφορά τα κύρια συστατικά του, η μέση χημική σύνθεση του γάλακτος είναι 87% νερό, 3,6% λίπος, 2,8% καζεΐνη, 0,6% πρωτεΐνη ορού, 4,9% λακτόζη και 0,7% ανόργανα άλατα (τέφρα). Είναι πλούσιο σε ασβέστιο και λυσίνη, ένα αμινοξύ που συχνά δεν περιέχεται στις φυτικές πρωτεΐνες.

Η περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες του αγελαδινού γάλακτος κυμαίνεται από 2,3% έως 44%, ανάλογα με τη φυλή, τη διατροφή, την ατομικότητα, το στάδιο γαλακτικής περιόδου, την εποχή και την υγεία του ζώου.

Η πλειονότητα των λιπιδίων που περιέχει είναι κορεσμένα λιπαρά. Ωστόσο, σε σύγκριση με το μητρικό γάλα, η περιεκτικότητα σε λιπαρά του αγελαδινού γάλακτος υστερεί σε λινελαϊκό οξύ, το οποίο περιέχει 50 φορές φτωχότερο. Στον παρακάτω πίνακα αναλύονται τα κύρια λιπαρά οξέα που περιέχονται στο αγελαδινό γάλα.

Λιπαρό οξύ	Άτομα Άνθρακα	% Συνόλου λιπαρών οξέων	Διπλοί Δεσμοί	Φυσική Κατάσταση
<b>Κορεσμένα</b>				
Βουτυρικό	4	2.79	-	Πτητικά, ρευστά, διαλυτά στο νερό
Καπρονικό	6	2.34	-	
Καπρυλικό	8	1.06	-	Πτητικά, στερεά, αδιάλυτα στο νερό
Λαυρικό	12	2.87	-	
Μυριστικό	14	8.94	-	Μη πτητικά, στερεά
Παλμιτικό	16	23.8	-	
Στεατικό	18	13.2	-	
<b>Ακόρεστα</b>				
Ελαϊκό	18	29.6	1	Ρευστά σε θερμοκρασία περιβάλλοντος
Λινελαϊκό	18	2.6	2	
Λινολενικό	18	1.3	3	

**Πίνακας 1.3**<sup>3</sup>: Κυριότερα λιπαρά οξέα του αγελαδινού γάλακτος

Κύριο συστατικό των μεταλλικών στοιχείων είναι το ασβέστιο, το κάλιο και ο φώσφορος, που όπως φαίνεται στον παρακάτω πίνακα ευνοούν την απορρόφησή του από τον οργανισμό.

Ανόργανα συστατικά (mg/l)	
Νάτριο	450
<b>Κάλιο</b>	1500
Χλώριο	950
<b>Ασβέστιο</b>	1200
Μαγνήσιο	120
<b>Φώσφορος</b>	920
Σίδηρος	0.46
Χαλκός	0.22
Ψευδάργυρος	3.80
Μαγγάνιο	0.06
Ιώδιο	0.07

**Πίνακας 1.4**: Μέση συγκέντρωση ανόργανων συστατικών (mg/l) του αγελαδινού γάλακτος

<sup>3</sup> Kurtz, 1974

Ιχνοστοιχείο	Συγκέντρωση (µg/kg)	Ιχνοστοιχείο	Συγκέντρωση (µg/kg)
Αλουμίνιο	460	Μόλυβδος	40
Αρσενικό	45	Νικέλιο	26
Βάριο	Ίχνη	Πυρίτιο	3000
Βρώμιο	600	Ρουβίδιο	2000
Ιώδιο	260	Σελήνιο	10
Κάδμιο	26	Σίδηρος	300
Κασσίτερος	170	Φθόριο	150
Κοβάλτιο	0,5	Χαλκός	90
Μαγγάνιο	30	Χρώμιο	2
Μολυβδαίνιο	50	Ψευδάργυρος	4000

**Πίνακας 1.5 :** Μέση συγκέντρωση ιχνοστοιχείων στο αγελαδινό γάλα (µg/kg)

Περιέχει όλες τις βιταμίνες εκτός από τη βιταμίνη B12, ενώ περιέχει 0,1 έως 0,2 mg βιταμίνης D και 2 mg βιταμίνης C.

Βιταμίνες	
Βιταμίνη A	40
Βιταμίνη D	0.08
Βιταμίνη E	110
Θειαμίνη (B <sub>1</sub> )	40
Ριβοφλαβίνη (B <sub>2</sub> )	170
Νιασίνη (B <sub>3</sub> )	90
Παντοθενικό Οξύ (B <sub>5</sub> )	340
Πυριδοξίνη (B <sub>6</sub> )	40
Βιοτίνη (B <sub>7</sub> )	2.0
Φυλλικό οξύ (B <sub>9</sub> )	5.3
Κοβαλαμίνη (B <sub>12</sub> )	0.35
Βιταμίνη C	1000

**Πίνακας 1.6:** Μέση συγκέντρωση βιταμινών (µg/100 g) του αγελαδινού γάλακτος



### 1.7.1.1 Θρεπτική αξία και λειτουργικά οφέλη

Το αγελαδινό γάλα έχει μικρή διάρκεια και τυποποιείται σε:

- α) «πλήρες», και περιέχει όλα τα λιπαρά (τουλάχιστον 3,25%), συσκευάζεται σε μπλε συσκευασία,
- β) πράσινο, χαμηλής περιεκτικότητας σε λιπαρά (2% ή λιγότερο) και
- γ) «χωρίς λιπαρά», συνήθως συσκευάζεται σε μωβ συσκευασία.

Στο εμπόριο είναι δυνατό να βρει κανείς αγελαδινό γάλα είτε με προσθήκη ασβεστίου, είτε με προσθήκη βιταμίνης D και E ή με προσθήκη λιπαρών Ω-3.

Το φρέσκο αγελαδινό γάλα βραχείας διάρκειας, κρατάει έως και 5 μέρες από την ημερομηνία εμφιάλωσης και δέχεται θερμική επεξεργασία στους 71,7°C για 15 δευτερόλεπτα το λιγότερο (παστερίωση). Ακόμη διατίθεται στο εμπόριο φρέσκο γάλα μακράς διάρκειας το οποίο έχει υποστεί υψηλή παστερίωση, και έτσι είναι δυνατή η συντήρηση του στο ψυγείο έως και 3 εβδομάδες από την εμφιάλωση του. Το γάλα αυτό είναι δυνατόν να διαρκέσει και περισσότερο, κάτι που αποφεύγεται να αναγράφεται από τις εταιρείες τυποποίησης για λόγους marketing. Μια άλλη κατηγορία τυποποίησης είναι το γάλα UHT (ultra high temperature processing), όπου με την χρήση ιδιαίτερα υψηλών θερμοκρασιών (135°C για τουλάχιστον 1 δευτερόλεπτο), τα βακτήρια θανατώνονται. Με αυτόν τον τρόπο είναι δυνατή η διατήρηση του προϊόντος σε θερμοκρασία δωματίου και σε αεροστεγείς συσκευασίες, έως και έναν χρόνο από την ημερομηνία της αρχικής εμφιάλωσης, όμως έχει την ίδια διάρκεια ζωής με το φρέσκο γάλα από την στιγμή που θα ανοιχτεί η συσκευασία.

Η επίδραση της επεξεργασίας στην θρεπτικότητα του γάλακτος δεν είναι μεγάλη, όμως στο UHT γάλα παρατηρείται μια χαρακτηριστική γεύση. Με την πιο έντονη θερμική επεξεργασία αποστείρωσης στο γάλα καταστρέφεται σχεδόν η μισή ποσότητα βιταμινών C και B.

### 1.7.2 Πρόβειο γάλα

Το πρόβειο γάλα στην χώρα μας μπορεί να καταναλωθεί ως έχει είτε να αναμειχθεί με κατσικίσιο είτε με αγελαδινό γάλα. Σε σύγκριση με το αγελαδινό γάλα, το γάλα του προβάτου είναι πλουσιότερο σε στερεά συστατικά, αλλά η περιεκτικότητα των συστατικών του, επηρεάζεται από την γαλακτική περίοδο, την διατροφή και την φυλή.

Στον παρακάτω πίνακα δίνεται η βασική χημική σύσταση του γάλακτος του προβάτου. Σύμφωνα με αυτόν, το γάλα του προβάτου, έχει πολύ υψηλή περιεκτικότητα σε λιπίδια (7.5%) και πρωτεΐνες (5.4%), ενώ η περιεκτικότητα της λακτόζης παραμένει ίδια με εκείνη του αγελαδινού γάλακτος (4,6%).

Είδος ζώου	Συνολικά Στερεά	Λίπος	Καζεΐνες	Πρωτεΐνες ορού	Λακτόζη	Τέφρα
Αγελάδα	12,8	3,9	2,7	0,6	4,6	0,7
Πρόβατο	18,6	7,5	4,4	1,0	4,6	1,0

**Πίνακας 1.7 :** Μέση χημική σύσταση (%) του πρόβειου γάλακτος σε σύγκριση με το αγελαδινό

Το ειδικό του βάρος είναι μεταξύ του 1,035 και 1,039 στους 150°C, η οξύτητα σε γαλακτικό οξύ κυμαίνεται από 0,22 έως 0,25%, το pH από 6,5 έως 6,8 και το σημείο πήξης είναι γύρω στο -0,570°C.

Αξιόλογη διακύμανση στην εκατοστιαία αναλογία, ειδικά των πρωτεϊνών και του λίπους, παρουσιάζεται κατά την διάρκεια της γαλακτικής περιόδου, στην σύσταση του πρόβειου γάλακτος. Το λίπος εμφανίζει σχετική μείωση έως την 3η εβδομάδα και έπειτα αυξάνεται. Απότομη πτώση της λιποπεριεκτικότητας του 2-3%, παρατηρείται όμως, κατά την μετάβαση από τα 2 στα 3 αρμέγματα το 24ωρο και χρειάζεται να περάσουν 3-4 εβδομάδες για να επανέλθει και πάλι στα προηγούμενα επίπεδα (Meurant,1995). Το κλάσμα των συνολικών στερεών φαίνεται να έχει την ίδια πορεία, ενώ οι πρωτεΐνες (ολικό άζωτο), αυξάνονται στα φυσιολογικά επίπεδα (5,5-6,5%), αφού πρώτα είχε προηγηθεί μια μικρή μείωση κατά την 1η-3η βδομάδα, και καθ' όλη την υπόλοιπη διάρκεια της γαλακτικής περιόδου, παραμένουν σχεδόν σταθερές. Η λακτόζη, έπειτα από μία μικρή αύξηση στην αρχή της γαλακτικής περιόδου (2η βδομάδα), παρουσιάζει ελαφριά μείωση, και παραμένει σταθερή καθ' όλη την υπόλοιπη διάρκεια της περιόδου. Το πρόβειο γάλα έχει μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες και λίπος σε σύγκριση με το αγελαδινό, ενώ όσον αφορά τα υπόλοιπα συστατικά δεν παρουσιάζουν ιδιαίτερες διαφορές. Γι' αυτό τον λόγο το πρόβειο γάλα έχει μεγαλύτερη απόδοση στην τυροκόμηση και παράγει γιαούρτη με μεγαλύτερο ιξώδες.

Αναφορικά με τα λιπίδια , έχει διαπιστωθεί ότι δεν διαφέρουν ουσιαστικά από εκείνα του αγελαδινού γάλακτος. Υπάρχουν δηλαδή τα ίδια σχεδόν λιπαρά οξέα με μόνο ποσοτικές διαφορές . Εξαιτίας των οργανοληπτικών και διατροφικών χαρακτηριστικών που προσδίδουν στα γαλακτοκομικά προϊόντα, τα λιπίδια είναι ένα από τα σημαντικότερα συστατικά του πρόβειου γάλακτος. Βρίσκονται με την μορφή λιποσφαιρίων , τα οποία έχουν μέση διάμετρο μικρότερη από 3,5 μm. Μεταξύ των μηρυκαστικών, το πρόβειο γάλα κατέχει το μικρότερο μέσο μέγεθος των λιποσφαιρίων. Έτσι, το πρόβειο γάλα πλεονεκτεί σε σχέση με το αγελαδινό, ως προς την πέψη και τον αποτελεσματικότερο μεταβολισμό των λιπιδίων. Αυτό συμβαίνει επειδή η επιφάνεια δράσης των λιπασών κατά την πέψη, αυξάνεται χάρις στο μικρό μέγεθος των λιποσφαιρίων.

Το μικρότερο μέγεθος των λιποσφαιρίων, σε συνδυασμό με την απουσία καρτενοειδών, προσδίδουν στο γάλα αλλά και στο βούτυρο και στα τυριά που παράγονται από γάλα αιγοπροβάτων, ένα λευκότερο χρώμα. Η δομή και η σύνθεση της μεμβράνης των λιποσφαιρίων του πρόβειου γάλακτος αντιπροσωπεύει περίπου το 1% του

συνολικού όγκου των λιπιδίων του γάλακτος και είναι παρόμοια με εκείνη του αγελαδινού γάλακτος. Η δομή των λιποσφαιρίων έχει την εξής μορφή: ένας υδρόφοβος πυρήνας λιπιδίων περιέχεται σε αυτά, ο οποίος αποτελείται κυρίως από τριγλυκερίδια και περιβάλλεται από μία μεμβράνη αποτελούμενη από φωσφολιπίδια και γλυκοπρωτεΐνες.

Όσον αφορά τις πρωτεΐνες, η συγκέντρωσή τους στο πρόβειο γάλα κυμαίνεται από 4,7 έως 6,6%. Εξαρτάται κυρίως από την ατομικότητα, την διατροφή, την φυλή, το στάδιο της γαλακτικής περιόδου, την υγεία του ζώου και την εποχή. Όπως και στο αγελαδινό γάλα, έτσι και στο γάλα προβάτου, οι πρωτεΐνες διακρίνονται σε δύο κύρια πρωτεϊνικά κλάσματα τις πρωτεΐνες ορού και τις καζεΐνες, οι οποίες αποτελούν το 1,0% και 4,4% αντίστοιχα των συστατικών του γάλακτος.

Το κύριο κλάσμα των πρωτεϊνών του πρόβειου γάλακτος (76-83% των συνολικών πρωτεϊνών) αποτελείται από τις καζεΐνες και διακρίνονται σε  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\beta$ - και  $\kappa$ -καζεΐνη. Κάθε καζεΐνη υπάρχει στο γάλα σε διαφορετικές γενετικές παραλλαγές, οι οποίες διαφέρουν σε ένα ή και πιο σπάνια, σε παραπάνω από ένα αμινοξέα. Στον πίνακα που ακολουθεί, παραθέτονται ορισμένα από τα χαρακτηριστικά των καζεϊνών του πρόβειου γάλακτος.

Πρωτεΐνη	Γενετικές Παραλλαγές	Αριθμός Αμινοξέων
$\alpha_{s1}$ - καζεΐνη	A, B, C, D, E, F, G, H	199
$\alpha_{s2}$ -καζεΐνη	A, B, C	208
$\beta$ -καζεΐνη	A, B, C, D, E	209
$\kappa$ - καζεΐνη	A, B	171
$\alpha$ -λακταλβουμίνη	A, B	123
$\beta$ -λακτοσφαιρίνη	A,B, C	162

**Πίνακας 1.8:** Πρωτεΐνες πρόβειου γάλακτος

Μεταξύ αυτών, η  $\alpha_1$ - καζεΐνη κατέχει το 52%, η  $\alpha_2$ -καζεΐνη το 5% , η  $\beta$ -καζεΐνη το 32% και η  $\kappa$ -καζεΐνη το 11% του συνόλου. Στο γάλα προβάτου, τα μικκύλια, τα οποία είναι σύμπλοκα μορίων των  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\beta$ - και  $\kappa$ - καζεϊνών, βρίσκονται σε κολλοειδή διασπορά στην υδάτινη φάση. Η μέση διάμετρος τους στο πρόβειο γάλα είναι περίπου 200 nm, είναι μεγαλύτερη από την μέση διάμετρο των μικκυλίων στο γάλα της αγελάδας.

Βιταμίνες		Ανόργανα συστατικά	
Βιταμίνη A	80	Νάτριο	440
Βιταμίνη D	0.18	Κάλιο	1360
Βιταμίνη E	110	Χλώριο	1600
Θειαμίνη (B <sub>1</sub> )	80	Ασβέστιο	1930
Ριβοφλαβίνη (B <sub>2</sub> )	350	Μαγνήσιο	180
Νιασίνη (B <sub>3</sub> )	420	Φώσφορος	1580
Παντοθενικό Οξύ (B <sub>5</sub> )	410	Σίδηρος	0.80

Πυριδοξίνη (B <sub>6</sub> )	80	Χαλκός	0.40
Βιοτίνη (B <sub>7</sub> )	2.0	Ψευδάργυρος	5.70
Φυλλικό οξύ (B <sub>9</sub> )	5.0	Μαγγάνιο	0.07
Κοβαλαμίνη (B <sub>12</sub> )	0.71	Ιώδιο	0.20
Βιταμίνη C	5000		

**Πίνακας 1.9:** Μέση συγκέντρωση βιταμινών (μg/100 g) και ανόργανων συστατικών (mg/l) του πρόβειου γάλακτος

### 1.7.3. Κατσικίσιο γάλα

Το κατσικίσιο γάλα χρησιμοποιείται από πολύ παλιά ως υποκατάστατο του αγελαδινού και του μητρικού σε ορισμένες περιπτώσεις στην διατροφή μικρών παιδιών. Αυτός ήταν ο λόγος που κίνησε ιδιαίτερα το ενδιαφέρον των ερευνητών.

Από τα αποτελέσματα διαφόρων ερευνών έχει διαπιστωθεί ότι η χημική σύσταση του κατσικίσιου γάλακτος, δεν διαφέρει σημαντικά από το αγελαδινό, παρόλο που η σύσταση του πρώτου τόσο ποιοτικά όσο και ποσοτικά παρουσιάζει μεγάλες διαφορές εξαρτώμενες από πολλούς παράγοντες (γαλακτική περίοδος, διατροφή, φυλές κ.ά.). Το κατσικίσιο γάλα παρέχει υψηλής ποιότητας πρωτεΐνη και χαμηλού κόστους, και πιο συγκεκριμένα προσφέρει 8,7g πρωτεΐνης/κούπα 250ml ποσότητα που καλύπτει το 17,4% της συνιστώμενης ημερήσιας πρόσληψης σε πρωτεΐνη (RDI). Όσον αφορά το αγελαδινό γάλα προσφέρει 8,1g/κούπα 250ml, δηλαδή 16,3% του RDI σε πρωτεΐνη.

Η υποαλλεργική ιδιότητα του κατσικίσιου γάλακτος που έχει παρατηρηθεί σε πολλές περιπτώσεις αλλεργιών, έχει συνδεθεί από πολλούς ερευνητές από την μικρή περιεκτικότητα του σε α-καζεΐνη. Επίσης περιέχει σε μικρή συγκέντρωση την α-καζεΐνη και έτσι ευνοείται ο σχηματισμός πιο εύθραυστου και μαλακού πήγματος κατά την πήξη του γάλακτος. Συνεπώς το πήγμα αυτό διασπάται ταχύτερα από τα ένζυμα του στομάχου, πρωτεάσες, χαρίζοντας καλύτερη πέψη.

Οι πρωτεΐνες του κατσικίσιου γάλακτος αποτελούν πηγή βιοενεργών πεπτιδίων, τα οποία επηρεάζουν θετικά την λειτουργία των συστημάτων του ανθρώπινου οργανισμού (γαστρεντερικό, ανοσοποιητικό, καρδιαγγειακό, νευρικό) χάρις στην δομή και την σύσταση του λίπους του γάλακτος (προφίλ λιπαρών οξέων). Τέλος το κατσικίσιο γάλα περιέχει σε μεγάλη περιεκτικότητα την θειαμίνη, βιταμίνη A, Ριβοφλαβίνη, Νιασίνη και Παντοθενικό οξύ ενώ σε μικρότερη συγκέντρωση την βιταμίνη B και το φολικό οξύ καθώς επίσης και ορισμένα ένζυμα όπως οξειδάση, ξανθίνη, αλκαλική φωσφατάση και ριβονουκλεάση, συγκρινόμενο με το αγελαδινό.

### 1.7.3.1 Θρεπτική αξία και λειτουργικά οφέλη.

Το κατσικίσιο γάλα έχει ανώτερη ή ίση θρεπτική αξία συγκρινόμενο με το αγελαδινό. Συστήνεται σε όσους παρουσιάζουν αλλεργία ή δυσανεξία στο αγελαδινό γάλα, εξαιτίας της διαφορετικής σύστασης των πρωτεϊνών του (καζεΐνη, λακταλβουμίνη). Η καζεΐνη του κατσικίσιου γάλακτος απορροφάται ευκολότερα από αυτήν του αγελαδινού αφού είναι πιο διαλυτή. Η καλύτερη απορρόφηση είναι κριτήριο καλύτερης ποιότητας. Χωνεύεται ευκολότερα χάρη στην σύσταση του, που οφείλεται στην παρουσία 30 μικρότερων λιποσφαιρίων που διασπώνται ευκολότερα από τα ένζυμα του εντέρου. Περιέχει σε υψηλότερη περιεκτικότητα απαραίτητα λιπαρά οξέα που ενδείκνυται σε θεραπείες ασθενειών όπως εντερικές διαταραχές, στεφανιαίες νόσοι και κυστική ίνωση. Ακόμη αυτά τα λιπαρά οξέα έχουν την ιδιότητα να παρέχουν ενέργεια ενώ παράλληλα μειώνουν την συγκέντρωση της χοληστερόλης.

## 1.8 ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑ ΝΩΠΟΥ ΓΑΛΑΚΤΟΣ

Η μεγάλη βιολογική αξία του γάλακτος ως τροφής, που αποδεικνύεται από το γεγονός ότι αποτελεί τη μοναδική τροφή για την ανάπτυξη των νεογνών αλλά και των νεαρών ζώων, είναι η αιτία για την απρόσκοπτη ανάπτυξη σ' αυτό διαφόρων μικροοργανισμών. Το γάλα θεωρείται στείρο καθώς εκκρίνεται στις κυψελίδες του μαστού (Tolle,1980). Ωστόσο, η υψηλή περιεκτικότητά του σε ποικίλα θρεπτικά συστατικά και νερού σε συνδυασμό με το σχεδόν ουδέτερο pH, το καθιστούν άριστο μέσο ανάπτυξης πολλών μικροοργανισμών (Quigley et al., 2013).

Επομένως, όταν υπάρχουν ευνοϊκές συνθήκες, κυρίως θερμοκρασίας, σε σύντομο χρονικό διάστημα τα συστατικά του αλλοιώνονται σε βαθμό που η παραγωγή προϊόντων ποιότητας είναι αδύνατη.

Δεδομένου ότι, όπως και για κάθε άλλο προϊόν η ποιότητα της πρώτης ύλης αποτελεί βασική προϋπόθεση επιτυχίας, απαιτείται καλή γνώση:

- 1) των πηγών μόλυνσής του,
- 2) των τρόπων προστασίας και
- 3) των ειδών των μικροοργανισμών και των ιδιοτήτων τους.

Η μικροβιακή μόλυνση του γάλακτος μπορεί να συμβεί από τρεις κύριες πηγές: α) από το μαστό του ζώου, β) από το εξωτερικό του μαστού και γ) από τις επιφάνειες και τον εξοπλισμό κατά το χειρισμό από τους παραγωγούς και τους χειρισμούς κατά την αποθήκευσή του (Murphy and Boor,2000, Skoufos et al. 2006).

## Γενικά

Ακόμα και αν το γάλα προέρχεται από υγιή ζώα και παραλαμβάνεται με προφυλάξεις από το μαστό των ζώων αυτών, περιέχει μικρόβια, που ο αριθμός τους ανέρχεται σε μερικές εκατοντάδες ανά ml και εισέρχονται στο γάλα από τη θηλή του μαστού και από τους γαλακτοφόρους αγωγούς. Οι μικροοργανισμοί αυτοί είναι, κατά κύριο, λόγο μη παθογόνοι και ανήκουν, κυρίως, στα γένη *Lactococcus* και *Micrococcus*. Η μικροχλωρίδα αυτή, αλλάζει σε περίπτωση λοιμώξεων του μαστού και του ζώου και είναι δυνατόν να περιέχει μεγάλο πληθυσμό μικροβίων. Μετά την απομάκρυνση του γάλακτος από το μαστό, αυτό εμπλουτίζεται με μικρόβια που προέρχονται από το μαστό και το σώμα του ζώου, τα κόπρανα, το τρίχωμα του, το προσωπικό, το χρησιμοποιούμενο νερό, τα σκεύη άμελης, τις τροφές, τα έντομα, τη σκόνη και, γενικά, το χώρο του βουστασίου, τη διακίνηση του γάλακτος, τη διατήρηση και την επεξεργασία του. Ο αριθμός και το είδος των μικροβίων διαφέρει ανάλογα με τις συνθήκες υγιεινής και θερμοκρασίας που επικρατούν κατά την άμελη, τη συλλογή, τη μεταφορά, τη συντήρηση και την μεταποίησή του. Το μεγαλύτερο μέρος των μικροοργανισμών που απαντώνται στο γάλα είναι βακτήρια. Υπάρχουν, βέβαια, ζύμες, μύκητες και ιοί, αλλά σε πολύ μικρό αριθμό σε σχέση με τα βακτήρια. Εντοπίζονται περισσότερο στα όξινα είδη του γάλακτος και ακόμα πιο συχνά στα τυριά. Στα τυριά, ιδιαίτερα με επιφανειακή μούχλα, δίνουν χαρακτηριστική γεύση και άρωμα. Άρα, από τους μικροοργανισμούς αυτούς, άλλοι είναι αλλοιογόνοι και επιβλαβείς, άλλοι ωφέλιμοι και μερικοί παθογόνοι για τον άνθρωπο ή τα ζώα.

Τα οξυγαλακτικά βακτήρια (LAB), τα οποία περιλαμβάνουν τα γένη *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus* και *Enterococcus*, είναι αυτά που εντοπίζονται κυρίως στην μικροβιακή χλωρίδα των γαλακτοπαραγωγών ζώων. Μέσω της κατανάλωσης του νωπού γάλακτος δυνητικά μεταδίδονται στον άνθρωπο παθογόνα βακτήρια και μπορούν να προκαλέσουν σοβαρές τροφολοιμώξεις. Τα παθογόνα αυτά βακτήρια περιλαμβάνουν τα γένη: *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Brucella abortus*, *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica*, *Yersinia pseudotuberculosis*, *Corynebacterium* spp., *Streptococcus zooepidemicus* και τα παράσιτα *Toxoplasma gondii* και *Cryptosporidium parvum* (Oliver et al., 2005). Ακόμη συσχετίστηκαν και άλλα βακτήρια με την εκδήλωση ανθρώπινων λοιμώξεων μέσω της κατανάλωσης νωπού γάλακτος, περιλαμβάνοντας τα γένη: *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp., *STEC*, *Brucella melitensis*, *Mycobacterium bovis* και *TBEV*. Άλλοι μικροοργανισμοί που απομονώθηκαν από το νωπό γάλα ανήκουν στην οικογένεια των *Enterobacteriaceae*, στην οικογένεια *Micrococcaceae*, στις ζύμες και τους ζυμομύκητες (Lagneau et al., 1996, Fotou et al., 2011, Bezirtzoglou et al., 2013, Quigley et al., 2013).

Από υγιή ζώα ή από ζώα που εμφάνισαν μαστίτιδα έχουν ταυτοποιηθεί στο νωπό γάλα ζύμες που περιλαμβάνουν τα γένη *Kluyveromyces*, *Rhodotorula*, *Debaryomyces*, *Saccharomyces*, *Geotrichum*, *Pichia*, *Candida*, *Trichosporon* και *Cryptococcus*. Όσον αναφορά του μύκητες, υπάρχουν σε χαμηλότερα επίπεδα στο νωπό γάλα συγκριτικά με τους ζυμομύκητες, και τα κυριότερα γένη που απομονώνονται συχνότερα είναι τα: *Penicillium*, *Aspergillus*, *Mucor*, *Fusarium* και *Cladosporium*. Ένας ακόμη σημαντικός μικροοργανισμός που μπορεί να βρεθεί στο νωπό γάλα, είναι του γένους *Prototheca*. Σε

έρευνα που έχει διεξαχθεί, είδη του γένους *Prototheca*, (*P. zopfii*, *P. blaschkeae*, *P. stagnora* και *P. wickerhamii*), απομονώθηκαν σε ποσοστό 29% σε σύνολο 200 εξετασθέντων δειγμάτων νωπού γάλακτος και σε ποσοστό 55% σε σύνολο 100 δειγμάτων τυριού. Αξιοσημείωτο είναι δε, το γεγονός ότι είδη του γένους αυτού και κυρίως το *P.zopfii* είναι ανθεκτικά σε πληθώρα αντιβιοτικών (Abdel-Hameed ,2016). Η Ευρωπαϊκή Αρχή για την Ασφάλεια των Τροφίμων (European Food Safety Authority , EFSA), προσδιόρισε τους μικροβιολογικούς κινδύνους, αναφορικά με την κατανάλωση γάλακτος από διαφορετικά είδη ζώων και την δημόσια υγεία στην Ε.Ε. (EFSA ,2015b).

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

---

### 2.ΜΑΣΤΙΤΙΔΑ

Σε όλο τον κόσμο, ζώα προσβάλλονται από μαστίτιδα, διαφέροντας μόνο στην μορφή και το ποσοστό προσβολής τους. Όλα τα είδη θηλαστικών ζώων είναι δυνατό να προσβληθούν από μαστίτιδα προκαλώντας σημαντικές οικονομικές συνέπειες. Στις περισσότερες περιπτώσεις, η μαστίτιδα οφείλεται στην είσοδο βακτηρίων στο μαστικό αδένα από τη θηλή του. Εάν επικρατούν οι κατάλληλες συνθήκες στο εσωτερικό περιβάλλον του μαστικού αδένα, τότε τα βακτήρια πολλαπλασιάζονται, ερεθίζουν τον μαστικό ιστό και έπειτα προκύπτει φλεγμονώδης αντίδραση. Η μαστίτιδα αποτελεί την σημαντικότερη ασθένεια του μαστικού αδένα (G.C. Fthenakis,1994).

#### 2.1 ΟΡΙΣΜΟΣ

Μαστίτιδα ονομάζεται η φλεγμονή του μαστικού αδένα, που οφείλεται σε διάφορες αιτίες, και χαρακτηρίζεται από παθολογικές αλλαγές στο μαστικό ιστό και από αύξηση των λευκοκυττάρων στο γάλα. Ο ορισμός της μαστίτιδας μπορεί να προκύψει λαμβάνοντας υπόψη πολλά κριτήρια. Η αντίληψη της μαστίτιδας σαν μια αντίδραση του μαστού στα τραύματα που υφίσταται, αποτελεί ένα σπουδαίο πρώτο βήμα για την αντιμετώπιση και την καταπολέμηση των ερεθισμών στους μαστούς. Εξάλλου, δεν υπάρχει μαστίτιδα, εάν δεν παρατηρηθούν τραύματα στους μαστούς.

Η περίπτωση να είναι ο μαστός ελαττωματικός ή ευαίσθητος καθιστά τον μαστό εκτεθειμένο στο άρμεγμα. Έτσι, ακόμα και αν μια αμελκτική μηχανή βρίσκεται σε καλή λειτουργική κατάσταση, υπό αυτές τις συνθήκες, είναι δυνατόν να προκαλέσει πληγές. Αυτές οι πληγές μπορούν να οδηγήσουν σε καταστροφές των ιστών κι έτσι δημιουργούνται οι φλεγμονές του μαστού αφού τα νεκρά κύτταρα επενεργούν σαν ξένα σώματα. Ο βαθμός κινδύνου τραυματικών πληγών στο μαστό, ποικίλλει ανάλογα με τις συνθήκες που επικρατούν στους στάβλους των ζώων, τη λειτουργική κατάσταση της αμελκτικής μηχανής, την τεχνική του αρμέγματος, τη μεταχείριση των ζώων, κτλ. Ιδιαίτερα σε συνθήκες όπως είναι η υγρασία, το κρύο, ο αέρας, και οι ακαθαρσίες είναι δυνατόν να προκληθούν πληγές με την μορφή ρυτίδων, σχισμών και ανωμαλιών, στο δέρμα της θηλής και του μαστού.



## 2.2 ΤΑΞΙΝΟΜΙΣΗ ΔΙΑΦΟΡΩΝ ΤΥΠΩΝ ΜΑΣΤΙΤΙΔΑΣ

Η μαστίτιδα μπορεί να ταξινομηθεί σε διάφορους τύπους, οι οποίοι είναι:

1. Οξεία και χρόνια ,
2. Κλινική (εμφανής ) και υποκλινική(κρυφή) και
3. σε μολυσματικές και μη μολυσματικές,

Η ταξινόμηση τους αυτή βοηθάει την συστηματική καταπολέμηση των μαστίτιδων.

Στις οξείες μαστίτιδες οι οποίες ονομάζονται αλλιώς και τέταρτα από τον παραγωγό γάλακτος, εμφανίζονται ξαφνικά και παρουσιάζουν οίδημα περισσότερο ή λιγότερο σοβαρό και επικίνδυνο. Το οίδημα συνοδεύεται συνήθως και με αύξηση της θερμοκρασίας. Η έκκριση από μια τέτοια μαστίτιδα συχνά διαφέρει από το γάλα, ενώ η νόσος είναι πάντα εμφανής. Για να παρθούν αποφάσεις σχετικά με τα μέτρα που θα ληφθούν, χρειάζεται να γνωρίζουμε αν το ζώο παρουσιάζει ή όχι πυρετό. Οι οξείες μαστίτιδες που στην συμπτωματολογία τους συνοδεύονται με πυρετό θα πρέπει να αντιμετωπίζονται επειγόντως. Εν αντιθέσει, οι χρόνιες μαστίτιδες εξελίσσονται αργά. Συχνά το οίδημα δεν συμπεριλαμβάνεται στα εμφανή συμπτώματα, ενώ με μια ψηλάφηση στο μαστό γίνεται δυνατή η διαπίστωση σκληρύνσεων μέσα στον αδενικό ιστό. Το γάλα έχει μια υδαρή όψη που περιέχει ιζήματα ή πυοσφαίρια.



Εικόνα 2.1 : Βακτηριακή οξεία μαστίτιδα αγελάδας

Στις μορφές που είναι κρυφές(υποκλινική μαστίτιδα) αλλά και πιο συχνές, δεν μπορούν να διαπιστωθούν χωρίς την δοκιμή του Schalm, κι αυτό εξαιτίας του γεγονότος ότι το γάλα ή ο αδενικός ιστός δεν παρουσιάζουν προφανείς αλλοιώσεις. Η αύξηση του αριθμού των κυττάρων στο γάλα που παρατηρείται πάντα, μπορεί να διαπιστωθεί με την δοκιμή του Schalm με ελαφριά, μέτρια ή έντονα θετικά αποτελέσματα. Οι διάφορες μορφές της μαστίτιδας: οξεία, χρόνια, κλινική και υποκλινική, είναι δυνατό να εμφανιστούν με ασταθή τρόπο. Οξείες προσβολές μπορούν να εξελιχθούν σε χρόνιες και αντίστροφα χρόνιες προσβολές να παρουσιάζουν οξείες φάσεις. Αντίστοιχα κλινικές μορφές είναι δυνατό να εξελιχθούν σε υποκλινικές και το αντίστροφο.

Οι μαστίτιδες μπορούν να υποδιαιρεθούν σε επιμέρους κατηγορίες ανάλογα με το αποτέλεσμα της διαγνωστικής εξέτασης του γάλακτος, σε μολυσματικές (μολύνσεις) ή μη, και μη ειδικές (ερεθισμοί). Αυτή η διάκριση θα πρέπει να θεωρείται με επιφύλαξη, παρά μόνο εάν υπάρχει μόνο ένα αποτέλεσμα. Μια ανεπαρκώς ασηπτική δειγματοληψία, είναι πιθανό να καταλήγει στην ψευδή εμφάνιση μολυσματικής μαστίτιδας όπως η μη κανονική έκκριση μικροβίων ή πολύ χαμηλός αριθμός μικροβίων προκαλούν υποψίες για ερεθισμό του μαστού.

Για την διάγνωση και αντιμετώπιση της μαστίτιδας θα πρέπει να γνωρίζουμε εάν η αρρώστια εμφανίστηκε κατά τη διάρκεια της γαλακτικής ή της ξηράς περιόδου και εάν το ζώο παρουσιάζει γενικές διαταραχές ή όχι.

## 2.3 ΜΑΣΤΙΚΕΣ ΠΛΗΓΕΣ ΠΟΥ ΠΡΟΚΑΛΟΥΝ ΜΑΣΤΙΤΙΔΕΣ

Μελετώντας τα τραύματα των μαστών, που προκαλεί μία μαστίτιδα, γνωρίζουμε καλύτερα την μαστίτιδα. Τα τραύματα αυτά είναι δυνατόν να προκληθούν από μικροοργανισμούς, μώλωπες και τραυματισμούς και σπάνια είναι αποτέλεσμα άλλων παραγόντων.

### 2.3.1 Μαστικές πληγές από βακτήρια

Όσον αφορά τις βακτηριακές παθήσεις των μαστών, προκαλούνται από παθογόνα βακτήρια τα οποία εισέρχονται μέσω του θηλαίου κόλπου, στον μαστό και εγκαθίστανται στο γαλακτοφόρο σύστημα και στον αδενώδη ιστό, όπου και αναπαράγονται. Σπανιότερα εισχωρούν στο μαστό από άλλες διόδους, όπως μέσω του αίματος. Τέτοια παθογόνα βακτήρια για τον μαστό, υπάρχουν σε όλους τους στάβλους των γαλακτοφόρων ζώων. Επίσης προέρχονται και από διάφορες ασθένειες, όπως είναι οι μολύνσεις των νεφρών και της μήτρας, οι μολύνσεις του δέρματος και τα έλκη των νυχιών. Πηγή μόλυνσης αποτελεί επίσης και ο αρμόδιος της άμελης.

Οι κίνδυνοι μόλυνσης είναι αναλογικοί της υγιεινής του στάβλου. Η μετάδοση βακτηρίων στις θηλές μπορεί να πραγματοποιηθεί με διάφορους τρόπους όπως είναι τα χέρια του αμελκτή, η άμελη, τα θήλαστρα, το υλικό καθαρισμού των μαστών καθώς και το γάλα που επιστρέφει στην θηλή από τον συλλέκτη της αμελκτικής μηχανής με την μορφή σταγονιδίων. Ο τελευταίος παράγοντας μας εξηγεί την αιτία των μαστίτιδων μέσω της μεταφοράς μικροβίων πάνω στις θηλές των μόσχων. Ακόμη σημαντικό ρόλο στην μεταφορά μικροοργανισμών έχουν οι μύγες και το λίπος φάλαινας που χρησιμοποιείται στην μάλαξη. Συσπάσεις του σφιγκτήρα (π.χ. αμέσως μετά το άρμεγμα), κοντοί, φαρδιοί ή μπλοκαρισμένοι θηλαίοι κόλποι (πληγές, εγχειρήσεις), κενά στο θηλαίο κόλπο (ξηρό άρμεγμα) όπως και η ρίψη γάλακτος με τη μορφή σταγονιδίων από το συλλέκτη, διευκολύνουν την είσοδο των βακτηρίων στο θηλαίο κόλπο και από εκεί στο εσωτερικό του μαστού. Είναι σημαντικό να τονισθεί η είσοδος αέρα μέσα στο κύπελλο, που οφείλεται σε λάθος χειρισμό του αμελκτή κατά το στράγγισμα, κι έτσι επιτρέπεται η είσοδος των βακτηρίων στο φράγμα του θηλαίου πόρου. Εξαιτίας της ύπαρξης αυτού του αέρα, προκαλείται το πέρασμα υπολειμμάτων γάλακτος με μεγάλη ταχύτητα στις άλλες τρεις θηλές, μέσω του κυπέλλου.

Κατά την διάρκεια της ξηράς περιόδου, μπορούν να αναπτυχθούν βακτήρια και να εισέλθουν στο μαστό, από την στιγμή που παραμένει γάλα ή δημιουργείται καινούριο στο θηλαίο κόλπο. Η πλειονότητα των βακτηρίων που έχει εισέλθει στον μαστό, απομακρύνεται κατά την επόμενη άμελη. Ένα μέρος αυτών ωστόσο, καταφέρνουν να εισέλθουν και να εγκατασταθούν στο θηλαίο κόλπο, παρά την παρουσία των λευκοκυττάρων, των ανασταλτικών ενζυμικών συστημάτων, της επιδερμίδας που εμποδίζει την ανάπτυξη τους, καθώς και των ειδικών αντισωμάτων που ενεργοποιούνται κατά την είσοδο τους στο εσωτερικό του μαστού. Προκειμένου να εκδηλωθεί μια μολυσματική φλεγμονή, χρειάζεται να συμβεί εντατικός πολλαπλασιασμός των βακτηρίων στο θηλαίο κόλπο, στο

γαλακτοφόρο κόλπο στο γαλακτοφόρο πόρο και στις κυψελίδες. Οι εσωτερικές επιφάνειες των κόλπων και των υποκείμενων ιστών βλάπτονται από τις τοξίνες που παράγονται από τα παθογόνα βακτήρια. Στις πληγές αυτές, η αντίδραση του μαστού εξωτερικεύεται με μία φλεγμονή.

Τα σημαντικότερα βακτήρια που είναι υπεύθυνα για τις μολύνσεις του μαστού είναι οι στρεπτόκοκκοι, σταφυλόκοκκοι, μικρόκοκκοι, τα κολοβακτηρίδια και τα πυογόνα βακτήρια. Ποσοστό μεγαλύτερο από το 90% των μαστικών μολύνσεων, προκαλείται από του στρεπτόκοκκους, σταφυλόκοκκους και μικρόκοκκους (κόκκους θετικούς κατά Gram). Αυτά τα παθογόνα βακτήρια ευδοκιμούν σε διαφορετικά σημεία. Το μικρόβιο της μολυσματικής μαστίτιδας *S. agalactiae* επιβιώνει μόνο στους μαστούς των αγελάδων. Τα υπόλοιπα υπάρχουν έξω από το μαστό, όπως στο δέρμα της θηλής, σε πυορρούσες πληγές, στην βλέννα των διαφόρων οργάνων, και αλλού. Τα κολοβακτηρίδια κατοικούν στο έντερο και μπορούν να επιμολύνουν τον μαστό με την αποβολή κοπράνων και ούρων.



**Εικόνα 2.2 :** Φουρουλίωση σε μαστό αγελάδας από σταφυλόκοκκους ή στρεπτόκοκκους

### 2.3.2 Μαστίτιδες που προκαλούνται από μύκητες

Ορισμένοι μύκητες που διαδίδονται ευρέως σε περιβάλλοντα γαλακτοφόρων ζώων μπορούν επίσης να προκαλέσουν λοιμώξεις του μαστού. Λόγω της πιο συχνής αντιμετώπισης των φλεγμονών του μαστού με αντιβιοτικά, η συχνότητα των μολύνσεων από μύκητες είναι αυξημένη. Αυτό συμβαίνει, εν μέρει, αφού η παρουσία ορισμένων αντιβιοτικών προάγει την ανάπτυξη μυκήτων. Κλινικά, είναι αδύνατο να διακρίνουμε τις μυκητιασικές λοιμώξεις από τις βακτηριακές λοιμώξεις. Η μαστίτιδα που επιδεινώνεται αμέσως μετά τη λήψη αντιβιοτικών και η μαστίτιδα που εμφανίζεται 8 έως 10 ημέρες μετά τη λήψη αντιβιοτικών μπορεί να έχει προκληθεί από μύκητες. Ένα δείγμα γάλακτος μπορεί να αναλυθεί για επιβεβαίωση, και θα αναγράφεται πάνω στην αίτηση της ανάλυσης, η ένδειξη «ύποπτο για μύκητες». Σε κάθε περίπτωση, είναι αδύνατο να διακρίνουμε εάν ο παθογόνος παράγοντας εγκαταστάθηκε κατά τη διάρκεια της θεραπείας ή εάν υπήρχε σε μικρή ποσότητα στον θηλαίο κόλπο ή στο μαστό πριν από τη χρήση του φαρμάκου. Το ενδεχόμενο πολλαπλασιασμού των μυκήτων, κατά την διάρκεια της θεραπείας είναι ο λόγος για αυστηρά μέτρα υγιεινής κατά τη χρήση ενδομαστικών φαρμάκων. Μεγάλη ομάδα κτηνιάτρων είναι πεπεισμένη ότι μυκητιασικές μαστίτιδες περιορίζουν την εμφάνισή τους σε εγκαταστάσεις όπου τηρείται η απολύμανση των θηλών.

### 2.3.3 Μαστικές πληγές που προκαλούνται από τραυματισμούς

Η τραυματική πληγή θεωρείται ως άλλη μία μορφή μαστικής πάθησης, αρκετά συχνής, και οφείλεται σε πληγές και μωλωπισμούς διαφορετικής προέλευσης. Είναι δυνατόν να παραχθούν περιστασιακά (π.χ. ποδοπατημένη θηλή), κατά επαναλαμβανόμενο τρόπο (στράγγισμα σε επίπεδο κενού, πολύ ψηλό άρμεγμα κλπ.) ή κατά τρόπο μόνιμο (θέσεις πολύ κοντές, ενώ οι μαστοί βρίσκονται συνεχώς στην άκρη της θέσης). Αυτές οι πληγές δεν φαίνονται πάντα με γυμνό οφθαλμό.

### 2.3.4 Συνδυασμός τραυματικών και μολυσματικών μαστικών πληγών

Η ανάπτυξη των μαστίτιδων ευνοείται από την ύπαρξη συνδυασμού τραυματικών και μολυσματικών πληγών. Τα βακτήρια περνούν και εγκαθίστανται πιο εύκολα στο εσωτερικό του μαστού, όταν υπάρχουν ήδη τραυματικές πληγές στον ιστό των θηλών και του μαστού. Οι μαστίτιδες εμφανίζονται έως και 10 φορές πιο συχνά όταν είναι πληγωμένο το εξωτερικό άκρο των θηλών παρά σε μαστούς που το άκρο των θηλών παραμένει ανέπαφο.

### 2.3.5 Μαστικές πληγές που δε συναντώνται συχνά

Μία περίπτωση μαστικής πληγής που δεν συναντάται συχνά είναι η δημιουργία ρυτίδων και σχισμών κατά την έκθεση στον ήλιο, στην αρχή της περιόδου βοσκής, λόγω της ξήρανσης του δέρματος και των πληγών που προκαλούνται από τοξικές ουσίες. Οι τοξικές αυτές ουσίες αποδίδονται σε γαστρεντερικές διαταραχές που οφείλονται σε αλλαγές στην διατροφή των ζώων ή αλλοιώσεις του σανό. Σε στάβλους που είναι εκτεθειμένοι σε ρεύματα αέρα, είναι συχνό το φαινόμενο της υποθερμίας, δηλαδή της πτώσης της θερμοκρασίας του μαστού, όμως δεν αποτελεί στην κυριολεξία πληγή. Είναι το αποτέλεσμα της αντίστασης που έχει καμφθεί. Από την στιγμή που η αγελάδα έχει νοσήσει ήδη από μια υποκλινική μαστίτιδα, ο κίνδυνος για οξεία κρίση αυξάνεται. Σε όλες αυτές τις πληγές, η απάντηση του μαστού έρχεται με μια ορατή αντίδραση για να τις εξουδετερώσει. Ο βαθμός, η διάρκεια και το είδος της αντίδρασης αυτής εξαρτώνται από τον βαθμό, την διάρκεια και το είδος της πληγής/πληγών του μαστού αλλά και από την αντίσταση της αγελάδας. Για τον λόγο που μια αρρώστια παραμένει κρυφή ή φανερή σε μία περίπτωση, οξεία ή χρόνια σε μία άλλη μπορούν να γίνουν μόνο υποθέσεις. Η φλεγμονή θα έχει εξαφανιστεί από την στιγμή που οι μαστικές πληγές εξαλειφθούν, είτε λόγω αμυντικών μηχανισμών της αγελάδας είτε χάρη στην θεραπεία σε περιπτώσεις μολυσματικών πληγών, είτε λόγω της εξάλειψης λαθών και ελαττωμάτων στις περιπτώσεις των τραυματικών πληγών.

## 2.4 ΜΕΤΑΒΟΛΕΣ ΓΑΛΑΚΤΟΚΟΜΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ, ΓΑΛΑΚΤΟΣ ΚΑΙ ΜΑΣΤΟΥ

Η γαλακτοκομική παραγωγή επηρεάζεται δυσμενώς από όλες τις μαστίτιδες, οι οποίες προκαλούν τροποποιήσεις και στην σύνθεση του γάλακτος. Ένα ποσοστό μαστίτιδων προκαλεί επίσης ορατές κλινικές αλλοιώσεις στο μαστό και στο γάλα. Η μείωση της γαλακτοκομικής παραγωγής διαπιστώνεται αμέσως με το άρμεγμα με το χέρι. Με την χρήση αμελκτικής μηχανής, είναι δυσκολότερο να υπολογισθεί το μέγεθος των απωλειών. Ως απόδειξη μείωσης της παραγωγής, προτείνεται να γίνει ξεχωριστά το άρμεγμα με αμελκτική μηχανή όπως αυτές που χρησιμοποιούνται για τον έλεγχο της ικανότητας άμελης, της παραγωγής κάθε τεταρτημορίου και θα οδηγηθούμε στο συμπέρασμα ότι όλα τα άρρωστα τεταρτημόρια δίνουν πιο λίγο γάλα σε σύγκριση με ένα υγιές τεταρτημόριο.

Σε αρχικό στάδιο της μαστίτιδας, ο αριθμός των κυττάρων του γάλακτος αυξάνεται. Με την δοκιμή του Schalm, είναι δυνατόν να διαπιστωθεί πολύ εύκολα αυτή η αύξηση των κυττάρων που προκαλείται από όλες τις μαστίτιδες. Τα λευκά αιμοσφαίρια (λευκοκύτταρα) και τα επιθηλιακά κύτταρα (επένδυση των κυψελίδων, των γαλακτοφόρων αγωγών, των γαλακτοφόρων κόλπων, και των θηλαίων κόλπων) είναι τα σημαντικότερα κύτταρα που υπάρχουν στο γάλα. Αυτοί οι δύο τύποι κυττάρων είναι που παρεμβαίνουν στις αντιδράσεις της δοκιμής του Schalm και της δοκιμής της καυστικής σόδας. Από την στιγμή που αυξάνεται ο αριθμός των κυττάρων εξαιτίας της μαστίτιδας, ο αριθμός των λευκοκυττάρων αυξάνεται γρήγορα. Σε περιπτώσεις όπου η αύξηση του αριθμού των κυττάρων είναι φυσιολογικό φαινόμενο, όπως στο πρωτόγαλα ή στο γάλα των αγελάδων που έχουν να γεννήσουν καιρό, η μεγαλύτερη ποσότητα των σωματιδίων αυτών είναι υπεύθυνα για το θετικό αποτέλεσμα της δοκιμής του Schalm. Το γάλα υγιών τεταρτημορίων παρουσιάζει λιγότερα από 200.000 κύτταρα στο κυβικό εκατοστό. Οι απώλειες στην παραγωγή σε συνδυασμό με την αύξηση του αριθμού των κυττάρων είναι αλληλένδετα με τις μεταβολές στην σύνθεση του γάλακτος. Η περιεκτικότητα συστατικών επιθυμητών όπως του λίπους, της λακτόζης και των πρωτεϊνών μειώνεται, σε αντίθεση με την περιεκτικότητα των μη επιθυμητών συστατικών όπως του χλωριούχου νατρίου και του ορού αίματος που αυξάνεται. Για παράδειγμα, η αύξηση αυτών των συστατικών είναι υπεύθυνη για την υφάλμυρη γεύση του γάλακτος. Οι μαστίτιδες αλλοιώνουν επίσης και την όψη του γάλακτος. Όσο πιο σοβαρή είναι η μαστίτιδα, τόσο η εμφάνιση του γάλακτος μοιάζει με τον ορό αίματος. Επιπροσθέτως μπορεί να περιέχονται σε διάφορες ποσότητες ιζήματα (υπόλευκα) ή πυοσφαίρια (υποκίτρινα). Σε ορισμένες περιπτώσεις, το γάλα έχει άσχημη μυρωδιά, σπανιότερα περιέχει αίμα ή φυσαλίδες αέρα. Στις χρόνιες μαστίτιδες, το γάλα μπορεί να έχει μια υδαρή όψη και να περιέχει ποσότητες πυοσφαιρίων ή ινωδών νιφάδων. Στις προηγούμενες διαταραχές μπορούν να προστεθούν και αλλοιώσεις του μαστού όπως οίδημα, το οποίο εμφανίζεται συχνότερα στις οξείες μαστίτιδες, αύξηση της θερμοκρασίας και πόνο. Σε χρόνιες φλεγμονές μπορούν να παρατηρηθούν οζίδια ή ατροφία του ιστού.

## 2.5 ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑ ΤΩΝ ΑΓΕΛΑΔΩΝ ΣΤΗΝ ΜΑΣΤΙΤΙΔΑ

Η ευαισθησία των γαλακτοφόρων ζώων στις μαστίτιδες αυξάνεται στο μέγιστο, κατά την διάρκεια των 2 ή 3 πρώτων εβδομάδων της ξηράς περιόδου. Αυτό συμβαίνει επειδή τα βακτήρια που δεν έχουν απομακρυνθεί με την άμεση μπορούν να περάσουν μέσω του θηλαίου κόλπου. Θα χρειαστεί να ληφθούν μέτρα κατά του κινδύνου της αυξημένης μόλυνσης για να αποφευχθεί το αυξημένο ποσοστό μολύνσεων στην διάρκεια της γέννας παρά στην ξηρά περίοδο. Το γεγονός αυτό είναι αρκετά αναπάντεχο να συμβεί. Λίγο πριν και μετά την γέννα η αγελάδα έχει μεγαλύτερη προδιάθεση να νοσήσει από μαστίτιδα από ότι κατά την διάρκεια της φυσιολογικής γαλακτικής περιόδου. Το ίδιο ισχύει και κατά την χρονική περίοδο που η αγελάδα βρίσκεται στις γόνιμες μέρες. Επιπρόσθετα, η είσοδος των βακτηρίων στο εσωτερικό του μαστού διευκολύνεται από τις συνθήκες που επικρατούν μετά από κάθε άμεση. Άλλοι παράγοντες που βοηθούν στην επιμόλυνση του μαστού είναι οι τραυματικές πληγές και το μη ικανοποιητικό στράγγισμα. Τροποποιήσεις στην τεχνική του αρμέγματος έχει διαπιστωθεί ότι συμβάλλουν στην λύση των προβλημάτων της υγείας του μαστού. Παράγοντες που επίσης αυξάνουν τον κίνδυνο νόσου από μαστίτιδα, είναι οι εξής: ποσοστό υγρασίας υψηλό, υψηλές θερμοκρασίες στο εσωτερικό του στάβλου, μαστική υποθερμία (κακή θερμομόνωση των θέσεων, ρεύματα αέρα), όχι πολύ καλή ποιότητα του πόσιμου νερού και του σανό, ξαφνικές αλλαγές στην διατροφή των ζώων. Τέλος, είναι γνωστό, ότι κάποιες γενιές αγελάδων παρουσιάζουν αυξημένη ευαισθησία στις μαστίτιδες.

## 2.6 ΜΑΣΤΙΤΙΔΑ ΤΩΝ ΑΙΓΟΠΡΟΒΑΤΩΝ

Η μαστίτιδα όχι μόνο προκαλεί σημαντικές απώλειες στην εκτροφή προβάτων, αλλά και στην εκτροφή αιγών. Οι οικονομικές επιπτώσεις της μαστίτιδας αποδίδονται αφενός στην απώλεια λειτουργίας του μαστικού αδένος, αφετέρου στην ανάγκη που δημιουργείται για πρόωρη σφαγή των προβάτων και των αιγών. Οι αρνητικές οικονομικές επιπτώσεις επεκτείνονται στα έξοδα αντικατάστασης των ζώων που προορίζονται πρόωρα για σφαγή, στις ανάγκες για κτηνίατρο, στην ποιοτική υποβάθμιση του γάλακτος και μειωμένη παραγωγή του, και τέλος στην αυξημένη θνησιμότητα και την απότομη αύξηση βάρους των αιγών και των προβάτων. Οι βασικοί αιτιολογικοί παράγοντες στην πρόκληση μαστίτιδας είναι τα βακτήρια *Staphylococcus aureus* και *Pasteurella haemolytica*. Έχει βρεθεί ότι είναι υπεύθυνοι για το περίπου 80% των περιπτώσεων μαστίτιδας. Έχουν επίσης αναφερθεί περιστατικά μαστίτιδων που οφείλονται σε *Escherichia coli* και ιδιαίτερα σε ενσταυλισμένα κοπάδια. Ο ιός *Maedi Visna* μπορεί να προκαλέσει σκληρυντική μαστίτιδα και ανεπαρκή παραγωγή γάλακτος σε αιγοπρόβατα. Οι παράγοντες που προκαλούν μαστίτιδα στις πρόβατα και τις αιγες δεν έχουν διερευνηθεί διεξοδικά.

Ορισμένοι παράγοντες που προσδιορίστηκαν είναι οι εξής:

1. περιβαλλοντικοί: λόγω του διαδοχικού παρασιτισμού σε θηλές ασθενών και υγιών ζώων, διάφορα έντομα, ίσως μεταδίδουν βακτήρια, ιδιαίτερα η μύγα *Hydrotoea*

irritans. Επίσης άλλος ένας περιβαλλοντικός παράγοντας που να οδηγεί σε μόλυνση των μαστικών αδένων, μπορεί να είναι η επιμόλυνση των θηλών με τα κόπρανα των σταβλισμένων ζώων.

2. γενετικοί: υπάρχει πιθανότητα γενετικοί παράγοντες να επηρεάζουν τον μηχανισμό άμυνας του μαστικού αδένος σε επιμολύνσεις.
3. ζωοτεχνικοί: Ο περιορισμός των κινήσεων των ζώων σε μικρούς στάβλους, όπως και λανθασμένες ρυθμίσεις σε αμελκτικές μηχανές, προδιαθέτουν σε μαστίτιδα. Η μη επαρκής απολύμανση των αμελκτικών μηχανών ή των χεριών των υπεύθυνων άμελης, μπορούν να προδιαθέσουν σε μαστίτιδα.
4. Ηθολογικοί: είναι δυνατή η μετάδοση παθογόνων βακτηρίων, μέσω του θηλασμού των αρνιών από τις προβατίνες, μεταδίδοντας παθογόνα βακτήρια από ένα ασθενές ζώο σε υγιή.
5. Διατροφικοί: έχει βρεθεί ότι η χορήγηση βιταμίνης E και σεληνίου σε γαλακτοπαραγωγικά ζώα, μειώνει την συχνότητα εμφάνισης κλινικής και υποκλινικής μαστίτιδας, ενώ με την έλλειψη σε αυτά τα στοιχεία, παρατηρήθηκε αυξημένη εμφάνιση μαστίτιδας. Επίσης, η κατανάλωση μουχλιασμένων ζωοτροφών είναι πιθανό να συντελέσει στην εμφάνιση μαστίτιδας.
6. Νοσολογικοί: διάφοροι τραυματισμοί όπως αυτοί της θηλής ή αυτοί που προκύπτουν κατά το κούρεμα θεωρείται ότι προδιαθέτουν σε μαστίτιδα.

Τα παραπάνω θεωρούνται ως παράγοντες προδιάθεσης για μαστίτιδα σε αιγοπρόβατα, αλλά το ποσοστό συμμετοχής ή η συμβολή του καθενός από αυτά στην αιτιολογία της νόσου δεν έχει ακόμη καθοριστεί.

## 2.7 ΜΕΘΟΔΟΙ ΔΙΑΓΝΩΣΗΣ

### 2.7.1 Γενικά

Υπάρχουν πολλοί τρόποι για τη διάγνωση της μαστίτιδας, οι οποίες βασίζονται σε αλλαγές στα συστατικά του γάλακτος, όπως ο αριθμός των σωματικών κυττάρων στο γάλα, η περιεκτικότητα σε χλώριο στο γάλα, ειδικά η αναλογία χλωρίου προς λακτόζη, η ηλεκτρική αγωγιμότητα του γάλακτος και τιμή pH του γάλακτος κ.λπ. Η πιο αξιόπιστη τεχνική για διάγνωση θεωρείται ο προσδιορισμός του αριθμού των σωματικών κυττάρων στο γάλα.

Οι τεχνικές που χρησιμοποιούνται είναι οι εξής:

1. Άμεση μικροσκοπική μέτρηση των σωματικών κυττάρων (Microscopic count of somatic cells),
2. Αυτοματοποιημένη και ταχεία φθορισμο-οπτικό-ηλεκτρική μέθοδος (Fluoro-Optic-Electronic method) και
3. Δοκιμή της Καλιφόρνιας (Δοκιμή Schalm).

Η μέθοδος με το μικροσκόπιο είναι η βασική και η προτεινόμενη μέθοδος της Διεθνούς Ομοσπονδίας Γάλακτος. Η μέθοδος αυτή βασίζεται στη χρώση του πυρήνα των σωματικών κυττάρων με κυανού του μεθυλενίου και στην μετέπειτα καταμέτρησή τους με

μικροσκόπιο. Η μέθοδος αυτή απαιτεί αρκετό χρόνο μέχρι την έκβαση των αποτελεσμάτων, εφαρμόζεται για μικρό αριθμό δειγμάτων και κατά την εκτέλεση της, απαιτεί μεγάλη εμπειρία.

Ακόμη, προτείνεται από την IDF η αυτοματοποιημένη και ταχεία φθορισμο-οπτικό-ηλεκτρική μέθοδος, αρχή της οποίας είναι η χρώση του DNA του πυρήνα των κυττάρων σε υπεριώδες φως με φθορίζουσα χρωστική (βρωμιούχο αιθύλιο). Για την μέθοδο αυτή γίνεται χρήση σύγχρονων συσκευών, όπως είναι η συσκευή Fossomatic, και εφαρμόζεται από μεγάλες βιομηχανίες. Η συσκευή αυτή έχει απόδοση 180 δείγματα/h, αλλά σε επίπεδο εκτροφής και σε μικρές μονάδες μεταποίησης γάλακτος γίνεται εφαρμογή μιας άλλης τεχνικής που ονομάζεται δοκιμή της Καλιφόρνιας.



Εικόνα 2.3 : Συσκευή Fossomatic

## 2.7.2 Δοκιμή της Καλιφόρνιας (California Mastitis Test –CMT) ή δοκιμή Schalm

Γίνεται η ποσοτικοποίηση των σωματικών κυττάρων στα δείγματα του γάλακτος όλης της γαλακτοπαραγωγής ή στα δείγματα γάλακτος από κάθε τεταρτημόριο του μαστού της αγελάδας. Η μέθοδος αυτή είναι απλή και έμμεση και λαμβάνει χώρα κυρίως στον στάβλο. Ύστερα από μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί για τι διάφορες μεθόδους ελέγχου μαστίτιδας στο γάλα, η δοκιμή της California (ή δοκιμή Schalm), είναι η εξέταση που σε επίπεδο εκτροφής εμφανίζει την μέγιστη δυνατή ακρίβεια αλλά και ευαισθησία και ταυτόχρονα διαθέτει χαμηλό κόστος (3,5€/1000 δοκιμές) αλλά και άμεση διάγνωση (Αντωνόπουλος et al.,2009)

### 2.7.2.1 Αρχή της μεθόδου

Ο δείκτης που χρησιμοποιείται είναι η πορφυρή βρωμοκρεζόλη, όπου πήζει το γάλα όταν αυτό περιέχει σωματικά κύτταρα. Η μέθοδος βασίζεται στην τάση του ανιονικού αντιδραστηρίου Alkyl aryl sulfonate. Ο αριθμός των σωματικών κυττάρων που περιέχονται στο γάλα, είναι ανάλογος του βαθμού πήξεως. Ακόμη με την χρήση του δείκτη αυτού μας επιτρέπεται να εκτιμήσουμε το pH του γάλακτος. Όταν το δείγμα, μετά την προσθήκη του δείκτη αποκτά μωβ χρώμα, σημαίνει ότι το



Εικόνα 2.4 : Δοκιμή California

pH ισούται ή είναι μεγαλύτερο του 6,8. Ο τόπος όπου γίνεται η αντίδραση είναι ένας πλαστικός δίσκος με 4 μικρά φρεάτια, τα οποία παρέχουν την δυνατότητα εφαρμογής τους και στον στάβλο προκειμένου να ελεγχθούν τα 4 τεταρτημόρια του μαστού.



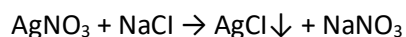
## 2.7.3 Προσδιορισμός Χλωρίου

### 2.7.3.1 Γενικά

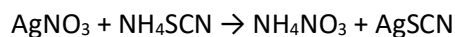
Στο φυσιολογικό γάλα το χλώριο κυμαίνεται από 0,07-0,1%. Στο γάλα που προέρχεται από μαστό προσβεβλημένο από μαστίτιδα, παρουσιάζεται αύξηση της συγκέντρωσης του σε χλώριο και παράλληλα πτώση της συγκέντρωσης του σε λακτόζη. Αυτό συμβαίνει προκειμένου να διατηρηθεί στα ίδια επίπεδα η ωσμωτική πίεση. Η περιεκτικότητα του γάλακτος σε χλώριο μεγαλύτερη του 0,14% αποτελεί κριτήριο ότι το ζώο από το οποίο προέρχεται το γάλα, έχει προσβληθεί από μαστίτιδα. Για τον έλεγχο της ύπαρξης μαστίτιδας μπορεί να χρησιμοποιηθεί και η ακόλουθη σχέση : (% χλώριο ×100)/% λακτόζη. Η τιμή από ένα φυσιολογικό γάλα πρέπει να είναι μικρότερη του 3. Σε άλλη περίπτωση το γάλα προέρχεται από προσβεβλημένο από μαστίτιδα μαστό (αριθμός Koestler).

### 2.7.3.2. Μέθοδος Davis

Σε αυτή τη μέθοδο, η οργανική ουσία στο γάλα καταστρέφεται με  $\text{KMnO}_4$  και πυκνό  $\text{HNO}_3$ . Το χλώριο γάλακτος αντιδρά με περίσσεια  $\text{AgNO}_3$  και σχηματίζει ίζημα  $\text{AgCl}$  κατά τη διάρκεια της αντίδρασης:



Το όξινο περιβάλλον αποτρέπει τον σχηματισμό αλάτων αργύρου με άλλα ανιόντα. Στη συνέχεια, η περίσσεια νιτρικού αργύρου τιτλοδοτείται με θειοκυανικό αμμώνιο και ακολουθεί η εξής αντίδραση:



Με αυτή την μέθοδο υπολογίζεται έμμεσα το χλώριο του γάλακτος.

## 2.8 ΣΥΝΕΠΕΙΕΣ ΜΑΣΤΙΤΙΔΑΣ

Η πιο σοβαρή συνέπεια της μαστίτιδας είναι η απώλεια παραγωγής γάλακτος, επειδή ο ιστός που παράγει γάλα έχει υποστεί βλάβη από μόλυνση και η σύνθεση του παραγόμενου γάλακτος έχει επίσης αλλάξει. Σε αρκετές περιπτώσεις, η μείωση της παραγωγής γάλακτος μπορεί να αγγίξει το 50%. Η απώλεια βάρους των ζώων είναι επίσης δυνατή, που κυμαίνεται από 7-12,5%. Η μαστίτιδα μπορεί να προκαλέσει μείωση της γονιμότητας των ζώων και να καθυστερήσει την έναρξη της περιόδου αναπαραγωγής. Μελέτες έχουν δείξει ότι τα αυξημένα επίπεδα ανασυνδυασμένης αυξητικής ορμόνης στις αγελάδες γαλακτοπαραγωγής, οδηγούν σε αύξηση της συχνότητας μαστίτιδων.

Η αντιμετώπισή της απαιτεί αύξηση της ποσότητας των αντιβιοτικών, κάτι που με τη σειρά του θα προκαλέσει περισσότερα κατάλοιπα αντιβιοτικών στο παραγόμενο γάλα. Το μαστιτικό γάλα διαθέτει επίσης αυξημένα επίπεδα πρωτεολυτικών και λιπολυτικών ενζύμων, τα οποία επηρεάζουν αρνητικά τις οργανοληπτικές ιδιότητες του παραγόμενου τυριού.

Φυσικά, αυτές δεν είναι οι μόνες αρνητικές συνέπειες της μαστίτιδας. Ο αριθμός των σωματικών κυττάρων αυξάνεται με την προσβολή και τον τραυματισμό τους, προκειμένου να γίνει εφικτή η εξουδετέρωση των παθογόνων παραγόντων. Μερικά από αυτά τα κύτταρα μεταφέρονται στο γάλα, και προκαλούν αύξηση των σωματικών κυττάρων στο γάλα των ζώων που έχουν μολυνθεί με μαστίτιδα. Το επίπεδο αυτών των κυττάρων είναι πολύ σημαντικό για την ανάκτηση των βασικών συστατικών του γάλακτος.

Επομένως, εκτός από την αλλαγή της σύνθεσης του γάλακτος, τα σωματικά κύτταρα μειώνουν επίσης τη θρεπτική του αξία. Η λακτόζη μειώνεται κατά 5-20% και η συνολική περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες ελαττώνεται ελαφρά επειδή αυξάνεται ο αριθμός των υδατοδιαλυτών πρωτεϊνών, ενώ προκαλείται μείωση των καζεϊνών κατά 6-18%. Παρατηρείται σημαντική αύξηση στα χλωριούχα άλατα και το pH μπορεί να είναι υψηλότερο από 7,0. Κατά συνέπεια, αφού παρατηρήθηκε ότι κατά την θερμική επεξεργασία, το μαστιτικό γάλα πήζει στην παστερίωση, οι ποσότητες σε τυρί είναι μικρότερες λόγω της χαμηλής συγκέντρωσης σε καζεΐνη, την αυξημένη πρωτεόλυση της καζεΐνης και υδρόλυση του λίπους και τέλος περιέχει αυξημένη περιεκτικότητα σε χλώριο και κάλιο, συστατικά που συντελούν στην επιμήκυνση του χρόνου πήξεως του γάλακτος, κρίθηκε ότι το μαστιτικό γάλα είναι ακατάλληλο για την παρασκευή γαλακτοκομικών προϊόντων.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

### 3. ANTIBIOTIKA

Τα αντιβιοτικά είναι ουσίες συνθετικές, βιοσυνθετικές ή ημισυνθετικές, οι οποίες εκδηλώνουν μικροβιοκτόνο ή μικροβιοστατική δράση σε χαμηλές συγκεντρώσεις. Πρόκειται για τοξικές ουσίες (ενδοτοξίνες) που χρησιμοποιούνται από τους μικροοργανισμούς που τις παράγουν σαν όπλο εναντίον άλλων μικροοργανισμών, σε έναν αγώνα επιβίωσης. Ετυμολογικά η λέξη «αντιβιοτικό» (αντί-βίος) προέρχεται από την ελληνική γλώσσα και χαρακτηρίζει μία ουσία η οποία δρα εναντίον της ζωής των βακτηρίων. Ορισμένα αντιβιοτικά είναι δυνατόν να περιέχουν συστατικά συνθετικά (δηλαδή που δεν παράγονται από μικροοργανισμούς) και ημισυνθετικά εργαστηριακά παράγωγα με αντιβακτηριδιακή δράση, που σκοτώνουν ή αναστέλλουν εξίσου την ανάπτυξη μικροβίων. Μέχρι σήμερα, γνωρίζουμε περίπου 6.000 αντιβιοτικά εκ των οποίων τα 100 τουλάχιστον παράγονται με ζύμωση.

#### 3.1 ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΤΩΝ ANTIBIOTIKΩN

Η ταξινόμηση των αντιβιοτικών γίνεται με βάση:

1. Το φάσμα της μικροβιακής δράσης
2. Τον μηχανισμό μέσω του οποίου δρουν
3. Την πηγή της βιοσυνθετικής πορείας από την οποία παράγονται και
4. Την δομή του μορίου τους

Οι κατηγορίες των αντιμικροβιακών ουσιών σε βακτηριοστατικές (αναστολή της ανάπτυξης βακτηρίων) και βακτηριοκτόνες (καταστροφή- θανάτωση βακτηρίων) παρουσιάζουν έντονο ενδιαφέρον. Στον πίνακα 3.1 που ακολουθεί παρατίθενται κάποιες βακτηριοκτόνες και βακτηριοστατικές αντιμικροβιακές ουσίες.

ΒΑΚΤΗΡΙΟΚΤΟΝΑ	ΒΑΚΤΗΡΙΟΣΤΑΤΙΚΑ
Πενικιλίνες	Μακρολίδια
Αμινογλυκοσίδες	Τετρακυκλίνες
Τριμεθοπρίμη + Σουλφαδιαζίνη	Σουλφοναμίδες

**Πίνακας 3.1<sup>4</sup>** : Ομαδοποίηση διαφόρων αντιμικροβιακών ουσιών

Ενδιαφέρον έχει η ταξινόμηση διαφόρων αντιβιοτικών με βάση τη χημική τους δομή. Ο Πίνακας 3.2 παραθέτει μερικά παραδείγματα αντιβιοτικών με τις χημικές τους δομές.

<sup>4</sup> Antimicrobials in food, P. Michael Davidson, John N. Sofos, A. L. Branen

Πολλά από αυτά τα αντιβιοτικά έχουν παραχθεί σε βιομηχανική κλίμακα χρησιμοποιώντας ένα συνδυασμό χημικών και ενζυμικών μεθόδων.

ΔΟΜΗ	ΠΑΡΑΔΕΙΓΜΑΤΑ
1. Υδατάνθρακες	
Αμινογλυκοσίδες	Στρεπτομυκίνη
C-Γλυκοσίδες	Βανκομυκίνη
2. Μακροκυκλικές λακτόνες	
Μακρολίδια	Ερυθρομυκίνη
3. Κινόνες	
Τετρακυκλίνες	Τετρακυκλίνη
Ανθρακυκλίνες	Ακλαρουβικίνη
Βενζοκινόνες	Μιτομυκίνη
4. Αμινοξέα και πεπτίδια	
Παράγωγα αμινοξέων	Κυκλοσερίνη
Β-λακτάμη	Πενικιλίνη
Πεπτίδια	Βακιτρακίνη
5. Αρωματικές ενώσεις	
Παράγωγα βενζολίου	Χλωραμφαινικόλη
Συμπυκν.Αρωμ. Δακτύλιοι	Γκριζεοφουλβίνη
Αρωματικοί αιθέρες	Νοβομπιοκίνη
6. Αλειφατικές ενώσεις	
Ενώσεις που περιέχουν φώσφορο	Φωσφομυκίνη
7. Ετεροκυκλικές ενώσεις	

<b>Νουκλεοτίδια</b>	Πολυοξίνες
<b>Πολυαιθέρες</b>	Μονενσίνη
8. Αλικυκλικά παράγωγα	
<b>Κυκλοαλκάνια</b>	Κυκλοεξιμίδιο
<b>Στεροειδή</b>	Φουσιδικό οξύ

**Πίνακα 3.2 :** Παραδείγματα αντιβιοτικών με βάση την χημική τους δομή

### 3.2 ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΔΡΑΣΗΣ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΩΝ

Τα αντιμικροβιακά φάρμακα δρουν με διαφορετικούς μηχανισμούς ενάντια στους μικροοργανισμούς και ταξινομούνται ανάλογα με τον μηχανισμό δράσης τους στις ακόλουθες κατηγορίες:

1. Στα αντιβιοτικά που προκαλούν παρεμπόδιση ή αναστολή της σύνθεσης του κυτταρικού τοιχώματος των μικροοργανισμών όπως είναι οι κεφαλοσπορίνες, πενικιλίνες, καρβαπενέμες, μονοβακτάμες, βακιτρακίνη και τα γλυκοπεπτίδια.
2. Στα αντιβιοτικά που αναστέλλουν την πρωτεϊνική σύνθεση των μικροοργανισμών όπως είναι οι τετρακυκλίνες, αμινογλυκοσίδες, χλωραμφαινικόλη, μακρολίδια, στρεπτογραμίνες και λινκοσαμίδες
3. Σε αυτά που προκαλούν διάσπαση/αποσύνθεση της κυτταρικής μεμβράνης των μικροοργανισμών όπως είναι η πολυμυξίνη Β, κολιστίνη, νυστατίνη, αμφοτερικίνη Β
4. Στα αντιβιοτικά που αναστέλλουν την λειτουργία ή την σύνθεση των νουκλεϊκών οξέων όπως είναι οι σουλφοναμίδες, κινολόνες-φθοριοκινολόνες και διαμινοπυριδίνες.

Τα αντιβιοτικά, ανάλογα με την χημική δομή του κάθε μορίου, παρουσιάζουν υψηλή επιλεκτικότητα σε μεμονωμένα είδη παρασίτων, όπως ευρείες ομάδες βακτηρίων καθώς επίσης και σε Gram- όπως κολοβακτηρίδια τύπου *Escherichia coli* και *Salmonella* ή Gram+ όπως Σταφυλόκοκκοι και οι Στρεπτόκοκκοι.

Αυτού του τύπου τα αντιβακτηριδικά, ανήκουν στην κατηγορία των «αντιβιοτικών ευρέος φάσματος», σε αντίθεση με τα αντιβιοτικά «στενού φάσματος» που έχουν ως στόχο συγκεκριμένους τύπους βακτηρίων.

### 3.3 ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ ΚΑΙ ΚΤΗΝΟΤΡΟΦΙΑ

Τα αντιβιοτικά στην κτηνοτροφία έχουν ευρύτατη χρήση. Σύμφωνα με τα στοιχεία του FDA, περίπου 14.000 τόνοι αντιβιοτικών (70% της παραγωγής των αντιβιοτικών) στις ΗΠΑ χρησιμοποιείται στην κτηνοτροφία. Μελέτες δείχνουν ότι χορηγούνται ετησίως στην κτηνοτροφία 63.000-240.000 τόνους καθαρής ουσίας. Λόγω των ελλειπών δεδομένων για τις χώρες των BRICS (Brazil,Russia,India,China,South Africa) δεν είναι δυνατός ο ακριβής υπολογισμός της ποσότητας αντιβιοτικών. Ακόμη, είναι γνωστό πως τα 31 από τα 41 αντιβιοτικά που έχουν αδειοδοτηθεί για χρήση στην κτηνοτροφία, είναι ίδια με αυτά που χρησιμοποιούνται και στην ιατρική (FDA 2010a, FDA 2010c). Μέχρι το 2030 προβλέπεται η χρήση των αντιβιοτικών να αυξηθεί έως και 67%, ενώ στις χώρες των BRICS θα διπλασιαστεί η χρήση τους (Van Boeckel et al., 2015). Η τακτική της χορήγησης αντιβιοτικών σαν παράγοντα αύξησης βάρους σε παραγωγικά ζώα, είναι συνήθης και χρησιμοποιείται ευρύτατα. Παρά τις πιέσεις από τα MME και την απαγόρευση της άσκοπης χρήσης αντιβιοτικών στην κτηνοτροφία ήδη από το 2006, φαίνεται να μην έχει γίνει μείωση της συνολικής ποσότητας αντιβιοτικών που καταναλώνονται από τα ζώα της γαλακτοπαραγωγής.

#### 3.3.1 Κατηγορίες αντιβιοτικών που χρησιμοποιούνται στα παραγωγικά ζώα

Συνήθως σε παραγωγικά ζώα, τα αντιμικροβιακά φάρμακα που χρησιμοποιούνται ανήκουν στην ίδια κατηγορία αντιμικροβιακών φαρμάκων που χρησιμοποιούνται και στον άνθρωπο και χωρίζονται στις ακόλουθες κατηγορίες ανάλογα με τη σημασία τους για την ανθρώπινη υγεία:

1. Πολύ μεγάλης σπουδαιότητας όπως είναι οι ριφαμυκίνες, δεύτερης γενεάς φθοριοκινολόνες, λινκομυκίνη, κεφαλοσπορίνες 3ης και 4ης γενιάς και η ερυθρομυκίνη
2. Μεγάλης σπουδαιότητας όπως είναι οι κεφαλοσπορίνες 1ης και 2ης γενεάς και η γενταμυκίνη
3. Μέτριας σπουδαιότητας όπως είναι η αμπικιλίνη, καναμυκίνη, κινολόνες στενού φάσματος, αμοξικιλίνη
4. Μικρής σπουδαιότητας όπως είναι η πενικιλίνη G και V, κολιστίνη και η σπεκτινομυκίνη
5. Πολύ μικρής σπουδαιότητας όπως είναι η πολυμυξίνη και η βακιτρακίνη

## 3.4 ΚΑΤΗΓΟΡΙΕΣ ΚΑΙ ΔΡΑΣΕΙΣ ΔΙΑΦΟΡΩΝ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΩΝ

### 3.4.1 ΒΗΤΑ ΛΑΚΤΑΜΕΣ – BETA LACTAM

Οι βήτα λακτάμες είναι βακτηριοκτόνα φάρμακα που δρουν με πιο αργούς ρυθμούς εξουδετέρωσης από τα αντιβιοτικά όπως είναι οι φλουροκινόλες ή οι αμινογλυκοσίδες. Ο μηχανισμός δράσης τους περιλαμβάνει την εξουδετέρωση της ενεργητικότητας του βακτηρίου και έπειτα ξεκινάει η περίοδος επιβράδυνσης του βακτηρίου. Η βέλτιστη αποτελεσματικότητα του φαρμάκου εξαρτάται από τον χρόνο και όχι από την συγκέντρωση του. Για τον λόγο αυτό, οι β-λακτάμες συνιστανται να χορηγούνται σε επαναληπτικές δόσεις ή με συνεχή έγχυση. Στις βήτα λακτάμες ανήκει η υποκατηγορία των πενικιλινών και η υποκατηγορία των κεφαλοσπορινών.

Οι β-λακτάμες είναι ευρέως διαδεδομένες λόγω:

1. Της εκλεκτικότητας τους
2. Της ευελιξίας του αντιβιοτικού
3. Της χαμηλής τοξικότητας τους

Οι β-λακτάμες παρεμβαίνουν στο τελικό στάδιο της σύνθεσης πεπτιδογλυκάνης, προλαμβάνοντας το βακτηριακό κυτταρικό τοίχωμα από τον σχηματισμό του. Ακόμη, προκαλούν αναστολή της δράσης της τρανσπεπτιδάσης και άλλων ενζύμων δράσης της πεπτιδογλυκάνης. Οι βήτα λακτάμες ασκούν βακτηριοκτόνο δράση, όμως προκαλούν και καταστροφή σε αναπτυσσόμενα κύτταρα. Τα κύτταρα αυτά δεν υφίστανται δραστική σύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος, ενώ ο μηχανισμός της λύσης τους δεν είναι μέχρι και τώρα γνωστός με ακρίβεια. Η διαφορά μεταξύ των βακτηρίων Gram+ και Gram- όσον αφορά την ευαισθησία, εξαρτάται από τις διάφορες θέσεις υποδοχών της δεσμευτικής πρωτεΐνης (PBPs) για το σχετικό ποσό της πεπτιδογλυκάνης, σχετικά με την ικανότητα που διαθέτουν τα φάρμακα να εισβάλλουν στην εξωτερική κυτταρική μεμβράνη των Gram- βακτηρίων και στην ανθεκτικότητα του φαρμάκου σε διάφορους τύπους ένζυμων (βήτα λακταμάσων – πενικιλινάσες ) που έχουν παραχθεί από το ίδιο το βακτήριο.

#### 3.4.1.1 Πενικιλίνη

Οι πενικιλίνες είναι μια μεγάλη υποδεέστερη κατηγορία των βήτα λακταμών που εμπεριέχει τις εξής ομάδες, σύμφωνα με την αντιμικροβιακή τους δράση :

- Φυσικές πενικιλίνες,
- Αντισταφυλοκοκκικές πενικιλίνες,
- Αμινοπενικιλίνες
- Πενικιλίνες ευρέους φάσματος

Η δομή της πλευρικής αλυσίδας είναι διαφορετική σε πολλές πενικιλίνες. Εκτός όμως από αυτές τις διαφορές τους, οι πενικιλίνες διαφέρουν ακόμη και στην ικανότητα τους να

διδεισδύουν στην εξωτερική μεμβράνη των Gram αρνητικών βακτηρίων, στο αντιμικροβιακό φάσμα, στην σταθερότητα των γαστρικών οξέων καθώς επίσης και στην συμπεριφορά που έχουν εντός του ξενιστή. Η βασική δομή των πενικιλινών περιλαμβάνει τον πυρήνα ο οποίος αποτελείται από μία πλευρική ομάδα και έναν δακτύλιο βήτα λακτάμης (τετραμελές κυκλικό αμίδιο). Η αντιβακτηριακή δράση της, οφείλεται στην ύπαρξη του δακτυλίου βήτα λακτάμης και η πλευρική ομάδα καθορίζει τις φαρμακευτικές ιδιότητες και το αντιβακτηριακό φάσμα (Emed expert, 2012). Το στέλεχος *Penicillium notatum* παράγει μια χημική ουσία στην οποία βασίζονται οι πενικιλίνες. Όσον αφορά την ονοματολογία, η πλειονότητα των αντιβιοτικών αυτής της κατηγορίας παίρνουν ως κατάληξη – cillin. Ακόμη υποδιαιρούνται σε φάσματα



Εικόνα 3.1 : *Penicillium notatum*

σύμφωνα με τον οργανισμό-στόχο τους. Ορισμένα αντιβιοτικά έχουν αναπτύξει ημισυνθετικά με διαφορετικές πλευρικές αλυσίδες με σκοπό να αποδώσουν διαφορετικές ιδιότητες όπως για παράδειγμα η εντερική χορήγηση ή για την αποφυγή βλάβης από το ίδιο φάρμακο από βακτηριακές πενικιλινάσες (βήτα λακταμάσες). Επίσης οι πλευρικές αλυσίδες μπορεί να προκαλέσουν ορισμένες παρενέργειες όπως είναι μια αλλεργική αντίδραση. Κάποιες πενικιλίνες μπορούν να χρησιμοποιηθούν και σε συνδυασμό με άλλες χημικές ενώσεις, οι οποίες όμως δεν φέρουν αντιβιοτικές ιδιότητες αλλά έχουν παρόμοια δομή με αυτήν της πενικιλίνης και έτσι δρουν ως αναστολείς των βακτηριακών πενικιλινάσων (ένζυμα)

#### 3.4.1.2 Κεφαλοσπορίνες

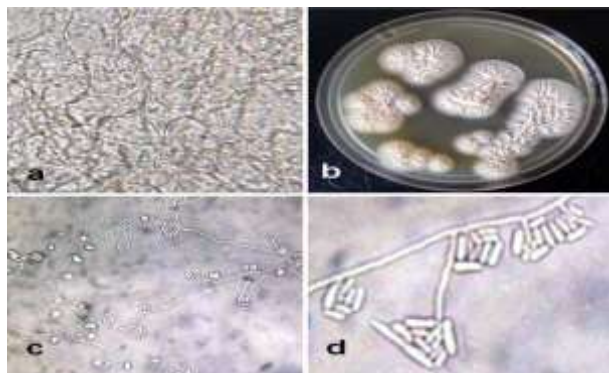
Οι κεφαλοσπορίνες είναι επίσης μια άλλη κατηγορία των β-λακταμών και βάσει της χρονικής περιόδου ανακάλυψης και δράσης τους, εμπεριέχει τις κεφαμυκίνες και τις ακόλουθες ομάδες:

- κεφαλοσπορίνες 1ης γενιάς(χωρίς αυξημένη σταθερότητα β-λακταμάσης), όπως είναι η κεφαζολίνη, η κεφαδροξίλη και η κεφαλεξίνη
- κεφαλοσπορίνες 2ης γενιάς (μεταβατικού σταδίου με βελτιωμένη δράση στο Gram- πεδίο και αυξημένη σταθερότητα β-λακταμάσης) όπως είναι η κεφοτιαμίνη και η κεφουροξίμη
- κεφαλοσπορίνες 3ης γενιάς(ευρέους- φάσματος με υψηλή σταθερότητα β-λακταμάσης) όπως είναι η κεφοταξίμη, η κεφοβεκίνη και η κεφιξίμη
- κεφαλοσπορίνες 4ης γενιάς ( αυξημένο φάσμα δράσεως έναντι σε Gram+ και Gram - βακτήρια και αυξημένη σταθερότητα β-λακταμάσης) με μοναδικό παράδειγμα την κεφεπίμη
- κεφαλοσπορίνες 5ης γενιάς

Διαθέτουν βακτηριοκτόνο δράση σε πολλαπλασιαζόμενα κύτταρα, παρεμποδίζοντας την σύνθεση της κυτταρικής μεμβράνης. Οι κεφαλοσπορίνες στην φύση συναντώνται ως



κεφαλοσπορίνη-C , στον μύκητα (μούχλα) *Acremonium chrysogenum* (παλαιότερα ονομαζόταν *Cephalosporium acremonium*).



**Εικόνα 3.2 :** Καλλιέργεια του μύκητα *Acremonium chrysogenum*

### 3.4.2. ΠΕΠΤΙΔΙΑ – PEPTIDE ANTIBIOTICS

Πεπτίδια-αντιβιοτικά με ποικίλες δράσεις έναντι των βακτηρίων είναι οι πολυμυξίνες, οι στρεπτογραμίνες και τα γλυκοπεπτίδια (βανκομυκίνη). Η κλινική εξέλιξη των πολυμυξινών, δεν έχει τους επιδιωκόμενους στόχους από την ανακάλυψη των αντιβιοτικών, λόγω της συστηματικής τοξικότητας. Αντιθέτως, οι στρεπτογραμίνες και τα γλυκοπεπτίδια κινούν το ενδιαφέρον στον τομέα της ιατρικής του ανθρώπου, εξαιτίας των δράσεων τους κατά των Gram+ βακτηρίων, καθώς επίσης και των πολύ ανθεκτικών εντερόκοκκων (Multi resistant enterococci). Η πρώτη αναφορά των πολυμυξινών έγινε την δεκαετία του 1940, κάνοντας γνωστό ότι είναι αντιβιοτικά προϊόντα του *Bacillus polymyxa*.

Οι πολυμυξίνες έχουν μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα κατά των Gram αρνητικών και των Gram θετικών βακτηρίων. Τέλος, οι πολυμυξίνες στενού φάσματος δρουν κατά των εντεροβακτηρίων *Shigella* spp, *Bordetella*, *Klebsiella*, *Salmonella*, *Pasteurella*, και *E.coli*. Οι πολυμυξίνες ακόμη, είναι υπεύθυνες για την αποδιοργάνωση της εξωτερικής μεμβράνης των Gram αρνητικών βακτηρίων από τη δέσμευση των λιποσακχαριτών (LPP, ενδοτοξίνες), μέσω της άμεσης διαδραστικότητας με τα ανιόντα και τα λιπίδια. Ταχέως βακτηριοκτόνα και ισχυρής δράσης είναι οι πολυμυξίνες και η κολιστίνη κατά πολλών στελεχών των Gram αρνητικών βακτηρίων, όπως *Salmonella*, *E.coli*, και *Pseudomonas aeruginosa*. Εξαιτίας της παρουσίας των συνηθισμένων συγκεντρώσεων του ασβεστίου η δράση έναντι της *Pseudomonas aeruginosa* είναι περιορισμένη.

### 3.4.3 ΤΕΤΡΑΚΥΚΛΙΝΕΣ

Οι τετρακυκλίνες παρουσιάζονται ως αντιμικροβιακοί παράγοντες με ευρύ φάσμα δράσης. Η ξεχωριστή ημισυνθετική ουσία τετρακυκλίνη έδωσε το όνομα της σε ολόκληρη την ομάδα. Η οξυτετρακυκλίνη και η χλωροτετρακυκλίνη ήταν οι πρώτες φυσικές τετρακυκλίνες, ενώ όλες οι τετρακυκλίνες είναι ουσίες αμφοτερικές. Σχηματίζουν δηλαδή εύκολα άλατα με οξέα αλλά και με βάσεις. Σε υδατικά διαλύματα οι τετρακυκλίνες είναι

ασταθείς και κυρίως σε υψηλές τιμές pH (7.0-8.5). Στις τετρακυκλίνες περιλαμβάνονται οκτώ συγγενή αντιβιοτικά που προέρχονται από το γένος *Streptomyces* καθώς ακόμη υπάρχουν και τετρακυκλίνες ημισυνθετικές. Οι τετρακυκλίνες είναι αντιβιοτικά που διαλύονται γενικά δύσκολα στο νερό. Από όλες τις τετρακυκλίνες σχηματίζονται σταθερά δυσδιάλυτα σύμπλοκα (χημικές ενώσεις) με τα μεταλλικά ιόντα μαγνήσιο, σίδηρο, ασβέστιο. Για τον λόγο αυτόν μειώνεται αισθητά η απορρόφηση τους από τον εντερικό σωλήνα, εάν χορηγηθεί ταυτόχρονα τροφή που να περιέχει υψηλή ποσότητα των ιόντων αυτών. Χάρη στις φυσικοχημικές ιδιότητες των τετρακυκλινών επιτρέπεται η παρασκευή πολλών φαρμακευτικών μορφών όπως υδατοδιαλυτής σκόνης, ενέσιμων διαλυμάτων, καψουλών, αλοιφών κ.α. Παρακάτω παρατίθενται διάφορες φυσικές και ημισυνθετικές τετρακυκλίνες.

ΦΥΣΙΚΕΣ ΤΕΤΡΑΚΥΚΛΙΝΕΣ	ΗΜΙΣΥΝΘΕΤΙΚΕΣ ΤΕΤΡΑΚΥΚΛΙΝΕΣ
Οξυτετρακυκλίνη (Oxytetracycline)	Τετρακυκλίνη (Tetracycline)
Χλωροτετρακυκλίνη (Chlorotetracycline)	Δοξυκυκλίνη (Doxycycline)
Διμεθυλχλωροτετρακυκλίνη (Dimethylchlortetracycline)	

**Πίνακας 3.3 :** Παραδείγματα Τετρακυκλινών

Το αντιμικροβιακό φάσμα των τετρακυκλινών περιλαμβάνει τα κατά Gram αρνητικά και θετικά βακτήρια καθώς επίσης σπειροχαίτες, μυκοπλάσματα, χλαμύδια, ακτινομύκητες, ρικέτσιες και πρωτόζωα. Έναντι των τετρακυκλινών, αναπτύσσονται εύκολα ανθεκτικά στελέχη από μεγάλο αριθμό μικροβιακών στελεχών. Πιο συγκεκριμένα αναπτύσσονται μηχανισμοί οι οποίοι παρεμποδίζουν την είσοδο αυτών των αντιμικροβιακών ουσιών στο κυτταρόπλασμα κι έτσι αυξάνεται η αντοχή τους στην αντιμικροβιακή δράση των τετρακυκλινών. Ακόμη, αυτές οι αντιμικροβιακές ουσίες έχουν συχνή χρήση σε κτηνιατρικά φάρμακα λόγω του χαμηλού τους κόστους και του ευρέως φάσματος δράσης τους. Χάρη στην σύνδεση της με την 30S ριβοσωμική υπομονάδα, παρεμποδίζεται η σύνθεση των πρωτεϊνών. Η είσοδος των τετρακυκλινών στους μικροοργανισμούς γίνεται κυρίως με διάχυση. Οι τετρακυκλίνες είναι αποτελεσματικές επειδή είναι βακτηριοστατικές και ανταποκρίνονται στο αμυντικό σύστημα του ξενιστή. Οι τετρακυκλίνες έχουν βακτηριοκτόνο δράση σε πολύ υψηλές συγκεντρώσεις κι αυτό επειδή χάνουν την λειτουργική ακεραιότητα της κυτταροπλασματικής μεμβράνης.

### 3.4.4 ΑΜΙΝΟΓΛΥΚΟΣΙΔΕΣ (ΣΤΡΕΠΤΟΜΥΚΙΝΗ)

Η ομάδα αυτή περιλαμβάνει αντιμικροβιακούς παράγοντες με παρόμοια χαρακτηριστικά αντιμικροβιακά και φαρμακοκινητικά, που η χημική τους σύσταση αποτελείται από αμινοσάκχαρα συνδεδεμένα μεταξύ τους με γλυκοζιτικό δεσμό. Συνήθως χορηγούνται παρεντερικά και κυρίως ενδομυϊκά διότι η απορρόφηση τους από το έντερο είναι ελάχιστη. Οι αμινογλυκοσίδες διακρίνονται σε περιορισμένου και σε ευρέους φάσματος. Οι αμινογλυκοσίδες δρουν κατά των αερόβιων Gram αρνητικών βακτηρίων ενώ

αντίθετα η δράση τους κατά των Gram θετικών βακτηρίων είναι αισθητά περιορισμένη, όπως και η δράση τους κατά των αναερόβιων βακτηρίων και των προαιρετικά αερόβιων βακτηρίων υπό αναερόβιες συνθήκες που κρίνονται έως και αδρανείς. Για παράδειγμα η στρεπτομυκίνη και η διυδροστρεπτομυκίνη που πλέον δεν διατίθενται στις ΗΠΑ, δρουν έναντι των σταφυλόκοκκων και σε ένα σύνολο Gram αρνητικών βάκιλων, συμπεριλαμβανομένων των : *Salmonella* spp, *Escherichia coli*, *Pasteurella* spp, *Campylobacter fetus*, *Leptospira* spp, *Actinomyces*, *Mycobacterium tuberculosis* και *Brucella* spp. Η στρεπτομυκίνη λόγω της μικροβιακής αντίστασης που έχει αναπτυχθεί, χρησιμοποιείται μόνο για τη θεραπεία της λεπτοσπείρωσης, και πιο σπάνια χρησιμοποιείται στα ζώα για διάφορες άλλες λοιμώξεις.

ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΕΝΟΥ ΦΑΣΜΑΤΟΣ	ΕΥΡΕΩΣ ΦΑΣΜΑΤΟΣ
Δραστικές έναντι Gram αρνητικών βακτηρίων	Δραστικές έναντι Gram θετικών και Gram αρνητικών βακτηρίων
<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Streptomycin (Στρεπτομυκίνη)</b></li> <li>• <b>Dihydrostreptomycin (Διυδροστρεπτομυκίνη)</b></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Spectinomycin (Σπεκτινομυκίνη)</li> <li>• Neomycin (Νεομυκίνη)</li> <li>• Kanamycin (Καναμυκίνη)</li> </ul>

**Πίνακας 3.4 :** Παραδείγματα στρεπτομυκινών

Οι αμινογλυκοσίδες αναστέλλουν την πρωτεϊνοσύνθεση από τα ριβοσώματα αφού πρώτα εισχωρήσουν στο βακτηριακό κύτταρο και συνδεθούν με την ριβοσωμική μεμβράνη. Οι αμινογλυκοσίδες δρουν εντός του βακτηριακού κυττάρου και είναι βακτηριοκτόνα και αντιμικροβιακά. Ο τρόπος που περνούν στη κυτταρική μεμβράνη γίνεται μόνο με ενεργό μεταφορά διότι η διείσδυση στο βακτηριακό κύτταρο με διάχυση είναι αδύνατη λόγω της φτωχής διεισδυτικής ικανότητας τους. Για την ενεργό μεταφορά όμως απαιτείται κατανάλωση ενέργειας. Τα περισσότερα αναερόβια βακτήρια είναι ανθεκτικά στη δράση των αμινογλυκοσίδων, γιατί όταν υπάρχει χαμηλή συγκέντρωση οξυγόνου δεν είναι δυνατή η μεταφορά τους στο βακτηριακό κύτταρο. Άλλοι παράγοντες που επηρεάζουν τη μεταφορά τους μέσω της κυτταρικής μεμβράνης είναι το pH, η οσμωτική πίεση και η ύπαρξη κατιόντων ασβεστίου και μαγνησίου. Όσον αφορά τη μικροβιακή αντοχή στη στρεπτομυκίνη, είναι σχετικά εύκολο να αναπτυχθεί και σε σχετικά υψηλή συχνότητα από τα ευαίσθητα βακτήρια σε αυτήν. Ο συνδυασμός στρεπτομυκίνης και πενικιλίνης μειώνει σημαντικά την πιθανότητα ανάπτυξης ανθεκτικών στελεχών. Σε αντίθεση με τη στρεπτομυκίνη, η εμφάνιση ανθεκτικών στελεχών σε άλλες αμινογλυκοσίδες είναι σπάνια.

### 3.4.5 ΣΟΥΛΦΟΝΑΜΙΔΕΣ

Το 1935 ανακαλύφθηκαν οι αντιμικροβιακές ιδιότητες των σουλφοναμιδών μέσω της εξέτασης μεγάλου αριθμού χρωστικών ουσιών, που περιείχαν την σουλφοναμιδική ομάδα ( $\text{SO}_2\text{NH}_2$ ). Αποδείχθηκαν ιδιαίτερα αποτελεσματικές ενάντια σε ένα ευρύ φάσμα βακτηρίων Gram τόσο θετικών όσο και αρνητικών. Η απλούστερη σουλφοναμίδη, αποτέλεσε τη βασική ρίζα από την οποία ξεκίνησε η σύνθεση χιλιάδων συνθετικών παραγώγων μεταξύ των οποίων λιγότερες από 80 χρησιμοποιούνται επιτυχημένα στην κτηνιατρική. Είναι διαλυτές σε αλκαλικό και όχι σε όξινο περιβάλλον και συμπεριφέρονται όπως τα ασθενή οργανικά οξέα.

Αν και οι σουλφοναμίδες έχουν το ίδιο αντιμικροβιακό φάσμα διαφέρουν μεταξύ τους ως προς ορισμένες φαρμακοκινητικές ιδιότητες που καθιέρωσαν και τη βάση για τη κατάταξη των απορροφήσιμων από το έντερο σουλφοναμιδών σε βραχείας και σε παρατεταμένης δράσης, ανάλογα με το χρόνο που απαιτείται από τη στιγμή της χορήγησης τους ως την πτώση του επιπέδους τους στο αίμα κατά το ήμισυ, δηλαδή ως προς την ημιπερίοδο αποβολής. Ως προς τον βαθμό απορρόφησης τους από το έντερο διακρίνονται σε σουλφοναμίδες διασυστημικής δράσης, οι οποίες χορηγούνται σε γενικές λοιμώξεις και σε σουλφοναμίδες που χορηγούνται σε λοιμώξεις του γαστρεντερικού και επίσης για τοπική χρήση.

Οι σουλφοναμίδες δεν είναι βακτηριοκτόνες αλλά βακτηριοστατικές, για αυτό είναι αποτελεσματικότερες όταν χορηγούνται στη φάση όπου τα παθογόνα βακτήρια πολλαπλασιάζονται, δηλαδή στην οξεία φάση της λοίμωξης. Το θεραπευτικό αποτέλεσμα δεν εμφανίζεται αμέσως από τη στιγμή της χορήγησης τους αλλά απαιτείται κάποιο χρονικό διάστημα (λανθάνουσα περίοδος).

Η έναρξη της σουλφοναμιδικής θεραπείας πρέπει να γίνεται σε υψηλές δόσεις ώστε να εξασφαλίζεται η υψηλή συγκέντρωση τους στο αίμα και στους ιστούς του σώματος. Με αυτόν τον τρόπο η βακτηριοστατική δράση των σουλφοναμιδών είναι πλήρης όταν βρίσκονται σε υψηλή συγκέντρωση στα υγρά του σώματος. Αντίθετα η χρήση χαμηλών δόσεων σουλφοναμιδών διευκολύνει την εμφάνιση ανθεκτικών στελεχών και δεν εξασφαλίζεται θεραπεία. Συμπεραίνουμε λοιπόν ότι η μικροβιακή θεραπεία με σουλφοναμίδες πρέπει να αρχίζει όσο το δυνατόν νωρίτερα και με σχετικά υψηλή δόση από την αρχή. Επίσης με την χορήγηση συνδυασμού διαφόρων σουλφοναμιδών μειώνεται σημαντικά η πιθανότητα εμφάνισης αντοχής.

### 3.4.6 ΜΑΚΡΟΛΙΔΙΑ – MACROLIDES

Μια μεγάλη κατηγορία αντιβιοτικών είναι τα μακρολίδια που είναι μεταβολικά προϊόντα του *Streptomyces* spp. Η τυλοσίνη π.χ. είναι ένα μακρολίδιο που έχει απομονωθεί από το *Streptomyces fradiae*. Τα μακρολίδια είναι τοξικά για τα φυτοφάγα ζώα για αυτό η χρήση τους είναι περιορισμένη.

Η ευπάθεια των μικροοργανισμών φαίνεται στα αερόβια βακτήρια όπως *Bacillus* spp, *Corynebacterium* spp, *Listeria* spp, *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *Staphylococci* και *Streptococci* που είναι Gram θετικά. Μεταξύ των Gram αρνητικών αερόβιων βακτηρίων είναι τα *Campylobacter* spp, *Actinobacillus* spp, τα *Brucella* spp και τα *Leptospira* spp. Αναερόβια είναι τα εξής βακτήρια: *Actinomyces* spp, *Clostridium* spp και *Bacteroides* spp.

Άλλα μακρολίδια όπως λινκοσαμίδες και η ερυθρομυκίνη δεσμεύουν τις υπομονάδες του 50S ριβοσώματος και αναστέλλουν την πρωτεϊνική σύνθεση και εν συνεχεία το στάδιο της μετατόπισης, ενώ σε μεγάλες συγκεντρώσεις έχουν βακτηριοκτόνο δράση. Η ερυθρομυκίνη και η τυλοσίνη έχουν το ίδιο φάσμα δράσης αλλά σε μεγάλη ποικιλία μυκοπλασμάτων η τυλοσίνη είναι πιο δραστική.

## 3.5 ΛΟΓΟΙ ΧΡΗΣΗΣ ΤΩΝ ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΩΝ ΦΑΡΜΑΚΩΝ ΣΤΑ ΠΑΡΑΓΩΓΙΚΑ ΖΩΑ

Τα αντιμικροβιακά φάρμακα στα παραγωγικά ζώα χρησιμοποιούνται για :

- Θεραπεία
- Μεταφύλαξη
- Προφύλαξη - Πρόληψη
- Αυξητική δράση

### 3.5.1 Θεραπεία

Ο ορισμός της θεραπείας είναι η χρήση αντιμικροβιακών φαρμάκων σε ζώα (ατομική θεραπεία) ή μια ομάδα ζώων με κλινική νόσο (δηλαδή, με προφανή βακτηριακή λοίμωξη) (ομαδική θεραπεία). Ο σκοπός της θεραπείας είναι να περιοριστεί η εξέλιξη της νόσου των ασθενών ζώων, επειδή η ασθένεια μπορεί να οδηγήσει σε μειωμένη απόδοση των ζώων. Η μέθοδος χορήγησης αντιμικροβιακών φαρμάκων για λόγους θεραπείας εξαρτάται από τον αριθμό των ζώων και την εκτροφή. Η ατομική θεραπεία εφαρμόζεται κυρίως στα οικόσιτα ζώα, ενώ στα ζώα παραγωγής βρίσκεται εφαρμογή σε αγελάδες γαλακτοπαραγωγής, μοσχάρια, χοίρους, ενήλικα πρόβατα και αίγες (Schwarz et al., 2001, McEwen and Fedorka-Cray, 2002). Η ατομική θεραπεία σε ζώα μπορεί να συγκριθεί με τη χρήση αντιβακτηριδιακών παραγόντων στην ανθρώπινη ιατρική και βασίζεται στις ακόλουθες καταστάσεις:

1. Στην κλινική εξέταση οποιουδήποτε άρρωστου ζώου,

2. στις εργαστηριακές δοκιμές για τον προσδιορισμό παθογόνων και στον έλεγχο της ευαισθησίας του στους αντιβακτηριδιακούς παράγοντες
3. στους χορηγούμενους μόνο από του στόματος αντιβακτηριδιακούς παράγοντες ή ενέσεις σε ζώα που παρουσιάζουν συμπτώματα κάποιας ασθένειας.
4. στην επιλογή ενός κατάλληλου σχήματος δοσολογίας ανάλογα με τα είδη των ζώων και το στάδιο της νόσου

Στην πράξη, η ατομική θεραπεία δεν μπορεί συνήθως να εφαρμοστεί σε ζώα που εκτρέφονται σε ομάδες, όπως είναι τα κοτόπουλα ή οι απογαλακτισμένοι χοίροι. Σε αυτές τις περιπτώσεις, είναι καλύτερο να χρησιμοποιείται ομαδική θεραπεία και έτσι τα αντιβακτηριδιακά φάρμακα χορηγούνται μέσω της τροφής ή του νερού. Τόσο στην περίπτωση της ατομικής όσο και της ομαδικής, το παθογόνο βακτήριο πρέπει να ταυτοποιείται με βάση τη δοκιμή ευαισθησίας του φαρμάκου και να επιλέγεται ο κατάλληλος αντιβακτηριδιακός παράγοντας. Ανεξάρτητα από το πόσο εύκολο είναι να χρησιμοποιούνται για θεραπεία αντιβακτηριδιακές ουσίες μέσω της τροφής ή νερού, υπάρχουν σοβαρά προβλήματα. Περισσότερο αξιοσημείωτα από αυτά είναι :

1. η ανομοιόμορφη μίξη της αντιμικροβιακής ουσίας με την τροφή,
2. η αδυναμία πλήρους διαλυτότητας της ουσίας στο νερό και
3. η αλληλεπίδραση της με κάποιο από τα συστατικά του νερού ή της τροφής.

Επίσης, ένα ακόμη πρόβλημα που παρουσιάζεται στην ομαδική θεραπεία, είναι η αδυναμία ολοκληρωμένης πρόσληψης του φαρμάκου από τα ζώα, λόγω της μειωμένης κατανάλωσης τροφής και νερού από τα ζώα που νοσούν. Παρά το γεγονός αυτό, η ομαδική θεραπεία μέσω τροφής και νερού είναι ο μοναδικός τρόπος για να χορηγηθούν φάρμακα στα παραγωγικά ζώα και για να είναι αποτελεσματική η θεραπεία πρέπει να γίνεται με ενδεδειγμένη μέθοδο.

### 3.5.2 Μεταφύλαξη

Η έννοια μεταφύλαξη, χρησιμοποιείται για να περιγράψει την χρήση αντιβακτηριδιακών ουσιών σε μια ομάδα ζώων σε χρόνο κατά τον οποίο κάποια από αυτά, εκδηλώνουν συμπτώματα της ασθένειας, αλλά στη πορεία αναμένεται η εκδήλωση συμπτωμάτων και σε άλλα ζώα της ομάδας. Η μεταφύλαξη λοιπόν, είναι ζωτικής σημασίας για την αποφυγή της μετάδοσης της ασθένειας από τα νοσούντα ζώα στα υγιή. Μειονέκτημα της μεταφύλαξης ως ομαδική θεραπεία, αποτελεί η χορήγηση φαρμάκων στα ζώα τα οποία δεν τα χρειάζονται. Από την άλλη, η χορήγηση φαρμάκων μόνο σε ασθενή ζώα, μειονεκτεί στο ότι τα ζώα στα οποία χορηγούνται βρίσκονται σε προχωρημένο στάδιο της ασθένειας. Οι προσπάθειες περιορισμού της μεταφύλαξης σε ζώα που ενδέχεται να επωφεληθούν από τη θεραπεία με χρήση της θερμοκρασίας του σώματος ως ένδειξη της κλινικής κατάστασης, έχουν αποτύχει. (Guthrie, et al., 1997). Για το λόγο αυτό, αναζητούνται πιο συγκεκριμένες μέθοδοι για την αξιολόγηση της κατάστασης της νόσου, προκειμένου να βελτιωθεί η βάση για την επιλογή της κατάλληλης θεραπείας. Στο τέλος, σύμφωνα με την Αμερικανική Κτηνιατρική Ιατρική Ένωση (American Veterinary Medical Association, AVMA) η μεταφύλαξη συνήθως περιλαμβάνει τη χορήγηση φαρμάκων σε δόσεις για σύντομο χρονικό διάστημα.

### 3.5.3 Προφύλαξη-Πρόληψη

Η προφύλαξη- πρόληψη, αποτελεί την χορήγηση αντιμικροβιακών ουσιών σε ζώα που δεν νοσούν αλλά έχουν εκτεθεί σε κίνδυνο χωρίς όμως να έχουν εκδηλωθεί συμπτώματα και να έχει προσδιοριστεί η αιτία (Phillips, et al., 2004). Αυτό σημαίνει ότι η προφυλακτική θεραπεία, εφαρμόζεται σε συγκεκριμένες χρονικές περιόδους πολύ σημαντικές για την διασφάλιση της υγείας των ζώων, περιόδους δηλαδή που υπάρχει αυξημένη καταπόνηση με τον κίνδυνο της εκδήλωσης λοιμωδών νοσημάτων. Η προφυλακτική χρήση των αντιμικροβιακών ουσιών, μπορεί να γίνει και ατομικά αλλά και ομαδικά και είναι απολύτως εγκεκριμένη από την κτηνιατρική κλινική πρακτική. Ειδικότερα :

1. στις αγελάδες που χρησιμοποιούνται στην παραγωγή γάλακτος, η χορήγηση αντιμικροβιακών ουσιών από τον μαστό, σε επίπεδα που επιφέρουν θεραπεία κατά την λήξη της γαλακτικής περιόδου, μπορεί να φέρει την πρόληψη εμφάνισης μαστίτιδας κατά την επόμενη γαλακτική περίοδο. Αυτό είναι αποτέλεσμα της υψηλής συγκέντρωσης αντιμικροβιακών παραγόντων κατά την διάρκεια της ξηράς περιόδου
2. στην εκτροφή μόσχων και χοίρων, η χορήγηση αντιμικροβιακών ουσιών με σκοπό την πρόληψη, γίνεται κατά την περίοδο του απογαλακτισμού καθώς επίσης κατά την ανάμιξη ζώων διαφορετικών ομάδων, με σκοπό να γίνει έλεγχος της εκδήλωσης ασθενειών του αναπνευστικού και πεπτικού συστήματος. Το αποτέλεσμα της αποφυγής προληπτικής χορήγησης αντιμικροβιακών ουσιών θα ήταν η εκδήλωση σε αυξημένο ποσοστό κλινικών λοιμώξεων με αρνητική επίδραση στην ευζωία, η ανάγκη για αυξημένες ποσότητες αντιμικροβιακών ουσιών με σκοπό την θεραπεία-μεταφύλαξη, ενώ ταυτόχρονα η μείωση της παραγωγικότητας των ζώων.

Έτσι, η προληπτική θεραπεία κατά περιόδους εκτροφής των ζώων τα οποία καταπονούνται έντονα και άρα είναι αυξημένος ο κίνδυνος εκδήλωσης λοιμώξεων-ειδικά στην περίπτωση της εκτροφής μόσχων και χοίρων-, δεν μπορεί να αποφευχθεί (Schwarz, et al., 2001). Ωστόσο, η χορήγηση αντιμικροβιακών ουσιών με σκοπό την πρόληψη, θεωρείται από πληθώρα ερευνητών σαν το υπόστρωμα για την ανάπτυξη βακτηρίων που εμφανίζουν ανθεκτικότητα στις αντιμικροβιακές ουσίες, λειτουργεί δηλαδή ως παράγοντας άσκησης «πίεσης επιλογής» (selective pressure). Μεγαλύτερος παράγοντας πίεσης επιλογής για τα βακτήρια, θεωρήθηκε όμως και η χρήση των αντιμικροβιακών ουσιών ως αυξητικών παραγόντων.

### 3.5.4 Αυξητικοί παράγοντες

Αν και η χρήση των αντιμικροβιακών ουσιών ως αυξητικοί παράγοντες είναι απαγορευμένη στην Ευρωπαϊκή Ένωση (Ε.Ε), είναι απαραίτητη η αναφορά ορισμένων δεδομένων για την δράση τους. Η ικανότητα των αντιμικροβιακών ουσιών να επιταχύνουν την ανάπτυξη των ζώων, ανακαλύφθηκε το 1940 όταν διαπιστώθηκε ότι κοτόπουλα που καταλάωναν τροφή εμπλουτισμένη με τετρακυκλίνες, εμφάνιζαν επιταχυνόμενη ανάπτυξη σε σχέση με τα κοτόπουλα που καταλάωναν απλή τροφή. Στην πορεία ,μετά από σχετικές έρευνες έχουν ανακαλυφθεί πολλές αντιμικροβιακές ουσίες οι οποίες βελτιώνουν την μέση ημερήσια αύξηση βάρους καθώς και την μετατρεψιμότητα της τροφής σε πολλά ζωικά είδη

(Gaskins, et al., 2002). Για αυτόν τον σκοπό, γίνεται χρήση των αντιμικροβιακών ουσιών ως προσθετικά στην τροφή σε υπό-θεραπευτικές δόσεις που έχουν εύρος από 2,5 έως και 125mg/kg (ppm) (Lawrence,1998). Στις Η.Π.Α, αυτού του είδους η χορήγηση των αντιμικροβιακών ουσιών, δηλαδή η χρήση για βελτιωμένη ανάπτυξη των ζώων και μετατρεψιμότητα της τροφής, σημαίνει ενίσχυση της τροφής με συγκέντρωση μικρότερη από 200 g/τόνο για περισσότερο από δύο εβδομάδες.

Στην πραγματικότητα, με προληπτική έννοια, μπορεί να λειτουργήσει ταυτόχρονα η χρήση αντιβακτηριδιακών φαρμάκων ως αυξητικών παραγόντων, γι 'αυτό ορισμένα αντιβακτηριδιακά φάρμακα στη Βόρεια Αμερική εγκρίνονται και για τους δύο λόγους, δηλαδή την πρόληψη και την ανάπτυξη. Γι 'αυτό οι Mellon et al. (2001) χρησιμοποίησαν τον όρο "μη θεραπευτική χρήση" των αντιβακτηριδιακών φαρμάκων, ο οποίος περιλαμβάνει την ανάπτυξη και προφυλακτική χρήση κατά των νοσημάτων των ζώων.

Γεγονός αποτελεί ότι η διαφορά μεταξύ πρόληψης και ανάπτυξης δεν είναι τόσο σαφής όσο η διαφορά μεταξύ πρόληψης και θεραπείας. Η Ευρωπαϊκή Ένωση, υιοθετώντας την «Αρχή της πρόβλεψης κινδύνου ή της πρόληψης», δηλώνει ότι η αντιμικροβιακή αντίσταση είναι πιο σημαντική για τη Δημόσια υγεία από τη χρήση τους για την ανάπτυξη των ζώων. Στηριζόμενη σε αυτή την αρχή, απαγόρευσε ορισμένα αντιμικροβιακά φάρμακα που η χρήση τους ήταν ως αυξητικοί παράγοντες. Τον Ιανουάριο του 1999 έγινε απαγόρευση κάποιων αντιμικροβιακών τα οποία ήταν η τυλοσίνη και η σπιραμυκίνη (μακρολίδια), η βακιτρακίνη (πολυπεπτίδιο) και οι carbadox και olaquinox (κινόξαλίνες). Ακολούθησε όμως, εξ ολοκλήρου απαγόρευση της χρήσης αντιβακτηριδιακών ουσιών με σκοπό την ανάπτυξη των ζώων σύμφωνα με τον Κανονισμό 1831/2003 του Ε.Κ. για τις πρόσθετες ύλες που χρησιμοποιούνται στην διατροφή των ζώων. Πιο συγκεκριμένα, στο άρθρο 11 σημείο 2 γίνεται αναφορά : «κατά παρέκκλιση του άρθρου 10 και με την επιφύλαξη του άρθρου 13 τα αντιβιοτικά εκτός των κοκκιδιοστατικών , μπορούν να διατίθενται στην αγορά και να χρησιμοποιούνται ως πρόσθετες ύλες ζωοτροφών μόνο μέχρι τις 31/12/2005. Από 1/1/2006 αυτές οι ουσίες διαγράφονται από το μητρώο». Αντιθέτως, οι Η.Π.Α όπως και ορισμένες χώρες εκτός Ευρώπης, ακολουθούν την «αρχή της απόδειξης», δηλαδή ότι δεν υπάρχουν στοιχεία που αποδεικνύουν ότι η ανθεκτικότητα που παρουσιάζουν τα μικρόβια είναι αποτέλεσμα της χρήσης των αντιμικροβιακών ουσιών ως αυξητικοί παράγοντες.

Επομένως, στηριζόμενοι σε αυτή την αρχή, δεν απαιτείται κάποια ενέργεια και όσες ενέργειες έχουν λάβει χώρα έως σήμερα είναι αβάσιμες (Turnidge,2004). Λόγω αυτού, οι Η.Π.Α. καθώς και άλλες χώρες συνεχίζουν μέχρι και σήμερα να προσθέτουν αντιμικροβιακά φάρμακα στις τροφές των ζώων με σκοπό την βέλτιστη ανάπτυξη τους.



Τρόπος χρήσης αντιμικροβιακών	Σκοπός χρήσης	Οδός χορήγησης	Χορήγηση μεμονωμένα ή σε ομάδες	Ασθενή ζώα
<b>Θεραπευτικά</b>	Θεραπεία	Ενέσιμα, τροφή, νερό	μεμονωμένα ή ομαδικά	Μεμονωμένα ασθενή , ομάδες με ζώα μη ασθενή ή με υποκλινική λοίμωξη
<b>Μεταφυλακτικά</b>	Προφύλαξη από ασθένεια, θεραπεία	Ενέσιμα (παχυνόμενα μοσχάρια), τροφή, νερό	ομάδα	ορισμένα ασθενή
<b>Προφυλακτικά</b>	Πρόληψη ασθένειας	Τροφή	ομάδα	κανένα εμφανώς ασθενές, ορισμένα ίσως υποκλινική λοίμωξη
<b>Υποθεραπευτικά</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Αύξηση ανάπτυξης</li> <li>• Βελτίωση μετατρεψιμότητας τροφής</li> <li>• Πρόληψη ασθένειας</li> </ul>	Τροφή	ομάδα	κανένα ασθενές

**Πίνακας 3.5 :** Τρόπος χρήσης αντιμικροβιακών φαρμάκων στα παραγωγικά ζώα (McEwen & Fedorka-Cray, 2002)

### 3.6 ΤΟ ΦΑΙΝΟΜΕΝΟ ΤΗΣ ΚΑΤΑΧΡΗΣΗΣ

Η υπερβολική χρήση των αντιβιοτικών (φαινόμενο της κατάχρησης) στην κτηνοτροφία επιφέρει αρνητικές και πολύ σημαντικές επιπτώσεις οι οποίες περιγράφονται σύντομα παρακάτω :

1. **Η αύξηση της αντοχής των παθογόνων οι οποίοι είναι υπεύθυνοι για ασθένειες του ανθρώπου και των ζώων και τα τροφιμογενή νοσήματα.** Χαρακτηριστική είναι η αύξουσα πορεία της αντοχής των καμπυλοβακτηριδίων στην ερυθρομυκίνη και τις κινολόνες, η εμφάνιση και η κλωνική διασπορά στελεχών *Salmonella typhimurium* με αντοχή σε οκτώ αντιβακτηριδιακές ουσίες, η αύξηση της παρουσίας των εντεροτοξινογόνων στελεχών της *Escherichia coli* με χαρακτηριστικό παράδειγμα την επιδημία της Γερμανίας το 2013, η ξαφνική εμφάνιση επιδημιών προέλευση των οποίων είναι στελέχη εντερόκοκκων που εμφανίζουν αντοχή στην βανκομυκίνη, αλλά και η αύξουσα πορεία των επιδημιών σε νοσοκομεία που προέρχονται από τον ανθεκτικό στην μεθικιλίνη *Staphylococcus aureus*. Πρόσφατη είναι και η απόδειξη ότι το μόνο όπλο που απέμεινε στους γιατρούς για την εξουδετέρωση των λοιμώξεων που παρουσιάζονται στις Μονάδες Εντατικής Θεραπείας (Μ.Ε.Θ.) που είναι η κολιστίνη, καταπολεμάται από βακτήρια που ανήκουν στο γένος της *Escherichia coli* με επίκτητα χαρακτηριστικά. Συμπέρασμα είναι ότι την ευθύνη για την κατάσταση αυτή, φέρει η υπερβολική χρήση αντιβιοτικών στην κτηνοτροφία.
2. **Η αύξηση αντοχής των συμβιωτικών μικροοργανισμών.** Οι μηχανισμοί με τους οποίους αυξάνεται η αντοχή, έχουν εντοπιστεί, καθώς η αντοχή πραγματοποιείται με τα πλασμίδια ή άλλα γενετικά στοιχεία τα οποία μεταβιβάζονται εξαιρετικά απλά, ή ακόμη και με μεταλλάξεις στα χρωμοσώματα. Έχει ανακαλυφθεί ότι, στον εντερικό σωλήνα των θηλαστικών συμβιώνουν 10<sup>10</sup> αερόβιοι και άλλοι τόσοι αναερόβιοι μικροοργανισμοί σε κάθε ml περιεχομένου. Η αντοχή είναι κάτι που εκτός από τα παθογόνα βακτήρια, παρουσιάζεται και στα μη παθογόνα, με την αμοιβαία μεταφορά γενετικού υλικού. Έτσι, σε τέτοιο αριθμό βακτηρίων, το φαινόμενο της μεταβίβασης αντοχής είναι εξαιρετικά εύκολο και πολύ συχνό φαινόμενο. Είναι εκτός ελέγχου η ανάπτυξη αντοχής στους συμβιωτικούς μικροοργανισμούς, και η είσοδος των βακτηρίων αυτών στο περιβάλλον και την τροφική αλυσίδα. Η εξολοκλήρου μόλυνση της τροφικής αλυσίδας αλλά ιδιαίτερα των ζωικών τροφίμων με τα συμβιωτικά βακτήρια, αποτελούν τα βασικότερα μέσα μεταβίβασης της ανθεκτικότητας και των γονιδίων που είναι υπεύθυνα για την αντοχή τους, από τα ζώα στον άνθρωπο.

Είναι λοιπόν σημαντικό να αποφεύγεται η υπερβολική χρήση, αντιβιοτικών που είναι εξαιρετικής σημασίας για την υγεία και την ευζωία του ανθρώπου, όπως για παράδειγμα οι κεφαλοσπορίνες 3<sup>ης</sup> και 4<sup>ης</sup> γενιάς, οι οποίες χρησιμοποιούνται αποκλειστικά για νοσοκομειακές λοιμώξεις από gram- βακτήρια αλλά και στην περίπτωση που αποτυγχάνει μια θεραπεία με άλλες β-λακτάμες, λαμβάνοντας υπόψη ότι είναι μεγάλη η πιθανότητα σχηματισμού ανθεκτικών στελεχών που έχουν την δυνατότητα να μεταφερθούν από τα ζώα στον άνθρωπο. Δεν είναι δυνατή η αντιμετώπιση των ανθεκτικών αυτών στελεχών με τα παραπάνω αντιμικροβιακά, και έτσι μειώνονται τα όπλα που είναι διαθέσιμα για την προστασία της Δημόσιας Υγείας.

### 3.7 ΥΠΟΛΕΙΜΜΑΤΑ ΚΤΗΝΙΑΤΡΙΚΩΝ ΦΑΡΜΑΚΩΝ ΣΤΑ ΚΤΗΝΟΤΡΟΦΙΚΑ ΠΡΟΙΟΝΤΑ

Τα κτηνιατρικά φάρμακα και ειδικότερα τα αντιβιοτικά, χρησιμοποιούνται γενικά για τη θεραπεία διαφόρων ζωικών ασθενειών, συμπεριλαμβανομένης της μαστίτιδας. Ανάλογα με τον τύπο και τη μέθοδο χορήγησης ενός αντιβιοτικού, ένα μέρος του εκκρίνεται στο γάλα. Η έκκριση του αντιβιοτικού στο γάλα συνεχίζεται για μια περίοδο (τουλάχιστον 4-6 ημέρες) μετά την τελευταία δόση. Τα αντιβιοτικά έχουν την ιδιότητα να μην καταστρέφονται από τη συνήθη θερμική επεξεργασία που πραγματοποιείται στο γάλα ενώ αντίθετα οι φυσιολογικές υπάρχουσες αντιμικροβιακές ουσίες καταστρέφονται.

Η έκκριση αντιβιοτικών στο γάλα αποτελεί σημαντικό πρόβλημα της Δημόσιας υγείας. Αν και είναι δύσκολο να αποδοθούν οι κίνδυνοι για τη Δημόσια υγεία, αναγνωρίζεται ότι τα κατάλοιπα αντιβιοτικών μπορεί να είναι η αιτία εμφάνισης αλλεργιών σε ευαίσθητες ομάδες και να έχουν αρνητική επίπτωση στον σχηματισμό της φυσιολογικής μικροχλωρίδας του ανθρώπου. Σε γενικές γραμμές, η κατάχρηση των αντιβιοτικών έχει ως αποτέλεσμα την ανάπτυξη ανθεκτικών στα φάρμακα ζώων και στην παθογένεια του ανθρώπου, όπως αναφέρεται από τον Alanis (2005). Επίσης, το μολυσμένο γάλα, ακόμη και με ελάχιστα κατάλοιπα αντιβιοτικών, καθιστά δύσκολη την παραγωγή ζυμωμένων γαλακτοκομικών προϊόντων λόγω του ότι οι ουσίες αυτές εμποδίζουν την ανάπτυξη των καλλιιεργειών που χρησιμοποιούνται για την ζύμωση.

Έχει οριστεί ένα μέγιστο όριο υπολειμμάτων (maximum residue limit, MRL) για τα αντιβιοτικά, και έχουν συμπεριληφθεί στον κανονισμό **N°2377/90** του Ευρωπαϊκού Συμβουλίου. Ο σκοπός του ορίου αυτού είναι να καθοριστεί ο χρόνος απόσυρσης, ο οποίος θα δίνει το χρονικό περιθώριο να μειωθεί η ποσότητα του αντιβιοτικού στα εγκεκριμένα επίπεδα, πριν δοθούν τα προϊόντα προς κατανάλωση. Οι ποσότητες που είναι μικρότερες από το MRL, θεωρείται ότι δεν έχουν αρνητικές επιπτώσεις για την υγεία του καταναλωτή. Τα ανώτατα αυτά όρια παρουσιάζουν διαφορές που εξαρτώνται από τον ιστό (συκώτι, νεφρό, δέρμα, μυς, γάλα, λίπος) αλλά και τα ζωικά είδη. Στην περίπτωση που τα όρια αυτά ξεπερνιούνται σημαίνει ότι δεν παρατηρήθηκε ο χρόνος απόσυρσης ή χρησιμοποιήθηκε παραπάνω δόση από αυτήν που χρειαζόταν. Υπάρχουν κυρώσεις δικαστικές αλλά και οικονομικές για τον υπεύθυνο παραγωγό, σε περίπτωση που γίνει έλεγχος ο οποίος θα δείξει αυξημένα υπολείμματα (παραπάνω από το MRL).

### 3.8 ΝΟΜΟΘΕΣΙΑ ΠΟΥ ΣΧΕΤΙΖΕΤΑΙ ΜΕ ΤΗΝ ΕΜΠΟΡΙΚΗ ΔΙΑΘΕΣΗ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΖΩΙΚΗΣ ΠΡΟΕΛΕΥΣΗΣ

Γίνονται προσπάθειες για να περιοριστεί όσο το δυνατόν περισσότερο το πρόβλημα με τα κατάλοιπα κτηνιατρικών φαρμάκων, τα οποία μπορεί να έχουν πολύ αρνητικές επιπτώσεις για τον άνθρωπο. Έχουν καθοριστεί κάποια όρια για τις χημικές προσμίξεις που υπάρχουν στα τρόφιμα, ώστε αυτά να μην είναι επιβλαβή.

Η μέθοδος αξιολόγησης της ασφάλειας των χημικών προσμίξεων που υπάρχουν στα τρόφιμα που διατίθενται για ανθρώπινη κατανάλωση, είναι μέσω του καθορισμού της **Ημερήσιας Επιτρεπόμενης Δόσης (ΗΕΔ)** για κάθε χημική ουσία, η οποία εκφράζεται σε **mg/άτομο/ημέρα** (σημείο αναφοράς του βάρους του ατόμου 60 kg). Ως **ΗΕΔ** ορίζεται η μέγιστη ημερήσια ποσότητα της εκάστοτε χημικής ουσίας που μπορεί να καταναλωθεί από τον άνθρωπο χωρίς να του δημιουργήσει πρόβλημα. Έτσι προκύπτει το **Ανώτατο Όριο Καταλοίπου (ΑΟΚ)** στα τρόφιμα (Maximum Residue Limit, MRL) το οποίο εκφράζεται σε **mg/kg** τροφίμου. Στις Η.Π.Α, οι συγκεντρώσεις υπολειμμάτων που δεν αποτελούν κίνδυνο για την Δημόσια Υγεία, θεσπίζονται 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 νωπού προϊόντος.

Έχουν θεσπιστεί με τα χρόνια, ορισμένοι κανονισμοί οι οποίοι εξασφαλίζουν την ασφαλή εμπορική διάθεση των προϊόντων ζωικής προέλευσης, έτσι ώστε να προστατεύεται όσο το δυνατόν περισσότερο η Δημόσια Υγεία καθώς και να περιοριστεί το σοβαρό πρόβλημα της μικροβιακής αντοχής. Οι κανονισμοί αυτοί παρουσιάζονται παρακάτω.

- **Κανονισμός 2377/90** : Αναφέρεται στον καθορισμό των MRL κτηνιατρικών καταλοίπων στα τρόφιμα ζωικής προέλευσης. Ο κανονισμός θεσπίστηκε τόσο για την διασφάλιση της υγείας των καταναλωτών, όσο και για την διευκόλυνση της διάθεσης τροφίμων ζωικής προέλευσης στην Ε.Ε. (Κανονισμός (ΕΟΚ) **2377/90**, Επίσημη Εφημερίδα της Ε.Ε).
- **Κανονισμός (ΕΟΚ) αριθ. 315/93** : καθορίζει την θέσπιση κοινοτικών διαδικασιών για τις προσμίξεις των τροφίμων (ΕΕ L 37 της 13.2.1993, σ. 1-3).
- **Κανονισμός 1831/2003 του Ε.Κ. και συμβουλίου** : Σύμφωνα με αυτόν, ο οποίος αφορά τα πρόσθετα που εμπλουτίζουν την διατροφή των ζώων, από το 2003 απαγορεύεται η χρήση αντιβιοτικών ως αυξητικών παραγόντων σε όλα τα κράτη μέλη της Ε.Ε. Η έως τότε υπερβολική χρήση τους είναι η αιτία της αύξησης του φαινομένου αντοχής των μικροβίων

- **Κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 854/2004** : αναφέρεται στον καθορισμό ειδικών διατάξεων για την οργάνωση των επίσημων ελέγχων στα προϊόντα ζωικής προέλευσης που προορίζονται ανθρώπινη κατανάλωση.
- **Κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 470/2009** : . Θεσπίζει κανόνες σχετικά με τα ανώτατα όρια καταλοίπων των φαρμακολογικά δραστικών ουσιών, όπως τα αντιβιοτικά, οι οποίες χρησιμοποιούνται σε κτηνιατρικά φάρμακα, όσον αφορά τα τρόφιμα ζωικής προέλευσης, συμπεριλαμβανομένων του κρέατος, του ψαριού, του γάλακτος, των αυγών και του μελιού, προκειμένου να διασφαλιστεί η ασφάλεια των τροφίμων.

Ως προς αυτό, ορίζει τα εξής:

1. το ανώτατο όριο καταλοίπων( MRL)
  2. το σημείο αναφοράς για δράση\* όσον αφορά περιπτώσεις στις οποίες δεν έχει υπολογιστεί ανώτατο όριο καταλοίπων.
- **Κανονισμός (ΕΕ) αριθ. 37/2010**: καθορίζει τις φαρμακολογικά δραστικές ουσίες και την ταξινόμησή τους όσον αφορά τα ανώτατα όρια καταλοίπων στα τρόφιμα ζωικής προέλευσης (ΕΕ L 15 της 20.1.2010, σ. 1-72).
  - **Κανονισμός (ΕΕ) 2017/12**: καθορίζει τη μορφή και το περιεχόμενο των αιτήσεων και αιτημάτων προς τον Οργανισμό για τον καθορισμό ανώτατων ορίων καταλοίπων σύμφωνα με τον κανονισμό (ΕΚ) αριθ. 470/2009 του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου (ΕΕ L 4 της 7.1.2017, σ. 1-7).
  - **Κανονισμός (ΕΕ) 2017/880**: θεσπίζει κανόνες σχετικά με τη χρήση ανώτατου ορίου καταλοίπων που έχει καθοριστεί για μια φαρμακολογικά δραστική ουσία σε ένα συγκεκριμένο τρόφιμο, για άλλο τρόφιμο που παράγεται από το ίδιο είδος, και ανώτατου ορίου καταλοίπων που έχει καθοριστεί για μια φαρμακολογικά δραστική ουσία σε ένα ή περισσότερα είδη, για άλλα είδη (δηλ. παρέκταση των ανώτατων ορίων καταλοίπων) σύμφωνα με τον κανονισμό (ΕΚ) αριθ. 470/2009 του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου (ΕΕ L 135 της 24.5.2017, σ. 1-5).
  - **Κανονισμός (ΕΕ) 2019/4**: αφορά την παρασκευή, διάθεση στην αγορά και τη χρήση ζωοτροφών εμπλουτισμένων με φάρμακα
  - **Κανονισμός (ΕΕ) 2019/6** : αφορά διαδικασίες χορήγησης άδειας και εποπτείας όσον αφορά τα φάρμακα που προορίζονται για ανθρώπινη και για κτηνιατρική χρήση)
  - **Απόφαση 2013/652/ΕΕ**: Εφαρμογή του Προγράμματος ελέγχου για την παρακολούθηση της μικροβιακής αντοχής (απομονώνονται από παραγωγικά ζώα και ορισμένα είδη τροφίμων):
    1. Salmonella spp.
    2. Escherichia coli

### 3. Campylobacter jejuni

Έτσι δημιουργήθηκε δίκτυο συνεργασίας μεταξύ :

- i. Διεύθυνσης Κτηνιατρικής Δημόσιας Υγείας (ΥΠΑΑΤ)
- ii. Διεύθυνσης της Υγείας των Ζώων (ΥΠΑΑΤ)
- iii. Εθνικού Εργαστηρίου Αναφοράς (ΥΠΑΑΤ)
- iv. Κτηνιατρικών Αρχών των Περιφερειακών Ενοτήτων
- v. Περιφερειακών Διευθύνσεων του ΕΦΕΤ 12 Απόφαση 2013/652/ΕΕ της 1

## 3.9 Εφαρμογή του Hazard Analysis Critical Control Point (HACCP) Ανάλυση Κινδύνων & Κρίσιμα Σημεία Ελέγχου

Η υιοθέτηση του HACCP είναι απαραίτητη από όλες τις βιομηχανίες γάλακτος, για την διατήρηση και διασφάλιση της ποιότητας και ασφάλειας των γαλακτοκομικών προϊόντων, ως εργαλείου διαχείρισης της ποιότητάς τους, στα πρότυπα ISO 9001/2. Το HACCP ,καταρχήν, είναι ένα εργαλείο το οποίο μας βοηθάει να αναγνωρίσουμε όλους τους κινδύνους(Hazard Analysis) όσον αφορά τη ποιότητα του γάλακτος από την αρχική του μορφή (ακατέργαστο γάλα) έως το τελικό προϊόν (ακατέργαστο γάλα). Ακολουθώντας, κάνει εκτίμηση στους κινδύνους (Critical Control Point ή CCP) και μας βοηθάει να προσδιορίσουμε τις λειτουργίες έτσι ώστε ο έλεγχος της παραγωγικής διαδικασίας θα είναι αποδοτικός. Στο HACCP οριοθετούνται 7 βασικές αρχές στις οποίες μπορεί να βασιστεί η εφαρμογή του συστήματος σε όλη τη διάρκεια της παραγωγικής διαδικασίας :

1)Γίνεται αναγνώριση των δυνητικών κινδύνων και δημιουργείται ένα διάγραμμα ροής για κάθε διαδικασία, επάνω στο οποίο σημειώνονται όλοι οι ενδεχόμενοι κίνδυνοι ασφαλείας του προϊόντος (χημικοί, μικροβιακοί, φυσικοί)

2)Εν συνεχεία γίνεται καθορισμός των κρίσιμων σημείων ελέγχου (CCP).Είναι οποιοδήποτε σημείο ή επεξεργασία όπου πρέπει να γίνει έλεγχος για την ελαχιστοποίηση ή ακόμα και αποφυγή, όπου είναι δυνατόν, ενός κινδύνου

3)Ακολουθεί ο καθορισμός των κρίσιμων ορίων (Critical Limits)

4)Καθορίζονται οι διαδικασίες παρακολούθησης και ελέγχου που πρέπει να ακολουθηθούν των κρίσιμων σημείων. Κρίσιμα σημεία μπορεί να είναι η θερμοκρασία, ο χρόνος, η υγρασία κλπ

5)Καθορίζονται οι διορθωτικές ενέργειες που πρέπει να γίνουν όταν παρατηρείται απόκλιση από τα κρίσιμα όρια, με στόχο την επανόρθωσή τους (Correction).

6)Ακολουθεί ο καθορισμός μίας διαδικασίας επαλήθευσης (Verification) με κάποιες διαδικασίες και μεθόδους που πρέπει να γίνουν, για να γίνει ο προσδιορισμός ότι το σύστημα είναι σε συμφωνία με το σχέδιο.

7)Τέλος, καθορίζεται η διαδικασία καταγραφής του σχεδίου HACCP, σε ειδικά έγγραφα, και γίνεται αρχειοθέτηση του συστήματος για να είναι διαθέσιμο στις επιθεωρήσεις που

πρόκειται να υποστεί η επιχείρηση από τις αντίστοιχες επίσημες αρχές (Documentation). Για να είναι λειτουργικό ένα HACCP και η εφαρμογή του να είναι επιτυχής, πρέπει οι γαλακτοβιομηχανίες να λάβουν υπόψη τους μερικές προαπαιτήσεις. Πιο συγκεκριμένα, να καθοδηγείται η εφαρμογή του HACCP μέσα από την επιχείρηση και να γίνεται έλεγχος σε όλη τη διαδικασία, από τη παραγωγή του προϊόντος έως τη κατανάλωσή του. Τέλος θα πρέπει να γίνει κατανοητό από το προσωπικό η σημασία της ποιότητας του προϊόντος και πόσο μεγάλο ρόλο παίζει στην επίτευξη των στόχων που έχει θέσει η εταιρεία, οι οποίοι συνοψίζονται στο να είναι τα προϊόντα της ανταγωνιστικά στην αγορά, να έχουν τη μεγαλύτερη δυνατή διάρκεια ζωής, να είναι μικροβιολογικά σταθερά και να χαίρουν μεγάλης εκτίμησης από το καταναλωτικό κοινό στο οποίο απευθύνονται.

### **3.10 ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ ΣΤΑ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ**

Η κοινή πρακτική της ενσωμάτωσης αντιβιοτικών στη διατροφή των ζώων εκτροφής ακολουθεί τη δημοσίευση ενός άρθρου από τους Stokstad και Jukes (1950), το οποίο έδειξε ότι τα αντιβιοτικά αυξάνουν τον ρυθμό ανάπτυξης σε χαμηλές δόσεις. Η προκύπτουσα αύξηση της παραγωγής τροφίμων κατά μέσο όρο περίπου 4-10% εξαρτάται από διάφορους παράγοντες. Η χρήση αντιμικροβιακών ουσιών στην διατροφή των ζώων έδωσε την δυνατότητα ανάπτυξης δυσμενών συνθηκών εκτροφής, γεγονός που είναι σύνηθες στην σύγχρονη γεωργία.

Δεν άργησε να ακολουθήσει ανησυχία για την εμφάνιση αντοχής της μικροχλωρίδας στα αντιβιοτικά που της χορηγούνταν. Οι Jukes και Stokstad (1973) εξέτασαν την επίδραση των αντιβιοτικών 23 χρόνια μετά την εισαγωγή ζωοτροφών ευρείας κλίμακας και δεν βρήκαν στοιχεία για τοξικότητα στα αντιβιοτικά σε ζώα εκτροφής ή ανθρώπους. Η αύξηση σωματικού βάρους που οφείλεται στην χορήγηση αντιβιοτικών σε μικρές δόσεις μέσω της διατροφής, δεν παρουσιάζει κάποια μεταβολή. Ωστόσο, η αυξανόμενη επικράτηση ανθεκτικών μικροβίων προκαλεί ανησυχία. Υπάρχει η θεωρία ότι τα βακτήρια είναι ανθεκτικά λόγω χρωμοσωμικών μεταλλάξεων ή λόγω της επιλογής κάποιου χημειοθεραπευτικού παράγοντα από ανθεκτικά άτομα που εξακολουθούν να βρίσκονται στον πληθυσμό. Η αντοχή που οφείλεται σε χρωμοσωμικούς παράγοντες, είναι συγκεκριμένη για κάποια αντιβιοτικά. Το γεγονός ανακάλυψης της πολλαπλής αντοχής στα τέλη της δεκαετίας του 1950 από Ιάπωνες εργαζόμενους, ήταν μια νέα εξέλιξη στην ιστορία της βακτηριακής αντοχής.

Αυτό που ουσιαστικά ανακαλύφθηκε, είναι ότι τα βακτήρια έχουν την ικανότητα να εμφανίσουν ανθεκτικότητα σε πολλαπλές και άσχετες μεταξύ τους κατηγορίες αντιβιοτικών. Η πολλαπλή αυτή ανθεκτικότητα, μπορεί να αποκτηθεί από την μεταβίβαση ενός γενετικού στοιχείου που διαθέτει τις πληροφορίες αντοχής, από ένα ανθεκτικό μικρόβιο σε ένα ευάλωτο. Το στοιχείο αυτό έχει οριστεί ως πλασμίδιο και είναι ανεξάρτητο από το βακτηριακό χρωμόσωμα, και ένας μικροοργανισμός μπορεί να διαθέτει παραπάνω από ένα πλασμίδια. Έχει αποδοθεί ονομασία στον συγκεκριμένο τύπο πλασμιδίου που ευθύνεται για την ανθεκτικότητα των μικροοργανισμών. Η ονομασία αυτή είναι

«συντελεστής αντίστασης (παράγοντας R)» και ο μικροοργανισμός που διαθέτει τον συγκεκριμένο τύπο πλασμιδίου συμβολίζεται ως  $R^+$ . Δομική μονάδα του πλασμιδίου είναι τα μόρια δεοξυριβονουκλεϊκού οξέος όπως και των χρωμοσωμάτων. Τα πιο μεγάλα πλασμίδια R, καταλαμβάνουν το 1-2% του συνολικού γενετικού υλικού των βακτηρίων. Υπάρχει δυνατότητα μεταφοράς του πλασμιδίου μεταξύ βακτηρίων που ανήκουν σε διαφορετικά είδη. Ως εκ τούτου, οι παράγοντες R εμφανίζουν ιδιαίτερη σημασία για τα εντεροβακτήρια, τα οποία έχουν την ικανότητα μεταφοράς αντοχής από ένα μη παθογόνο *E.coli* σε μια παθογόνο σαλμονέλα. Όλα τα γένη που ανήκουν στο ευρύτερο γένος των εντεροβακτηρίων διαθέτουν παράγοντες R. Επίσης μπορεί να εμφανίζονται σε ψευδομονάδες σταφυλόκοκκους αλλά και στρεπτόκοκκους. Έχει πλέον αναγνωρισθεί, ότι το μεγαλύτερο μέρος της αντίστασης μικροβίων άγριου τύπου, αποδίδεται στους παράγοντες R και όχι σε κάποιο χρωμοσωμικό τύπο. Έτσι, προκύπτει ένα κοινό οικοσύστημα για τα ζώα και τον άνθρωπο.

Η ανησυχία που υπάρχει γύρω από την μεταβίβαση του πλασμιδίου R, από μη παθογόνα βακτήρια σε παθογόνα έχει οδηγήσει σε πολλές έρευνες, προκειμένου να αντιμετωπιστεί ο φόβος που υπάρχει για την μη αποτελεσματική θεραπεία του ανθρώπου με αντιβιοτικά. Οι περισσότερο αξιοσημείωτες έρευνες είναι η ομάδα κρούσης της υπηρεσίας τροφίμων και φαρμάκων στις Η.Π.Α. (Υπουργείο Υγείας, Παιδείας και πρόνοιας των ΗΠΑ, 1972) και η Επιτροπή Σουάν στο Ηνωμένο Βασίλειο. Και οι δύο, αντίκριζαν και αντιμετώπιζαν το πρόβλημα αυτό από κοινή οπτική γωνία, όμως η νομοθεσία που ακολούθησε διέφερε αρκετά μεταξύ των δύο χωρών.

Οι δύο φορείς, δεν κατέληξαν σε κάποια απόδειξη ότι προκαλούνται τοξικές συνθήκες για τον άνθρωπο, με την χρήση αντιβιοτικών σε υποθεραπευτικό επίπεδο στην διατροφή των ζώων. Επίσης, δεν αποδείχτηκε άμεσα ότι τα προϊόντα που προέρχονται από αυτά τα ζώα, μπορούν να προκαλέσουν αλλεργικές αντιδράσεις. Αντίθετα, υπήρχε ανησυχία και από τους δύο φορείς ότι υπάρχει πιθανότητα, τα βακτήρια που εμφανίζουν ανθεκτικότητα σε αντιβιοτικά και είναι επικίνδυνα για τον άνθρωπο, να μεταφέρονται με κάποιον τρόπο από τα ζώα στον άνθρωπο. Η έκθεση WHO ( Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας, 1973) , δίνει ιδιαίτερη βαρύτητα στα οφέλη που παρουσιάζονται από την χρήση χαμηλού επιπέδου αντιβιοτικών στην διατροφή των ζώων, και υποστηρίζει ότι είναι τόσο μεγάλα που δεν πρέπει να τεθεί το ζήτημα κατάργησής τους από την γεωργία. Λόγω της μεγάλης σημασίας των αντιβιοτικών για την θεραπεία του ανθρώπου αλλά και των ζώων, ακολούθησε η ταξινόμηση τους σε σειρά υψηλότερου κινδύνου. Τα αντιβιοτικά που ήταν χαμηλού κινδύνου, κρίθηκαν κατάλληλα για την σίτιση των ζώων, ενώ αντιθέτως εκείνα του υψηλού κινδύνου κρίθηκε απαραίτητο να καταργηθούν από την γεωργική χρήση. Εκτός από ταξινόμηση κινδύνου, πραγματοποιήθηκε ταξινόμηση τους με βάση την χρήση δηλαδή για θεραπεία, προφύλαξη ή σίτιση, με σκοπό την αύξηση του κινδύνου σχετικά με την ανάπτυξη βακτηριακής αντοχής :

1. Βακιτρακίνη,
2. Πολυμυξίνη, φουράνιο, λινκομυκίνη, τυλοσίνη, και σχετικά μακρολίδια
3. Ερυθρομυκίνη, Σπιραμυκίνη
4. Πενικιλίνες, Τετρακυκλίνες
5. Αμπικιλλίνη, Κεφαλοσπορίνες



6. Σουλφοναμίδες, Στρεπτομυκίνη, Νεομυκίνη

7. Χλωραμφαινικόλη

Η Ευρωπαϊκή Οικονομική Κοινότητα (ΕΟΚ) στη δεκαετία του 1960, αντιλήφθηκε ότι υπάρχει κίνδυνος με την διάθεση αντιβιοτικών, από όπου θα μπορούσαν να επιλεγούν οργανισμοί που εμφανίζουν αντοχή και μεταφέρουν πλασμίδια και αναγνώρισε την χρήση τετρακυκλινών, στρεπτομυκίνης και άλλων παρόμοιων ως πρόσθετων στην διατροφή των ζώων. Σημαντική, ήταν η απαγόρευση της πενικιλίνης, λόγω της εξαιρετικής σημασίας του συγκεκριμένου αντιβιοτικού για την θεραπεία τόσο του ανθρώπου όσο και των ζώων. Η πολυμυξίνη, οι κεφαλοσπορίνες, η χλωραμφαινικόλη, η αμπικιλίνη καθώς και οι σουλφοναμίδες, έχει αποφευχθεί να χρησιμοποιηθούν σε χώρες της ΕΟΚ για σίτιση. Ωστόσο, μερικές σουλφοναμίδες, εξακολουθούν να χρησιμοποιούνται ως κοκκιδιοστατικά στα πουλερικά. Δεν έχει αποφασιστεί ακόμη, εάν πρέπει να συνεχιστεί η χρήση μακρολιδίων συμπεριλαμβανομένων των λινκομυκινών, για την θεραπεία ή την σίτιση των ζώων. Ενδέχεται κάποια είδη αντιβιοτικών να απαγορευτούν για γεωργική χρήση.

### 3.10.1 ΑΝΘΕΚΤΙΚΑ ΣΤΕΛΕΧΗ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ

Η αντοχή που εμφανίζουν ορισμένα βακτήρια της αντιβακτηριδιακές ουσίες και η επίδραση της στην ανθρώπινη υγεία, αποτελεί ένα μείζον θέμα. Ειδικότερα, υπάρχουν διάφοροι τρόποι με τους οποίους τα βακτήρια που προέρχονται από τα ζώα μπορούν να φτάσουν στον άνθρωπο. Κάποια είδη βακτηρίων που έχουν εμφανίσει αντοχή σε πολλαπλά αντιβιοτικά με χαρακτηριστικό παράδειγμα την *Escherichia coli*, έχουν την δυνατότητα να δημιουργήσουν αποικίες και να επηρεάζουν την υγεία του ανθρώπου, πιθανότητα σε συνδυασμό με εντεροβακτήρια. Άτομα, που έχουν εκτεθεί όπως είναι το ανθρώπινο δυναμικό σε κτηνοτροφικές εγκαταστάσεις, οι χειριστές τροφίμων και οι αγρότες, εμφανίζουν μεγαλύτερη συχνότητα έκθεση στο ανθεκτικό στέλεχος της *Escherichia coli* συγκριτικά με τον γενικό πληθυσμό. Στα σφαγεία, παρουσιάζεται αυξημένο μολυσματικό φορτίο από τα πτώματα των ζώων, λόγω υψηλής μόλυνσης τους από εντεροβακτήρια. Ο βαθμός πρόσληψης βακτηρίων από τον άνθρωπο είναι εξαιρετικής σημασίας όσον αφορά τον ιατρικό τομέα, αφού τα βακτήρια εμφανίζουν αντοχή λόγω της χορήγησης αντιβιοτικών σε μεγάλες ποσότητες και πολύ συχνά. Επίσης, είναι δύσκολο να προσδιοριστεί η κλίμακα της πρόσληψης των μεταβιβάσιμων γονιδίων που ευθύνονται για την ανθεκτικότητα των περισσότερων παθογόνων. Η αντίσταση στα αντιβιοτικά, των περισσότερων παθογόνων μικροβίων που μολύνουν τον άνθρωπο συνδέεται στενότερα με τη χρήση αντιμικροβιακών παραγόντων στην ιατρική παρά στην κτηνοτροφία. Πολλά παθογόνα της εντερικής οδού των ζώων είναι υπεύθυνα για την εμφάνιση ζωονοσογόνων ασθενειών στον άνθρωπο, μεταξύ αυτών: *Salmonella*, *Campylobacter jejuni*, *Yersinia enterocolitica* και, σε ορισμένες περιπτώσεις, *Escherichia coli*. Η θεραπεία λοιμώξεων των ανθρώπων μπορεί να είναι δύσκολη επειδή η αντίσταση που επιτυγχάνεται με τη χρήση αντιμικροβιακών φαρμάκων για θεραπεία παρεμποδίζει την αντιμετώπιση των λοιμώξεων, καθιστώντας τα ανθεκτικά στελέχη λιγότερο αδρανή έναντι των αντιβιοτικών. Τα ανθεκτικά στα αντιβιοτικά βακτήρια

όπως το *Escherichia coli* και οι εντερόκοκκοι εισχωρούν συχνά στον άνθρωπο μέσω της τροφής (J. F.Prescott et al. 2000).

### 3.10.1.1 *E.coli*

Η *Escherichia coli*, είναι ένα κολοβακτηρίδιο gram αρνητικό, σχήματος ράβδου. Φυσιολογικά, βρίσκεται στην εντερική οδό των ενδόθερμων ζώων και τα στελέχη του αποτελούν κομμάτι της φυσιολογικής εντερικής μικροχλωρίδας. Υπάρχουν πολλές ενδείξεις, ότι η τροφή των ζώων είναι μια δεξαμενή ανθεκτικού στα αντιβιοτικά *Escherichia coli* που μπορεί να μολύνει τον ανθρώπινο πληθυσμό. Ακόμη, υπάρχει και μία ακόμη δεξαμενή η οποία περιλαμβάνει γονίδια που είναι υπεύθυνα για την έκφραση της μικροβιακής ανθεκτικότητας, τα οποία μπορούν να μεταβιβάσουν στο γενετικό υλικό της *Escherichia coli* και στη συνέχεια να προσβάλουν τον άνθρωπο. Διεξήχθη μελέτη το 1969, για τη

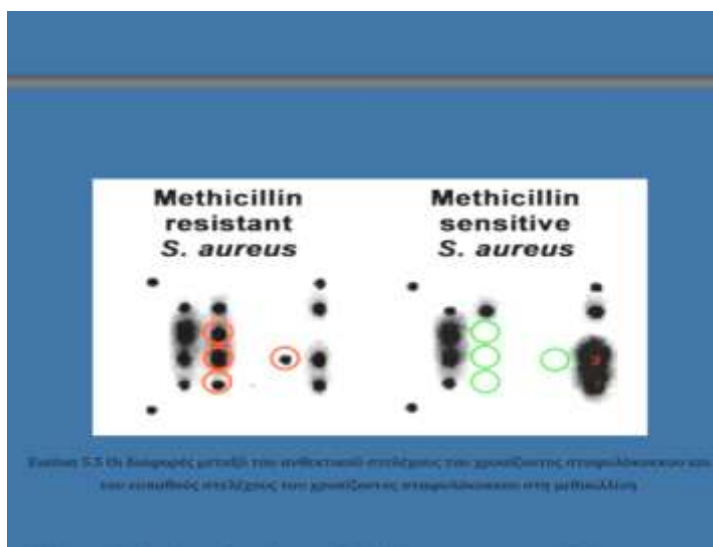


Εικόνα 3.3 : Στέλεχος *E.coli* στο οπτικό μικροσκόπιο

μεταφορά των γονιδίων μικροβιακής αντοχής από την *Escherichia coli* που βρίσκεται στο πεπτικό σύστημα των ζώων εκτροφής, στην *Escherichia coli* που υπάρχει φυσιολογικά στο ανθρώπινο πεπτικό σύστημα (DS Davies 2014). Αρκετές μελέτες, συμπεριλαμβανομένης μιας μελέτης σε χοιροτροφικές εκμεταλλεύσεις της Δανίας, έδειξαν ότι ενώ το *Escherichia coli* από χοίρους, το *Escherichia coli* από το περιβάλλον και το *Escherichia coli* από εκτροφείς ήταν γενετικά διαφορετικές, και οι τρεις έφεραν το πλασμίδιο που είναι υπεύθυνο για την αντίσταση. Έτσι, οι Δανοί επιστήμονες κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι η μεταφορά γονιδίων που εκφράζουν την αντίσταση μεταξύ του *Escherichia coli* ζώων και ανθρώπων είναι δυνατή (D. S. Davies 2014). Η EFSA (Ευρωπαϊκή Αρχή για την Ασφάλεια των Τροφίμων) κατέληξε σε όμοιο συμπέρασμα, δηλώνοντας: «Ορισμένες κατηγορίες τροφίμων μπορεί να είναι επιμολυσμένες με απομονωμένα στελέχη *Escherichia coli* που εμφανίζουν ανθεκτικότητα και αυτά τα βακτήρια παραμένουν στο ανθρώπινο έντερο αρκετό καιρό για να καθίσταται εφικτό να μεταφέρουν γονίδια αντοχής στη μικροβιακή χλωρίδα. Υπάρχει λοιπόν μια καλή πιθανότητα τα τρόφιμα να είναι ένας τρόπος διάδοσης μικροβιακής αντοχής μεταξύ των διαφορετικών οικοσυστημάτων». Ωστόσο, παρά τη μεγάλη επιστημονική δυσκολία στον εντοπισμό των πηγών αντοχής των δύο τύπων βακτηρίων, είναι σαφές ότι και η χρήση αντιβιοτικών στον γεωργικό τομέα, έχει σημαντική επίδραση στην αντοχή κατά αντιβιοτικών στις ανθρώπινες λοιμώξεις (D.S. Davies 2014).

### 3.10.1.2 Χρυσίζων Σταφυλόκοκκος – *S. aureus*

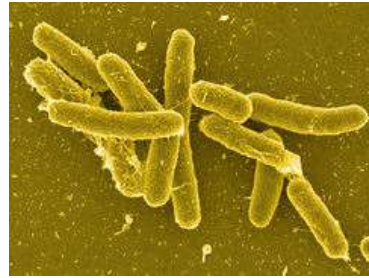
Ο χρυσίζων σταφυλόκοκκος ή αλλιώς MRSA (Methicillin-Resistant Staphylococcus Aureus), έχει αναγνωρισθεί παγκοσμίως, ως ένα από τα πιο επικίνδυνα παθογόνα στελέχη μικροβίου, που φέρει την ευθύνη για νοσοκομειακές λοιμώξεις, ενώ οι κτηνίατροι έχουν στρέψει την προσοχή τους σε αυτόν. Μια ματιά στα στοιχεία που έχουν συλλεχθεί σχετικά με τον MRSA, φανερώνει ότι τελευταία, ο χρυσίζων σταφυλόκοκκος πολλαπλασιάζεται στις αγελάδες που εκτρέφονται για την γαλακτοβιομηχανία. Μερικά από τα στελέχη του, έχουν την ιδιότητα να παράγουν εντεροτοξίνες οι οποίες είναι υπεύθυνες για τροφική δηλητηρίαση και η ανησυχία που σχετίζεται με την εμφάνιση ανθεκτικότητας του *S.aureus* στα αντιβιοτικά, είναι μεγάλη. Ειδικότερα στα αντιβιοτικά της κατηγορίας των β-λακταμών και στην μεθικιλίνη (J. Pinto Ferreira et. al 2012). Η αντοχή που παρουσιάζει ο *S.aureus* στην μεθικιλίνη, είναι αποτέλεσμα της παραγωγής καινούργιων πρωτεϊνών δέσμευσης πενικιλίνης (PBP)-2a, οι οποίες εμφανίζουν χαμηλή συγγένεια σύνδεσης για τα αντιβιοτικά που ανήκουν στην κατηγορία των β-λακταμών. Ο μηχανισμός αυτός, μας οδηγεί σε έναν από τους τέσσερις μηχανισμούς ανθεκτικότητας των μικροβίων έναντι των αντιβιοτικών. Ειδικότερα, στον μηχανισμό μεταβολής των στόχων-υποδοχών των κυττάρων, οι νέες πρωτεΐνες δέσμευσης (PBP)-2a, δεν αντιστοιχούν στους υποδοχείς των κυττάρων. Το αποτέλεσμα αυτού, είναι να είναι ανίκανο το αντιβιοτικό να δράσει και το στέλεχος του *S.aureus* να παραμένει ανεπηρέαστο (J. Pinto Ferreira et. al 2012).



**Εικόνα 3.4 :** Οι διαφορές μεταξύ του ανθεκτικού στελέχους του *S.aureus* και του ευπαθούς στην μεθικιλίνη *S.aureus*

### 3.10.1.3 Σαλμονέλα- *Salmonella spp*

Η σαλμονέλα - *Salmonella spp* , είναι παθογόνο, κινούμενο, με μορφή ράβδου βακτήριο, το οποίο είναι υπεύθυνο για πληθώρα ασθενειών του εντέρου και του στομάχου, τόσο στον άνθρωπο όσο και στα ζώα. Το παθογόνο αυτό μπορεί να προέλθει από το νερό, το έδαφος, τα περιττώματα ζώων, καθώς και από μη επεξεργασμένα θαλασσινά, πουλερικά και κρέατα. Η ασθένεια που προκαλείται από το συγκεκριμένο γένος, ονομάζεται σαλμονέλωση και αποτελεί μια δηλητηριώδη τροφιμογενή λοίμωξη, η οποία λόγω των αποικιών που δημιουργεί είναι ικανή να μολύνει ταυτόχρονα μια ομάδα ανθρώπων. Πιο ειδικά, η σαλμονέλωση



Εικόνα 3.5 :Στέλεχος *Salmonella spp.*

προκαλείται όταν το στέλεχος της σαλμονέλας διεισδύσει στο επιθήλιο του λεπτού εντέρου και προκαλέσει φλεγμονή, με αποτέλεσμα την παραγωγή εντεροτοξίνης. Υπάρχουν δύο βασικές κατηγορίες σαλμονέλωσης που είναι η τυφική και η μη τυφική (D.S. Davies 2014) και έτσι είναι αρκετά απλό να καθοριστεί η αιτία. Λόγω της χρήσης αντιβιοτικών στην διατροφή των ζώων με σκοπό την γρηγορότερη ανάπτυξη τους, τα βακτήρια της σαλμονέλας που υπάρχουν φυσιολογικά στα ζώα, δημιουργούν άμυνες ενάντια στα αντιβιοτικά (ανθεκτικότητα) (D.S. Davies 2014), γεγονός που δημιουργεί μεγάλη ανησυχία. Η αντίσταση στα αντιβιοτικά συνδέεται με τη συστηματική πλέον νοσηλεία, με τη νοσηρότητα, την εμφάνιση μόλυνσης υψηλού κινδύνου και με την διπλάσια αύξηση του κινδύνου της θνησιμότητας (W.H.O., World Health Organization, 2011). Βρέθηκε ότι το μεγαλύτερο ποσοστό της αντίστασης της *Salmonella spp.* εμφανίζεται στην αμπικιλίνη και την τετρακυκλίνη, έχοντας 19% και 21% αντίστοιχα. Βρέθηκε ότι η ανθεκτικότητα στην τετρακυκλίνη είναι συνδεδεμένη με μια πρωτεΐνη, την tet A (tetracycline resistance protein) και στις πρωτεΐνες tet B και tet G. Η μικροβιακή αντοχή έναντι στην χλωραμφαινικόλη, οφείλεται στην παρουσία των γονιδίων flo R και cml A. Η ανθεκτικότητα στο ναλιδιξικό οξύ σχετίζεται με την ύπαρξη μεταλλάξεων στα κωδικόνια των αμινοξέων 83 ή 87 του γονιδίου gyrA (R. Cabrera et. al. 2004). Πιο ειδικά, στις φλουροκινολόνες (συμπεριλαμβανομένου και του ναλιδιξικού οξέος), οι πιο συχνές μεταλλάξεις εμφανίζονται στο γονίδιο gyrA, σε στελέχη της σαλμονέλας που εμφανίζουν ανθεκτικότητα που είναι αλλαγές στο κωδικόνιο 83 από σερίνη σε φαινυλαλανίνη, στη τυροσίνη ή στην αλανίνη και στο κωδικόνιο 87 από το ασπαρτικό οξύ στη γλυκίνη, στην ασπαραγίνη και την τυροσίνη (P. J. Quinn et. al , 2011). Ένας άλλος μηχανισμός που μπορεί να συμβάλλει στην αντίσταση της σαλμονέλας κατά των φλουροκινολόνων είναι το σύστημα εκροών AcrAB-TolC καθώς και τα ρυθμιστικά γονίδια marRAB και soxRS. Τόσο η μετάλλαξη του γονιδίου-στόχου όσο και το σύστημα εκροής αποτελούν σημαντικούς μηχανισμούς για την εμφάνιση σε μεγάλο βαθμό μικροβιακής αντίστασης στις φλουροκινολόνες. Ωστόσο, το σύστημα εκροής φαίνεται να διαδραματίζει σημαντικό ρόλο: όταν το γονίδιο acrB καθίσταται αδρανές, το επίπεδο της μικροβιακής ανθεκτικότητας στις φλουροκινολόνες παρουσιάζει αξιοσημείωτη μείωση, ακόμα και όταν υπάρχουν πληθώρα μεταλλάξεων σε άλλα γονίδια-στόχους.

Η μικροβιακή αντίσταση στις κεφαλοσπορίνες, οφείλεται κατά βάση στην παραγωγή κεφαλοσπορινών του βακτηρίου. Τα ανθεκτικά στελέχη της *Salmonellas* στις

κεφαλοσπορίνες, έχουν την ιδιότητα να παράγουν ένζυμα, των οποίων η πλειοψηφία είναι ευρέους φάσματος β-λακταμάσες, τα οποία έχουν την ικανότητα να αδρανοποιούν διαμέσου της υδρόλυσης τις κεφαλοσπορίνες και τις κεφαμυκίνες. Τα γονίδια που κωδικοποιούν την παραγωγή των παραπάνω ενζύμων μπορούν εύκολα να μεταφέρονται σε άλλους μικροοργανισμούς. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα, όχι μόνο την δημιουργία ανθεκτικότητας της σαλμονέλας λόγω αλόγιστης χρήσης αντιβιοτικών στην κτηνοτροφία, αλλά και την δημιουργία συνθηκών ανθεκτικότητας in vivo από τα ίδια τα αντιβιοτικά στα οποία είναι ευαίσθητη η σαλμονέλα που οδηγεί τα βακτήρια να αποκτήσουν πλασμίδια ανθεκτικότητας από άλλα παθογόνα του εντέρου του ξενιστή. Βρέθηκαν επίσης τα γονίδια *aac* σε απομονωμένα στελέχη σαλμονέλας, τα οποία είναι υπεύθυνα για την εμφάνιση αντίστασης στη γενταμυκίνη, στη τομπραμυκίνη, και στη καναμυκίνη όσον αφορά την κατηγορία των αμινογλυκοσίδων ( Jonathan G. Frye et. al. 2013).

### 3.10.1.4 Καμπυλοβακτηρίδιο- *Campylobacter*

Το *Campylobacter* είναι ένα αερόφιλο, αρνητικό κατά gram βακτήριο που διαθέτει μονοπολικές ή διπολικές βλεφαρίδες προκειμένου να κινείται. Τα περισσότερα είδη *campylobacter* είναι παθογόνα και επηρεάζουν τόσο τους ανθρώπους όσο και τα ζώα. Οι δύο πιο δημοφιλείς τύποι είναι το *Campylobacter jejuni* και το *Campylobacter coli*. Η ασθένεια που προκαλείται από το καμπυλοβακτηρίδιο ονομάζεται καμπυλοβακτηρίωση και ορίζεται ως μια λοίμωξη του γαστρεντερικού συστήματος με χαρακτηριστικά συμπτώματα την αιματηρή διάρροια ή το σύνδρομο δυσεντερίας. Στις 29 Ιουνίου 2011, το Υπουργείο Υγείας του Ουαϊόμινγκ ανακοίνωσε δύο εργαστηριακά επιβεβαιωμένα κρούσματα *Campylobacter jejuni* σε δύο άτομα του εργατικού προσωπικού προβατοστάσιου οι οποίοι εφάρμοσαν ευνουχισμό και διαμέλιση των ούρων των προβάτων. Οι μολύνσεις



Εικόνα 3.6: *Campylobacter jejuni*

που οφείλονται στο καμπυλοβακτηρίδιο εκδηλώνονται σπάνια, γεγονός το οποίο δυσκολεύει τον εντοπισμό της προέλευσης τους (DS Davies 2014).

Τα ανθεκτικά στις κινολόνες στελέχη του *Campylobacter* έχουν απομονωθεί και αναγνωρισθεί στη δεκαετία του 1980. Επίσης, αρκετές μελέτες κατέληξαν στο ότι η χρήση αντιβιοτικών, συμπεριλαμβανομένων των φθοριοκινολόνων, με σκοπό την επιτάχυνση της ανάπτυξης των ζώων αλλά και της θεραπείας αυτών, είχε ως αποτέλεσμα την εμφάνιση και εξάπλωση ανθεκτικών στα αντιβιοτικά στελεχών των καμπυλοβακτηριδίων. Ο αριθμός των στελεχών των καμπυλοβακτηριδίων που έχουν παρουσιάσει αντοχή στα αντιβιοτικά, όπως φθοριοκινολόνες, μακρολίδια, αμινογλυκοσίδες και βήτα-λακτάμες, αυξάνεται συνεχώς. Οι μικροοργανισμοί όπως είναι το καμπυλοβακτηρίδιο ανάλογα με την ουσία που έρχονται αντιμέτωποι, εφαρμόζουν τον αντίστοιχο πιο κατάλληλο μηχανισμό άμυνας τους, καθώς

διαθέτουν πολλούς και πολύπλοκους μηχανισμούς. Έτσι πρόκειται για έναν συνδυασμό μηχανισμών : ο πρώτος μηχανισμός είναι το εξαιρετικά σταθερό κυτταρικό τοίχωμα και η δυσκολία στην διαπερατότητα της εξωτερικής μεμβράνης . Ο δεύτερος μηχανισμός είναι η ενεργή απομάκρυνση της ουσίας από την αντλία εκροής που διαθέτει το κύτταρο. Έχουν εντοπιστεί το λιγότερο οκτώ διαφορετικά συστήματα εκροής με σκοπό να αποφευχθεί η ζημιά που μπορεί να προκαλέσουν οι κινολόνες στο βακτηριακό κύτταρο (K. Wiczorek et. Al. 2013). Ο τρίτος μηχανισμός είναι η λήψη γενετικού υλικού μέσω πλασμιδίων με το φαινόμενο της οριζόντιας μεταφοράς γονιδίων από άλλους μικροοργανισμούς όπως είναι ο στρεπτόκοκκος και ο εντερόκοκκος. Ως τέτοια, η διαδικασία περιλαμβάνει τη μεταφορά γενετικών πληροφοριών που καταδεικνύουν μικροβιακή αντίσταση στην τετρακυκλίνη.

Αξίζει να σημειωθεί ότι μετά τη γενετική μετάδοση, η ομοιότητα του γενετικού υλικού των *Campylobacter* και του στελέχους *Streptococcus pneumoniae* έχουν φτάσει το 75%. Στον τέταρτο μηχανισμό, το γενετικό υλικό του ήδη ανθεκτικού στελέχους καμπυλοβακτηρίου μεταλλάσσεται με αντικατάσταση. Πιο ειδικά, οι αζωτούχες βάσεις του χημικού βακτηρίου έχουν τροποποιηθεί στις θέσεις 2074 και 2075 στο γονίδιο 23srRNA, καθώς και άλλες μεταλλάξεις (όπως A2074C, A2074G και A2075G) που πραγματοποιούνται στο *Campylobacter jejuni* και στο *Campylobacter coli* δίνουν υψηλή ανθεκτικότητα κατά των μακρολιδίων. Άλλες μεταλλάξεις, όπως αυτές στις ριβοσωμικές πρωτεΐνες L4 και L22, δίνουν χαμηλότερα επίπεδα μικροβιακής αντοχής. Αξίζει επίσης να σημειωθεί ότι η αντίσταση στην ερυθρομυκίνη είναι ισοδύναμη με τη διασταυρούμενη αντίσταση με άλλα μακρολίδια. Υπάρχει επίσης η ικανότητα παρέμβασης από τον έναν μηχανισμό στον άλλο για καταλυτικούς λόγους. Υπάρχουν ενδείξεις ότι η αλληλεπίδραση μεταξύ του μηχανισμού εκροής και των μεταλλάξεων στο γονίδιο 23S rRNA, συμβάλλουν σε υψηλότερα επίπεδα αντοχής έναντι των μακρολιδίων. Μια άλλη μέθοδος είναι να απενεργοποιηθεί ή να τροποποιηθεί το αντιβιοτικό εξαιτίας της δράσης κάποιου ενζύμου . Η πλειονότητα των στελεχών *Campylobacter* πιστεύεται ότι παρουσιάζει αντίσταση στις β-λακτάμες και ειδικά στις πενικιλίνες και κεφαλοσπορίνες στενού φάσματος (K. Wiczorek et. Al. 2013).

### **3.10.1.5 *Listeria monocytogenes***

Το *Listeria monocytogenes* είναι ένα Gram θετικό βακτήριο, προαιρετικά αναερόβιο, μη σπορογόνο σε σχήμα ράβδου, το οποίο κινείται με τα μαστίγια που διαθέτει. Αποτελεί και αυτό, ένα από τα παθογόνα που έχει προκαλέσει θανατηφόρες λοιμώξεις στον άνθρωπο, προερχόμενο από κατανάλωση νωπού γάλακτος στις Η.Π.Α (Oliver et al. 2009). Δεν έχει γίνει συχνά αναφορά σε χώρες της Ε.Ε, για στελέχη της *L.monocytogenes*, απομονωμένα από το νωπό γάλα, που να εμφανίζουν στοιχεία ανθεκτικότητας. Στην Βόρεια Ιρλανδία το 2001, διεξήχθη μελέτη σε 45 απομονωμένα στελέχη και ελέγχθηκε η ευαισθησία τους σε ορισμένα αντιβιοτικά όπως είναι η γενταμυκίνη, η στρεπτομυκίνη, οι σουλφοναμίδες, η χλωραμφαινικόλη , οι τετρακυκλίνες, η αμπικιλίνη και η κεφαλοθίνη (Harvey and Gilmour 2001). Τα αποτελέσματα ήταν ότι μόνο δύο από τα σαράντα πέντε παρουσίασαν ανθεκτικότητα στην τετρακυκλίνη. Σε χώρες εκτός της Ε.Ε, έχει σημειωθεί ανθεκτικότητα στελεχών του *L.monocytogenes* στην τετρακυκλίνη και πενικιλίνη, από μελέτη που διεξήχθη

στην Μαλαισία το 2012 (Jamali et al. 2013) και πρόσφατα έγινε αναφορά για πολλαπλή ανθεκτικότητα στελεχών *Listeria* τα οποία απομονώθηκαν από νωπό γάλα στην Νιγηρία (Uwanibe et al. 2014).

### **3.10.2 Μετάδοση βακτηρίων ανθεκτικών στα αντιβιοτικά στον άνθρωπο μέσω της κατανάλωσης γάλακτος**

Το γάλα αποτελεί ένα εξαιρετικό υπόστρωμα για τους μικροοργανισμούς, και μπορεί να φιλοξενήσει μεγάλη ποικιλία αυτών (Oliver et al 2005). Σύμφωνα με την EFSA, και όσον αφορά τους κινδύνους για τα έτη 2007-2012, στην Ε.Ε εντοπίστηκαν 27 διαφορετικές εστίες τροφολοιμώξεων που είχαν άμεση σχέση με την κατανάλωση νωπού γάλακτος. Ειδικότερα, από αυτές, οι 21 είχαν προκληθεί από το *Campylobacter* spp. (κυρίως το *C.jejuni*), καθώς επίσης και :

1. από το γένος *Salmonella typhimurium*,
2. από στελέχη *Escherichia coli* που παράγουν την τοξίνη shiga (STEC) και
3. από τον ιό της κροτωγενούς εγκεφαλίτιδας (TBEV).

Αντίθετα δεν έγινε καμία αναφορά μετάδοσης *L. monocytogenes* μεταξύ των ετών αυτών.

Αναφορικά με την κατανάλωση νωπού πρόβειου και κατσικίσιου γάλακτος σε χώρες της Ε.Ε, οι μόνες αναφορές που έχουν γίνει για μικροβιακή αντίσταση αφορούν :

1. απομονωθέντα στελέχη *Staphylococcus* spp. στη βόρεια Ιταλία, όπου το 10% αυτών έφερε το γονίδιο αντοχής tet (K) (Ruaro et al 2013),
2. στελέχη *E. coli* O157 τα οποία απομονώθηκαν από γάλα αιγών και αγελάδων στην περιοχή της Λομβαρδίας στην Ιταλία (Picozzi et al 2005) και
3. απομονωθέντα στελέχη *E. coli* O157 από γάλα βοοειδών και αιγοπροβάτων στην Ελλάδα το 2009, όπου παρατηρήθηκαν υψηλά επίπεδα αντοχής στις τετρακυκλίνες, τη στρεπτομυκίνη και τις σουλφοναμίδες (Solomakos et al 2009)

Τέλος, δεν υπήρξε κάποια σχετική αναφορά ύπαρξης ανθεκτικών στελεχών, απομονωμένων από νωπό γάλα καμήλας στην Ε.Ε.

### **3.10.3 Ο ρόλος της αρμόδιας αρχής στον έλεγχο του φαινομένου**

Οι Κ. Υ. παρακολουθούν προσεκτικά και καταγράφουν την ποσότητα και τον τύπο των αντιβιοτικών που χορηγούνται σε ζώα με δεδομένα που λαμβάνουν από εισαγωγείς ή/και χονδρεμπόρους κτηνιατρικών φαρμάκων. Στη συνέχεια, στέλνουν αυτά τα δεδομένα όπως και άλλα κράτη μέλη στον EMA (European Medicines Agency) , ο οποίος μετά από έρευνα και επεξεργασία, συντάσσει μια έκθεση που δημοσιεύεται στον ιστότοπο της. Αυτή η έκθεση από το 2014 δημοσιεύεται στον επίσημο ιστότοπο του Κ. Υ. :

Υπάρχουν επιπλέον μέτρα τα οποία λαμβάνονται από τις Κ.Υ. για τον περιορισμό του φαινομένου τα οποία είναι :

- i. Ο προσεκτικός έλεγχος σε επίπεδο φάρμακας από τα Επαρχιακά Κτηνιατρικά Γραφεία, για την εφαρμογή των κανόνων υγιεινής αλλά και για την τήρηση μητρώων χρήσης ΚΦΠ και

αρχείου με συνταγές που έχουν χορηγηθεί στα ζώα. Το διάστημα 2005-2008, μετά από σύσταση της Ε.Ε. πραγματοποιήθηκαν από τις Κ.Υ., μελέτες ανθεκτικότητας σε μικρόβια, όπως η *Salmonella*, το *Campylobacter* και ο ανθεκτικός στη μεθικιλίνη, *Staphylococcus aureus* σε όρνιθες, γαλοπούλες και χοίρους.

- ii. Από το 2010, οι Κ.Υ. έχουν υιοθετήσει ένα πρόγραμμα ελέγχου μικροβιακής ανθεκτικότητας σε στελέχη *Salmonella* που προέρχονται από κότες παραγωγής αυγού και εκτροφής και από κοτόπουλα και γαλοπούλες πάχυνσης.
- iii. Το Υπουργείο Υγείας της Κυπριακής Δημοκρατίας, συνεργατικά με τις ΚΥ του Υπουργείου Γεωργίας, αναγνωρίζοντας την επείγουσα ανάγκη λήψης μέτρων για τον περιορισμό της εξάπλωσης ανθεκτικών στελεχών, εκπόνησαν το Κυπριακό Σχέδιο Δράσης για την Καταπολέμηση των Ανθεκτικών στελεχών, που αποτελεί σημαντικό εργαλείο με σκοπό τον έλεγχο και περιορισμό της ανθεκτικότητας των μικροβίων.

### **3.11 ΕΠΙΠΤΩΣΕΙΣ ΤΩΝ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΩΝ ΤΟΥ ΓΑΛΑΚΤΟΣ ΣΤΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ – ΣΤΗ ΔΗΜΟΣΙΑ ΥΓΕΙΑ**

Το θέμα της ανίχνευσης αντιβιοτικών στο γάλα έστρεψε την προσοχή των ειδικών, τόσο από άποψη τεχνολογίας όσο και από άποψη Δημόσιας υγείας. Υπηρεσίες εμπορικής διάθεσης γάλακτος έχουν σχηματιστεί σε διάφορες χώρες, κυρίως στις Ηνωμένες Πολιτείες, τον Καναδά και το Ηνωμένο Βασίλειο, οι οποίες είναι αφοσιωμένες στο θέμα των καταλοίπων αντιβιοτικών στο γάλα. Οι στόχοι τους, είναι να δοκιμαστούν δείγματα φρέσκου και παστεριωμένου γάλακτος για την ανίχνευση αντιβιοτικών σε αυτά. Ο οργανισμός FAO/WHO προτείνει, να αποτρέπεται η διάθεση του γάλακτος, από αγελάδες που έχουν υποστεί θεραπεία για την μαστίτιδα, για κατανάλωση τουλάχιστον μέχρι το πέρας 72 ωρών από την χορήγηση του αντιβιοτικού. Μάλιστα συνιστά, εάν αυτό είναι εφικτό, την απόρριψη του ακόμη και για 96 ώρες.

#### **3.11.1 Οικονομικές- Τεχνολογικές επιπτώσεις**

Η παρουσία αντιβιοτικών στο γάλα το οποίο προορίζεται για παρασκευή διαφόρων γαλακτοκομικών προϊόντων, διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην οικονομία που περιστρέφεται γύρω από αυτό. Η ανίχνευση κατάλοιπων τους, μπορεί να προκαλέσει σοβαρά προβλήματα στην μεταποίηση του αλλά και στην παραγωγή ζυμωμένων προϊόντων όπως είναι το τυρί, το γιαούρτι και το ξινόγαλα. Οι γαλακτοβιομηχανίες, πλήττονται ισχυρά από τα κατάλοιπα αντιβιοτικών, καθώς αυτά, επιβραδύνουν ή ακόμη παρεμποδίζουν εντελώς την παραγωγή οξέων από τις καλλιέργειες ζύμωσης που είναι απαραίτητα για την ζύμωση των γαλακτοκομικών προϊόντων. Πιο συγκεκριμένα, παρεμποδίζεται η ανάπτυξη της σημαντικής χλωρίδας μικροβίων όσον αφορά την παραγωγή τυριού αλλά και άλλων προϊόντων, γεγονός που επηρεάζει την φυσική τους κατάσταση αλλά και διάφορα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά τους όπως είναι η οσμή, η γεύση και το χρώμα. Καλλιέργειες όπως είναι οι *Str. cremoris*, *Str. diacetylactis* και *Leuc. citrovorum*, παύουν να



δρουν σε περίπτωση παρουσίας αρκετής ποσότητας αντιβιοτικών, με αποτέλεσμα να καθίσταται αδύνατη η ζύμωση γιαούρτης. Επίσης, επηρεάζεται η δράση προπιονικών ενζύμων, τα οποία συμβάλουν στην σωστή ωρίμανση του τυριού. Η χαρακτηριστική γεύση στο βούτυρο, είναι αδύνατον να αναπτυχθεί, αφού λόγω ύπαρξης αντιβιοτικών, εμποδίζεται ο σχηματισμός της απαραίτητης γεύσης και αρώματος. Αποτέλεσμα, είναι να αδυνατεί να μεταβληθεί η οξύτητα, λόγω του ότι δεν εκκρίνεται το γαλακτικό οξύ. Το φαινόμενο αυτό, δημιουργεί τις κατάλληλες συνθήκες για την εμφάνιση και ανάπτυξη κολοβακτηριοειδών τα οποία εκκρίνουν αέρια τα οποία δημιουργούν στο τυρί αλλοιώσεις. Πιο συγκεκριμένα, σχηματίζονται στο τυρί μεγάλες και ανομοιόμορφες οπές και δεν αποκτά την επιθυμητή γεύση. Τέλος, με την ύπαρξη καταλοίπων αντιβιοτικών, ένα γάλα μπορεί να θεωρηθεί κατάλληλο, ενώ είναι κακής ποιότητας, και τα αντιβιοτικά που υπάρχουν σε αυτό, έχουν επιπτώσεις στον χρόνο αποχρωματισμού καθώς επιβραδύνεται η αναγωγή κατά την δοκιμή αναγωγής του μπλε του μεθυλενίου.

### 3.11.2 Επίδραση στην Δημόσια Υγεία

Η υγεία του καταναλωτή, μπορεί να κινδυνέψει έντονα στην περίπτωση που το γάλα διατεθεί προς κατανάλωση με υπολείμματα αντιβιοτικών. Αυτό μπορεί να συμβεί, στην περίπτωση που δεν έχει περάσει ο χρόνος που είναι απαραίτητος για την αποβολή του αντιβιοτικού από τους μαστούς του ζώου. Συνοπτικά, τα προβλήματα αυτά είναι :

1. Οι καταναλωτές εκτίθενται σε στελέχη παθογόνων, τα οποία εμφανίζουν ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά και μπορεί να υπάρχουν σε προϊόντα που παρασκευάζονται από μη παστεριωμένο γάλα
2. Η ευαισθησία που παρουσιάζει ο καταναλωτής στα αντιβιοτικά, μπορεί να αυξηθεί ή να χειροτερέψει
3. Οι αλλαγές που μπορεί να γίνουν στην φυσιολογική χλωρίδα του εντέρου των καταναλωτών, έχουν ως αποτέλεσμα την ανεπαρκή παραγωγή βιταμινών
4. Η αλλαγή στην φυσιολογική εντερική χλωρίδα των καταναλωτών, δημιουργεί τις κατάλληλες συνθήκες για την εγκατάσταση και τον πολλαπλασιασμό στελεχών που εμφανίζουν ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό
5. Να προκληθούν αλλεργικές αντιδράσεις

Σε κύριο θέμα του περιοδικού 'SPIEGEL' παρατηρήθηκαν τα εξής :

- Με το πέρας του χρόνου, τα όπλα που διαθέτει ο ιατρικός κλάδος για την αντιμετώπιση των μολυσματικών ασθενειών, αποδυναμώνονται όλο και περισσότερο, λόγω της αύξησης ανθεκτικότητας ορισμένων στελεχών στα αντιβιοτικά.
- Οι άνθρωποι που παρουσιάζουν ευαισθησία υψηλού βαθμού σε κάποια αντιβιοτικά, αυξάνονται όλο και περισσότερο.
- Παρουσιάζονται έντονες και θανατηφόρες αλλεργίες σε αλλεργικούς ασθενείς που χορηγούνται αντιβιοτικά σε μια κρίσιμη στιγμή (παράδειγμα αποτελεί η Δυτική

Γερμανία, στην οποία ποσοστό της τάξεως του 5-10%, παρουσιάζει αλλεργία στην πενικιλίνη).

Γιατροί αλλά και βιοχημικοί, τονίζουν ότι οι λόγοι που προκάλεσαν όλα αυτά τα προβλήματα είναι, η υπερβολική και χωρίς φρένο χρήση αντιβιοτικών στα εκτροφεία για να ενισχύσουν της τροφές και να επιταχύνουν την ανάπτυξη, στα τρόφιμα προκειμένου να επιμηκύνουν τον χρόνο συντήρησής τους και το πιο σημαντικό, στην ιατρική με σκοπό την καταπολέμηση διαφόρων νοσημάτων.

Υπάρχει διακύμανση όσον αφορά την ευαισθησία των καταναλωτών σε ορισμένα αντιβιοτικά και το που έχει στραφεί το ενδιαφέρον της επιστήμης. Αντιβιοτικά ευρέως φάσματος όπως είναι η στρεπτομυκίνη, η βακτριακίνη, οι τετρακυκλίνες, η πολυμυξίνη και η νεομυκίνη, είναι σχεδόν ανίκανα να επιφέρουν ευαισθησία του καταναλωτή ενώ αντιθέτως, η πενικιλίνη είναι αντιβιοτικό στο οποίο ο καταναλωτής μπορεί να παρουσιάσει αυξημένη ευαισθησία, και έτσι η παρουσία της στο γάλα έχει μπει στο στόχαστρο. Τα συμπτώματα που μπορεί να παρουσιαστούν ακόμη και από κατανάλωση ελάχιστης ποσότητας πενικιλίνης, σε άτομα ευάλωτα στο αντιβιοτικό αυτό, μπορεί να είναι από ένα έκζεμα μέχρι και θάνατο από αναφυλαξία. Επίσης, περιγράφηκε αλλεργική δερματίτιδα από την κατανάλωση πενικιλίνης από τους Erskine (1966), Vickers (1966), Borrie and Barret (1961). Ωστόσο, ανακαλύφθηκε ότι ασθενείς οι οποίοι εμφάνιζαν αλλεργία στην πενικιλίνη, θεραπεύτηκαν ύστερα από ένεση με το ένζυμο πενικιλινάση, το οποίο λειτουργεί ως καταλύτης στην υδρόλυση της πενικιλίνης σε πενικιλικό οξύ.

Γενικότερα, οι αρνητικές επιπτώσεις που μπορεί να επιφέρει η κατανάλωση αντιβιοτικού, αλλά και τα προβλήματα τα οποία δημιουργούνται λόγω εθισμού των μικροβίων για τα αντιβιοτικά, εμφανίζουν διακυμάνσεις. Άλλα παρουσιάζονται ως αντιβιοτικά με μικρή τοξικότητα και άλλα με υψηλή και προκαλούν διαφορετικές αντιδράσεις στον άνθρωπο, από νευροτοξικές αντιδράσεις (π.χ. χλωραμφαινικόλη), μέχρι και να μην εμφανίσουν καμία αντίδραση ανεξάρτητα με την τοξικότητα τους.

### 3.11.3 Μέτρα που πρέπει να ληφθούν

Υπάρχουν ορισμένα μέτρα τα οποία εάν τεθούν σε εφαρμογή, μπορούν να περιορίσουν τις επιπτώσεις που δημιουργούνται λόγω των καταλοίπων αντιβιοτικών στο γάλα. Μερικά από αυτά είναι :

1. Οι παραγωγοί να παρακολουθούν και να ενημερώνονται μέσω εκπαιδευτικών προγραμμάτων, όσον αφορά την ορθολογική χρήση αντιβιοτικών αλλά και του γάλακτος το οποίο περιέχει κατάλοιπα τους
2. Να θεσπιστούν κανονισμοί οι οποίοι να εμποδίζουν την διάθεση του γάλακτος που περιέχει αντιβιοτικά, για κατανάλωση
3. Να λαμβάνει χώρα νομοθετικός έλεγχος που θα αφορά τις δόσεις των αντιβιοτικών που χορηγούνται
4. Οι παραγωγοί, να χρειάζονται την άδεια του κτηνίατρου προκειμένου να προμηθευτούν το εκάστοτε αντιβιοτικό που θέλουν να χρησιμοποιήσουν

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

---

### 4. ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΩΝ ΟΥΣΙΩΝ ΣΤΟ ΓΑΛΑ

Είναι λογικό, η χρήση πολλών αντιμικροβιακών ουσιών στην θεραπεία των παραγωγικών ζώων, ειδικά αντιβιοτικών και σουλφοναμιδών, να προκαλέσει την ανίχνευση καταλοίπων των ουσιών αυτών στο γάλα. Ύστερα από την χορήγηση ουσιών από το στόμα, τον μαστό ή το έντερο, πρέπει να περάσουν ορισμένες ημέρες προκειμένου να δοθεί το γάλα των ζώων αυτών για κατανάλωση. Ο χρόνος αυτός, χαρακτηρίζεται ως χρόνος αναμονής. Στην περίπτωση που δεν τηρηθεί αυτός ο χρόνος, βρίσκονται κατάλοιπα στο γάλα σε ποσότητες που εκτός από τις σοβαρές επιπτώσεις στην Δημόσια Υγεία, έχουν αντίκτυπο στην παραγωγή προϊόντων που υφίστανται ζύμωση όπως για παράδειγμα τα τυριά, το ξινόγαλα και το γιαούρτι.

Υπάρχουν διάφορες μέθοδοι οι οποίες χρησιμοποιούνται στην ανίχνευση των καταλοίπων των αντιμικροβιακών ουσιών στο γάλα. Οι μέθοδοι αυτές μπορεί να είναι μικροβιολογικές, στις οποίες αξιοποιούνται ευαίσθητα μικροβιακά στελέχη που ανήκουν στα είδη *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus megaterium*, *Streptococcus thermophilus*, ή μπορεί να είναι ενζυμικές, ανοσολογικές (χρήση μονοκλωνικών αντισωμάτων) ή και ραδιοανοσολογικές. Στο κεφάλαιο αυτό, θα γίνει εκτενής περιγραφή των μεθόδων αυτών οι οποίες δίνονται από την IDF (1991) και είναι δυνατό να χρησιμοποιηθούν ακόμη και από τα εργαστήρια ελέγχου των βιομηχανιών γάλακτος. Οι μέθοδοι που θα παρουσιαστούν παρακάτω, μπορούν να κατηγοριοποιηθούν με τον εξής τρόπο :

1. Μέθοδοι Διάχυσης
2. Χρωματομετρική μέθοδος οξίνισης
3. Άλλες Μέθοδοι

#### 4.1 Μέθοδοι Διάχυσης

Οι μέθοδοι της κατηγορίας αυτής, βασίζονται στην διάχυση των αντιβιοτικών του γάλακτος μέσα σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα και στην δημιουργία ζωνών αναστολής ανάπτυξης των ευάλωτων στα αντιβιοτικά μικροοργανισμών. Στην κατηγορία αυτή, ανήκει η μέθοδος των δίσκων καθώς και η μέθοδος των οπών στην οποία αντί το δείγμα του γάλακτος να βρίσκεται σε δίσκο απορροφητικού χαρτιού, τοποθετείται μέσα σε φρεάτια και διασπείρεται σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα.

#### 4.1.1 Μέθοδος δίσκων με *Bacillus stearotherophilus*

Ο μικροοργανισμός που χρησιμοποιείται στην συγκεκριμένη μέθοδο είναι το *Bacillus stearotherophilus* var. *Calidolactis* στέλεχος C953, ο οποίος κάτω από τις συνθήκες που υλοποιείται αυτή η μέθοδος, εμφανίζει την παρακάτω ευαισθησία :

Ουσία	Όριο Ανίχνευσης (ppb)
Βενζυλοπενικιλίνη	3,5
Αμπικιλίνη	5,0
Κλοξακιλλίνη	35
Οξυτετρακυκλίνη	500
Τετρακυκλίνη	400
Χλωροτετρακυκλίνη	450
Χλωραμφαινικόλη	15.000
Ερυθρομυκίνη	2.250
Σουλφοναμίδες	100-1.000

**Πίνακας 4.1 :** Ευαισθησία του *B. stearotherophilus* σε ορισμένες αντιμικροβιακές ουσίες (IDF 1991)

- **Προετοιμασία της καλλιέργειας του *B.stearotherophilus***

Στην περίπτωση που ο μικροοργανισμός διατίθεται σε μορφή λυοφιλοποιημένης καλλιέργειας, τότε επαναφέρεται και αναγεννάται με τέσσερις συνεχείς διόδους σε 10ml θρεπτικού ζωμού που έχει υποστεί αποστείρωση (B-76.4), σε φιάλες Erlenmeyer των 50 ml και ακολουθεί επώαση του στους 55°C για 24-28 ώρες. Από την αναγεννημένη καλλιέργεια, προκύπτει καλλιέργεια σε κεκλιμένο άγαρ συντήρησης (B-76.11) η οποία έχει την δυνατότητα να συντηρηθεί για περίπου 2 μήνες στους 0-5°C. Από τη συντηρημένη καλλιέργεια, γίνεται αναζωογόνηση με δύο το λιγότερο διόδους σε θρεπτικό ζωμό και τέλος, γίνεται ενοφθαλμισμός ποσότητας 0,1 ml της τελευταίας διόδου σε φιάλες Erlenmeyer που περιέχουν 10 ml θρεπτικού ζωμού. Ακολουθεί επώαση στους 55±1°C για 5-6 ώρες και η νεαρή καλλιέργεια χρησιμοποιείται για την προετοιμασία των τρυβλίων.

- **Προετοιμασία των Τρυβλίων**

Πραγματοποιείται ρευστοποίηση του υποστρώματος δοκιμής διάχυσης (B-76.6) ,με βρασμό σε υδατόλουτρο , στην συνέχεια σταθεροποιείται στους 55°C ,γίνεται ανάμιξη με την νεαρή καλλιέργεια δοκιμής σε αναλογία 1/10 και μοιράζεται ανά 5 ml σε τρυβλία διαμέτρου 85 mm. Το υπόστρωμα περιέχει περίπου 10<sup>7</sup>cfu/ml και είτε χρησιμοποιείται κατευθείαν μόλις γίνει στερεό είτε εντός 48 ωρών, εφ 'όσον συντηρηθεί σε ψυγείο και ενεργοποιηθεί πριν από την χρήση του με επώαση στους 55±1°C για 30min περίπου.

- **Προετοιμασία του δείγματος μάρτυρα πενικιλίνης G**

Την ημέρα της δοκιμής, το μητρικό διάλυμα της βενζυλοπενικιλίνης (πενικιλίνη G) υφίσταται διαδοχική αραιώση με απεσταγμένο νερό και τελικά μετατρέπεται σε

αναγεννημένη αποβουτυρωμένη γαλακτόσκονη, η οποία είναι απαραίτητο να περιέχει 6 prb (0,01 UI/ml) πενικιλίνης G.

- **Προετοιμασία του προς εξέταση δείγματος γάλακτος**

Το παστεριωμένο, αποστειρωμένο και UHT γάλα δεν χρειάζονται ειδική προετοιμασία. Αντιθέτως, το συμπυκνωμένο γάλα (εβαπορέ ή σακχαρούχο) χρήζει αραίωσης ώστε να έχει την φυσιολογική σύσταση γάλακτος. Η γαλακτόσκονη αναγεννάται διαλύοντας 5g σε 45 ml απεσταγμένου νερού και θερμαίνοντας την στους 45-50°C.

Το μη παστεριωμένο γάλα(νωπό) πρέπει προηγουμένως να θερμαίνεται στους 82±1°C για 5 min με σκοπό να καταστραφούν οι αντιμικροβιακές ουσίες που υπάρχουν φυσιολογικά σε αυτό, και να μειωθεί το μικροβιακό του φορτίο. Για το σκοπό αυτό μεταφέρονται 2 ml γάλακτος, σε δοκιμαστικό σωλήνα και τοποθετούνται σε υδατόλουτρο 82±1°C για ≥ 5min.

- **Προετοιμασία δείγματος με πενικιλινάση**

Γίνεται καλή ανακίνηση του δείγματος που πρόκειται να εξεταστεί και στην συνέχεια, ποσότητα 5 ml μεταφέρεται σε δοκιμαστικό σωλήνα στον οποίο προστίθενται ακόμη 0,1 ml πυκνού διαλύματος πενικιλινάσης (A-2) και ανακινείται καλά.

- **Εκτέλεση Δοκιμής**

Με τη βοήθεια αποστειρωμένης λαβίδας παραλαμβάνεται δίσκος διηθητικού χαρτιού και τοποθετείται στην επιφάνεια του υποστρώματος που περιέχει τον βάκιλο. Ασκείται πίεση στον δίσκο προκειμένου να έχει καλή επαφή και με το αυτόματο σιφώνιο προστίθενται στο δίσκο αμέσως (το πολύ εντός 60 sec) 100 ml γάλακτος προς εξέταση. Το ίδιο συμβαίνει τόσο με το δείγμα που περιέχει πενικιλινάση, όσο και με το δείγμα γάλακτος που περιέχει πενικιλίνη. Ακολουθεί επώαση των τρυβλίων στους 55±1°C για 2,5 -3 ώρες. Μετά την επώαση τα τρυβλία εξετάζονται για την ύπαρξη **διαυγούς ζώνης ανάσχεσης ανάπτυξης** του βάκιλου γύρω από τους δίσκους.

- **Ανάγνωση Αποτελεσμάτων**

- i. Θετικά θεωρούνται τα δείγματα που παρουσιάζουν ζώνη ανάσχεσης μικροβιακής ανάπτυξης με διάμετρο >14 mm.
- ii. Η απουσία της ζώνης ανάσχεσης σημαίνει ότι δεν υπάρχουν στο εξεταζόμενο δείγμα αντιμικροβιακές ουσίες.
- iii. Θετικό δείγμα, εφ' όσον δίνει αρνητικό αποτέλεσμα με την προσθήκη πενικιλινάσης, δηλώνει την ύπαρξη πενικιλίνης στο δείγμα.
- iv. Εάν η μέση διάμετρος των ζωνών ανάσχεσης του δείγματος είναι ίδια με την ανάσχεση που παράγεται στο ίδιο δείγμα με πενικιλινάση, αυτό δηλώνει την ύπαρξη πιθανών άλλων, εκτός πενικιλινών, αντιμικροβιακών ουσιών στο γάλα.

- v. Εάν η μέση διάμετρος των ζωνών ανάσχεσης του δείγματος είναι μεγαλύτερη από εκείνη του ίδιου δείγματος με πενικιλινάση αυτό υποδηλώνει ότι το δείγμα εκτός από κάποια πενικιλίνη περιέχει και άλλη ή άλλες αντιμικροβιακές ουσίες.

#### 4.1.2 Μέθοδος δίσκων με *Bacillus subtilis*

Στην μέθοδο αυτή, χρησιμοποιείται το στέλεχος ATCC 6693 του *Bacillus subtilis*, το οποίο υπό ορισμένες συνθήκες οι οποίες παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα, εμφανίζεται ευάλωτο.

Μελετώντας τον πίνακα, μπορούμε να αντιληφθούμε ότι η συγκεκριμένη μέθοδος παρουσιάζει ιδιαίτερη ευαισθησία στην ανίχνευση στρεπτομυκίνης και ερυθρομυκίνης, αλλά είναι δυνατή η ανίχνευση και άλλων αντιμικροβιακών ουσιών.

Ουσία	Όριο Ανίχνευσης (ppb)
Βενζυλοπενικιλίνη	18
Τετρακυκλίνη	5.000
Χλωραμφαινικόλη	10.000
Στρεπτομυκίνη	300
Ερυθρομυκίνη	100
Σουλφοναμίδες	100.000

**Πίνακας 4.2 :** Ευαισθησία του *B. subtilis* σε ορισμένες αντιμικροβιακές ουσίες (IDF 1991)

- **Προετοιμασία του μικροοργανισμού**

Τα βήματα που ακολουθούνται είναι τα εξής :

1. Αναγέννηση της λυοφιλοποιημένης καλλιέργειας: Γίνεται ασηπτική μεταφορά ενός μέρους της καλλιέργειας σε αποστειρωμένο δοκιμαστικό σωλήνα, και προστίθεται νερό. Στη συνέχεια γίνονται τέσσερις διόδοι σε 10 ml αποστειρωμένου θρεπτικού ζωμού (B-76.4 ) σε φιάλη Erlenmeyer με ενοφθαλμισμό κάθε φορά 0,1 ml και επώαση στους  $30\pm 1^{\circ}\text{C}$  για 12-16 ώρες.
2. Παραγωγή και προετοιμασία σπόρων : Ποσότητα 2 ml από πρόσφατα αναγεννημένη καλλιέργεια ενοφθαλμίζεται επιφανειακά με εξάπλωση σε υπόστρωμα σπορογονίας που έχει διανεμηθεί σε φιάλες Roux. Ακολουθεί επώαση στους  $30\pm 1^{\circ}\text{C}$  για 6-7 ημέρες και εφόσον ο έλεγχος της καλλιέργειας με χρώση πράσινο του μαλαχίτη (malachite green) ή με έλεγχο σε μικροσκόπιο αντίθετης φάσης , αποδείξει μετά την 5<sup>η</sup> ημέρα επαρκή σπορογονία , γίνεται συλλογή της καλλιέργειας και παραλαμβάνονται οι σπόροι με τον εξής τρόπο : γίνεται έκπλυση της καλλιέργειας που πολλαπλασιάστηκε στη φιάλη Roux, με αποστειρωμένο φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα και το εναιώρημα υποβάλλεται σε φυγόκεντρο σε 5000 x g για 15 min , σε θερμοκρασία 0-5°C. Απορρίπτεται το υπερκείμενο υγρό και το ίζημα υφίσταται έκπλυση και πάλι με αποστειρωμένο φωσφορικό διάλυμα και

αυτό επαναλαμβάνεται άλλες 2 φορές. Τελικά το ίζημα παραλαμβάνεται με 50 ml στείρου φωσφορικού ρυθμιστικού διαλύματος και τοποθετείται για συντήρηση στο ψυγείο.

3. Τιτλοποίηση εναιωρήματος σπόρων: Ποσότητα εναιωρήματος σπόρων 1,5 ml μεταφέρεται σε αποστειρωμένο δοκιμαστικό σωλήνα και μετά από τοποθέτηση σε υδατόλουτρο  $80\pm 1^{\circ}\text{C}$  για 15 min, γίνεται ενεργοποίηση των σπόρων. Στην συνέχεια γίνεται ψύξη του εναιωρήματος σε παγόλουτρο και προσδιορισμός της συγκέντρωσης των σπόρων με παρασκευή δεκαδικών αραιώσεων σε στείρο τρυπτονόχο αραιωτικό και ενοφθαλμισμό με ενσωμάτωση σε υπόστρωμα Agar medium N11 (υπόστρωμα δοκιμής διάχυσης) . Τα τρυβλία επωάζονται στους  $30\pm 1^{\circ}\text{C}$  για 24ώρες. Μετά την επώαση γίνεται η αρίθμηση των αποικιών και προσδιορίζεται η συγκέντρωση των σπόρων.

- **Προετοιμασία τρυβλίων με σπόρους *B. Subtilis***

Την ημέρα εξέτασης των δειγμάτων , γίνεται ρευστοποίηση του υποστρώματος δοκιμής διάχυσης με βρασμό και σταθεροποιείται στους  $55^{\circ}\text{C}$  σε υδατόλουτρο. Ενεργοποιούνται οι σπόροι του βακίλλου όπως περιγράφηκε και ανάλογα με την πυκνότητα του εναιωρήματος ορισμένη ποσότητα από τους ενεργοποιημένους σπόρους, αναμιγνύονται με το ρευστοποιημένο υπόστρωμα διάχυσης ,ώστε να έχουμε συγκέντρωση σπόρων της τάξης των 10 cfu/ml . Το μίγμα διαμοιράζεται ανά 5 ml σε τρυβλία διαμέτρου 85 mm και αφήνεται να στερεοποιηθεί.

- **Προετοιμασία δείγματος μάρτυρα στρεπτομυκίνης**

Την ημέρα δοκιμής αραιώνεται το μητρικό διάλυμα της στρεπτομυκίνης με αποστειρωμένο νερό , έτσι ώστε η τελευταία αραιώση που γίνεται σε στείρα αναγεννημένη αποβουτυρωμένη σκόνη γάλακτος, να περιέχει 500 rrb στρεπτομυκίνης.

- **Προετοιμασία του δείγματος γάλακτος**

Το παστεριωμένο, το αποστειρωμένο και το UHT γάλα , δεν απαιτούν ιδιαίτερη προετοιμασία . Το συμπυκνωμένο γάλα, υφίσταται αραιώση με στείρο απεσταγμένο νερό κατά το συντελεστή συμπύκνωσης . Η σκόνη γάλακτος αναγεννάται σε κανονική σύσταση γάλακτος (5g σε 45 ml αποστειρωμένου νερού  $45-50^{\circ}\text{C}$ ) . Το νωπό (μη παστεριωμένο) γάλα θερμαίνεται στους  $82\pm 1^{\circ}\text{C}$  για  $\geq 5$  min για να γίνει αδρανοποίηση των αντιμικροβιακών ουσιών που υπάρχουν φυσιολογικά στο γάλα και να μειωθεί το μικροβιακό του φορτίο .

- **Εκτέλεση της δοκιμής**

Με αποστειρωμένη λαβίδα παραλαμβάνεται δίσκος διηθητικού χαρτιού και τοποθετείται στην επιφάνεια του τρυβλίου, που περιέχει το στερεό μίγμα βακίλλου/υποστρώματος διάχυσης και πιέζεται, ώστε να έχει καλή επαφή. Ο δίσκος τοποθετείται σε ένα από τους 6 χώρους στους οποίους έχει χωριστεί το υπόστρωμα με σήμανση στην εξωτερική επιφάνεια του τρυβλίου. Πάνω στον δίσκο αφήνονται 100 μl δείγματος με τη βοήθεια του αυτόματου σιφωνίου. Η εργασία αυτή γίνεται πολύ γρήγορα ( εντός 60 sec). Κατά τον ίδιο τρόπο τοποθετείται και δείγμα μάρτυρα με στρεπτομυκίνη. Στα άλλα χωρίσματα τοποθετούνται άλλα δείγματα και ένας ακόμη μάρτυρας στρεπτομυκίνης. Τα τρυβλία επωάζονται ανεστραμμένα στους 37±1°C για 3,5 έως 4 ώρες. Μετά την επώαση τα τρυβλία εξετάζονται για παρουσία διαυγών ζωνών ανάσχεσης γύρω από τους δίσκους.

- **Έκφραση αποτελεσμάτων**

Θετικά θεωρούνται τα δείγματα που εμφανίζουν ζώνη ανάσχεσης μαζί με το δίσκο μεγαλύτερη των 14 mm (13 mm διάμετρος δίσκου). Οι ζώνες ανάσχεσης γύρω από τους δίσκους των 13 mm που περιέχουν το πρότυπο δείγμα γάλακτος με 500 ppb (0,5 μg/ml) πρέπει να έχουν διάμετρο ≥14 mm.

#### 4.1.3 Μέθοδος δίσκων με *Bacillus megaterium*

Στην συγκεκριμένη δοκιμή, προκειμένου να ανιχνευθούν αντιμικροβιακές ουσίες στο γάλα, χρησιμοποιείται ο *Bacillus megaterium* στέλεχος ATCC 9885. Η μέθοδος αυτή, παρουσιάζει ευαισθησία στην ανίχνευση χλωραμφαινικόλης και σουλφοναμιδίων. Η ευαισθησία ανίχνευσης για κάποιες αντιμικροβιακές ουσίες παρουσιάζεται στον παρακάτω πίνακα :

Ουσία	Όριο Ανίχνευσης (ppb)
Βενζυλοπενικιλίνη	12
Τετρακυκλίνη	1.500
Χλωραμφαινικόλη	2.000
Στρεπτομυκίνη	1.200
Ερυθρομυκίνη	200
Σουλφοναμίδες (σουλφαδιαζίνη)	100- 1.000

**Πίνακας 4.3 :** Ευαισθησία του *B.megaterium* σε ορισμένες αντιμικροβιακές ουσίες (IDF 1991)



- **Προετοιμασία του μικροοργανισμού**

1. Αναγέννηση λυοφιλοποιημένης καλλιέργειας: Μέρος της λυοφιλοποιημένης καλλιέργειας μεταφέρεται σε δοκιμαστικό σωλήνα και ενυδατώνεται με στείρο απεσταγμένο νερό . Στη συνέχεια αναζωογονείται πλήρως με τέσσερις διόδους από 0,1 ml σε 10 ml αποστειρωμένου θρεπτικού ζωμού (B-4) και επώαση στους  $37\pm 1^{\circ}\text{C}$  για 12-16 ώρες. Εναλλακτικά μπορεί η αναγέννηση να πραγματοποιηθεί σε σωλήνες με κεκλιμένο άγαρ Muller-Hinton.
2. Παραγωγή και προετοιμασία των σπόρων: Ποσότητα 2 ml της πρόσφατα αναγεννημένης καλλιέργειας ενοφθαλμίζεται επιφανειακά με τη βοήθεια κεκαμένης υάλινης ράβδου σε υπόστρωμα σπορογονίας που έχει διανεμηθεί σε φιάλες Roux και ακολουθεί επώαση στους  $37\pm 1^{\circ}\text{C}$  για 4-5 ημέρες . Μετά την τρίτη ημέρα γίνονται έλεγχοι του ποσοστού σπορογονίας με χρώση πράσινου του μαλαχίτη (malachite green) και οι σπόροι συλλέγονται όταν η σπορογονία φθάσει το 90%. Για τη συλλογή των σπόρων η καλλιέργεια παραλαμβάνεται με 20-25ml αποστειρωμένου φωσφορικού ρυθμιστικού διαλύματος. Ακολουθεί φυγοκέντρηση σε 5000 g σε ψυχόμενη φυγόκεντρο και το ίζημα εκπλένεται 3 φορές με 50 ml στείρου φωσφορικού ρυθμιστικού διαλύματος μετά από κάθε φυγοκέντρηση. Τελικά το ίζημα εναιωρείται σε 50 ml στείρου φωσφορικού ρυθμιστικού διαλύματος και συντηρείται έως 6 μήνες στους  $0-5^{\circ}\text{C}$ .
3. Τιτλοποίηση εναιωρήματος σπόρων: Ποσότητα 1,5 ml εναιωρήματος σπόρων μεταφέρεται σε δοκιμαστικό σωλήνα και ενεργοποιούνται οι σπόροι με θέρμανση στους  $80\pm 1^{\circ}\text{C}$  για 15min σε υδατόλουτρο . Ακολουθεί ψύξη σε παγόλουτρο και αρίθμηση των σπόρων σε υπόστρωμα Muller-Hinton αφού γίνουν οι απαραίτητες δεκαδικές αραιώσεις με στείρο τρυπτονόχο αραιωτικό. Τα τρυβλία επωάζονται στους  $37\pm 1^{\circ}\text{C}$  για 48 ώρες.

- **Προετοιμασία τρυβλίων με σπόρους *B. megaterium***

Την ημέρα εξέτασης των δειγμάτων , γίνεται ρευστοποίηση του υποστρώματος δοκιμής διάχυσης με βρασμό και αναμιγνύεται με ορισμένη ποσότητα του εναιωρήματος ενεργοποιημένων/τιτλοδοτημένων σπόρων ώστε να επιτευχθεί συγκέντρωση σπόρων στο υπόστρωμα της τάξεως του 10cfu/ml. Το μίγμα διαμοιράζεται ανά 5 ml σε τρυβλία διαμέτρου 85 mm. Μετά τη στερεοποίηση τα τρυβλία πρέπει να χρησιμοποιηθούν αμέσως ή εντός της ημέρας αφού τοποθετηθούν σε ψυγείο .

- **Προετοιμασία δείγματος μάρτυρα χλωραμφαινικόλης**

Την ημέρα της δοκιμής το μητρικό διάλυμα χλωραμφαινικόλης, αραιώνεται με αποστειρωμένο νερό , έτσι ώστε η τελική αραιώση που γίνεται με αναγεννημένη αποβουτυρωμένη σκόνη γάλακτος να περιέχει 2.500 prb (2,5  $\mu\text{g/ml}$  ).

- **Προετοιμασία δείγματος μάρτυρα με σουλφαθειαζόλη**

Παράλληλα με το δείγμα μάρτυρα χλωραμφαινικόλης, παρασκευάζεται με την ίδια μέθοδο από το μητρικό διάλυμα σουλφαθειαζόλης δείγμα μάρτυρας που περιέχει 1.000 ppb (1,0 μg/ml ) σουλφαθειαζόλης.

- **Προετοιμασία δείγματος μάρτυρα με αμινο-4-βενζοϊκό οξύ**

Από το δείγμα γάλακτος που πρόκειται να εξεταστεί λαμβάνονται 2 ml, μεταφέρονται σε στείρο δοκιμαστικό σωλήνα και σ' αυτό προστίθεται 0,1 ml μητρικού διαλύματος αμινο-4-βενζοϊκού οξέος και το περιεχόμενο ανακινείται έντονα .

- **Προετοιμασία του δείγματος για εξέταση**

Όλα τα θερμικά επεξεργασμένα γάλατα εξετάζονται ως έχουν . Το συμπυκνωμένο γάλα και η σκόνη γάλακτος αναγεννάται αναλόγως ώστε να επιτευχθεί φυσιολογική σύσταση γάλακτος. Το νωπό γάλα θερμαίνεται στους  $82\pm 1^{\circ}\text{C}$  για 5 min για να γίνει αδρανοποίηση των αντιμικροβιακών ουσιών που υπάρχουν φυσιολογικά στο νωπό γάλα και να μειωθεί το μικροβιακό του φορτίο .

- **Εκτέλεση της δοκιμής**

Στην επιφάνεια του υποστρώματος που περιέχει τους σπόρους του *B. megaterium* τοποθετείται με λαβίδα δίσκος διηθητικού χάρτη στο κέντρο του χώρου που έχει σημειωθεί (η βάση του τρυβλίου διαιρείται σε 4 ή 6 ίσα τμήματα ) . Ο δίσκος εμποτίζεται με 100 μl δείγματος. Η ίδια διαδικασία εφαρμόζεται και στα δείγματα μάρτυρες χλωραμφαινικόλης , σουλφαθειαζόλης και αμινο-4-βενζοϊκού οξέος. Ακολουθεί επώαση στους  $37\pm 1^{\circ}\text{C}$  για 4,5-5 ώρες.

- **Εκτίμηση αποτελεσμάτων**

Μετά την επώαση τα τρυβλία εξετάζονται για ύπαρξη ζωνών ανάσχεσης ανάπτυξης. Μετράται η συνολική διάμετρος των ζωνών (του δίσκου συμπεριλαμβανομένου) και γίνεται η εκτίμηση ως εξής:

Οι ζώνες ανάπτυξης γύρω από τους δίσκους μάρτυρα χλωραμφαινικόλης και σουλφαθειαζόλης πρέπει να είναι τουλάχιστον 14 mm σε διάμετρο. Η παρουσία ζώνης ανάσχεσης τουλάχιστον 14 mm στους δίσκους με δείγματα προς εξέταση, δείχνει την ύπαρξη αντιμικροβιακών ουσιών στο γάλα. Εάν παράλληλα στο δίσκο με μάρτυρα αμινο-4-βενζοϊκό οξύ δεν υπάρχει ζώνη, τότε η ανάσχεση που παρατηρείται στο δείγμα οφείλεται σε κάποια σουλφοναμίδη, ενώ εάν υπάρχει ζώνη τότε : εάν η ζώνη είναι ίσης διαμέτρου τότε το δείγμα περιέχει άλλες πλην σουλφοναμιδών, αντιμικροβιακές ουσίες

εάν η ζώνη ανάσχεσης είναι μικρότερης διαμέτρου από τη μέση διάμετρο του δείγματος τότε το δείγμα περιέχει και σουλφοναμίδες.

## 4.2 ΧΡΩΜΑΤΟΜΕΤΡΙΚΗ ΜΕΘΟΔΟΣ ΟΞΙΝΙΣΗΣ

Με την συγκεκριμένη μέθοδο, διαπιστώνεται η ανάπτυξη ενός ευάλωτου σε αντιμικροβιακές ουσίες μικροοργανισμού με την παραγωγή οξέος στο υπόστρωμα, που οφείλεται στην μεταβολική δραστηριότητα του στελέχους το οποίο χρησιμοποιείται. Η παραγωγή οξέος, διαπιστώνεται από την αλλαγή χρώματος που υφίσταται στο υπόστρωμα, λόγω ενσωμάτωσης του κατάλληλου δείκτη. Στην μέθοδο αυτή, χρησιμοποιείται ως μικροοργανισμός δοκιμής ο *Streptococcus thermophilus* στέλεχος TJ. Το συγκεκριμένο στέλεχος, υποβαλλόμενο στις συνθήκες της συγκεκριμένης μεθόδου, δείχνει ευαισθησία ανίχνευσης η οποία παρουσιάζεται για μερικές μικροβιακές ουσίες στον παρακάτω πίνακα :

Ουσία	Όριο Ανίχνευσης (ppb)
Βενζυλοπενικιλίνη	3
Αμπικιλίνη	5
Κλοξακιλλίνη	200
Οξυτετρακυκλίνη	400
Τετρακυκλίνη	400
Στρεπτομυκίνη	5.000
Χλωραμφαινικόλη	1.200
Ερυθρομυκίνη	60
Σουλφοναμίδες	100-1.000

**Πίνακας 4.4** :Ευαισθησία του *S.thermophilus* TJ σε ορισμένες αντιμικροβιακές ουσίες (IDF 1991)

- **Προετοιμασία του μικροοργανισμού**

Ο μικροοργανισμός εφ' όσον προέρχεται από λυοφιλοποιημένη καλλιέργεια **αναγεννάζεται** με τρεις διαδοχικές διόδους σε 10 ml στείρας αναγεννημένης σκόνης γάλακτος με επώαση στους 37±1°C για 16-18 ώρες, Η συντήρηση του στελέχους μπορεί να γίνει σε 10 ml αναγεννημένης αποβουτυρωμένης σκόνης γάλακτος στους -25°C για 2-3 μήνες. Η καλλιέργεια δοκιμής παρασκευάζεται από καλλιέργεια συντήρησης που αφού αποψυχθεί σε υδατόλουτρο 40±1°C επώαζεται στους 37±1°C για 16-18 ώρες. Από αυτή την καλλιέργεια παρασκευάζεται τελική καλλιέργεια που περιέχει:

- ❖ 10ml 18ωρης καλλιέργειας
- ❖ 5 ml διαλύματος yeast extract
- ❖ 10 ml διαλύματος bromocresol purple

- **Προετοιμασία του προς εξέταση δείγματος**

Το δείγμα γάλακτος είτε ως έχει είτε αναγεννημένο σε αναλογία συστατικών κανονικού γάλακτος υποβάλλεται σε θέρμανση 100°C για 5 min σε υδατόλουτρο. Για το σκοπό αυτό

ποσότητα 2 ml φέρεται σε δοκιμαστικό σωλήνα και βυθίζεται σε υδατόλουτρο ώστε η στάθμη του δείγματος να είναι 2 cm κάτω της στάθμης του νερού. Με την ίδια διαδικασία προετοιμάζονται:

- ❖ Ένας σωλήνας με 2 ml δείγματος αναγεννημένης σκόνης γάλακτος (αρνητικός μάρτυρας)
- ❖ Ένας σωλήνας με 2 ml δείγματος μάρτυρα πενικιλίνης.
- ❖ Ένας σωλήνας με 2 ml δείγματος μάρτυρα σουλφαθειαζόλης

#### • **Εκτέλεση της δοκιμής**

Σε κάθε σωλήνα (μάρτυρες και δείγμα) που προετοιμάστηκε όπως περιγράφηκε στην παράγραφο παραπάνω προστίθενται και 0,2 ml του διαλύματος τριμεθοπρίμης. Γίνεται ανάμιξη του περιεχομένου και επώαση σε υδατόλουτρο στους  $45\pm 0,5^{\circ}\text{C}$  για 2,5 ώρες.

#### • **Έκφραση αποτελέσματος**

Μετά το τέλος της επώασης εξετάζεται το χρώμα του γάλακτος στο σωλήνα:

- ❖ Εάν το χρώμα του δείγματος είναι κίτρινο το αποτέλεσμα κρίνεται ως αρνητικό. Το δείγμα δεν περιέχει ανιχνεύσιμες αντιμικροβιακές ουσίες.
- ❖ Εάν το χρώμα του δείγματος είναι μπλε τότε το αποτέλεσμα κρίνεται ως θετικό, δηλαδή το δείγμα περιέχει ανιχνεύσιμη συγκέντρωση αντιμικροβιακών ουσιών.
- ❖ Εάν το προς εξέταση δείγμα έχει ενδιάμεση απόχρωση μεταξύ του χρώματος του δείγματος μάρτυρα με πενικιλίνη και του αρνητικού μάρτυρα, το αποτέλεσμα κρίνεται αμφίβολο. Στις δύο τελευταίες περιπτώσεις το προς εξέταση δείγμα πρέπει να υποβάλλεται, το συντομότερο, στις διαδικασίες ταυτοποίησης πενικιλινών και σουλφοναμιδών κατά τα αναφερόμενα παρακάτω.

#### • **Ταυτοποίηση πενικιλίνης**

Ποσότητα δείγματος 5 ml μεταφέρεται σε δοκιμαστικό σωλήνα και θερμαίνεται σε υδατόλουτρο στους  $100^{\circ}\text{C}$  για 5 min. Ακολουθεί ψύξη στους  $37^{\circ}\text{C}$  και προσθήκη 0,1ml πυκνού διαλύματος πενικιλινάσης. Με την ίδια διαδικασία προετοιμάζονται:

- ❖ Ένας σωλήνας με αρνητικό μάρτυρα (5ml αναγεννημένη αποβουτυρωμένη σκόνη γάλακτος).
- ❖ Ένας σωλήνας με δείγμα μάρτυρα πενικιλίνης.

Οι σωλήνες επωάζονται σε κλίβανο στους  $37\pm 1^{\circ}\text{C}$  για 20 min τουλάχιστον. Μετά το τέλος της επώασης 2 ml γάλακτος από κάθε σωλήνα μεταφέρονται σε αποστειρωμένους δοκιμαστικούς σωλήνες. Ετοιμάζεται και ένας επιπλέον σωλήνας με 2 ml δείγματος γάλακτος που είναι προς εξέταση και το οποίο θερμαίνεται στους  $100^{\circ}\text{C}$  για 5 min, αλλά δεν προστίθεται πενικιλινάση. Σε κάθε έναν από τους παραπάνω σωλήνες προσθέτονται με αυτόματο σιφώνιο 100ml καλλιέργειας δοκιμής. Ακολουθεί επώαση στους  $45\pm 0,5^{\circ}\text{C}$  για 2,5 ώρες.

- **Έκφραση αποτελεσμάτων**

Ο αρνητικός μάρτυρας πρέπει να έχει κίτρινο χρώμα . Το δείγμα μάρτυρας πενικιλίνης που περιέχει πενικιλινάση πρέπει ομοίως να έχει κίτρινο χρώμα . Εάν το ύποπτο δείγμα ,στο οποίο έχει προστεθεί πενικιλινάση , έχει κίτρινο χρώμα τότε το γάλα περιέχει πενικιλίνη . Εάν έχει μπλε χρώμα τότε πιθανόν να υπάρχουν άλλες πλην, πενικιλινών, αντιμικροβιακές ουσίες. Εάν το προς εξέταση δείγμα γάλακτος στο οποίο έχει προστεθεί πενικιλινάση έχει ενδιάμεση απόχρωση, τότε περιέχει , εκτός πενικιλίνης , και άλλες αντιμικροβιακές ουσίες. Η εμφάνιση μπλε χρώματος στο προς εξέταση δείγμα που δεν περιέχει πενικιλινάση, επιβεβαιώνει το αποτέλεσμα της πρώτης εξέτασης.

- **Ταυτοποίηση σουλφοναμιδών**

Ποσότητα 2 ml από το προς εξέταση δείγμα θερμαίνεται στους 100°C για 5 min. Ψύχεται στους 45°C και προστίθενται 0,1 ml μητρικού διαλύματος αμινο-4-βενζοϊκού οξέος. Με την ίδια διαδικασία προετοιμάζονται:

- Ένας σωλήνας με αρνητικό μάρτυρα (2 ml αναγεννημένης αποστειρωμένης σκόνης γάλακτος)
- Ένας σωλήνας με θετικό μάρτυρα (σουλφαθειαζόλη).
- Ένας σωλήνας με δείγμα γάλακτος που θερμάνθηκε στους 100°C για 5 min , αλλά χωρίς αμινο-4-βενζοϊκό οξύ.

Σε καθένα από τους παραπάνω σωλήνες προσθέτονται 100 μl καλλιέργειας δοκιμής και 0,2 ml μητρικού διαλύματος τριμεθοπρίμης και οι σωλήνες επωάζονται σε υδατόλουτρο στους 45±0,5°C για 2,5 ώρες . Μετά το τέλος της επώασης εξετάζονται οι σωλήνες για αλλαγή χρώματος οπότε:

- Ο αρνητικός μάρτυρας πρέπει να έχει κίτρινο χρώμα .
- Ο σωλήνας μάρτυρας που περιέχει σουλφαθειαζόλη και αμινο-4-βενζοϊκό οξύ πρέπει να έχει ομοίως κίτρινο χρώμα . Εάν έχει ενδιάμεσο χρωματισμό ή μπλε χρώμα σημαίνει ανεπαρκή ποσότητα αμινο-4-βενζοϊκού οξέος.
- Εάν το ύποπτο δείγμα γάλακτος στο οποίο έχει προστεθεί αμινο-4-βενζοϊκό οξύ έχει κίτρινο χρώμα τότε το γάλα περιέχει κάποια σουλφοναμίδη . Η εμφάνιση μπλε χρώματος υποδηλώνει αντιμικροβιακές ουσίες πλην σουλφοναμιδών ή ανεπαρκή ποσότητα αμινο-4-βενζοϊκού οξέος
- Εάν το προς εξέταση δείγμα γάλακτος στο οποίο έχει προστεθεί αμινο-4-βενζοϊκό οξύ έχει ενδιάμεσο χρωματισμό τότε το γάλα περιέχει μαζί με τις σουλφοναμίδες και άλλες αντιμικροβιακές ουσίες .
- Η εμφάνιση μπλε χρώματος στο προς εξέταση δείγμα γάλακτος που δεν έχει αμινο-4-βενζοϊκό οξύ επιβεβαιώνει το αποτέλεσμα της πρώτης εξέτασης.

## 4.3 ΑΛΛΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ

### 4.3.1 Delvotest® (Pater 1976; APHA 2004)

Η δοκιμή και το όνομα είναι εμπορικά κατοχυρωμένα και κυκλοφορεί σε τυποποιημένη μορφή (kit). Το τεστ αυτό παρασκευάζεται από την εταιρεία Gist-Brocades NY και αποτελείται από αμπούλες ή κυψελίδες μέσα στις οποίες σε στερεό υπόστρωμα είναι διασπαρμένα τα σπόρια του *Bacillus Stearothermophilus*, με τέτοιο τρόπο, ώστε να εξασφαλίζεται άριστη ανάπτυξη του μικροοργανισμού. Βασίζεται στην γρήγορη ανάπτυξη του *Bacillus Stearothermophilus* var. *calidolactis*, την παραγωγή οξέος στο υπόστρωμα και την αλλαγή του χρώματος λόγω παρουσίας δείκτη πορφυρό βρωμοκρεσόλης. Τα θρεπτικά συστατικά, τα απαραίτητα για την ανάπτυξη του μικροοργανισμού, προστίθενται με την μορφή ταμπλέτας, που διατίθεται χωριστά. Η ταμπλέτα περιέχει επίσης και τον δείκτη. Όταν ο έλεγχος γίνεται σε γάλα χωρίς αντιβιοτικά, το χρώμα του δείκτη αλλάζει και γίνεται κίτρινο, λόγω της παραγωγής οξέος από τον μικροοργανισμό που αναπτύχθηκε. Η ευαισθησία κυμαίνεται περίξ των 0,005 UI/ml (3 µg/l) στο ρευστό γάλα, πλην αυτού που δεν έχει έγχρωμα πρόσθετα (π.χ. γάλα με κακάο). Είναι κατάλληλη για την ανίχνευση κυρίως πενικιλινών.

#### Διαδικασία

- Σε κάθε αμπούλα ή κυψελίδα, με λαβίδα τοποθετούμε από μία ταμπλέτα.
- Χρησιμοποιώντας σύριγγα με υποδοχή (μίας χρήσεως), παίρνουμε δείγμα γάλακτος 0,1ml.
- Τοποθετούμε τις αμπούλες ή κυψελίδες σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας 64°C (63-66°C ανεκτό εύρος).
- Διαβάζουμε τα αποτελέσματα μετά από 2,5 ώρες.

#### Ανάγνωση Αποτελεσμάτων

- Θετικό (+)** : Το χρώμα είναι σε ολόκληρη την αμπούλα έντονα πορφυρό, πράγμα που αποτελεί ένδειξη για την παρουσία ανασταλτικών παραγόντων. Στην περίπτωση παρουσίας πενικιλίνης, η συγκέντρωση της είναι μεγαλύτερη των 0,006 IU.
- Αμφίβολο (±)** : Το χρώμα είναι ελαφρά πορφυρό. Στην περίπτωση αυτή, ο έλεγχος επαναλαμβάνεται, ή μπορεί το γάλα να περιέχει μικρότερες ποσότητες αντιβιοτικών.
- Αρνητικό(-)** : Το χρώμα είναι σε ολόκληρη την αμπούλα κίτρινο, πράγμα που αποτελεί ένδειξη ότι ο μικροοργανισμός αναπτύχθηκε και παρήγαγε οξύ.

#### Παρατηρήσεις

Το τεστ αυτό έχει τα εξής πλεονεκτήματα:

- Η υψηλή θερμοκρασία επώασης των 63°C παρεμποδίζει την παρεμβολή των μικροοργανισμών του γάλακτος
- Με την χρησιμοποίηση στερεού υποστρώματος παρεμποδίζεται η παρεμβολή διαφόρων ανασταλτικών ουσιών (μεγάλου μοριακού βάρους, όπως των φυσικών αντιμικροβιακών ουσιών του γάλακτος, που είναι πρωτεϊνικής φύσης) που δεν

διαχέονται εύκολα στο άγαρ (για τον λόγο αυτόν δεν συνιστάται η θερμική επεξεργασία του νωπού γάλακτος)

- c. Το τεστ δεν είναι ευαίσθητο στα απορρυπαντικά και απολυμαντικά

#### 4.3.2 Penzyme® και PenzymeIII®

Και οι δοκιμές αυτές κυκλοφορούν σε τυποποιημένη μορφή (kit) και είναι εμπορικά κατοχυρωμένες . Βασίζονται στη σύνδεση του αντιβιοτικού (beta lactam) με το ένζυμο DD carboxy-peptidase. Μετά την αρχική επώαση του ενζύμου με το δείγμα, ένα υπόστρωμα το R-D-ala-D-ala προστίθεται στο σύστημα το οποίο αντιδρά με το μη δεσμευμένο ένζυμο και ελευθερώνει D-ala . Το ελεύθερο D-ala οξειδώνεται σε πυροσταφυλικό οξύ και υπεροξειδίο του υδρογόνου, παρουσία άλλων ενζύμων και flavine adenine dinucleotide (FAD).

Οι άχρωμοι δείκτες οξειδώνονται από το υπεροξειδίο του υδρογόνου παρουσία υπεροξειδάσης και χρωματίζουν το υπόστρωμα ερυθρώ (pink). Η ευαισθησία της μεθόδου για την βενζυλοπενικιλίνη είναι περίπου 0,005 IU/ml (3,0 µg/l) στο νωπό γάλα.

#### 4.3.3 Δοκιμές Charm®(APHA 2004)

Πρόκειται για μια σειρά από κατοχυρωμένες εμπορικά δοκιμές με διάφορα ονόματα (π.χ. Charm, Charm I, Charm II κτλ.) οι οποίες στηρίζονται στις ιδιότητες που έχουν οι αντιμικροβιακές ουσίες να προσβάλλουν συγκεκριμένο σημείο του βακτηριακού κυττάρου. Ως βακτήριο χρησιμοποιείται ο *B.stearothermophilus* και ως ανταγωνιστής της αντιμικροβιακής ουσίας που ανιχνεύεται χρησιμοποιείται ραδιοσημασμένη με <sup>14</sup>C αντιμικροβιακή ουσία. Το αποτέλεσμα εκτιμάται σε μετρητή κρούσεων και συγκρίνεται πάντα προς αρνητικό μάρτυρα.

#### 4.3.4 Δοκιμές SPOT®(Ryan και συν. 1986; APHA 2004)

Πρόκειται για ανοσοχημική μέθοδο (latex agglutination immunoassay ή spot test) που βασίζεται στη χρήση μονοκλωνικών αντισωμάτων και ειδικών σωματιδίων latex, η επιφάνεια των οποίων φέρει προσκολλημένη την ουσία που θέλουμε να ανιχνεύσουμε. Εφαρμόζεται στην ανίχνευση της πενικιλίνης G, της κλοξακιλλίνης και της κεφαπυρίνης σε νωπό γάλα. Η παρουσία των αντιβιοτικών αυτών στο προς εξέταση δείγμα γάλακτος δεσμεύει τα αντισώματα οπότε δεν παρατηρείται συγκόλληση σωματιδίων τα οποία παραμένουν σε μορφή γαλακτώματος. Στην αντίθετη περίπτωση τα σωματίδια συγκολλούνται ισχυρά . Η χρονική διάρκεια της μεθόδου είναι μόνο 8 min. Η δοκιμή κυκλοφορεί στο εμπόριο με εμπορική κατοχύρωση.

#### 4.3.5 Άλλες ανοσοχημικές μέθοδοι

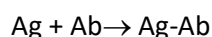
Στο εμπόριο έχουν κυκλοφορήσει με τη μορφή εμπορικώς κατοχυρωμένων τυποποιημένων δοκιμών (kit) μια σειρά από μεθόδους, οι οποίες χρησιμοποιούν αντισώματα για την ανίχνευση των καταλοίπων "αντιγόνων", (αντιβιοτικών ή άλλων φαρμάκων), στο γάλα. Οι δοκιμές αυτές βασίζονται στην τεχνική ELISA και είναι πολύ χρήσιμες κυρίως στα εργαστήρια ελέγχου των ιδίων των γαλακτοβιομηχανιών προκειμένου να εξεταστεί μεγάλος αριθμός δειγμάτων και το αποτέλεσμα να δίδεται πολύ γρήγορα, ώστε να μπορεί να αξιοποιηθεί το γάλα. Οι τυποποιημένες αυτές δοκιμές κυκλοφορούν με διάφορα εμπορικά ονόματα όπως Lac Tek®, Signal® detection test, Ez-screen® Agri-Screen® κτλ.).

#### 4.3.6. Ενζυμική ανοσολογική μέθοδος ELISA

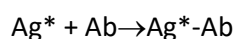
Η μέθοδος ELISA είναι μια τεχνική η οποία χρησιμοποιείται κυρίως στην ανοσολογία για την ανίχνευση της παρουσίας ενός αντιγόνου ή ενός αντισώματος σε ένα δείγμα. Η συγκεκριμένη μέθοδος έχει ευρείες εφαρμογές όπως είναι η ανίχνευση ενός αντιγόνου ή ενός αντισώματος στον ορό, έχει εφαρμογές στη βιομηχανία τροφίμων για την ανίχνευση δυνητικά αλλεργιογόνων τροφών όπως είναι τα φιστίκια, το γάλα, το αμύγδαλο κ.α. και τέλος, χρησιμοποιείται στην τοξικολογία. Οι τεχνικές της ELISA μπορούν να χρησιμοποιηθούν τόσο για ποιοτική όσο και για ποσοτική ανάλυση. Η ποιοτική ανάλυση φανερώνει την ύπαρξη ή μη θετικού αποτελέσματος σε ένα δείγμα. Η ποσοτική ανάλυση δε βασίζεται μόνο στη μέτρηση της απορρόφησης (O.D.). Η ποσοτική μέτρηση της αλληλεπίδρασης αντιγόνου-αντισώματος μπορεί να γίνει με διάφορους τρόπους όπως:

1. Επισήμανση με ραδιενεργά (ραδιοανοσολογικός προσδιορισμός – RIA). Επισήμανση με ένζυμο (ανοσοενζυμικός προσδιορισμός – EIA). Στην περίπτωση που χρησιμοποιούνται οι αντιδράσεις ένζυμου – υποστρώματος για τον ποσοτικό προσδιορισμό της ουσίας που μας ενδιαφέρει.
2. Χρήση φθορίζοντων συστατικών, ως ιχνηθετών, μαζί με υποστρώματα που προκαλούν φθορισμό (φθορισμομετρικός προσδιορισμός – FIA) (Medlineplus, 2007)

Η αρχή της μεθόδου της ELISA βασίζεται στην ειδική δέσμευση αντιγόνου αντισώματος. Το αντιγόνο (Ag) με το αντίσωμα (Ab) συνδέονται με τρόπο ειδικό και αμφίδρομο και σχηματίζουν ένα σύμπλοκο το οποίο μπορεί να διαχωριστεί από τα υπόλοιπα ελεύθερα μόρια του δείγματος που εξετάζεται (Sblattero D., 2000).



Μια ανάλογη ισορροπία αποκαθίσταται μεταξύ ενός επισημασμένου αντιγόνου και αντισώματος.





Το αντίσωμα αποτελείται από μια βαριά και μια ελαφριά αλυσίδα. Στην ελαφριά αλυσίδα υπάρχει μια σταθερή περιοχή καθώς και η ειδική θέση δέσμευσης του αντιγόνου με το αντίσωμα (Κωτίτσας, 2007).

Στην ELISA η επισήμανση πραγματοποιείται με τη σύνδεση ενός ενζύμου στο προς ιχνηθέτηση αντιγόνο ή αντίσωμα. Ο προσδιορισμός του συνδεδεμένου αντισώματος απαιτεί την προσθήκη του υποστρώματος και τη μέτρηση μιας καταλυτικής αντίδρασης ενζύμου – υποστρώματος. Μια μικρή σχετικά ποσότητα ενζύμου μπορεί να προκαλέσει σε σύντομο χρόνο τη μετατροπή μεγάλης ποσότητας υποστρώματος, σε έγχρωμο προϊόν. Η παραγωγή αυτού του προϊόντος σταματάει με την προσθήκη ενός συγκεκριμένου αντιδραστήριου (συνήθως οξύ) και μετράται η απορρόφησή του με τη βοήθεια ειδικού φασματοφωτομέτρου τύπου ELISA (Lequin R., 2005).

Οι μέθοδοι της ELISA διακρίνονται σε:

1. Ανταγωνιστικές
2. Μη Ανταγωνιστικές

#### **4.3.6.1 Ανταγωνιστική Μέθοδος ELISA**

Στην ανταγωνιστική μέθοδο, ο επισημασμένος ιχνηθέτης είναι το ίδιο το αντιγόνο. Το αντιγόνο που πρόκειται να μετρηθεί καθώς και το επισημασμένο αντιγόνο ανταγωνίζονται για τη δέσμευση με το περιορισμένο σε ποσότητα αντίσωμα γι' αυτό και το αποτέλεσμα της αντίδρασης είναι αντιστρόφως ανάλογο με τη συγκέντρωση του μετρούμενου αντιγόνου στο δείγμα. Τα στάδια της ανταγωνιστικής μεθόδου είναι τα εξής:

1. Αρχικά, το ειδικό αντίσωμα ακινητοποιείται στο πλακίδιο εργασίας,
2. Ακολουθεί η προσθήκη του αντιγόνου, το αντίσωμα πρέπει να είναι σε περίσσεια και να πιάνει όλο το αντιγόνο.
3. Στη συνέχεια προστίθεται το ιχνηθετημένο με ένζυμο αντιγόνο το οποίο ανταγωνίζεται με το ήδη υπάρχον αντίγονο για τη σύνδεση με το ακινητοποιημένο αντίσωμα. Το δείγμα και το ιχνηθετημένο αντιγόνο προστίθενται ταυτόχρονα. Γίνεται επώαση και πλύση 2-3 φορές ώστε να απομακρυνθεί ό, τι δεν δεσμεύτηκε.
4. Τέλος, προστίθεται το υπόστρωμα του ενζύμου, γίνεται επώαση κατά την οποία πραγματοποιείται η αντίδραση και σαν αποτέλεσμα είναι η παραγωγή του προϊόντος. Το υπόστρωμα του ενζύμου μπορεί να είναι χρωμογόνο ή χημειοφωταυγειογόνο, οπότε αντίστοιχα μετράται η απορρόφηση του διαλύματος ή η ένταση της παραγόμενης χημειοφωταύγειας (Schuurs AHWM, 1980, Lequin R., 2005).

#### 4.3.6.2 Μη ανταγωνιστική μέθοδος ELISA

Η μη ανταγωνιστική μέθοδος της ELISA χαρακτηρίζεται από τη χρησιμοποίηση δύο διαφορετικών αντισωμάτων που αναγνωρίζουν διαφορετικούς τύπους του αντιγόνου. (τεχνική sandwich). Το αποτέλεσμα της αντίδρασης είναι ευθέως ανάλογο προς τη συγκέντρωση της ουσίας που μετράται στο δείγμα. Τα στάδια της μη ανταγωνιστικής μεθόδου ELISA είναι τα παρακάτω :

1. Αρχικά, υπάρχει ακινητοποιημένο το αντίσωμα στα πλακίδια εργασίας, έπειτα προστίθεται το δείγμα, το οποίο περιέχει το προς μέτρηση αντιγόνο. Γίνεται επώαση και πλύσεις 3-5 φορές
2. Στη συνέχεια προστίθεται το επισημασμένο με ένζυμο αντίσωμα, ακολουθεί επώαση και πλύσεις 3-5 φορές ώστε να απομακρυνθεί ό,τι δε δεσμεύτηκε από το αντίσωμα.
3. Το επόμενο βήμα είναι η προσθήκη υποστρώματος και επώαση κατά την οποία πραγματοποιείται αντίδραση και παράγεται το προϊόν (Lequin R., 2005, DeLaRica, 2012).

Οι δύο μέθοδοι που αναφέρθηκαν παραπάνω έχουν το κοινό ότι στα αρχικά τους στάδια, πριν την εισαγωγή του δείγματος, διάλυμα BSA (λευκωματίνη ορού βόειας προέλευσης) ή καζεΐνης, προστίθεται στα πλακίδια της πλάκας μικροτιτλοδότησης. Οι πρωτεΐνες αυτές έχουν την ικανότητα να «μπλοκάρουν» τις μη ειδικές προσροφήσεις άλλων πρωτεϊνών στα πλακίδια μικροτιτλοδότησης, οι οποίες θα μπορούσαν να δώσουν ψευδώς θετικό αποτέλεσμα (DeLaRica, 2012).

**Τα πλεονεκτήματα αυτής της τεχνικής αναφέρονται παρακάτω:**

- Σε κάθε ένα πλακίδιο μπορεί να είναι ακινητοποιημένα διαφορετικά αντιδραστήρια/αντισώματα, επιτρέποντας έτσι την ταυτόχρονη ανίχνευση πολλαπλών αντιγόνων σε δοκιμασίες πολλαπλής ανάλυσης.
- Ο όγκος του δείγματος μπορεί να αυξηθεί ώστε να βελτιωθεί η ευαισθησία της δοκιμασίας, σε κλινικά, διατροφικά, περιβαλλοντικά δείγματα.
- Οι δοκιμασίες ολοκληρώνονται σε λίγα λεπτά και μπορούν να αυτοματοποιηθούν πολύ εύκολα.
- Η τεχνική αυτή είναι κατάλληλη για ποιοτικούς προσδιορισμούς (οι οποίοι γίνονται ορατοί με γυμνό οφθαλμό).

#### 4.3.6.3. Χρωμογόνα, φθορισμογόνα και χημειοφωταυγειογόνα – βιοφωταυγειογόνα υποστρώματα

Οι ELISA αποτελούν την πλειοψηφία των τεχνικών ανοσοπροσδιορισμού οι οποίες εφαρμόζονται. Ανάλογα με το χρησιμοποιούμενο υπόστρωμα διακρίνονται:

- Σε ανοσοπροσδιορισμούς με υπόστρωμα χρωμογόνο.
- Σε ανοσοπροσδιορισμούς με υπόστρωμα φθορισμογόνο.

- Σε ανοσοπροσδιορισμούς με υπόστρωμα χημειοφωταύγειας και βιοφωταύγειας (Cosling, 2000).

#### **4.3.6.4 Εφαρμογή της ανοσοχημικής μεθόδου ELISA για την ανίχνευση αλλεργιογόνων**

Η πιο συχνά χρησιμοποιούμενη τεχνική ELISA, για την ανίχνευση των αλλεργιογόνων, είναι η τεχνική της sandwich ELISA ακολουθώντας τη διαδικασία που έχει αναφερθεί παραπάνω. Η τεχνική της sandwich ELISA έχει χρησιμοποιηθεί κατά καιρούς για την ανίχνευση αλλεργιογόνων τροφίμων όπως, φιστίκι, φουντούκι, γάλα, αμύγδαλο κ.α. Πιο συγκεκριμένα, για το φιστίκι, η ELISA στηρίχθηκε στην ανίχνευση της ειδικής πρωτεΐνης μέσω ειδικών αντισωμάτων. Η ανίχνευση του φιστικιού με τη συγκεκριμένη μέθοδο, φτάνει σε συγκέντρωση μέχρι τα 10 ppm, σε επεξεργασμένα τρόφιμα (Oliver S., 2004).

Η τεχνική της sandwich ELISA έχει χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση καταλοίπων φουντουκιού σε πολύπλοκα τρόφιμα. Η ανίχνευση του φουντουκιού φτάνει σε όρια μεταξύ 2 έως 421 ppm σε εμπορικά προϊόντα διατροφής, κάτι που αποδεικνύει την παρουσία δυνητικά αλλεργιογόνων πρωτεϊνών σε αυτά (Holzhauser T., 2002). Με τη συγκεκριμένη τεχνική έχουν εξετασθεί τρόφιμα όπως, διάφορες σοκολάτες και μπισκότα, για την ύπαρξη φιστικιού και φουντουκιού (Pele M., 2007).

Η AMP είναι η κύρια πρωτεΐνη που συναντάται στα αμύγδαλα, και είναι αυτή η οποία είναι υπεύθυνη, για την εμφάνιση αλλεργίας. Μια δοκιμασία ELISA, που έχει αναπτυχθεί, βασίζεται στην ανίχνευση και ποσοτικοποίηση της AMP μέσω ενός ειδικού αντισώματος. Η συγκεκριμένη δοκιμασία, έχει αναπτυχθεί, για τη μελέτη της αντιγονικής σταθερότητας της AMP σε σκληρές συνθήκες (Roux K.H., 2001). Ένα άλλο αλλεργιογόνο, που είναι δυνατόν να ανιχνευθεί, με την τεχνική της sandwich ELISA είναι το γάλα. Οι κύριες πρωτεΐνες του γάλακτος που προκαλούν αλλεργία είναι η καζεΐνη και η β- λακτογλοβουλίνη. Για την ανίχνευση των συγκεκριμένων πρωτεϊνών έχουν αναπτυχθεί ειδικές δοκιμασίες ELISA (Almikulon A., 2006).

## 4.4 ΕΡΕΥΝΑ

### 4.4.1 ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΒΕΝΖΥΛΟΠΕΝΙΚΙΛΙΝΗΣ ΜΕ ΤΗΝ ΜΕΘΟΔΟ HPLC ΣΕ ΠΡΟΒΕΙΟ ΓΑΛΑ



#### Monitoring of benzylpenicillin in ovine milk by HPLC

Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 17 (1998) 733–738

JOURNAL OF  
PHARMACEUTICAL  
AND BIOMEDICAL  
ANALYSIS

Gianpiero Boatto \*, Riccardo Cerri, Amedeo Pau, Michele Palomba, Giorgio Pintore,  
Maria Giovanna Denti

*Istituto di Analitica Farmaceutica, Facolta` di Farmacia, Uni6ersita` degli Studi di Sassari, Via Muroli 23, 07100, Sassari, Italy*

Received 1 July 1997; received in revised form 3 November 1997; accepted 10 November 1997

Περιγράφηκε μια μέθοδος για τον προσδιορισμό *in vivo* των υπολειμμάτων βενζυλοπενικιλίνης στο πρόβειο γάλα σε χαμηλά επίπεδα. Δύο ομάδες προβάτων φυλής Σαρδηνίας έλαβαν μια δόση άλατος νατρίου πενικιλίνης G, με ενδομαστική έγχυση και ενδομυϊκή χορήγηση αντίστοιχα. Τα υπολείμματα ανιχνεύθηκαν με ισοκρατική μέθοδο HPLC των εκχυλισμάτων που ελήφθησαν από προηγούμενη διαδικασία καθαρισμού. Λήφθηκαν γραφήματα γραμμικής βαθμονόμησης σε μεγάλο εύρος συγκέντρωσης  $1 \text{ mg ml}^{-1}$ - $10 \text{ ng ml}^{-1}$ , με συντελεστές συσχέτισης μεγαλύτερους από 0,998. Λήφθηκαν ανακτήσεις μεταξύ 78,6% και 87,3%. Το όριο ανίχνευσης (LOD) και το όριο προσδιορισμού (LOQ) ήταν 2,6 και  $8,8 \text{ ng ml}^{-1}$  αντίστοιχα. Αυτή η μέθοδος θα ήταν χρήσιμη για την τακτική παρακολούθηση των υπολειμμάτων της πενικιλίνης G στο γαλακτοκομικό γάλα των προβάτων.

Λέξεις Κλειδιά : Βενζυλοπενικιλίνη, ανίχνευση *in vivo*, υπολείμματα, γάλα, αντίστροφης φάσης υγρή χρωματογραφία

#### 4.4.1.1 Εισαγωγή

Η πενικιλίνη G χρησιμοποιείται συχνά στην κτηνιατρική πρακτική για τη θεραπεία της μαστίτιδας των προβάτων και των μικροβιακών λοιμώξεων. Αυτό το γεγονός έχει μεγάλη σημασία στην ανθρώπινη παθολογία. Πράγματι μια πολύ μέτρια ποσότητα αυτής της ένωσης στο γάλα μπορεί να είναι υπεύθυνη για αλλεργικές αντιδράσεις στον άνθρωπο. Επιπλέον, η πενικιλίνη αναστέλλει τις καλλιέργειες εκκίνησης στην παραγωγή γαλακτοκομικών προϊόντων που έχουν υποστεί ζύμωση, όπως τυρί, βουτυρόγαλα και γιαούρτι. Η εκτροφή προβάτων στη Σαρδηνία είναι το πιο παραγωγικό εισόδημα της τοπικής οικονομίας. Ως εκ τούτου, έχει μεγάλη σημασία να βελτιωθούν οι μέθοδοι ανίχνευσης αυτού του αντιβιοτικού στο γάλα κατά την επεξεργασία των προβάτων γαλακτοπαραγωγής. Υπάρχουν πολλές μέθοδοι για τον προσδιορισμό των υπολειμμάτων βενζυλοπενικιλίνης στο γάλα. Αυτές αναφέρουν βιοπροσδιορισμούς ως μικροβιολογικές δοκιμές, αναστολή ενζύμου, ανοσοδοκιμασίες και ανταγωνιστική σύνδεση. Όλες αυτές οι μέθοδοι είναι πολύ ευαίσθητες αλλά δεν είναι συγκεκριμένες επειδή δεν μπορούν να

διακρίνουν μεταξύ διαφορετικών αντιβιοτικών β-λακτάμης. Οι φυσικοχημικές μέθοδοι είναι πιο αξιόπιστες από τους βιοπροσδιορισμούς. Οι τελευταίες είναι χρωματογραφία λεπτής στιβάδας, ηλεκτροφόρηση και αέρια-υγρή χρωματογραφία, ωστόσο οι περισσότερες από αυτές δεν μπορούν να θεωρηθούν αρκετά απλές, γρήγορες και ακριβείς. Πρόσφατα σημειώθηκε σημαντική πρόοδος στην ανίχνευση υπολειμμάτων πενικιλίνης G με τη χρήση υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC).

Ιδιαίτερα οι τρέχουσες μέθοδοι HPLC έχουν ασχοληθεί κυρίως με ανάλυση ενός συστατικού, χρησιμοποιώντας στήλες αντίστροφης φάσης. Αυτές οι μέθοδοι είναι πολύ πιο επιλεκτικές από τη μικροβιολογική δοκιμασία και μπορούν να επιλύσουν προβλήματα με παρεμβαλλόμενες ουσίες.

Με την τεχνική HPLC είναι δυνατή η μείωση των παρεμβαλλόμενων κορυφών φόντου στα χρωματογραφήματα και η αύξηση της ειδικότητας. Πράγματι, η πενικιλίνη G είναι καλά απομονωμένη από παρεμβολές κορυφών στο τυφλό γάλα και οι περιοχές κορυφής παρέχουν καλό ποσοτικό προσδιορισμό. Περαιτέρω επιβεβαίωση της ανίχνευσης της πενικιλίνης G μπορεί να βασίζεται στο φάσμα UV που λαμβάνεται, χρησιμοποιώντας έναν ανιχνευτή συστοιχίας διόδων. Τέλος, με τις διαδικασίες καθαρισμού, παρόλο που είναι χρονοβόρο, όλα τα δείγματα δίνουν ουσιαστικά ποσοτικές ανακτήσεις και μεγάλοι όγκοι δείγματος θα μπορούσαν να αποφευχθούν, αφήνοντας ωστόσο, έναν επαρκή όγκο δείγματος για ένεση προκειμένου να επιτευχθεί καλή ακρίβεια και αρκετή ευαισθησία.

Αυτή η έρευνα, περιγράφει μια βελτιωμένη μέθοδο για την in vivo παρακολούθηση της πενικιλίνης G στο γάλα που συνδυάζει μια διαδικασία καθαρισμού με βάση τη μέθοδο που περιγράφεται από τον Moats, με μια τροποποιημένη διαδικασία HPLC, που περιγράφεται από τον ίδιο συγγραφέα.

Τα δεδομένα, μας δείχνουν την καταλληλότητα αυτής της μεθόδου για παρακολούθηση ρουτίνας. Η μέθοδος εφαρμόστηκε για τον προσδιορισμό υπολειμμάτων βενζυλοπενικιλίνης στο γάλα δύο ομάδων προβάτων φυλής Σαρδηνίας που υποβλήθηκαν σε αγωγή με συνιστώμενη δόση άλατος νατρίου πενικιλίνης G, χορηγούμενη με ενδομυϊκή έγχυση (ομάδα A) και ενδομυϊκή ένεση (ομάδα B) αντίστοιχα. Οι καμπύλες συγκέντρωσης / χρόνου λήφθηκαν από την όγδοη ημέρα από τη χορήγηση.

#### **4.1.1.2 Πειραματικό**

##### **Υλικά και αντιδραστήρια**

Το άλας νατρίου πενικιλίνης G (99%) αγοράστηκε από τη Fluka Biochemika. Το ακετονιτρίλιο ποιότητας-HPLC αγοράστηκε από την Carlo Erba (Μιλάνο, Ιταλία). Το απιονισμένο και το απεσταγμένο νερό καθαρίστηκε μέσω συστήματος Milli Q (Millipore). Όλα τα άλλα αντιδραστήρια ήταν αναλυτικού βαθμού και αγοράστηκαν από την Carlo Erba Reagents (Μιλάνο, Ιταλία). Το φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα, pH 7, 0,0067M, παρασκευάστηκε σύμφωνα με τη Βρετανική Φαρμακοποιία, ρυθμίζοντας το pH με ορθοφωσφορικό οξύ όταν είναι απαραίτητο.

### Προετοιμασία των δειγμάτων

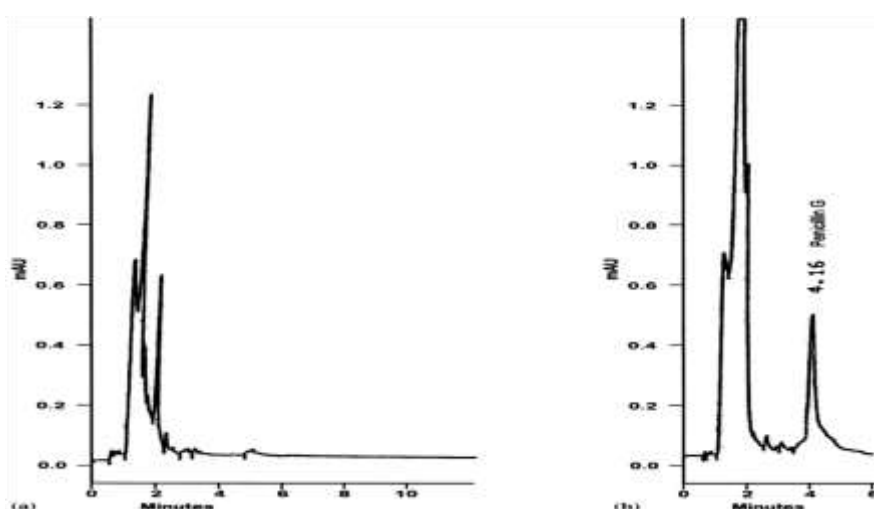
Τα αρχικά βασικά διαλύματα πενικιλίνης G ( $1000-0,01 \text{ mg ml}^{-1}$ ) παρασκευάστηκαν σε νερό και ήταν σταθερά για 1 μήνα φυλαγμένα στους  $-25^\circ\text{C}$ . Παρασκευάστηκαν τυποποιημένα δείγματα βαθμονόμησης με βάση τα εκχυλίσματα από τυφλά δείγματα γάλακτος με τους κατάλληλους όγκους πρωτογενών βασικών διαλυμάτων. Για τον προσδιορισμό της ανάκτησης, έξι δείγματα γάλακτος αυξήθηκαν με προσθήκη του κατάλληλου όγκου διαλύματος σε 10 ml γάλακτος, λαμβάνοντας τελικές συγκεντρώσεις 1, 0,1, 0,01  $\text{mg ml}^{-1}$ , 1, 0,1, 0,01  $\text{mg ml}^{-1}$ .

### Διαδικασία εξαγωγής και καθαρισμού

Μετρήθηκε όγκος γάλακτος 10 ml και μεταφέρθηκε σε κωνική φιάλη των 50 ml. Προστέθηκαν αργά 20 ml ακετονιτριλίου με έντονη ανακίνηση. Μετά από παραμονή για 10 λεπτά, το διαυγές υπερκείμενο μεταφέρθηκε μέσω βύσματος από υαλοβάμβακα στο στέλεχος της χοάνης και συλλέχθηκε απευθείας σε διαχωριστική χοάνη των 100 ml. Προστέθηκε μεθυλενοχλωρίδιο (15 ml) και, μετά από ανάδευση, το μείγμα αφέθηκε να διαχωριστεί για 5 λεπτά. Η κατώτερη στιβάδα (υδατική φάση) μεταφέρθηκε σε φιάλη των 50 ml. Το υπόλοιπο οργανικής στιβάδας πλύθηκε με 3 ml νερού. Οι υδατικές φάσεις αναμίχθηκαν και εξατμίστηκαν υπό ελαττωμένη πίεση σε υδατόλουτρο  $40-50^\circ\text{C}$ . Οι τελικοί όγκοι που λήφθηκαν ήταν: 10 ml για πιο συμπυκνωμένα διαλύματα δείγματος και 1 ml για πιο αραιωμένα. Τα ληφθέντα τελικά διαλύματα μεταφέρθηκαν σε κατάλληλα φιαλίδια αυτόματης δειγματοληψίας. Η πρόθεσή με τον καθαρισμό είναι να αποφύγουμε τη χρήση μεγάλων όγκων δείγματος διατηρώντας επαρκή ενέσιμο όγκο χωρίς απώλεια ακρίβειας και ευαισθησίας.

### Όργανα και συνθήκες HPLC

Οι αναλύσεις HPLC διεξήχθησαν σε υγρό χρωματογράφο Hewlett Packard HP 1084-B,



**Εικόνα 4.1:** Χρωματογραφήματα εκχυλισμάτων που λαμβάνονται από α) δείγμα τυφλού γάλακτος και β) δείγμα γάλακτος εμπλουτισμένο με πενικιλίνη G έως  $0,01 \text{ mg ml}^{-1}$

έγχυση μεταβλητού όγκου και ανιχνευτή UV μεταβλητού μήκους κύματος στα 214 nm. Η

απόκτηση δεδομένων ελέγχθηκε από τον ολοκληρωτή συστήματος (τερματικό HP 79850 B LC). Οι ενέσεις έγιναν αυτόματα σε στήλη Supelco Supelcosil LC-18-DB αντίστροφης φάσης (5 μm, 4,6 × 150 mm). Η κινητή φάση απαιρώθηκε χρησιμοποιώντας ήλιο που παραδόθηκε με ρυθμό 1 ml min<sup>-1</sup>. Ο όγκος της ένεσης ήταν 100 μl για όλα τα πρότυπα και δείγματα των τελικών εκχυλισμάτων γάλακτος. Οι αναλύσεις διεξήχθησαν σε θερμοκρασία δωματίου υπό ισοκρατικές συνθήκες με ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού - ακετονιτρίλιου pH 7 (82:18, v/v) χρησιμοποιώντας το σύστημα HP.

- Ευαισθησία ανιχνευτή 512·10<sup>-4</sup> μονάδες απορρόφησης και
- Ταχύτητα γραφήματος 0,50 cm min<sup>-1</sup>

Οι εκλουσμένες κορυφές ανιχνεύθηκαν στα 214 nm.

Η μελέτη διεξήχθη για οκτώ ημέρες σε δύο ομάδες έξι προβάτων φυλής Σαρδηνίας (πέντε πειραματικά συν ένα μάρτυρα χωρίς ομάδα ανά ομάδα, μεσαίο βάρος 45 kg). Και οι δύο ομάδες υποβλήθηκαν σε αγωγή με εφάπαξ δόση 24 mg·kg<sup>-1</sup> άλατος νατρίου πενικιλίνης G. Μια ενδομαστική έγχυση χορηγήθηκε στην πρώτη ομάδα μετά το πρωινό άρμεγμα, ενώ η δεύτερη ομάδα υποβλήθηκε σε θεραπεία με ενδομυϊκή χορήγηση. Δείγματα γάλακτος ελέγχου, ελήφθησαν από τα πρόβατα που δεν είχαν υποστεί αγωγή, και όλα τα άλλα δείγματα συλλέχθηκαν σε διαστήματα 6 ωρών κατά την πρώτη ημέρα της δοκιμής και σε διαστήματα 12 ωρών κατά τις επόμενες επτά ημέρες. Όλα τα δείγματα αποθηκεύτηκαν στους -25 °C μέχρι να αναλυθούν.

**Πίνακας 4.5:** Δεδομένα ανάκτησης των εμβολιασμένων δειγμάτων γάλακτος

Προστιθέμενη Συγκέντρωση (μg ml <sup>-1</sup> )	Αριθμός Επαναλήψεων	Μέση Συγκέντρωση που βρέθηκε ± S.D. (μg ml <sup>-1</sup> )	Μέση Ανάκτηση %	S.D. %
1000	6	857.6 ± 21.1	85.80	2.45
100	6	78.57 ± 2.92	78.57	3.71
10	6	7.965 ± 0.325	79.65	4.02
1	6	0.851 ± 0.038	85.10	4.70
0.1	6	0.0873 ± 0.0047	87.30	5.36
0.01	6	0.00821 ± 0.00045	82.10	5.48

**Πίνακας 4.6 :** Δεδομένα ακρίβειας για εμβολιασμένα δείγματα γάλακτος με 0,1 μg ml<sup>-1</sup>

Ημέρα 1	Ημέρα 2	Ημέρα 3	Ημέρα 4	Ημέρα 5	Ημέρα 6	Ημέρα 7	Ημέρα 8
0.07830	0.08344	0.08731	—	0.09159	0.08416	0.08634	0.07696
0.08881	0.08977	0.08030	0.09015	0.09081	0.08113	0.08615	0.08774
0.09052	0.09001	—	0.08607	0.08651	0.08509	0.08711	0.09038
0.08970	0.08711	0.08341	0.09305	0.08643	0.08881	0.08537	0.09333
0.08621	0.08022	0.08475	0.08225	0.07415	0.09691	0.08763	0.08973
0.09033	0.09351	0.08503	0.08671	0.08812	0.07998	0.09458	0.08865

Μέσος όρος	0.08731	0.08734	0.08416	0.08765	0.08627	0.08601	0.08786	0.08780
S.D.	0.00468	0.00484	0.00257	0.00412	0.00631	0.00618	0.00338	0.00564
R.S.D. %	5.36	5.54	3.06	4.70	7.31	7.18	3.84	6.42
Ανάκτηση %	87.3	87.3	84.2	87.6	86.3	86	87.9	87.8

#### 4.1.1.3 Αποτελέσματα και συζήτηση

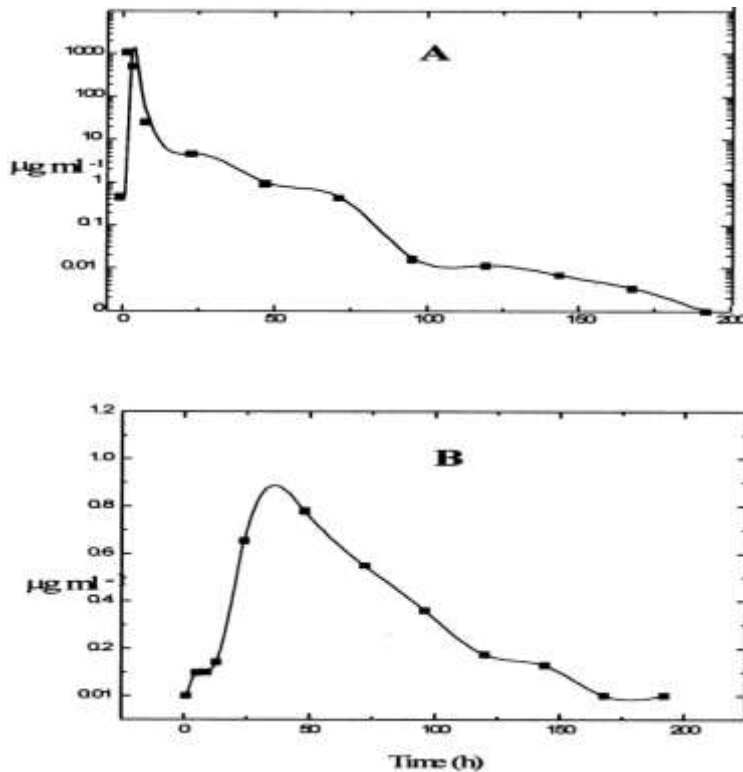
Στην παρούσα εργασία εκχυλίσματα που ελήφθησαν από καθαρισμό γάλακτος αναλύθηκαν με HPLC για προσδιορισμό της περιεκτικότητας σε πενικιλίνη G. Προηγούμενες μελέτες έδειξαν ότι η εκχύλιση / αποπρωτεϊνοποίηση ήταν απλή, γρήγορη και έδωσε ουσιαστικά ποσοτικές ανακτήσεις. Η γραμμικότητα των καμπυλών βαθμονόμησης, που αποκτήθηκε με βάση τα εκχυλίσματα των τυφλών δειγμάτων γάλακτος, μελετήθηκε σε μεγάλο εύρος συγκέντρωσης  $1 \text{ mg ml}^{-1}$  -  $10 \text{ ng ml}^{-1}$ . Το ευρύ φάσμα ήταν απαραίτητο για τον προσδιορισμό των καταλοίπων σε δείγματα που ελήφθησαν μετά από ενδομαστική έγχυση. Πράγματι, οι ποσότητες υπολειμμάτων ήταν ιδιαίτερα υψηλές κατά την πρώτη δειγματοληψία. Σχεδιάστηκαν τρεις τυπικές καμπύλες ως η μέγιστη περιοχή έναντι της συγκέντρωσης με έξι βαθμούς η καθεμία. Η εξίσωση των τυπικών καμπυλών ήταν:

- $y = 6.06 (\pm 2.55) + 0.2971 (\pm 0.0043) x$  και  $r = 0.9996$  (εύρος  $1000 - 100 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$ ),
- $y = 0.8861 (\pm 0.1824) + 0.3291 (\pm 0.0087) x$  και  $r = 0.9986$  (εύρος  $50 - 0,5 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$ ),
- $y = 0,0176 (\pm 0.0006) + 0,3503 (\pm 0.0122) x$  και  $r = 0,9982$  (εύρος  $0,1 - 0,01 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$ )

Οι τιμές για το όριο ανίχνευσης (LOD) και το όριο προσδιορισμού (LOQ) ήταν  $2,6 \text{ ng ml}^{-1}$  ( $0,0026 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$ ) και  $8,8 \text{ ng ml}^{-1}$  ( $0,0088 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$ ) αντίστοιχα στο χαμηλότερο εύρος. Το LOD και το LOQ ορίστηκαν ως οι συγκεντρώσεις που λήφθηκαν υπολογίζοντας την τυπική απόκλιση του χαμηλότερου εύρους πολλαπλασιαζόμενη επί τρεις και δέκα φορές αντίστοιχα.

Η ανάκτηση της μεθόδου μελετήθηκε με τον εμβολιασμό των δειγμάτων γάλακτος σε έξι επίπεδα εμπλουτισμού, με υδατικά πρότυπα διαλύματα πενικιλίνης και ανάλυση έξι επαναλήψεων. Η συγκέντρωση κυμαινόταν από  $1000$  έως  $0,01 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$ . Λιγότερα τετράγωνα και ανάλυση παλινδρόμησης των δεδομένων που παρουσιάζονται στον Πίνακα 1 δείχνουν ότι η σχέση μεταξύ «προστέθηκε» και «βρέθηκε» περιγράφηκε επαρκώς από τη γραμμική παλινδρόμηση  $y = -1,47 + 0,885x$ , ( $r = 0,9998$ ). Επομένως, η κλίση ( $0.858 \pm 0.01$ ) αυτής της γραμμής παλινδρόμησης θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως εκτίμηση της συνολικής ανάκτησης που αντιστοιχεί στο  $85,8 \pm 1\%$ .





**Εικόνα 4.2 :** Καμπύλες συγκέντρωσης/ χρόνου : Α ενδομαστική έγχυση και Β ενδομυϊκή έγχυση

αυτήν την περίπτωση, η υψηλότερη συγκέντρωση παρατηρήθηκε στις 48 ώρες, ενώ τις επόμενες ημέρες μειώθηκε σταδιακά σε μη ανιχνεύσιμα επίπεδα στις 8 ημέρες μετά την ένεση.

Η ακρίβεια της μεθόδου μελετήθηκε επίσης με τον προσδιορισμό, σε κάθε μία από τις οκτώ διαφορετικές ημέρες, αρκετά δείγματα γάλακτος με πενικιλίνη στα  $0,1 \mu\text{g ml}^{-1}$  (ενδιάμεσο επίπεδο). Για τη βελτίωση της ακρίβειας, οι αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν από τον ίδιο χειριστή, χρησιμοποιώντας το ίδιο υλικό και πραγματοποιώντας έξι δοκιμές κάθε μέρα κατά τη διάρκεια οκτώ ημερών. Τα αποτελέσματα φαίνονται στον Πίνακα 4.6.

Μόνο δύο από τις 48 τιμές ήταν αμφίβολες και απορρίφθηκαν. Τελικά αξιολογήθηκε η σταθερότητα της στήλης υπολογίζοντας τον χρόνο κατακράτησης ενός τυπικού διαλύματος πενικιλίνης G κάθε 50 ενέσεις δείγματος (μετά από έκπλυση με το έκλουσμα για 20 λεπτά) και ο μέσος όρος του παρατηρούμενου χρόνου κατακράτησης ήταν 4,24 λεπτά  $\pm 2,4\%$  S.D . Η παρούσα μέθοδος παρείχε το απαραίτητο μέσο για τον προσδιορισμό υπολειμμάτων πενικιλίνης G σε πραγματικά δείγματα (in vino) μελετώντας δύο ομάδες προβάτων φυλής Σαρδηνίας για οκτώ ημέρες.

**Εικόνα 2A :** δείχνει την καμπύλη χρόνου συγκέντρωσης γάλακτος για ενδομαστική έγχυση. Η υψηλότερη συγκέντρωση παρατηρήθηκε, όπως αναμενόταν λαμβάνοντας υπόψη αυτή τη μέθοδο χορήγησης, στη δεύτερη δειγματοληψία με ανάκτηση 27% της πενικιλίνης, ενώ η συγκέντρωση παρέμεινε αρκετά αυξημένη έως τις 72 ώρες και παρέμεινε στο γάλα για 8 ημέρες μετά τη θεραπεία.

**Εικόνα 2B:** δείχνει την καμπύλη συγκέντρωσης γάλακτος - χρόνου για ενδομυϊκή χορήγηση. Σε

#### 4.1.1.4 Συμπεράσματα

Η συγκέντρωση καμπυλών / χρόνος έδειξε υπολείμματα πενικιλίνης G για μεγάλο χρονικό διάστημα και με τους δύο τρόπους χορήγησης. Παραδόξως υψηλές συγκεντρώσεις ελήφθησαν επίσης στην ενδομαστική έγχυση όπου αναμενόταν μια αρκετά γρήγορη κάθαρση. Από την άλλη πλευρά, η ενδομυϊκή χορήγηση είχε ως αποτέλεσμα τιμές συγκέντρωσης αντιβιοτικών γύρω από το όριο προσδιορισμού που ήταν ακόμη την 8η ημέρα. Συμπερασματικά, τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης δείχνουν ότι η προτεινόμενη μέθοδος καθαρισμού-HPLC είναι ένα αποτελεσματικό και αξιόπιστο μέσο ποσοτικοποίησης της πενικιλίνης G στο γάλα και θα ήταν χρήσιμο για την τακτική παρακολούθηση των καταλοίπων της πενικιλίνης G. Δεδομένου ότι 12-14 δείγματα μπορούν να υποβληθούν σε εύκολη επεξεργασία από έναν χειριστή σε 8 ώρες εργασίμης ημέρας και χρησιμοποιείται μόνο ένα στάδιο καθαρισμού, η μέθοδος είναι κατάλληλη για ανίχνευση σε μεγάλη κλίμακα υπολειμμάτων πενικιλίνης G στο επεξεργασμένο γάλα προβάτου.

## 5.ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- [1] Βεϊνογλου, Β.Κ. 1980. *Γαλακτοκομία*, Τόμος 1
- [2] Γαζής, Γ., Ερευνητική εργασία με τίτλο : "Απομόνωση και ταυτοποίηση *Οξυγαλακτικών Βακτηρίων* από γιαούρτια της ελληνικής αγοράς- Έλεγχος ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά"
- [3] Γεωργαλλά, Γ. & Ηροδότου, Η., *Ανάκληση και ιχνηλασιμότητα των τροφίμων, Οδηγός Υγιεινής για τις επιχειρήσεις τροφίμων*
- [4] Καλογερόπουλος, Ν., *Τοξικοί παράγοντες σε τρόφιμα και σχετική νομοθεσία*
- [5] Καμιναρίδης Σ. και Μοάτσου Γ. (2009). *Γαλακτοκομία*, , Εκδόσεις Έμβρυο, Αθήνα-Αιγάλεω.
- [6] Κ.Τ.Π. 1978. Κώδικας τροφίμων, Ποτών και αντικειμένων κοινής χρήσης. Εθνικό Τυπογραφείο, Αθήνα
- [7] Μαντής, Α. et al., 2015. *Υγιεινή και τεχνολογία του γάλακτος και των προϊόντων του* : Αδελφοί Κυριακίδη
- [8] Μάντης, Α., et. al. *Εργαστηριακή εξέταση του γάλακτος και των γαλακτοκομικών προϊόντων*, Β' έκδοση
- [9] Μπαλατσούρας Γ. (2006). *Μικροβιολογία Τροφίμων* Εκδόσεις Έμβρυο, Αθήνα-Αιγάλεω Διεθνής
- [10] Πανέτσος,Α. 1969. *Γαλακτοκομία*, 104, Θεσσαλονίκη
- [11] Τσιγκοΐδα, Α., Μανωλακίδης, Κ.Σ. & Φωτακόπουλος, Θ., 1988. *Αντιβιοτικά και μαστίτιδες* 2<sup>nd</sup> ed., Αθήνα : Εθνική επιτροπή γάλακτος
- [12] Siliker J.H. (chairman),et. al., *MICROBIAL ECOOLOGY OF FOODS: Milk and Dairy Product Technology*, Edgar Spreer, DEKKER
- [13] Varnam A.H., & Jane P. Sutberland. *Milk and milk products*
- [14] Davidson P.M., Sofos J. N., A.L.Branen *Antimicrobials in food*
- [15] FAO Food and Nutrition Paper. *Residues of some veterinary drugs in animals and food*,
- [16] International dairy federation, *.Residues of antimicrobial drugs and other inhibitors in milk*
- [17] Lorian V. *Antibiotics in laboratory medicine*, 4nd edition, , M.D. editor
- [18] Watson D.J.& Buswell J.F. , 1984. *Modern aspects of sheep mastitis*. British veterinary journal
- [19] Watkins, G. H. (1990): *Mastitis in sheep. In: Mastitis treatment - making it work*. Proceedings of the third British Mastitis Conference, 67 Stoneleigh, UK, 17 October, 1990. Ciba-Geigy Agrochemicals, Cambridge, UK. Pp.
- [20] Simmons G.C.& Ryley J.W.(1954). *Ovine mastitis with special reference to mastitis caused by Pasteurella mastitidis*. Queensland Journal of agricultural Science 11
- [21] Serratos, 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)
- [22] Tollefson, L. & Miller, M.A.,2000. *Antibiotic use in food animals : controlling the human health impact*. Journal of AOAC INTERNATIONAL
- [23] J.M. Dewduey, R.G. Edwards, J. R. Soc. Med. 77 (1984) 866–877.
- [24] V. Burgat, Allergy and residues, in: Safety and Quality in Food; Bureau European d'Information pour le Developpement de la Sante` animale (DSA), Elsevier,

- Amsterdam, 1984, pp. 143–157. P.K. Orberg, W.E. Sandine, *Appl. Environ. Microbiol.* 49 (1985) 538–542.
- [25] K.M. Shahani, P.J. Whalen, Significance of antibiotics in food and feeds, in: W.A. Moats (Ed.), *Agricultural Uses of Antibiotics*, American Chemical Society, Washington DC, 1986, pp. 88–99.
- [26] D.M. MacCauley, V.S. Packard, *J. Food Prot.* 44 (1981) 696–698.
- [27] S.A. Thorogood, A. Ray, *J. Soc. Dairy Technol.* 37 (1984) 38–41.
- [28] J.J. Ryan, E.E. Wildman, A.H. Duthie, H.V. Hatherton, J.J. Allong, *J. Dairy Sci.* 69 (1986) 1510–1517. [8] P. Rohner, M. Shaellibaum, J. Nicolet, *J. Food Prot.* 48 (1985) 59–62.
- [29] S.E. Charm, R. Chi, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 71 (1988) 304–316.
- [30] D.L. Collins-Thompson, D.S. Wood, I.Q. Thomson, *J. Food Prot.* 51 (1988) 632–633.
- [31] W.A. Moats, *J. Agric. Food Chem.* 31 (1983) 1348–1350.
- [32] B. Pietrangeli, E. De Vito, A. Biondi, *Ig. Mod.* 85 (1986) 36–49.
- [33] U. Meetschen, M. Petz, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 73 (1990) 373–379.
- [34] B. Wiese, K. Martin, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 7 (1989) 95–106.
- [35] W.A. Moats, *J. Chromatogr.* 507 (1990) 177–185.
- [36] *British Pharmacopoeia*, II IE A 70-IE A 71, 1988.
- [37] U.S.P. 23, 1995, *Validation of compendial methods*, 1995

### **Διαδικτυακές πηγές**

- [1] [http://www.minagric.gr/images/stories/docs/agrotis/poulerika/Paroyiaseis\\_Semina/Mikrobiaki\\_antoxi.pdf](http://www.minagric.gr/images/stories/docs/agrotis/poulerika/Paroyiaseis_Semina/Mikrobiaki_antoxi.pdf)
- [2] [http://apothetirio.teiep.gr/xmlui/bitstream/handle/123456789/5306/344.pdf?sequence=1&fbclid=IwAR3y4W0IGaBe6CoeAHg\\_57J-1F8dZA7KQuvfQMjzewRMD4ks051YcHHzdSc](http://apothetirio.teiep.gr/xmlui/bitstream/handle/123456789/5306/344.pdf?sequence=1&fbclid=IwAR3y4W0IGaBe6CoeAHg_57J-1F8dZA7KQuvfQMjzewRMD4ks051YcHHzdSc)
- [3] <http://olympias.lib.uoi.gr/jspui/bitstream/123456789/29193/1/%CE%94.%CE%94.%20%CE%A6%CE%A9%CE%A4%CE%9F%CE%A5%20%CE%9A%CE%A9%CE%9D%CE%A3%CE%A4%CE%91%CE%9D%CE%A4%CE%99%CE%9D%CE%91%20%CE%93.%202018.pdf?fbclid=IwAR1SflcfOJQPot4pf6gz0ykNvWkH6rurBc64lvjwYW1k1HTkalLtucCdYQ>
- [4] [http://www.moa.gov.cy/moa/vs/vs.nsf/All/7EF50D3654E38ACEC2257F47003A475F/\\$file/%CE%B5%CE%BD%CE%B7%CE%BC%CE%B5%CF%81%CF%89%CF%84%CE%B9%CE%BA%CF%8C%20%CF%86%CF%85%CE%BB%CE%BB%CE%AC%CE%B4%CE%B9%CE%BF.pdf](http://www.moa.gov.cy/moa/vs/vs.nsf/All/7EF50D3654E38ACEC2257F47003A475F/$file/%CE%B5%CE%BD%CE%B7%CE%BC%CE%B5%CF%81%CF%89%CF%84%CE%B9%CE%BA%CF%8C%20%CF%86%CF%85%CE%BB%CE%BB%CE%AC%CE%B4%CE%B9%CE%BF.pdf)
- [5] [https://ead.gr/wp-content/uploads/2019/02/3\\_2\\_2019-%CE%A7%CF%81%CE%AE%CF%83%CE%B7-%CE%B1%CE%BD%CF%84%CE%B9%CE%B2%CE%B9%CE%BF%CF%84%CE%B9%CE%BA%CF%8E%CE%BD-%CF%83%CF%84%CE%B7%CE%BD-%CE%BA%CF%84%CE%B7%CE%BD%CE%BF%CF%84%CF%81%CE%BF%CF%86%CE%AF%CE%B1-%CE%BA%CE%B1%CE%B9-%CF%84%CE%B1-%CE%AF%CF%87%CE%BD%CE%B7-%CF%84%CE%BF%CF%85%CF%82-%CF%83%CF%84%CE%B1-%CF%84%CF%81%CF%8C%CF%86%CE%B9%CE%BC%CE%B1\\_%CE%A5%CE%A0%CE%91%CE%91%CE%A4\\_%CE%A7-%CE%96%CE%B1%CF%86%CE%B5%CE%B9%CF%81%CE%AF%CE%B4%CE%B7%CF%82.pdf?fbclid=IwAR3D5vZJKujNAEtGMM6grdrbb7ChmKoYSTo-VQPj\\_OmgWia9D3mSjHV7BqA](https://ead.gr/wp-content/uploads/2019/02/3_2_2019-%CE%A7%CF%81%CE%AE%CF%83%CE%B7-%CE%B1%CE%BD%CF%84%CE%B9%CE%B2%CE%B9%CE%BF%CF%84%CE%B9%CE%BA%CF%8E%CE%BD-%CF%83%CF%84%CE%B7%CE%BD-%CE%BA%CF%84%CE%B7%CE%BD%CE%BF%CF%84%CF%81%CE%BF%CF%86%CE%AF%CE%B1-%CE%BA%CE%B1%CE%B9-%CF%84%CE%B1-%CE%AF%CF%87%CE%BD%CE%B7-%CF%84%CE%BF%CF%85%CF%82-%CF%83%CF%84%CE%B1-%CF%84%CF%81%CF%8C%CF%86%CE%B9%CE%BC%CE%B1_%CE%A5%CE%A0%CE%91%CE%91%CE%A4_%CE%A7-%CE%96%CE%B1%CF%86%CE%B5%CE%B9%CF%81%CE%AF%CE%B4%CE%B7%CF%82.pdf?fbclid=IwAR3D5vZJKujNAEtGMM6grdrbb7ChmKoYSTo-VQPj_OmgWia9D3mSjHV7BqA)
- [6] <https://www.mednet.gr/archives/2013-3/pdf/272.pdf>