



Σχολή Επιστημών Υγείας και Πρόνοιας
Τμήμα Βιοϊατρικών Επιστημών
ΜΠΣ Βιοϊατρικές Μέθοδοι και Τεχνολογία Στη Διάγνωση



ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Προσδιορισμός Αντιβιοτικών Στο Μητρικό Γάλα Με Μεθόδους Ενόργανης Ανάλυσης

POST GRADUATE THESIS

Determination Of Antibiotics In Breast Milk With Instrumental Analysis Methods

ΟΝΟΜΑ ΦΟΙΤΗΤΗ/NAME OF STUDENT

**Αγγελική Αθανασοπούλου
Angeliki Athanasopoulou**

ΟΝΟΜΑ ΕΙΣΗΓΗΤΗ/NAME OF THE SUPERVISOR

**Αθανασία Βαρβαρέσου
Athanasia Varvaresou**

ΑΙΓΑΛΕΩ/ΑΙΓΑΛΕΟ 2023



Faculty of Health and Caring Professions

Department of Biomedical Sciences

Postgraduate program:

Biomedical Methods and Technology In Diagnosis



POST GRADUATE THESIS

Determination of Antibiotics in Breast Milk with Instrumental Analysis

Methods

ANGELIKI ATHANASOPOULOU

20002

tzail@hotmail.com

FIRST SUPERVISOR

ATHANASIA VARVARESOU

SECOND SUPERVISOR

GEORGIA ELENI TSOTSOU

AIGALEO 2023

Επιτροπή εξέτασης

Ημερομηνία εξέτασης: 07/07/2023

	Ονόματα εξεταστών	Υπογραφή
1 ^{ος} Εξεταστής	Αθανασία Βαρβαρέσου	
2 ^{ος} Εξεταστής	Γεωργία Ελένη Τσότσου	

Δήλωση συγγραφέα μεταπτυχιακής εργασίας

Η κάτωθι υπογεγραμμένη Αθανασοπούλου Αγγελική του Παναγιώτη, με αριθμό μητρώου 20002, φοιτήτρια του Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών «Βοϊατρικές Μέθοδοι και Τεχνολογία Στη Διάγνωση» του τμήματος Βιοϊατρικών Επιστημών της Σχολής Επιστημών Υγείας και Πρόνοιας του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής, δηλώνω ότι:

«Είμαι συγγραφέας αυτής της μεταπτυχιακής 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».

Η Δηλούσα

Ευχαριστίες

Θερμές ευχαριστίες στις δύο συντονίστριες της εργασίας μου, για τις πολύτιμες συμβουλές τους και την εξαιρετική συνεργασία μας:

- Αθανασία Βαρβαρέσου: *Καθηγήτρια Ανάπτυξης φαρμακευτικών, καλλυντικών και ιατροτεχνολογικών προϊόντων*
- Γεωργία Ελένη Τσότσου: *Κλινική Χημικός – Μεταδιδακτορική Ερευνήτρια Marie Curie – Συντάκτρια και Συντονίστρια Ερευνητικών Προγραμμάτων.*

Αφιερώσεις

Αφιερώνω την παρούσα εργασία στην οικογένειά μου, για την υπομονή και την ψυχολογική υποστήριξη, που μου έδειξαν.

Περίληψη

Εισαγωγή: Ο θηλασμός προτείνεται ως η καλύτερη μορφή διατροφής για τα βρέφη, καθώς δεν είναι μόνο θρεπτική τροφή αλλά έχει και αντι-μολυσματικά οφέλη. Οι μητέρες που θηλάζουν είναι συχνό φαινόμενο να κάνουν χρήση αντιβιοτικών τα οποία έχει αναφερθεί στις έρευνες ότι περνούν από την μητέρα στο μητρικό γάλα. Είναι αποδεκτό και στον κτηνοτροφικό τομέα, αλλά και επιβεβαιώνεται και για τον άνθρωπο, ότι τα αντιβιοτικά που παίρνει η μητέρα μπορεί να επηρεάσουν αρνητικά την υγεία του βρέφους. Είναι δυνατό να γίνει, με τις κατάλληλες ενόργανες μεθόδους, προσδιορισμός των αντιβιοτικών στο μητρικό γάλα. Οι μητέρες θα επωφελούνται ιδιαίτερα από την χρήση γρήγορων και εύχρηστων τεστ που θα επιτρέψουν τον προσδιορισμό των αντιβιοτικών ακόμα και στο σπίτι.

Σκοπός: Σκοπός της εργασίας αυτής είναι να παρουσιάσει τις ενόργανες μεθόδους προσδιορισμού των αντιβιοτικών στο μητρικό γάλα μέσω της παρουσίασης πρόσφατων σχετικών ερευνών. Επιπλέον, σκοπός ήταν η αναζήτηση εύχρηστων κιτ για την χρήση αυτή.

Μέθοδος: Θα πραγματοποιηθεί βιβλιογραφική ανασκόπηση βιβλιογραφικών και εμπειρικών ερευνών, στις βάσεις δεδομένων PubMed, Google Scholar, ResearchGate.

Αποτελέσματα: Από τη μελέτη της βιβλιογραφίας προέκυψαν μεθοδολογίες ανοσοχρωματογραφικού προσδιορισμού, διαδικασίες εκχύλισης, μέθοδοι UPLC/MS-MS καθώς και ανοσοδοκιμασίες πλευρικής ροής με βάση το λατέξ (LFIA) αλλά και μεθοδολογίες εύχρηστων strip tests με βάση την ανοσοχρωματογραφία, για τον προσδιορισμό των αντιβιοτικών στο μητρικό γάλα.

Συμπεράσματα: Είναι πολύ σημαντική η ανίχνευση των αντιβιοτικών στο μητρικό γάλα προκειμένου να ελαχιστοποιηθεί η τυχόν αρνητική επίδραση τους στο βρέφος. Η ιατρική τεχνολογία έχει προχωρήσει τόσο ώστε με τις μεθόδους αυτές να έχει τα μέσα για τον προσδιορισμό των αντιβιοτικών στο μητρικό γάλα. Στην κτηνοτροφία χρησιμοποιούνται συχνά γρήγορα τεστ με βάση την ανοσοχρωματογραφία για τον σκοπό αυτό. Βρέθηκε στη βιβλιογραφία και μία υπό έγκριση δοκιμασία πλευρικής ροής που επιτρέπει την γρήγορη και στο σπίτι ανίχνευση αντιβιοτικών ουσιών στο ανθρώπινο μητρικό γάλα.

Λέξεις κλειδιά: μητρικό γάλα, αντιβιοτικά, ενόργανη ανάλυση, βρέφη, θηλασμός.

Abstract

Introduction: Breastfeeding is suggested as the best form of nutrition for infants, as it is not only nutritious food but also has anti-infectious benefits. It is common for nursing mothers to use antibiotics, which have been reported in research to pass from the mother into breast milk. It is also accepted in the livestock sector, but also confirmed for humans, that antibiotics taken by the mother can negatively affect the health of the infant. It is possible, with appropriate instrumental methods, to determine the antibiotics in breast milk. Mothers would especially benefit from the use of quick and easy-to-use tests that would allow antibiotics to be determined even at home.

Purpose: The purpose of this work is to present the instrumental methods for the determination of antibiotics in breast milk through the presentation of recent relevant research. In addition, the aim was to search for easy-to-use kits for this use.

Method: A bibliographic review of literature and empirical research will be carried out in the databases PubMed, Google Scholar, ResearchGate.

Results: From the study of the literature, immunochromatographic determination methodologies, extraction procedures, UPLC/MS-MS methods as well as latex-based lateral flow immunoassays (LFIA) as well as methodologies of flexible strip tests based on immunochromatography emerged for the determination of antibiotics in breast milk.

Conclusions: It is very important to detect antibiotics in breast milk in order to minimize their possible negative effect on the infant. Medical technology has advanced so far that with these methods it has the means to determine antibiotics in breast milk. Rapid immunochromatography-based tests are often used in animal husbandry for this purpose. A licensed lateral flow assay was also found in the literature that allows for the rapid and at-home detection of antibiotic substances in human breast milk.

Key words: breast milk, antibiotics, instrumental analysis, infants, breastfeeding.

Περιεχόμενα

Δήλωση συγγραφέα μεταπτυχιακής εργασίας.....	v
Ευχαριστίες.....	vii
Αφιερώσεις.....	viii
Περίληψη.....	ix
Abstract	x
Συνομογραφίες	xiii
Πρόλογος.....	1
Κεφάλαιο 1. Εισαγωγή	3
1.1 Συστατικά.....	3
1.2 Η Μητέρα.....	4
1.3 Οφέλη	5
1.4 Προστατευτικοί Παράγοντες.....	8
Κεφάλαιο 2. Φαρμακευτική Αγωγή και Αντιβιοτικά Κατά Τον Θηλασμό - Γενικός Προβληματισμός	13
2.1 Παρουσία Αντιβιοτικών Στο Μητρικό Γάλα	13
2.2 Έκθεση Του Βρέφους Σε Αντιβιοτικά	14
Κεφάλαιο 3. Μέθοδοι Ενόργανης Ανάλυσης Για Τον Προσδιορισμό Αντιβιοτικών σε οποιοδήποτε μέσο	16
3.1 Μικροβιολογική Δοκιμασία	16
3.2 Αναλυτικές Τεχνικές	17
3.2.1 Ανοσοδοκιμασίες	17
3.2.2 Χρωματογραφικές Τεχνικές.....	18
3.2.3 Χρωματογραφία Λεπτής Στιβάδας (TLC)	18
3.2.4 Αέρια Χρωματογραφία (GC)	20
3.2.5 Υγροχρωματογραφία (LC).....	21
3.2.6 Υγροχρωματογραφία Υπερυψηλής Απόδοσης	23
3.2.7 Ανοσοχρωματογραφία.....	24
3.3. Τεχνικές Ηλεκτρομετανάστευσης	25
3.4 Εύχρηστα τεστ	27
Κεφάλαιο 4. Μέθοδοι Που Χρησιμοποιήθηκαν Σε Έρευνες Για Τον Προσδιορισμό Αντιβιοτικών Στο Μητρικό Γάλα.....	28

Κεφάλαιο 5. Συμπεράσματα-Συζήτηση.....	42
Βιβλιογραφικές Αναφορές	45

Συντομογραφίες

	Αγγλική ορολογία	Ελληνική ορολογία
MS	Mass Spectrometry	Φασματομετρία μάζας
LFIA	Lateral Flow ImmunoAssay	Ανοσοδοκιμασία πλευρικής ροής
AAP	American Academy of Pediatrics	Αμερικανική ακαδημία παιδιατρικής
G-CSF	Granulocyte Colony - Stimulating Factor	Παράγοντας διέγερσης αποικίας κοκκιοκυττάρων
EGF	Epidermal Growth Factor	Επιδερμικός αυξητικός παράγοντας
HMO	Human Milk Olichosaccharites	Ολιγοσακχαρίτες του ανθρώπινου γάλακτος
HIV	Human Immunodeficiency Virus	Ιός της ανθρώπινης ανοσοανεπάρκειας
TGF	Transforming Growth Factor	Μετασχηματιζόμενος αυξητικός παράγοντας
DHA	DocosaHexaenoic Acid	Εικοσιδυαεξανοϊκό οξύ
ARA	ARachidonic Acid	Αραχιδονικό οξύ
MIC	Minimum Inhibitory Concentration	Ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση
HPLC	High Performance Liquid Chromatography	Υγροχρωματογραφία υψηλής απόδοσης
GC	Gas Chromatography	Αέρια χρωματογραφία
TLC	Thin Layer Chromatography	Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας
CE	Capillary Electrophoresis	Τριχοειδική ηλεκτροφόρηση
ELISA	Enzyme - Linked Immunosorbent Assay	Μέθοδος ανίχνευσης ανοσοπροσροφητικού ενζύμου
LC	Liquid Chromatography	Υγροχρωματογραφία
SPME	Solid Phase MicroExtraction	Μικροεκχύλιση στερεάς φάσης
ΠΟΥ		Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας

Πρόλογος

Στη παρούσα εργασία θα γίνει μία παρουσίαση των ενόργανων μεθόδων προσδιορισμού των αντιβιοτικών στο μητρικό γάλα. Στόχος της εργασίας είναι η βιβλιογραφική ανασκόπηση των μεθόδων και της αποτελεσματικότητάς τους για τον προσδιορισμό αντιβιοτικών στο μητρικό γάλα.

Ο θηλασμός είναι αναμφίβολα καλή μορφή διατροφής για νεογέννητα και μικρά βρέφη. Τα πλεονεκτήματα σχετίζονται με τα πολλά θρεπτικά συστατικά που περιέχονται στο μητρικό γάλα καθώς και με τη μεταφορά αντισωμάτων από τη μητέρα στο βρέφος (Maqsood, Skidmore, & Holland, 2022).

Η χρήση αντιβιοτικών είναι αρκετά συχνή μεταξύ των μητέρων που θηλάζουν. Στις περισσότερες περιπτώσεις, τα αντιβιοτικά είναι ασφαλή για τη θηλάζουσα μητέρα και τα μωρά. Τα αντιβιοτικά είναι από τα πιο κοινά φάρμακα που συνταγογραφούνται στις μητέρες και μεταφέρονται σε κάποιο βαθμό στο μητρικό γάλα, σύμφωνα με την Ακαδημία Αμερικανικής Παιδιατρικής (AAP) (Smadi, Jammoul, & El Darra, 2019). Η πλειονότητα των φαρμάκων που εμφανίζονται στην κυκλοφορία του αίματος θα υπάρχει επίσης στο μητρικό γάλα. Ωστόσο, η συγκέντρωση στο γάλα είναι συνήθως χαμηλότερη από τη συγκέντρωση στο αίμα και τα περισσότερα φάρμακα «δεν αποτελούν πραγματικό κίνδυνο για τα περισσότερα βρέφη». Σύμφωνα με τη Mayo Clinic, υπάρχουν εξαιρέσεις κατά τη διάρκεια της γαλουχίας και η επιλογή του κατάλληλου αντιβιοτικού είναι ζωτικής σημασίας. Το φάρμακο μπορεί να περάσει στο μητρικό γάλα προκαλώντας τοξικότητα στο βρέφος (Maqsood, Skidmore, & Holland, 2022).

Για τον εντοπισμό αντιβιοτικών ενώσεων σε βιολογικά υγρά, ακολουθούνται τρεις θεμελιώδεις προσεγγίσεις. Η πρώτη προσέγγιση βασίζεται στον προσδιορισμό της βιολογικής δραστηριότητας της ένωσης. Εφαρμόζονται μικροβιολογικές μέθοδοι που καταγράφουν την αναστολή της ανάπτυξης ενός ευαίσθητου στα αντιβιοτικά δοκιμαστικού στελέχους (González de la Huebra, 2005).

Στο δεύτερο τύπο μεθόδων συνδυάζονται διαφορετικές χρωματογραφικές τεχνικές με κριτήριο τις φυσικοχημικές ιδιότητες των αναλυτών. Το κόστος αυτών των αναλύσεων είναι αρκετά υψηλό και η εφαρμογή τους απαιτεί εξειδικευμένο εξοπλισμό και εξειδικευμένο προσωπικό.

Η τρίτη προσέγγιση βασίζεται στην αναγνώριση της χωρικής εικόνας ενός μορίου αντιβιοτικού από συγκεκριμένο υποδοχέα, δηλαδή αντίσωμα. Τα χαρακτηριστικά των ανοσοαναλυτικών μεθόδων είναι η υψηλή απόδοση, η εξειδίκευση και η ευαισθησία, καθώς και το χαμηλό κόστος και η ευκολία εφαρμογής σε αρκετές περιπτώσεις (Raysyan, Galvidis, Schneider, Eremin, & Burkin, 2020).

Όσον αφορά τη συγκεκριμένη εργασία, είναι σημαντικό να αναφέρουμε ότι εκτός από τις προφανείς άμεσες ανεπιθύμητες ενέργειες της φαρμακευτικής αγωγής στα μωρά, ορισμένα φάρμακα έχουν επίσης μακροπρόθεσμες επιπτώσεις στην ανάπτυξη των βρεφών. Συζητούνται οι προσδιορισμοί που βρέθηκαν στην βιβλιογραφία, όπως η ανοσοχρωματική δοκιμασία προσδιορισμού (Raysyan, Galvidis, Schneider, Eremin, & Burkin, 2020), η διαδοχική φασματοφωτομετρία μάζας υψηλής απόδοσης (MS/MS) και η ανοσοδοκιμασία πλευρικής ροής με βάση σωματίδια λατέξ (Dei Cas, Casagni, Gambaro, Cesari, & Roda, 2019).

Κεφάλαιο 1. Εισαγωγή

Είναι ένα θέμα δημόσιας υγείας, δεδομένων των πλεονεκτημάτων του θηλασμού, τόσο για το παιδί όσο και για τη μητέρα. Οι επιστήμονες υγείας έχουν την ευθύνη να παρέχουν σαφείς πληροφορίες σχετικά με το θηλασμό και τα οφέλη του όσον αφορά τις πεποιθήσεις κάθε γυναίκας, επιτρέποντάς της να λάβει την καλύτερη δυνατή απόφαση. Η ανωτερότητα του μητρικού γάλακτος είναι αναγνωρισμένη και το ανθρώπινο γάλα φαίνεται να ταιριάζει καλύτερα στις απαιτήσεις του νεογέννητου. Η σύνθεσή του επιτυγχάνεται πολύ γρήγορα, τέσσερις-πέντε ημέρες μετά την έναρξη της γαλουχίας.

Σκοπός αυτής της εργασίας είναι να παρουσιάσει τις τεχνικές της ενόργανης χημείας για τον προσδιορισμό των αντιβιοτικών στο μητρικό γάλα.

1.1 Συστατικά

Σε σύγκριση με άλλα θηλαστικά, το ανθρώπινο γάλα έχει σημαντικά μειωμένη περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη. Αυτή η περιεκτικότητα είναι πολύ χαμηλή και κυμαίνεται μεταξύ 0,8 - 1,0 g/100 mL, υποδηλώνοντας αποτελεσματική απορρόφηση και σωστή συσχέτιση των χαρακτηριστικών των αμινοξέων που περιέχονται σε αυτό, με τις απαιτήσεις του μωρού. Το ανθρώπινο γάλα ωστόσο έχει τριπλάσια περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη από το αγελαδινό. Για παράδειγμα, τα σχετικά χαμηλότερα επίπεδα φαινυλαλανίνης, τυροσίνης και μεθειονίνης, καθώς και τα υψηλότερα επίπεδα κυστεΐνης, είναι κατάλληλα για την ενζυμική μεταβολική ανωριμότητα των μωρών (Maqsood, Skidmore, & Holland, 2022). Οι πρωτεΐνες ανθρώπινου γάλακτος έχουν έναν ιδιαίτερο ρόλο. Οι καζεΐνες, οι οποίες αποτελούν το 40% της περιεκτικότητάς του σε πρωτεΐνες (σε σύγκριση με το 80% των πρωτεϊνών του αγελαδινού), έχουν ιδιαίτερες φυσικοχημικές ιδιότητες. Τα μικκύλια που σχηματίζονται από καζεΐνες του ανθρώπινου γάλακτος είναι μικρότερα από αυτά που σχηματίζονται από καζεΐνες αγελαδινού. Αποτελείται κυρίως από καζεΐνη, η οποία όταν υδρολύεται προκύπτουν πεπτίδια που έχουν την ίδια δομή με οπιοειδή (καζεομορφίνες) και γλυκοζυλιωμένη η-καζεΐνη. Διαλυτές πρωτεΐνες είναι εκείνες που δεν καθιζάνουν με καζεΐνες και αποτελούν μεγάλο ποσοστό πρωτεϊνών του ανθρώπινου γάλακτος (60%). Επιπλέον, το ανθρώπινο γάλα είναι πιο εύπεπτο στο στομάχι του μωρού διότι το μωρό οδηγείται σε γρήγορη κένωσή του, εξαιτίας της χαμηλής περιεκτικότητάς του σε πρωτεΐνη και καζεΐνη (Peris-Vicente, et al., 2022).

Άλλες ουσίες που περιέχονται στο μητρικό γάλα είναι οι ανοσοσφαιρίνες, ιδιαίτερα εκκριτικό IgAS (50 έως 100 mL⁻¹ / 100 mL), λακτοφερίνη, ένζυμα (όπως λυσοζύμη και λιπάση), αυξητικοί παράγοντες όπως αυτός που μοιάζει με ινσουλίνη (Insulin-Like Growth Factor-1, ILF-1), ο αυξητικός παράγοντας μετασχηματισμού (Transforming Growth Factor, TGF), ο αυξητικός παράγοντας λευκοκυττάρων (G-CSF) και ο επιδερμικός αυξητικός παράγοντας (Epidermal Growth Factor, EGF), ο οποίος έχει θρεπτική επίδραση στον γαστρικό και εντερικό βλεννογόνο.

Υπάρχουν επίσης λεπτίνη, γκρελίνη και αδιπονεκτίνη, πρωτεΐνες δέσμησης βιταμίνης B9, B12 και D, θυροξίνη, κορτικοστεροειδή και πολυάριθμα προφλεγμονώδη (TNF-, IL-1, IL-6, IL-8, IL-12) και αντιφλεγμονώδεις κυτοκίνες (IL-10, TGF-2). Τα πεπτίδια, τα ελεύθερα αμινοξέα (συμπεριλαμβανομένης της ταυρίνης), η ουρία, το ουρικό οξύ, τα αμινοσάκχαρα, οι αλκοόλες, οι πολυαμίνες, τα νουκλεοτίδια και η αντιοξειδωτική ουσία καρνιτίνη, αντιπροσωπεύουν το 20% έως 25% του συνολικού αζώτου στο μητρικό γάλα έναντι του αγελαδινού γάλακτος, στο οποίο αντιστοιχεί μόνο σε 3% έως 5%. Το ανθρώπινο γάλα έχει πέντε έως 10 φορές περισσότερα ελεύθερα αμινοξέα από το γάλα των άλλων θηλαστικών, ιδιαίτερα γλουταμικό/γλουταμίνη, το οποίο είναι σημαντικό για τη θρέψη του εντέρου, ενώ το pH του είναι ανάμεσα στο 6.35–7.35 (Peris-Vicente, et al., 2022).

1.2 Η Μητέρα

Ανεξάρτητα από τον τρόπο ζωής ή τις διατροφικές συνήθειες των γυναικών, η παραγωγή γάλακτος είναι αξιοσημείωτα συνεπής σε διάφορες κοινότητες και εθνότητες σε όλο τον κόσμο. Ο μαστικός αδένας έχει την ικανότητα να παράγει το γάλα που απαιτείται για την ανάπτυξη του παιδιού σε κανονικές συνθήκες. Η παραγωγή γάλακτος σε μητέρες διδύμων μπορεί να είναι σχεδόν διπλάσια από αυτή μιας μεμονωμένης εγκυμοσύνης. Οι γυναίκες που θηλάζουν μόνο από τον ένα μαστό για διάφορους λόγους (π.χ. δυσπλασίες) έχουν παραγωγή γάλακτος που είναι εντυπωσιακά παρόμοια με εκείνες που θηλάζουν και από τους δύο μαστούς. Τέλος, το μητρικό γάλα σπάνια καταναλώνεται πλήρως κατά τη διάρκεια του θηλασμού (Pärnänen, Karkman, Hultman, Lyra, & Bengtsson-Palme, 2018). Η ικανότητα αποθήκευσης του μαστού εξαρτάται από τη ζήτηση του βρέφους, η οποία καθορίζει την ποσότητα του γάλακτος που παράγεται από τη μητέρα.

Η παραγωγή γάλακτος σημαίνει ενεργειακό κόστος για τη μητέρα, που αντισταθμίζεται από την αύξηση της ενεργειακής πρόσληψης αλλά και από την κινητοποίηση του αποθηκευμένου λίπους κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης. Το ενεργειακό κόστος της γαλουχίας καθορίζεται κυρίως από την ποσότητα γάλακτος που παράγεται, η οποία εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τη ζήτηση του παιδιού. Αυτή η ποσότητα μειώνεται μόλις χορηγηθεί τροφή εκτός από το μητρικό γάλα: η παραγωγή γάλακτος είναι κατά μέσο όρο 710mL ημερησίως κατά τους πρώτους 2 μήνες και στη συνέχεια αυξάνεται ελαφρώς, περίπου 800 έως 900mL για βρέφη και παιδιά που επωφελούνται από τον αποκλειστικό θηλασμό (Andreas, Kampmann, & Le-Doare, 2015).

Η ενεργειακή αξία του ανθρώπινου γάλακτος ποικίλλει ανάλογα με την ώρα της σίτισης, από το ένα στήθος στο άλλο και ακόμη και κατά τη διάρκεια του θηλασμού. Μια μέση τιμή είναι 67 kcal/100mL. Για μια γυναίκα που παράγει 750mL γάλακτος την ημέρα, η ενεργειακή αξία του παραγόμενου γάλακτος είναι περίπου 500 kcal ($750\text{mL} \times 67 \text{ kcal}/100 \text{ mL}$). Με μια ενεργειακή απόδοση της παραγωγής γάλακτος που εκτιμάται μεταξύ 80% και 85%, αυτό αντιστοιχεί σε μία αύξηση των απαιτήσεων της τάξης του 630 kcal/ημέρα. Αυτές οι πρόσθετες ενεργειακές ανάγκες καλύπτονται εν μέρει από την κινητοποίηση του λίπους που συσσωρεύεται κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης (Andreas, Kampmann, & Le-Doare, 2015).

Η απώλεια βάρους είναι μεταβαλλόμενη από τη μια γυναίκα στην άλλη και γενικά περιορίζεται στους πρώτους τρεις μήνες του θηλασμού. Σε γυναίκες με καλές διατροφικές συνήθειες σε βιομηχανικές χώρες, είναι κατά μέσο όρο 800 γραμμάρια το μήνα. Δεδομένου ότι αυτή η απώλεια βάρους έχει ενεργειακό ισοδύναμο 6,5 kcal/γραμμάριο, αντιστοιχεί στη χρήση 175 kcal την ημέρα κατά μέσο όρο (Palmeira & Carneiro-Sampaio, 2016). Στην περίπτωση αυτή, οι ενεργειακές ανάγκες μειώνονται κατά το ίδιο ποσό και αντιστοιχούν σε περίπου 450 kcal/ημέρα, που καλύπτονται πολύ εύκολα από την αύξηση της κατανάλωσης τροφίμων στις βιομηχανικές χώρες.

1.3 Οφέλη

Η ανάπτυξη των παιδιών που θηλάζουν αποκλειστικά αποκλίνει σημαντικά από τις διεθνείς καμπύλες ανάπτυξης αναφοράς των παιδιών τα οποία δεν θηλάζαν. Κατά το πρώτο τρίμηνο, η αύξηση του ύψους και ιδιαίτερα του βάρους είναι στην πραγματικότητα

μεγαλύτερη σε παιδιά που θηλάζουν αποκλειστικά. Μετά το πρώτο τρίμηνο, ο αποκλειστικός θηλασμός σχετίζεται με βραδύτερη αύξηση βάρους από ό,τι παρατηρείται στα βρέφη που τρέφονται με γάλα σε σκόνη (Walker, 2010). Περίπου στην ηλικία των έξι-οκτώ μηνών, παρατηρείται μια μέτρια αλλά αδιαμφισβήτητη επιβράδυνση στην ανάπτυξη του ύψους. Ενώ το ύψος είναι ίδιο στο πρώτο έτος, η διαφορά στο βάρος μεταξύ εννέα και 12 μηνών κατά το πρώτο έτος είναι σημαντική, με το βάρος των παιδιών που θηλάζουν να είναι χαμηλότερο κατά σχεδόν 600 γραμμάρια από αυτό των παιδιών που τρέφονται με «ξένο» γάλα.

Ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας κατά την δεκαετία του 1990 κατέληξε στο συμπέρασμα ότι τα υπάρχοντα διαγράμματα ανάπτυξης δεν περιγράφουν επαρκώς τη φυσιολογική ανάπτυξη των παιδιών που θηλάζουν και ότι η χρήση των διαγραμμάτων αυτών για την αξιολόγηση της υγείας και της διατροφικής κατάστασης των παιδιών σε ατομικό επίπεδο ή για την εκτίμηση του υποσιτισμού στον πληθυσμό, είναι ακατάλληλη. Στη συνέχεια, αποφασίστηκε να αναπτυχθούν νέες καμπύλες που ονομάζονται πρότυπα ανάπτυξης, με αναφορά στον δεδηλωμένο στόχο της περιγραφής, δηλαδή το πώς μεγαλώνουν τα παιδιά όταν θηλάζουν και το πώς μεγαλώνουν σε καλές συνθήκες υγιεινής (Walker, 2010).

Η μελέτη του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας (Π.Ο.Υ) πραγματοποιήθηκε από το 1997 έως το 2003 σε έξι πολύ διαφορετικές χώρες (Βραζιλία, Ηνωμένες Πολιτείες, Γκάνα, Ινδία, Νορβηγία, Ομάν). Στην έρευνα αυτή που ασχολήθηκε από τη γέννηση έως την ηλικία των 2 ετών, διατυπώθηκαν πρότυπα ανάπτυξης μέσω της διαχρονικής παρακολούθησης 882 παιδιών που ζούσαν σε συνθήκες ευνοϊκές για την ανάπτυξή τους. Προκειμένου να είναι ορθώς καταγεγραμμένα τα πρότυπα, διασφαλίστηκε ότι δεν υπήρχε κανένας παράγοντας υγείας ή περιβάλλοντος που να έχει αρνητική επίδραση στην ανάπτυξη αυτών των παιδιών. Στη μελέτη, η μητέρα ήταν πάντα μη καπνίστρια και ακολουθώντας τις συστάσεις του ΠΟΥ (αποκλειστικός ή κυρίαρχος θηλασμός για τουλάχιστον τέσσερις μήνες, διαφοροποίηση τροφής στους έξι μήνες και συνέχιση του θηλασμού έως 12 μήνες τουλάχιστον), χωρίς δίδυμη κύηση και με απουσία αξιοσημείωτης παθολογίας. Τα τελειόμηνα βρέφη με χαμηλό βάρος γέννησης δεν αποκλείστηκαν. Τα βρέφη παρακολούθηθηκαν από την γέννηση και μετέπειτα από το σπίτι, με συνολικά 21 επισκέψεις, κατά τις εβδομάδες 1, 2, 4, 6, στη συνέχεια μηνιαία, μεταξύ του δεύτερου και του 12^{ου} μήνα και στη συνέχεια κάθε δύο μήνες (Palmeira & Carneiro-Sampaio, 2016).

Για την επιστήμη της ψυχολογίας, ο θηλασμός αποτελεί βασικό στοιχείο της σχέσης μητέρας-παιδιού: «μια κατάσταση που την εμπλέκει βαθιά στο σώμα της και στην ψυχική της ζωή...Ο θηλασμός παρατείνει τον χρόνο της εγκυμοσύνης και του τοκετού και είναι αναπόσπαστο μέρος της σεξουαλικής και όχι μόνο ζωής της». Σε μια εποχή που η μητέρα και το παιδί σχηματίζουν μια δυάδα, ο θηλασμός προάγει τη στενότερη οικειότητα και την κοινή ευχαρίστηση. Τα μπράτσα, το μπούστο, το πρόσωπο της μητέρας που θηλάζει περιορίζουν τον ορίζοντα του μωρού από όλες τις πλευρές και σχηματίζουν μια κόγχη όπου διατηρείται η μητρική ζεστασιά και μυρωδιά. Αυτή η εγγύτητα της σχέσης μητέρας-παιδιού προωθεί τις ανταλλαγές σε μια δυναμική που οι παιδοψυχίατροι αποκαλούν «σπείρα συναλλαγής» (Pärnänen, Karkman, Hultman, Lyra, & Bengtsson-Palme, 2018).

Η επιστημονική απόδειξη του σωστού ρόλου του θηλασμού σε αυτά τα συναισθηματικά και πνευματικά οφέλη για το παιδί και για τη μητέρα είναι πολύ δύσκολη. Είναι απαραίτητο να υπογραμμιστούν οι δυσκολίες που ενυπάρχουν στις μεθόδους αξιολόγησης των γνωστικών λειτουργιών, των οποίων οι αριθμητικές εκτιμήσεις δεν πρέπει να είναι παραπλανητικές. Πολλές μελέτες έχουν αναζητήσει σχέση μεταξύ του θηλασμού και της πνευματικής απόδοσης. Τα αποτελέσματα των μελετών είναι αντιφατικά, αλλά ποτέ μόνον υπέρ του θηλασμού (Palmeira & Carneiro-Sampaio, 2016).

Η κλινική εμπειρία έχει δείξει ότι τα παιδιά που θηλάζουν και ζουν σε χώρες με χαμηλά επίπεδα υγιεινής και εισοδήματος έχουν πολύ χαμηλότερη θνησιμότητα και νοσηρότητα από τα παιδιά που δεν θηλάζουν. Μέχρι την εμφάνιση της βακτηριολογίας, της υγιεινής και της επιδημιολογίας υγιεινής, ήταν δύσκολο ωστόσο να εκτιμηθεί σωστά αυτή η πιθανή προστατευτική δύναμη, πόσο μάλλον να διακριθούν οι λόγοι για αυτήν (Kent, Prime, & Garbin, 2012).

Η πρώτη σημαντική πρόοδος από αυτή την άποψη εμφανίστηκε στις αρχές του 20^{ου} αιώνα από έναν νεαρό Γάλλο γιατρό, τον Tissier. Έχοντας παρατηρήσει ότι στα βρέφη που θηλάζαν, τα κόπρανα περιείχαν μεγαλύτερες ποσότητες μικρο-οργανισμών γένους “Bifidus”, από εκείνα των βρεφών που δεν θηλάζαν, πρότεινε αρχικά μια πιθανή σχέση μεταξύ αυτού του ευρήματος και του γεγονότος ότι τα θηλάζοντα βρέφη παρουσίαζαν λιγότερο οξεία διάρροια (Kent, Prime, & Garbin, 2012). Ο Tissier πριν από περισσότερο από έναν αιώνα, είχε την άποψη ότι το ανθρώπινο γάλα είχε αυτή την προστατευτική δύναμη επειδή ευνοούσε την ανάπτυξη ωφέλιμων μικροβίων στο έντερο.

1.4 Προστατευτικοί Παράγοντες

Το ανθρώπινο γάλα περιέχει πολλές ουσίες και κύτταρα τα οποία μέσω της άμεσης και έμμεσης δράσης τους, συμβάλλουν αποτελεσματικά στην πρόληψη λοιμώξεων στα μικρά παιδιά. Τα ανοσοεπαρκή κύτταρα (λεμφοκύτταρα, μακροφάγα), τα οποία συμμετέχουν άμεσα στην καταστροφή των επιθετικών μικροοργανισμών με τις φαγοκυτταρικές τους δράσεις, καθώς και η λακτοφερίνη, η οποία δεσμεύει τον σίδηρο και δεν επιτρέπει την ανάπτυξη παθογόνων μικρο-οργανισμών στο στομάχι, τα νουκλεοτίδια (τα οποία διεγείρουν την ανάπτυξη λεμφικού ιστού που σχετίζεται με την πεπτική οδό) και οι ολιγοσακχαρίτες, είναι πρεβιοτικοί παράγοντες οι οποίοι επιτρέπουν την ανάπτυξη και την εμφύτευση bifidobacteria. Τα bifidobacteria λειτουργούν ως φραγμός έναντι των παθογόνων παραγόντων. Επιπλέον, υπάρχουν ανοσοσφαιρίνες όπως η εκκριτική IgA, η οποία είναι ιδιαίτερα ανθεκτική στην πρωτεόλυση και προσκολλάται στον εντερικό βλεννογόνο και εμποδίζει την προσκόλληση ιών και βακτηρίων, η λυσοζύμη, η οποία προκαλεί υδρόλυση των μοριακών δεσμών των βακτηριακών τοιχωμάτων των περισσότερων βακτηρίων και τα ελεύθερα λιπαρά οξέα και μονογλυκερίδια (κυρίως του λαυρικού και λινολεϊκού οξέος) με λυτική δράση για τα τοιχώματα των βακτηρίων, των πρωτόζωων και των ιών (Kent, Prime, & Garbin, 2012).

Άλλοι παράγοντες που υπάρχουν στο ανθρώπινο γάλα ενισχύουν την εντερική και αναπνευστική επιθηλιακή άμυνα-φαινόμενο φραγμού. Η κορτιζόλη τροποποιεί το προφίλ γλυκοζυλίωσης των εντερικών μικρολάχνων και στα ζώα έχει ευεργετική επίδραση στην ωρίμανση των βλεννογόνων κυττάρων. Μια μεγάλη ποικιλία γαστρεντερικών ορμονών όπως μπομπεζίνη, χολοκυστοκινίνη, πεπτίδιο ΥΥ και αγγειοδραστικό εντερικό πεπτίδιο, οι αυξητικοί παράγοντες, τα ελεύθερα πεπτίδια ή τα πεπτίδια που απελευθερώνονται κατά την υδρόλυση καζεΐνης, παρέχονται από το θηλασμό (Kent, et al., 2006). Οι ουσίες αυτές έχουν ευεργετικές επιδράσεις στην τροφικότητα του επιθηλίου, αλλά και στην έκκριση και σύνθεση των βλεννινών, τροποποιώντας έτσι ευνοϊκά τις αλληλεπιδράσεις του εντερικού ή αναπνευστικού συγκροτήματος φραγμού - παθογόνων μολυσματικών παραγόντων.

Πέρα από αυτούς τους παράγοντες που συνδέονται ειδικά με τα συστατικά του ανθρώπινου γάλακτος, εμπλέκονται σε αυτές τις διαδικασίες προστασίας κάποιοι θεμελιώδεις μηχανισμοί για την ανταλλαγή βιολογικών μηνυμάτων μεταξύ της μητέρας

και του θηλάζοντος παιδιού της, με πιο γνωστό τη μεταφορά της παθητικής μητρικής ανοσίας (Andreas, Kampmann, & Le-Doare, 2015).

Επίσης, η προστατευτική δράση έναντι λοιμώξεων είναι το κύριο όφελος για την υγεία του θηλασμού. Η λοιμώδης νοσηρότητα και θνησιμότητα είναι πράγματι πολύ χαμηλότερη στα βρέφη που θηλάζουν, ειδικότερα στις αναπτυσσόμενες χώρες. Η μετα-ανάλυση AHRQ έδειξε ότι ο θηλασμός συσχετίστηκε με μειωμένο κίνδυνο οξείας μέσης ωτίτιδας καθώς και μείωση του κινδύνου οξείας λοιμώδους διάρροιας κατά το πρώτο έτος της ζωής, που επιμένει για δύο μήνες μετά την διακοπή του θηλασμού (Pärnänen, Karkman, Hultman, Lyra, & Bengtsson-Palme, 2018). Ο θηλασμός δεν έχει αποδεδειγμένη προστατευτική δράση έναντι του κινδύνου λοιμώξεων του κατώτερου αναπνευστικού, αλλά σχετίζεται με 72% μείωση του κινδύνου νοσηλείας για σοβαρή αναπνευστική λοίμωξη σε παιδιά κάτω του ενός έτους, υπό τον όρο ότι είναι αποκλειστικός και διαρκεί τουλάχιστον τέσσερις μήνες. Η προστατευτική δράση τείνει να εξασθενεί όταν σταματήσει ο θηλασμός και μειώνεται μετά την ηλικία των έξι μηνών (Pärnänen, Karkman, Hultman, Lyra, & Bengtsson-Palme, 2018).

Στο μητρικό γάλα βρίσκονται επίσης ενδογενή αντιμικροβιακά συστατικά, όπως κυτοκίνες, πολυακόρεστα λιπαρά οξέα, ανοσοδιεγερτικές πρωτεΐνες και γλυκοπρωτεΐνες όπως η λακτοφερίνη, οι βλεννίνες και οι ολιγοσακχαρίτες του ανθρώπινου γάλακτος (HMOs). Στον μαστικό αδέννα, τα λεμφοκύτταρα απελευθερώνουν αντισώματα IgA. Αυτά τα λεμφοκύτταρα στοχεύουν εντερικά μικρόβια και αντιγόνα στα οποία οι μητέρες είχαν προηγουμένως εκτεθεί. Περιλαμβάνονται αντισώματα σε οργανισμούς όπως είδη *Shigella* και *Campylobacter* που μπορεί να είναι ανθεκτικά στα αντιβιοτικά. Για παράδειγμα, τα αντισώματα αυτά αποτρέπουν την πρόσβαση των παθογόνων σε εντερικούς επιθηλιακούς υποδοχείς, βοηθούν στη δέσμευση των παθογόνων σε βακτηριακές θέσεις προσκόλλησης και παγίδευσής τους στη βλέννα και τούς προσδίδουν ιδιότητες για να καταστεί η ανίχνευση δυνατή από ανοσοκύτταρα που φέρουν υποδοχείς Fc. Ενθαρρύνοντας την εκκένωσή τους μία φορά στο έντερο, το sIgA βοηθά στην απομάκρυνση συγκεκριμένων παθογόνων (Peterson R, 2013).

Τα HMOs (Human Milk Oligosaccharites - ολιγοσακχαρίτες ανθρώπινου γάλακτος), είναι μια κατηγορία δομικά ποικίλων μη συζευγμένων γλυκανών που υπάρχουν μόνο στο ανθρώπινο γάλα και θεωρείται ότι επηρεάζουν τη σύνθεση της αναπτυσσόμενης μικροχλωρίδας του εντέρου του νεογέννητου. Ανάλογα με το στάδιο του

θηλασμού και τις μητέρες, τα επίπεδα HMOs αλλάζουν με την πάροδο του χρόνου. Η υψηλή περιεκτικότητα σε HMOs στο έντερο του πρώιμου βρέφους μπορεί να μειώσει την ευαισθησία των παιδιών στη μόλυνση από μικροοργανισμούς (He & Liu, 2014).

Οι HMOs έχουν διπλό ρόλο στην ανάπτυξη του ανοσοποιητικού συστήματος του βρέφους. Είναι ζωτικής σημασίας πρεβιοτικά που υποστηρίζουν την ανάπτυξη βακτηριακών στελεχών που είναι ευεργετικά για την υγεία, αλλά έχει επίσης αποδειχθεί ότι έχουν και άμεση αντική λειτουργία (Delgado, et al., 2009). Οι HMOs μπορούν να εμποδίσουν ορισμένους ιούς να προσκολληθούν στο κύτταρο-ξενιστή, όπως τον νοροϊό, τον HIV, τον ιό της γρίπης και τον ροταϊό. Τα HMO's εμποδίζουν τον ιό από το να εισέλθει στο κύτταρο χάρη στη συγκρίσιμη γλυκοσιδική δομή τους, με αυτή που φαίνεται στην επιφάνεια του βλεννογόνου. Σύμφωνα με μελέτες, τα βρέφη που θηλάζουν φαίνεται να έχουν χαμηλότερη απόκριση αντισωμάτων στον εμβολιασμό κατά του ροταϊού. Ωστόσο, μια έρευνα των Arroyo et al αντίθετα έχει δείξει πώς η χορήγηση διαφόρων HMOs μπορεί να ενισχύσει την απόκριση αντισωμάτων στην ανοσοποίηση με το στέλεχος του ροταϊού που ανήκει στον γονότυπο P, ο οποίος χρησιμοποιείται τώρα σε πολλές χώρες (Arroyo, et al., 2010).

Μικρές πρωτεΐνες που ονομάζονται κυτοκίνες έχουν ρόλο στη μεσοκυτταρική σηματοδότηση. Μια σημαντική ποικιλία κυτοκινών αντιφλεγμονώδους φύσης, μπορεί να βρεθεί στο μητρικό γάλα. Μεταξύ των φλεγμονωδών κυτοκινών, ο μετασχηματιζόμενος αυξητικός παράγοντας (TGF) φαίνεται να έχει αξιοσημείωτη ανοσοτροποποιητική και αντική δράση. Ο TGF ελέγχει θετικά τη σύνθεση IgA και ως εκ τούτου, την παθητική ανοσία. Το μητρικό γάλα έχει μεγαλύτερα επίπεδα TGF εάν η μητέρα εκτίθεται σε πολλά μικροβιακά ερεθίσματα, υποδεικνύοντας ότι μπορεί να υπάρχει ρύθμιση για να βοηθήσει στην προστασία του νεογέννητου (Fitzstevens, 2017).

Επίσης, τα λιπίδια στο μητρικό γάλα ή και τα υποπροϊόντα της πέψης τους, μπορεί να έχουν μια ιδιαίτερη αντιβακτηριακή και αντική λειτουργία. Τα λιπαρά οξέα που βρίσκονται στο μητρικό γάλα έχουν αντική δράση. Οι τριακυλογλυκερόλες, οι οποίες περιέχονται στο μητρικό γάλα εγκλωβίζονται σε φωσφολιπιδικές μεμβράνες. Οι τριακυλογλυκερόλες διασπώνται από τις λιπάσες του σάλιου και του στομάχου στο βρέφος σε μονογλυκερίδια και ελεύθερα λιπαρά οξέα. Αρκετά ελεύθερα λιπαρά οξέα, έχουν ισχυρή αντιβακτηριακή και αντική δράση, ανάλογα με το μήκος τους και το επίπεδο κορεσμού τους. Ιδιαίτερα τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα μακράς αλυσίδας

φαίνεται να έχουν ισχυρά αντιβακτηριακά αποτελέσματα, τόσο κατά των βακτηρίων όσο και των ιών.

Τα κύτταρα μπορεί να παράγουν περισσότερα από αυτά τα λιπαρά οξέα ως απόκριση σε μια ασθένεια, ειδικά εικοσιδυαεξανοϊκό οξύ (DHA), αραχιδονικό οξύ (ARA) και εικοσαπεντανοϊκό οξύ (EPA). Ακόμα, γαστρικές λιπάσες επηρεάζουν τις λιποξίνες, τις ρεσολβίνες, τις προστατευτικές ουσίες και τις μαρεσίνες με αποτέλεσμα τις ισχυρές ανοσοτροποποιητικές και αντιμικροβιακές επιδράσεις (Pannaraj, 2017).

Τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα και οι μεταβολίτες τους (προσταγλανδίνες, θρομβοζάνες και λευκοτριένια), έχουν διερευνηθεί ως προς την ικανότητά τους να αναστέλλουν και τον SARS-CoV-2.

Μια υπόθεση που έχει διατυπωθεί, είναι ότι η απουσία των ενώσεων που έχουν αναφερθεί ως αντιμικροβιακά συστατικά του μητρικού γάλακτος, μπορεί να επηρεάσει την πορεία της νόσου του SARS-CoV-2 λόγω της επίδρασής τους ενάντια στους ιούς που φέρουν περίβλημα και στον έλεγχο της φλεγμονής. Η σχέση μεταξύ της περιεκτικότητας σε πολυακόρεστα λιπαρά οξέα στο μητρικό γάλα και της αντιβακτηριακής και αντιϊκής δράσης ακόμα μελετάται. Η μελέτη για την αντική δράση των λιπιδίων έχει επικεντρωθεί στα προϊόντα οξειδωσης της χοληστερόλης. Οι οξυστερόλες, οι οποίες παράγονται όταν οξειδώνεται η χοληστερόλη και βρίσκονται στο μητρικό γάλα, κατά τη διάρκεια της γαλουχίας, κατά τους Cınra et al. (2019), μπορεί να καταστείλουν διάφορους κοινούς ιούς στον παιδιατρικό πληθυσμό (ρινοϊό και ροταϊό). Η 25-υδροξυχοληστερόλη (25OHC) και η 27-υδροξυχοληστερόλη (27OHC) φαίνεται να έχουν ευρύτερη και πιο σημαντική αντιβακτηριακή δράση μεταξύ των οξυστερολών. Το πρωτόγαλα έχει υψηλή περιεκτικότητα σε 27OHC. Μπορεί να θεωρηθεί ως μια επιπλέον αντική ουσία η οποία βοηθά στην ενίσχυση του αναπτυσσόμενου ανοσοποιητικού συστήματος του μωρού.

Η λακτοφερίνη μπορεί να έχει προστατευτική δράση έναντι του SARS-CoV-2 (Habib, 2021) (Campione, Cosio, & Rosa, 2020). Η ικανότητα αυτής της λακτοφερίνης να συνδέεται με τον σίδηρο στο γάλα και να τον απομακρύνει από τον βακτηριακό μεταβολισμό, βοηθά στη μείωση ανάπτυξης λοιμώξεων. Αποτρέποντας την είσοδο του ιού στα κύτταρα-ξενιστές, η λακτοφερίνη έχει επίσης ισχυρή αντική δράση ενάντια σε μια ποικιλία ιών DNA και RNA, συμπεριλαμβανομένου του ροταϊού, του ιού της ανθρώπινης ανοσοανεπάρκειας, του ιού των ανθρωπίνων θηλωμάτων και του ιού του απλού έρπητα.

Προτείνονται δυο μηχανισμοί για την εξήγηση αυτής της αντιαικής δράσης. Η λακτοφερίνη έχει την ικανότητα να αναγνωρίζει βιοχημικά χαρακτηριστικά των ιών, εμποδίζοντάς τους να προσκολληθούν στα κύτταρα. Επίσης η λακτοφερίνη μπορεί να προσκολληθεί σε μόρια θειικής ηπαράνης, τα οποία είναι άφθονα στη βασική μεμβράνη. Τα μόρια θειικής ηπαράνης χρησιμεύουν ως θέσεις προσκόλλησης και συγκέντρωσης για πολλούς ιούς για να τους βοηθήσουν να συνδεθούν με τον κυτταρικό υποδοχέα (Campione, Cosio, & Rosa, 2020). Η απενεργοποίηση της θειικής ηπαράνης από τη λακτοφερίνη, αποτελεί το δεύτερο προτεινόμενο μηχανισμό εξήγησης της αντιαικής δράσης της λακτοφερίνης.

Η τενασκίνη-C είναι μια άλλη πρωτεΐνη που βρίσκεται στο μητρικό γάλα και έχει ενδιαφέρουσες αντιαικές ιδιότητες. Εξουδετερώνει αποτελεσματικά τον ρετροϊό HIV και αποτρέπει τη μετάδοση μέσω του μητρικού γάλακτος. Η αποτελεσματικότητα αυτής της αναστολής φαίνεται να είναι πολύ μεγαλύτερη από εκείνη της λακτοφερίνης και είναι συγκρίσιμη με εκείνη του μονοκλωνικού αντισώματος που εξουδετερώνει τον HIV-1. Η αλληλεπίδραση μεταξύ της δομής της γλυκάνης της τενασκίνης-C και του περιβλήματος του HIV διαδραματίζει ρόλο στην αντιαική δράση της. Έχει προταθεί ότι ο ίδιος μηχανισμός αλληλεπίδρασης γλυκάνης μπορεί να αποτρέψει την εξάπλωση άλλων εγκλεισμένων ιών όπως ο ιός της γρίπης (Fitzstevens, 2017).

Μεγάλα γλυκοζυλιωμένα μόρια γνωστά ως βλεννίνες μπορούν να βρεθούν σε πολλά διαφορετικά σωματικά υγρά. Το ιξώδες των σωματικών υγρών αυξάνεται με την παρουσία βλεννινών. Οι τύποι ένα και τέσσερα των διαφορετικών υποτύπων βλεννίνης (MUC1 και MUC4) ανιχνεύονται στο μητρικό γάλα. Αυτοί οι υπότυποι έχουν δείξει αντιαική αποτελεσματικότητα *in vitro* έναντι του ιού HIV, του ιού της γρίπης και άλλων ιών. Η δράση τους βασίζεται στα πολλά σιαλυλιωμένα υπολείμματα που διαθέτουν και τα οποία προσκολλώνται στον ιό και τον παγιδεύουν, εμποδίζοντάς τον να φτάσει στην κυτταρική επιφάνεια. Η προστατευτική δράση των βλεννινών έναντι του SARS-CoV-2 έχει επίσης προταθεί, λαμβάνοντας υπόψη τους κυτταρικούς στόχους αυτού του ιού (Campione, Cosio, & Rosa, 2020). Υπήρξαν επίσης εικασίες ότι σε περιπτώσεις μόλυνσης της μητέρας από ορισμένους ιούς, όπως ο ιός ZIKA (ZIKV), η ποσότητα βλεννίνης στο μητρικό γάλα και το ιξώδες της μπορεί να αυξηθούν, παρέχοντας στο βρέφος επιπλέον προστασία. Για τον SARS-CoV-2, ο παρόμοιος μηχανισμός έχει προταθεί.

Κεφάλαιο 2. Φαρμακευτική Αγωγή και Αντιβιοτικά Κατά Τον Θηλασμό - Γενικός Προβληματισμός

Το μητρικό γάλα είναι η προτιμώμενη διατροφή για μωρά έως έξι μηνών. Μπορεί όμως κατά τη διάρκεια αυτής της περιόδου η θηλάζουσα μητέρα να πρέπει να λάβει αντιβιοτική θεραπεία για τη θεραπεία της ενδομητρίτιδας, της μαστίτιδας, της ουρολοίμωξης, της αναπνευστικής οδού ή άλλων λοιμώξεων. Πριν συνταγογραφηθεί ένα αντιβιοτικό ή οποιοδήποτε άλλο φάρμακο σε μία θηλάζουσα ασθενή, ο γιατρός θα πρέπει να σταθμίσει τον κίνδυνο διακοπής του θηλασμού έναντι του κινδύνου πιθανής βλάβης στο παιδί. Τα διαθέσιμα δεδομένα για τα φάρμακα και το θηλασμό είναι συχνά μερικά ή ελλιπή (Walker, 2010).

Οι διαθέσιμες φαρμακοκινητικές μελέτες περιλαμβάνουν λίγα άτομα, είναι μικρής διάρκειας και συχνά βασίζονται στη χρήση μίας δόσης. Η ικανότητα προσδιορισμού πιθανών επιπτώσεων στα βρέφη είναι επομένως περιορισμένη. Οι παρακάτω πληροφορίες θα είναι χρήσιμες στην συνταγογράφηση αντιβιοτικών για γυναίκες που θηλάζουν.

2.1 Παρουσία Αντιβιοτικών Στο Μητρικό Γάλα

Η διέλευση των φαρμάκων στο μητρικό γάλα, γίνεται μέσω της παθητικής διάχυσης και της ενεργητικής μεταφοράς. Οι φυσικοχημικές ιδιότητες του φαρμάκου θα καθορίσουν την ποσότητα που εκκρίνεται στο γάλα. Φάρμακα με υψηλή δέσμευση με πρωτεΐνες πλάσματος, χαμηλή διαλυτότητα λιπιδίων, υψηλό μοριακό βάρος, μικρό χρόνο ημιζωής και χαμηλό βαθμό ιονισμού όπως ασθενή οξέα, σουλφοναμίδες και πενικιλίνες καταλήγουν σε μικρότερη συγκέντρωση στο μητρικό γάλα από ό,τι στο μητρικό πλάσμα.

Άλλοι παράγοντες που πρέπει να ληφθούν υπόψη είναι η συχνότητα και η διάρκεια των τροφών, ο χρόνος εκκένωσης του στομάχου του βρέφους, η δόση του φαρμάκου που λαμβάνεται από τη μητέρα, η οδός χορήγησης (συστηματική ή τοπική), η διάρκεια δράσης του φαρμάκου και η παρουσία ενεργών μεταβολιτών (Lemas, 2016).

2.2 Έκθεση Του Βρέφους Σε Αντιβιοτικά

Η δράση του φαρμάκου είναι συνάρτηση της απορρόφησης, της κατανομής, του μεταβολισμού και της αποβολής του από το παιδί. Λόγω της ανωριμότητας του νεφρικού και του ηπατικού συστήματος, η ηλικία κύησης είναι ο πιο σημαντικός παράγοντας που πρέπει να ληφθεί υπόψη. Σε παιδιά που γεννιούνται πρόωρα, η κάθαρση δεν είναι παρόμοια με αυτή των ενηλίκων έως την ηλικία των έξι ή επτά μηνών. Επιπλέον, τα επιστημονικά δεδομένα και η κλινική εμπειρία δείχνουν ότι αρκετά φάρμακα είναι συμβατά με το θηλασμό (Mathew, 2004). Υποθέτοντας ότι ένα φάρμακο είναι ασφαλές κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης, θα είναι επίσης ασφαλές κατά τη διάρκεια του θηλασμού. Από την άλλη πλευρά, η φαρμακοκινητική ενός φαρμάκου σε εγκυμονούσες είναι πολύ διαφορετική από αυτή των θηλαζουσών γυναικών. Τα δεδομένα και στις δύο περιπτώσεις δεν είναι εναλλάξιμα. Στα βρέφη, η κάθαρση δεν είναι ώριμη μέχρι την ηλικία των έξι ή επτά μηνών. Αναγράφεται πάντα στη μονογραφία ενός φαρμάκου εάν είναι δυνατή η χορήγηση κατά τη γαλουχία (Mathew, 2004).

Γενικά, οι μονογραφίες συνιστούν την αποφυγή της χρήσης φαρμάκων κατά τη γαλουχία, συχνά για λόγους προσοχής ή επειδή τα δεδομένα για την ασφάλεια του φαρμάκου είναι ανεπαρκή. Συνιστάται να συμβουλευόμαστε αναγνωρισμένες πηγές πληροφοριών που μας παρέχουν σχετικές πληροφορίες για χρήση κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης ή του θηλασμού. Η αλλοίωση της εντερικής χλωρίδας, που προκαλεί κυρίως διάρροια ή κράμπες στην κοιλιά, είναι μια επίδραση που σχετίζεται με όλα τα αντιβιοτικά. Για τον λόγο αυτό κρίνεται σημαντικό η μητέρα να αναφέρει στο εργαστήριο τη λήψη ενός αντιβιοτικού από πλευράς της, δεδομένου ότι αυτή μπορεί να τροποποιήσει τα αποτελέσματα της καλλιέργειας στο βρέφος (παρουσία πυρετού), σε περίπτωση που αυτή κριθεί αναγκαία (Arroyo, et al., 2010). Οι μακρολίδες, ιδιαίτερα η ερυθρομυκίνη, μπορεί να αυξήσουν τη γαστρεντερική κινητικότητα. Η κλινδαμυκίνη είναι το αντιβιοτικό που είναι πιο πιθανό να προκαλέσει κολίτιδα *Clostridium difficile* (Κλωστηρίδιο το δύσκολο: είναι σχετικά μεγάλο gram αναερόβιο σπορογόνο βακτήριο. Είναι ο αιτιολογικός παράγοντας της ψευδομεμβρανώδους κολίτιδας. Είναι διαδεδομένος στη φύση και επιπλέον εντοπίζεται εντός της φυσιολογικής χλωρίδας του εντερικού σωλήνα του ανθρώπου) . Κατά τη χρήση αυτού του φαρμάκου, η μητέρα θα πρέπει να αναζητήσει ιατρική βοήθεια

εάν το παιδί εμφανίσει διάρροια, ειδικά εάν υπάρχει βλέννα ή αίμα στα κόπρανα του βρέφους.

Επιπλέον, περιπτώσεις αρθροπάθειας που σχετίζονται με φθοροκινολόνες, έχουν αναφερθεί σε νεαρά ζώα, γεγονός που εγείρει ορισμένες ανησυχίες, όταν το παιδί εκτίθεται σε πολύ χαμηλές δόσεις αυτών των φαρμάκων. Από την άλλη, δεν έχουν καταγραφεί κρούσματα σε γυναίκες που θηλάζουν (Mathew, 2004).

Είναι σημαντικό να λαμβάνεται υπόψη, ότι οι ανεπιθύμητες ενέργειες δεν σχετίζονται πάντα με τη δόση του φαρμάκου που λαμβάνεται. Μπορεί να παρατηρηθούν και πιθανές αντιδράσεις υπερευαισθησίας κυρίως σε αντιβιοτικά με το βητα-λακταμικό δακτύλιο και σουλφοναμίδες. Ορισμένοι ερευνητές θεωρούν, ότι αυτοί οι παράγοντες θα μπορούσαν να προδιαθέσουν σε αλλεργίες, να έχουν κάποια επίδραση στο ανοσοποιητικό σύστημα ή να προάγουν την ανάπτυξη αντίστασης (Delgado, et al., 2009).

Αρκετά αντιβιοτικά είναι συμβατά με το θηλασμό. Τουλάχιστον ένα αντιβιοτικό από κάθε κατηγορία συνιστάται από την Αμερικανική Ακαδημία Παιδιατρικής, η οποία υποστηρίζει τη χρήση του σύμφωνα με τις μελέτες που πραγματοποιήθηκαν. Η διακοπή του θηλασμού κρίνεται απαραίτητη λίγες φορές (Kent, et al., 2006). Η έκθεση στα αντιβιοτικά και οι ανεπιθύμητες παρενέργειες μπορούν να ελαχιστοποιηθούν με τη λήψη του φαρμάκου από τη θηλάζουσα αμέσως μετά το τάισμα ή πριν το μωρό κοιμηθεί για μεγάλο χρονικό διάστημα.

Κατά τους Bar – Oz et al (2003) οι πενικιλίνες, οι αμινοπενικιλίνες, το κλαβουλανικό οξύ, οι κεφαλοσπορίνες, οι μακρολίδες και η μετρονιδαζόλη σε δόσεις στο χαμηλό άκρο του συνιστώμενου εύρους δοσολογίας θεωρούνται κατάλληλες για χρήση σε θηλάζουσες γυναίκες. Οι φθοροκινολόνες δεν πρέπει να χορηγούνται ως θεραπεία πρώτης γραμμής, αλλά εάν ενδείκνυνται, ο θηλασμός δεν πρέπει να διακόπτεται επειδή ο κίνδυνος ανεπιθύμητων ενεργειών είναι χαμηλός.

Κεφάλαιο 3. Μέθοδοι Ενόργανης Ανάλυσης Για Τον Προσδιορισμό Αντιβιοτικών σε οποιοδήποτε μέσο

3.1 Μικροβιολογική Δοκιμασία

Η ταχεία ανίχνευση μιας απειλητικής για τη ζωή λοίμωξης, καθώς και η ακριβής αναγνώριση του βακτηρίου που την προκαλεί και η επιλογή του πιο αποτελεσματικού αντιβιοτικού, είναι κρίσιμοι παράγοντες της αποτελεσματικότητας της θεραπείας. Η ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση (Minimum Inhibitory Concentration, MIC) χρησιμοποιείται για την επιλογή ενός αντιμικροβιακού φαρμάκου. Η τιμή MIC προσδιορίζεται *in vitro* και χρησιμοποιείται για την εκτίμηση της ευαισθησίας των μικροοργανισμών στο φάρμακο. Οι τεχνικές μέτρησης MIC περιλαμβάνουν τη διάχυση δίσκου, τις διαδικασίες αραίωσης, τις δοκιμές E και τα αυτοματοποιημένα συστήματα. Οι μικρο- και οι μακρο-αραιώσεις είναι οι δύο βασικές μορφές αραιώσεων, με το ζυμό και το άγαρ να είναι τα πιο ευρέως χρησιμοποιούμενα μέσα. Η αραίωση ήταν μια από τις πρώτες στρατηγικές στη μικροβιολογική πρακτική στις αρχές της δεκαετίας του 1870.

Ο ποσοτικός προσδιορισμός των αντιβιοτικών, είναι ένα δύσκολο πεδίο της φαρμακευτικής ανάλυσης στην κλινική πράξη, ειδικά σε ασθενείς με δύσκολες στη θεραπεία ασθένειες όπως η ενδοκαρδίτιδα. Σε αυτή τη διαδικασία, ο ίδιος αριθμός βακτηριακών κυττάρων ανά συγκεκριμένη συγκέντρωση αντιβιοτικού, δίνεται στο υγρό ή στερεό θρεπτικό μέσο και η ανάπτυξη προσδιορίζεται παρουσία του αντιβιοτικού. Η χαμηλότερη βακτηριοκτόνος συγκέντρωση (MBC) μπορεί επίσης να προσδιοριστεί χρησιμοποιώντας την προσέγγιση σειριακής αραιώσης. Η μέθοδος κλίμακας έλικας (Helix Gradient) και διάχυσης σε άγαρ (Agar Diffusion) είναι η πιο κοινή μέθοδος υπολογισμού του MIC που χρησιμοποιείται σε δοκιμές ρουτίνας στα μικροβιολογικά εργαστήρια. Συνδυάζει τη θεωρία της διάχυσης αντιβιοτικού άγαρ με αραίωση άγαρ για να προσδιορίσει το (MIC). Ο έλεγχος της ποσοτικής δοκιμής E βασίζεται στη διάχυση του αντιβιοτικού από τη λεπτή λωρίδα χαρτιού έως το στάδιο συγκέντρωσης στο μέσο ανάπτυξης του βακτηριακού στελέχους. Τόσο ο προσδιορισμός MIC για ταχέως αναπτυσσόμενα αερόβια βακτήρια όπως οι σταφυλόκοκκοι και τα αρνητικά κατά Gram εντεροβακτηρίδια και τα απαιτητικά είδη όπως ο *Streptococcus pneumoniae* και τα αναερόβια βακτήρια, μπορούν να χρησιμοποιήσουν τη μέθοδο διάχυσης ταινιών ποιότητας αντιβιοτικού.

Για την κατανόηση της μέτρησης της συγκέντρωσης του φαρμάκου που λαμβάνεται πρέπει να πληρούνται οι ακόλουθες απαιτήσεις: η ανάπτυξη ευαίσθητων και ειδικών αναλυτικών μεθόδων που επιτρέπουν τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης του φαρμάκου στα σωματικά υγρά, η γνώση της φαρμακοκινητικής του υπό δοκιμή φαρμάκου και συσχέτιση μεταξύ της συγκέντρωσης του φαρμάκου στο αίμα και της θεραπευτικής συγκέντρωσης του υπό δοκιμή φαρμάκου.

3.2 Αναλυτικές Τεχνικές

Μία από τις πιο ευρέως χρησιμοποιούμενες αναλυτικές διαδικασίες για την ποσοτική και ποιοτική μέτρηση των αντιβιοτικών σε βιολογικά υλικά είναι η υγροχρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) (πλάσμα, ορός, πλήρες αίμα, ούρα). Εκτός από αυτές τις μεθόδους διατίθενται ανοσοχημεία, αέρια χρωματογραφία (GC), χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC) και τριχοειδική ηλεκτροφόρηση (CE).

3.2.1 Ανοσοδοκιμασίες

Οι ανοσοδοκιμασίες είναι αναλυτικές διαδικασίες που δημιουργούν ένα σταθερό σύμπλεγμα μεταξύ της αναλυόμενης ουσίας και ενός συγκεκριμένου αντισώματος, επιτρέποντας την ανίχνευση χημικών ουσιών σε κλινικά δείγματα. Οι αντιδράσεις μεταξύ αντιγόνου και αντισώματος είναι στοιχειομετρικές και οι αντιδράσεις έχουν ποσοτική απόδοση. Η ανίχνευση ελεύθερων ή/και συνδεδεμένων αντιγόνων δίνει τη δυνατότητα του άμεσου υπολογισμού της ποσότητάς του. Οι ανοσοδοκιμασίες, ωστόσο, έχουν το μειονέκτημα της πιθανότητας διασταυρούμενης αντίδρασης με μεταβολίτες, φάρμακα ή δομικά σχετικές ουσίες λόγω της έλλειψης εξειδίκευσής τους.

Η ανοσοδοκιμασία χρησιμοποιήθηκε από τους Pastor-Navarro και τους συνεργάτες (2014) για την αξιολόγηση των επιπέδων σουλφασαλαζίνης στο ανθρώπινο πλάσμα. Τα αντιβιοτικά μπορούν να ανιχνευθούν με όριο 0,02 ng / mL χρησιμοποιώντας τη δοκιμασία ανοσοπροσοφθητικού ενζύμου (ELISA).

Ο Hendrickson και οι συνεργάτες του (Hendrickson, et al., 2018) περιέγραψαν μέθοδο ανοσοδοκιμασίας πόλωσης φθορισμού λεβοφλοξασίνης (FPIA) στα ούρα. Η τιμή LOD που λήφθηκε ήταν 0,5 ng / mL.

Ο Dijkstra και οι συνεργάτες απέδειξαν ότι το κιτ ανοσοδοκιμασίας τομπραμυκίνης μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη μέτρηση των επιπέδων καναμυκίνης στον ορό. Τα αποτελέσματα της ανοσοδοκιμασίας συγκρίθηκαν με τα αποτελέσματα της ανάλυσης LC-MS/MS (υγροχρωματογραφία σε συνδυασμό με τριπλή τετραπολική φασματομετρία μάζας). Αυτή η προσέγγιση είναι ικανή να ποσοτικοποιήσει αξιόπιστα και με συνέπεια ένα ευρύ φάσμα συγκεντρώσεων καναμυκίνης (Carrey & Giuliano, 2013).

Μια προσέγγιση ανοσοαισθητήρα για τον προσδιορισμό των αντιβιοτικών - λακτάμης στον ανθρώπινο ορό και τα ούρα παρουσιάστηκε από τους Merola και συνεργάτες. Αυτή η μέθοδος αποδείχθηκε εξαιρετικά ευαίσθητη, φθηνή και επαναλαμβανόμενη. Η τιμή LOD ήταν περίπου 10 ng / mL.

3.2.2. Χρωματογραφικές Τεχνικές

Πολλές γρήγορες, ευαίσθητες και ειδικές αναλυτικές τεχνικές για την αξιολόγηση της συγκέντρωσης αντιβιοτικών, σε σύνθετα βιολογικά υλικά, έχουν χρησιμοποιηθεί τα τελευταία χρόνια. Αυτές οι στρατηγικές απαιτούνται για την παραγωγή επαναλήψεων δεδομένων που μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε κλινικές δοκιμές για την αύξηση της αποτελεσματικότητας της αντιβιοτικής φαρμακευτικής αγωγής. Αντιβιοτικά από διάφορες κατηγορίες, όπως πενικιλίνες, μακρολίδες, αμινογλυκοσίδες, τετρακυκλίνες, κινολόνες και νιτροϊμιδαζόλες, μπορούν να εντοπιστούν και να αναγνωριστούν χάρη στην ποικιλία των μεθόδων διαχωρισμού. Οι ιδιότητες των αντιμικροβιακών, όπως η διαλυτότητα στο νερό και τους οργανικούς διαλύτες ή οι ιδιότητες οξέος-βάσης, επηρεάζουν την επιλεγμένη μέθοδο διαχωρισμού (Xiao, Hu, Lai, Peng, & Lai, 2012).

3.2.3 Χρωματογραφία Λεπτής Στιβάδας (TLC)

Η χρήση χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας (TLC) για την ταυτοποίηση συγκεκριμένων αντιβιοτικών προτείνεται από την Ευρωπαϊκή Φαρμακοποιία. Οι Jain και συνεργάτες χρησιμοποίησαν πλάκα TLC επικαλυμμένη με πυρίτιο 60 F254, η οποία ψεκάστηκε με συνδυασμό μεθανόλης-ακετονιτριλίου-ισοπροπανόλης-νερού για την απομόνωση της μινοκυκλίνης στο πλάσμα. Υπεριώδης λάμπα με ακτινοβολία σε μήκη κύματος 190–400 nm χρησιμοποιήθηκε για την αναγνώριση των κηλίδων των αντιβιοτικών στην πλάκα-λεπτή στιβάδα. Η ακρίβεια της μεθόδου κυμαινόταν από 95,08 % έως 100,6 % όσον αφορά στο ποσοστό ανάκτησης (Brown, Iverson, Anslyn, & Foote, 2013). Η προσέγγιση πληρεί τα

κριτήρια επικύρωσης και θα μπορούσε να είναι αποτελεσματική για τον προσδιορισμό των επιπέδων μινουκυκλίνης στο ανθρώπινο πλάσμα.

Ο Gholipour και οι συνεργάτες περιέγραψαν τη μέθοδο υψηλής απόδοσης TLC (HPTLC) για τον προσδιορισμό για την ταυτοποίηση της αμοξικιλίνης και της αμπικιλίνης σε δείγματα ούρων με την χρήση πυκνομετρητή (densimeter) με ψεκασμό με νινυδρίνη. Το αντιδραστήριο εμφάνισης ήταν 1% διάλυμα νινυδρίνης σε αιθανόλη σε πλάκες TLC πυριτικού τιτανίου (IV) χρησιμοποιώντας μίγμα κινητής φάσης (K_2HPO_4 (0,1 M) + KH_2PO_4 (0,1 M), 1: 1 (v / v)) και μίγμα κινητής φάσης (K_2HPO_4 (0,1 M) + KH_2PO_4 (0,1 M), 1: 1 (v/v)). Σε βιολογικά δείγματα, η προτεινόμενη προσέγγιση TLC επέτρεψε μια απλή, ακριβή και επαναλαμβανόμενη μέτρηση τόσο της αμοξικιλίνης όσο και της αμπικιλίνης. Δυστυχώς, η μέθοδος TLC δεν επιλέγεται για ποσοτικοποίηση λόγω της χαμηλής αναπαραγωγιμότητας και της δύσκολης επικύρωσης των αποτελεσμάτων (Brown, Iverson, Anslyn, & Foote, 2013).

Ο συνδυασμός άμεσης επίπεδης χρωματογραφίας με φασματομετρία μάζας είναι μια άλλη επιλογή. Το MALDI-TOF / MS (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization - Ιονισμός Εκρόφησης Με Λέιζερ Υποβοηθούμενο Από Τη Μήτρα) είναι μια σύγχρονη τεχνολογία ιονισμού που μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε συνδυασμό με τη χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC-MALDI-TOF MS).

Κατά τη διερεύνηση του μίγματος αντιβιοτικών τετρακυκλίνης, επισημάνθηκαν τα κύρια πλεονεκτήματα του TLC-MALDI-TOF MS. Σωματίδια διαφορετικών υλικών και μεγεθών διερευνήθηκαν (Co-UFP, TiO_2 , γραφίτη και πυρίτιο) εφαρμόζοντας δύο εναιωρήματα σωματιδίων σε εκλουσμένες πλάκες TLC. Το σύστημα διαλυτών ήταν διχλωρομεθάνιο, μεθανόλη και νερό. Οι πλάκες TLC απευθείας χρησιμοποιήθηκαν για να ληφθούν φάσματα μάζας και χρωματογραφήματα. Μόνο ένα ανεπίλυτο σημείο για τετρακυκλίνη και χλωροτετρακυκλίνη ανιχνεύθηκε στην πλάκα TLC πριν από την ανάλυση MALDI (Weiß, et al., 2014). Ξεχωριστές κορυφές για τη χλωροτετρακυκλίνη και την τετρακυκλίνη βρέθηκαν χρησιμοποιώντας φάσματα μάζας MALDI και γραφική παράσταση μεμονωμένων χρωματογραφημάτων ιόντων. Η τιμή R_f (ραδιοσυχνότητας, Radio frequency, R_f) των κηλίδων αναλυόμενης ουσίας υπολογίστηκε χρησιμοποιώντας ανάλυση TLC-MALDI-TOF MS των τετρακυκλινών, υποδεικνύοντας καλή συμφωνία με την τιμή του παράγοντα κατακράτησης που λήφθηκε, χρησιμοποιώντας ανίχνευση UV.

3.2.4 Αέρια Χρωματογραφία (GC)

Η αέρια χρωματογραφία (GC) χρησιμοποιείται επίσης για την αναγνώριση αντιβιοτικών σε βιολογικά υγρά. Λόγω της ανάγκης μετατροπής των φαρμάκων και των μεταβολιτών τους σε θερμοσταθερά παράγωγα, η τεχνική GC έχει περιορισμένο ενδιαφέρον (Gordon & Gregory, 2022).

Για την ανάλυση της αζιθρομυκίνης σε βιολογικά υλικά, ο Thangadurai (2015) περιέγραψε αέρια χρωματογραφία με φασματομετρία μάζας (GC / MS) σε δείγματα γαστρικής κάθαρσης. Χρησιμοποιήθηκε χλωροφόρμιο για την εκχύλιση του υλικού, το οποίο στη συνέχεια καθαρίστηκε με η-εξάνιο. Στη συνέχεια, το καθαρισμένο εκχύλισμα ακετυλιώθηκε σε μίγμα οξικού ανυδρίτη-πυριδίνης (1:2). Η αζιθρομυκίνη αναλύθηκε με GC. Το δείγμα πρέπει να είναι και πτητικό και θερμικά σταθερό για να είναι αποτελεσματική η ανάλυση GC-MS. Δεδομένου ότι πολλά οργανικά μόρια έχουν πολικές λειτουργικές ομάδες, για παράδειγμα αμινομάδες, συχνά αποτυγχάνουν να ικανοποιήσουν αυτές τις απαιτήσεις. Η παραγωγοποίηση χρησιμοποιείται συνήθως για την προστασία αυτών των λειτουργικών ομάδων, γεγονός που οδηγεί σε ευνοϊκή συμπεριφορά GC-MS. Η παραγωγοποίηση χρησιμοποιείται για τη βελτίωση της συμπεριφοράς GC μιας ένωσης με υποκατάσταση λιπόφιλων ομάδων για «ενεργά» υδρογόνα ή για πλεονεκτική αλλαγή του φάσματος μάζας της ένωσης. Μπορεί επίσης να αυξήσει την πτητικότητα ή τη θερμική σταθερότητα μιας ένωσης. Οι αντιδράσεις παραγωγοποίησης που χρησιμοποιούνται γενικά για τον προσδιορισμό της GC είναι η σιλυλίωση, η ακετυλίωση και η αιθεροποίηση. Σε αυτή την εργασία, οι ερευνητές επέλεξαν να χρησιμοποιήσουν το σχηματισμό ακετυλο-παραγώγου, επειδή παρασκευάζεται εύκολα και είναι σταθερό, και η αύξηση του μοριακού βάρους από την παραγωγοποίηση δεν είναι τόσο μεγάλη. Η αζιθρομυκίνη ακετυλιώθηκε χρησιμοποιώντας οξικό ανυδρίτη και πυριδίνη σε θερμοκρασία δωματίου. Τα μίγματα της αντίδρασης παρακολούθηθηκαν με TLC για να εξασφαλιστεί η πλήρης μετατροπή των πρώτων υλών. Οι ερευνητές χρησιμοποίησαν την στήλη τριχοειδούς φάσης GC με στατική φάση φαινυλομεθυλοσιλικόνης (30 m x 0,25 mm x 0,25 μm, id (εσωτερική διάσταση κυλίνδρου: internal dimension)). Το ληφθέν όριο ανίχνευσης ήταν 2 μg/mL⁻¹. Αυτή η μέθοδος μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την παρακολούθηση του επιπέδου αντιβιοτικών σε βιολογικά υλικά για εγκληματολογικούς και τοξικολογικούς σκοπούς, γιατί επιτρέπει την ανίχνευση

υπολειμμάτων αζιθρομυκίνης σε βιολογικά υγρά χρησιμοποιώντας παρακολούθηση ενός ιόντος.

Η προσέγγιση GC με τον ανιχνευτή ατομικής εκπομπής (GC-AED) δημοσιεύτηκε από τους Gordon & Gregory (2022) για την ταυτοποίηση εννέα σουφλοναμιδίων. Χρησιμοποιήθηκε N-μεθυλίωση για την παραγωγοποίηση των δειγμάτων. Οι διαχωρισμοί GC που ελήφθησαν απαιτούσαν δύο ακόμη χρωματογραφικές δοκιμές, οι οποίες έγιναν σε τριχοειδή στήλη συντηγμένου πυριτίου με διαστάσεις 12,5 m x 0,22 mm. Η στήλη φαινυλομεθυλοσιλικόνης χρησιμοποιήθηκε για την επίτευξη διαχωρισμών με αέρια χρωματογραφία. Αυτή η μέθοδος έχει βρεθεί ότι είναι γραμμική και μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη μέτρηση των σουλφοναμιδίων.

3.2.5 Υγροχρωματογραφία (LC)

Στην ανίχνευση αντιβακτηριακών φαρμάκων στα σωματικά υγρά, η υγροχρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) χρησιμοποιείται συχνά. Μια ποικιλία ανιχνευτών (Υπεριώδης-Ultraviolet-UV, Ανιχνευτές Συστοιχίας Διόδων - Diode Array Detectors - DAD, συστοιχία διόδων φωτονίων - Photon Diode Array - PDA, Φθορισμού - Fluorescence - FL, Φασματομετρία μάζας - Mass spectrometry - MS, καθώς και γενικοί ανιχνευτές όπως Φορτισμένος ανιχνευτής αερολύματος- Charged Aerosol Detector - CAD ή ανιχνευτής σκέδασης εξατμιστικού φωτός - Evaporative Light Scattering Detector - ELSD) και σύγχρονες μέθοδοι προετοιμασίας δειγμάτων για ανάλυση επιτρέπουν την απόκτηση επαναλαμβανόμενων δεδομένων, ακόμη και σε πολύπλοκους πίνακες. Η τεχνολογία LC-MS / MS εξασφαλίζει σαφή ανάλυση (McMurry, 2014).

Χρησιμοποιώντας μια στήλη Nucleosil 100-5 C18, ο Borner και οι συνεργάτες του (2019) καθιέρωσαν μια ανάλυση HPLC για δοκιμή λινεζολίδης σε ανθρώπινο πλάσμα και ούρα. Η έκλυση των φαρμάκων μετρήθηκε στα 250 nm. Η σύγκριση των δεδομένων που ελήφθησαν χρησιμοποιώντας μικροβιολογικές δοκιμές και των δεδομένων που ελήφθησαν με τη μέθοδο HPLC, ήταν το αντικείμενο αυτής της μελέτης.

Οι Farshchi, Ghiasi και Bahram (2009) δημοσίευσαν μεθοδολογία για την ανάλυση της κλαριθρομυκίνης σε ανθρώπινο ορό μετά από παραγωγοποίηση με χλωρομυρμηκικό 9-φθορενυλομεθυλοξυκαρβονιλοχλωρίδιο το 2009 (FMOC-Cl). Οι ενώσεις κλαριθρομυκίνης δοκιμάστηκαν χρησιμοποιώντας HPLC με ανιχνευτή φθορισμού μετά

από εκχύλιση υγρού-υγρού (διχλωρομεθάνιο, HPLC-FL). Όπως αναφέρουν οι ερευνητές, η στήλη ήταν Shimpack CLC-ODS.

Χρησιμοποιήθηκε στήλη 150mm x 4,6mm id με μέγεθος σωματιδίου 5 μm, που προστατεύτηκε με στήλη προστασίας Shimpack CLC-ODS (1cm x 4,0mm id με μέγεθος σωματιδίου 5 μm). Μια προστατευτική στήλη είναι μια στήλη ή φυσίγγιο που τοποθετείται μεταξύ του εγχυτήρα και της αναλυτικής στήλης. Χρησιμεύει στην απομάκρυνση των υπολειμμάτων και των αιωρούμενων στερεών από το να φτάσουν στην αναλυτική στήλη. Έπειτα, μίγμα από 0,05 mL ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού με τριαιθυλαμίνη (2 mL/l, pH 3,8) και μεθανόλη (17:83, v/v) χρησιμοποιήθηκε για την κινητή φάση. Η θερμοκρασία του κλιβάνου στήλης ρυθμίστηκε στους 58°C και η κινητή φάση διηθήθηκε, απαερώθηκε και αντλήθηκε με ρυθμό ροής 2,0 mL/min.

Για την εξέταση δύο φθοροκινολονών (σιπροφλοξασίνης και λεβοφλοξασίνης) στα ανθρώπινα πτύελα, ο D'angelo και οι συνεργάτες του χρησιμοποίησαν μια γρήγορη ανάλυση HPLC με μικροεκχύλιση στερεάς φάσης (Solid Phase Micro Extraction: SPME – χρήση στήλης, που καθαρίζει το δείγμα από προσμίξεις, πριν την ανάλυσή του, με HPLC). Η κινητή φάση ήταν ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (30 mM, pH 2,5), 1% τριαιθυλαμίνη (TEA) και αιθανονιτρίλιου (86:14, V: V) με ρυθμό ροής 1,0 mL/min. Ο χρωματογραφικός διαχωρισμός έγινε χρησιμοποιώντας στήλη Gemini C18 (5μm x 250mm x 4,6mm) (D'angelo, De Luca, & Locatelli, 2016). Ο ανιχνευτής συστοιχίας φωτοδιόδων (PDA) ανίχνευσε την κορυφή της λεβοφλοξασίνης στα 295 nm και την κορυφή της σιπροφλοξασίνης στα 279 nm.

Σε πλήρες αίμα και ιστούς, οι Gordon & Gregory (2022) παρουσίασαν μια μέθοδο για την αναγνώριση πέντε αντιβιοτικών και των μεταβολιτών τους. Το δείγμα προσδιορίστηκε, χρησιμοποιώντας αναλυτική στήλη C18 και κινητή φάση νερού και ακετονιτρίλιου μετά από μικροεκχύλιση στερεάς φάσης (SPME). Για την ανίχνευση χρησιμοποιήθηκε ένα τριπλό τετραπολικό φασματόμετρο μάζας (HPLC-QqQ-MS) με ιονισμό ηλεκτροψεκασμού. Αυτό είναι ένα σημαντικό εύρημα στην τεχνική προετοιμασίας δειγμάτων SPME για την ταυτοποίηση των αντιβιοτικών και των μεταβολιτών τους σε βιολογικά υλικά. Επιπλέον, οι τεχνικές φασματομετρίας μάζας ESI-QqQ και MALDI TOF έχουν αποδειχθεί ότι είναι συμπληρωματικές στον προσδιορισμό των ενεργών χημικών ουσιών σε κλινικά δείγματα.

Αξίζει επίσης να αναφερθεί ότι η χρωματογραφία υδρόφιλης αλληλεπίδρασης μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ανάλυση πολικών φαρμακευτικών μορίων (HILIC). Χρησιμοποιώντας την προσέγγιση HILIC, ο Kathriarachchi και οι συνεργάτες του (2012) απομονώσαν αμοξικιλίνη και μετρονιδαζόλη στον ανθρώπινο ορό. Η στήλη ZIC-HILIC χρησιμοποιήθηκε για την επίτευξη χρωματογραφικού διαχωρισμού, με την κινητή φάση να αποτελείται από 0,1% (V/V) μυρμηκικό οξύ σε νερό και 0,1 τοις εκατό (V/V) μυρμηκικό οξύ σε ακετονιτρίλιο. Η μέθοδος επικυρώθηκε εκτενώς και το κατώτερο όριο ποσοτικοποίησης για την αμοξικιλίνη ήταν 0,0138 g/mL και για τη μετρονιδαζόλη ήταν 0,008 g/mL. Και τα δύο αντιβιοτικά είχαν γραμμικότητα που κυμαινόταν από 0,1 g/mL έως 6,4 g/mL.

3.2.6 Υγροχρωματογραφία Υπερυψηλής Απόδοσης

Το UPLC είναι μια σχετικά νέα τεχνολογία που επιτρέπει στο LC να ακολουθήσει διαφορετική πορεία. Το UPLC βελτιώνει την απόδοση του LC σε τέσσερις κρίσιμους τομείς: ταχύτητα, ευαισθησία, ανάλυση και ακρίβεια. Το UPLC έχει διαθέσει υλικά συσκευασίας στηλών με διάμετρο μικρότερη από 2 mm, ενισχύοντας την ταχύτητα, την ακρίβεια, την ανάλυση και την ευαισθησία σε σύγκριση με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC). Επιπλέον, το μέγεθος σωματιδίων που χρησιμοποιείται στις στήλες HPLC και UPLC είναι 3 έως 5 mm και 2 mm, αντίστοιχα, και ο ρυθμός ροής κινητής φάσης σε HPLC είναι κανονικά 3,0 mL / λεπτό, σε σύγκριση με 0,6 mL / λεπτό στο UPLC.

Η κύρια διαφορά μεταξύ UPLC και του HPLC είναι το υλικό συσκευασίας στήλης, το οποίο οδηγεί και σε σημαντική διαφορά στην ευαισθησία και την ακρίβεια των νέων τεχνικών. Οι βασικές αρχές λειτουργίας της τεχνολογίας της UPLC είναι όμοιες με αυτές της LC και αλλάζουν λίγο πέραν από την πίεση που δημιουργείται στα όργανα, γεγονός που την καθιστά πιο αποδοτική τεχνολογία (Leonard, Lygo, & Procter, 2013). Με την αύξηση της τρέχουσας χωρητικότητας έχουν αναπτυχθεί τεχνικές UPLC, οι οποίες έχουν ως πλεονεκτήματα τη βελτιωμένη απόδοση διαχωρισμού και τη σταθερή πίεση. Η αποτελεσματικότητα αυτής της τεχνικής είναι ανάλογη με το μέγεθος της στήλης και αντιστρόφως ανάλογη με την ακτίνα των ατόμων. Η UPLC, λειτουργεί σε πολύ υψηλές πιέσεις έως και 1000 bar, ενώ η πίεση της αντλίας για HPLC δεν ξεπερνά τα 300–400 bar. Τα τελευταία χρόνια, το UPLC έχει μεγάλη εφαρμογή καθώς μειώνει τον χρόνο εκτέλεσης

καθώς και το κόστος ανάλυσης για οποιαδήποτε ανάλυση (Leonard, Lygo, & Procter, 2013).

Δημοσιεύθηκε επίσης μια μελέτη προσδιορισμού επτά αντιβιοτικών σε ανθρώπινο ορό χρησιμοποιώντας υγροχρωματογραφία υπερ-απόδοσης (UPLC) με διαδοχική φασματομετρία μάζας (UPLC-MS /MS). Τα φάρμακα διαχωρίστηκαν χρησιμοποιώντας μια στήλη UPLC HSS T3 και έναν συνδυασμό κινητής φάσης 5 mM οξικού αμμωνίου (pH 2,45) και ακετονιτριλίου μετά από κατακρήμνιση πρωτεΐνης του ορού. Οι ερευνητές μπόρεσαν να φτάσουν σε ένα χαμηλότερο όριο ποσοτικοποίησης (LLOQ) 0,1 g/mL. Τέλος, η προσέγγιση UPLC-MS / MS φαίνεται να ενισχύει το όριο ποσοτικοποίησης ενώ παράλληλα μειώνει τη διάρκεια της ανάλυσης. Η προτεινόμενη μέθοδος, σύμφωνα με τους συγγραφείς, είναι απλή, γρήγορη, ευαίσθητη και κατάλληλη για κλινικές μελέτες, ιδιαίτερα σε νεογνικούς ασθενείς (Gordon & Gregory, 2022).

3.2.7 Ανοσοχρωματογραφία

Η ανοσοχρωματογραφία είναι μια εργαστηριακή μέθοδος που χρησιμοποιείται κυρίως σε ερευνητικά εργαστήρια. Οι δοκιμές κοντά σε ασθενείς, από την άλλη πλευρά, χρησιμοποιούν εμπορικά κατασκευασμένα «ραβδάκια» και ανοσοχρωματογραφία. Δείγμα, όπως τα ούρα, τοποθετείται στο ραβδί, το οποίο στη συνέχεια αναπτύσσεται μέσω τριχοειδικών φαινομένων και η ενδιαφερόμενη αναλυόμενη ουσία συνδέεται σε ζώνη πλούσια σε αντισώματα (Gordon & Gregory, 2022). Ορισμένες φορές ενσωματώνονται θετικοί και αρνητικοί έλεγχοι. Όταν το αντιγόνο και το αντίσωμα αλληλεπιδρούν, εμφανίζεται μια ορατή χρωματική κηλίδα ή ζώνη, που υποδηλώνει την παρουσία της επιθυμητής χημικής ουσίας. Παρά την πιθανότητα ανακρίβειας που ενέχουν, αυτές οι συσκευές προσφέρουν το πλεονέκτημα της αμεσότητας, το οποίο μπορεί να είναι κλινικά αποδεκτό εάν χρησιμοποιηθούν σωστά. Η τεχνολογία και ο σχεδιασμός των δοκιμών πλευρικής ροής σήμερα υπερνικά σε μεγάλο βαθμό την προηγούμενη αμφιβολία σχετικά με την ειδικότητα, την ακρίβεια και την αναπαραγωγικότητά των μεθόδων αυτών. Αυτές οι γρήγορες δοκιμές μπορούν να χρησιμοποιηθούν σχεδόν σε οποιοδήποτε περιβάλλον, από την κλινική μέχρι το πεδίο, λόγω της προσαρμοστικότητάς τους.

Η ανοσοχρωματογραφία ξεκίνησε να εφαρμόζεται στις Βιοϊατρικές επιστήμες στα μέσα της δεκαετίας του 1990, όταν ήταν διαθέσιμες δοκιμές αυτοελέγχου για τη γλυκόζη

του αίματος και τα ούρα (Gordon & Gregory, 2022). Σήμερα, (ανοσο)χρωματογραφικές δοκιμές σημείων φροντίδας χρησιμοποιούνται για τη διάγνωση καρδιακών προσβολών, καρκίνου, τραυματικού εγκεφαλικού τραυματισμού, νεφρικής νόσου, αυτοάνοσων νοσημάτων και γενετικών ανωμαλιών, μεταξύ άλλων εφαρμογών. Αυτές οι δοκιμές μπορούν να ανιχνεύσουν φυτοφάρμακα, μεταλλικά ιόντα και δηλητήρια όταν χρησιμοποιούνται για περιβαλλοντικό έλεγχο. Η κτηνιατρική χρήση, η ανίχνευση βιοτρομοκρατίας και η ασφάλεια των τροφίμων συγκαταλέγονται στις ταχέως αναπτυσσόμενες αγορές.

Η μέθοδος της υγροχρωματογραφίας, συζευγμένης με διαδοχική φασματοφωτομετρία (LC-MS / MS), είναι μέθοδος που συνδυάζει, τη διαχωριστική ικανότητα της υγροχρωματογραφίας, με τις δυνατότητες της φασματομετρίας μάζας-θραυσματοποίηση-ταυτοποίηση-και προσφέρει και ποσοτικοποίηση. Το LC-MS / MS είναι μια ευέλικτη τεχνολογία με καλή ευαισθησία και επιλεκτικότητα που χρησιμοποιείται σε ποικίλες εφαρμογές. Η χρήση του εστιάζεται κυρίως στην ανίχνευση και την πιθανή ταυτοποίηση ενώσεων παρουσία άλλων ουσιών σε ένα σύνθετο μείγμα (Leonard, Lygo, & Procter, 2013). Με αυτήν την τεχνική είναι δυνατές τόσο ποιοτικές όσο και ποσοτικές εφαρμογές. Μπορούν να αναγνωριστούν άγνωστες ενώσεις, μπορεί να προσδιοριστεί η ισοτοπική σύνθεση των στοιχείων σε ένα μόριο και η δομή μιας ένωσης μπορεί να προσδιοριστεί παρατηρώντας τη θραυσματοποίηση. Η ποσοτικοποίηση ενός συστατικού σε ένα δείγμα είναι επίσης πλεονέκτημα της μεθόδου (Gordon & Gregory, 2022).

3.3. Τεχνικές Ηλεκτρομετανάστευσης

Οι τεχνικές ηλεκτρομετανάστευσης χρησιμοποιούνται επίσης για την αξιολόγηση ορισμένων φαρμάκων, συμπεριλαμβανομένων των αντιβιοτικών, ιδιαίτερα των πολικών αντιβιοτικών, και των αναλύσεων στερεοϊσομερών. Οι ηλεκτροκινητικές αναλύσεις βασίζονται στη μετανάστευση ηλεκτρονίων ιόντων, στα φορτισμένα σωματίδια και στην ηλεκτροόσμωση, που είναι όλα ηλεκτροκινητικά φαινόμενα. Όταν φορτισμένα σωματίδια εισάγονται σε ένα ηλεκτρικό πεδίο, ειδικά σε υψηλή τάση, συμβαίνουν αρκετά φαινόμενα σε διαλύματα (McMurry, 2014). Οι τεχνικές διακρίνονται με βάση τη μέθοδο διαχωρισμού (CITP) σε: ηλεκτροφόρηση τριχοειδούς ζώνης (CZE), μικκυλιακή τριχοειδή ηλεκτροκινητική χρωματογραφία (MEKC), τριχοειδή μη υδατικής ηλεκτροφόρησης (NACK) και τριχοειδή

ισοταχοφόρησης Τα αντιβιοτικά μελετώνται χρησιμοποιώντας τριχοειδή ηλεκτροφόρηση κυρίως με CZE και MEKC. Το CE έχει μια σειρά από πλεονεκτήματα, όπως η προσβασιμότητα, η απλότητα του εξοπλισμού, η χρήση χαμηλών συγκεντρώσεων οργανικών διαλυτών στο ρυθμιστικό διάλυμα και το πιο σημαντικό, ο γρήγορος χρόνος ανάλυσης και η καλή αναλυτική απόδοση διαχωρισμού.

Η πλειονότητα των προτεινόμενων μεθόδων για ηλεκτροφορητικό διαχωρισμό αντιβιοτικών σε διάφορες μήτρες βασίζεται στη χρήση διαφόρων τεχνολογιών ανίχνευσης, όπως η υπεριώδης (UV) σε συνδυασμό με τη διάταξη διόδων (DAD), τον φθορισμό (FD) και την ηλεκτροχημική ανίχνευση (ECD) και LIF (Low-Induced Fluorescence). Άλλες τεχνολογίες ανίχνευσης, όπως η ανίχνευση αγωγιμότητας χωρίς επαφή (C4D) και η ανίχνευση πιθανής κλίσης (PGD), έχουν επίσης εφαρμοστεί πρόσφατα (McMurry, 2014).

Ο Solangi και οι συνεργάτες του (2011) χρησιμοποίησαν την ηλεκτροφόρηση τριχοειδούς ζώνης (CZE) για τον προσδιορισμό δύο κεφαλοσπορινών (κεφραδίνη και κεφουροξίμη) στα ούρα. Συγκεκριμένα, χρησιμοποίησαν διηθητικό χαρτί 42 μm για να φιλτράρουν αυτά τα φάρμακα και την ανίχνευση UV στα 214 nm. Η ανάλυση διεξήχθη σε 30 kV και 25 °C χρησιμοποιώντας ρυθμιστικό διάλυμα βορικού νατρίου 50 mM (pH 9). Τα όρια ανίχνευσης δύο κεφαλοσπορινών ήταν από 29,0 έως 30,2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ στην ανάκτηση 99–100% για την κεφουροξίμη και 1,3–1,9% για την κεφραδίνη.

Δύο κεφαλοσπορίνες (κεφραδίνη και κεφουροξίμη) ταυτοποιήθηκαν στα ούρα από τον Solangi και τους συνεργάτες του χρησιμοποιώντας ηλεκτροφόρηση τριχοειδούς ζώνης (CZE). Οι συγγραφείς χρησιμοποίησαν για τη διήθηση διηθητικό χαρτί 42 m και ανιχνευτή UV στα 214 nm. Το πείραμα διεξήχθη σε 30 kV και 25°C με ρυθμιστικό διάλυμα βορικού νατρίου 50 mM (pH 9). Τα όρια ανίχνευσης για δύο κεφαλοσπορίνες ήταν 29,0 έως 30,2 g / mL σε 99-100% ανάκτηση για την κεφουροξίμη και 1,3-1,9% για την κεφραδίνη, αντίστοιχα. Μια προσέγγιση σύζευξης CEC με βάση τη φασματομετρία μάζας δημοσιεύτηκε επίσης το 2015.

Σε δείγματα ούρων, οι Hernández-Mesa et al. ανακάλυψε πέντε νιτροϊμιδαζόλες (2012). Τα φάρμακα στη συνέχεια αξιολογήθηκαν χρησιμοποιώντας μια στήλη με μείγμα Bidentate C18: Lichrospher Silica-60 και ηλεκτρολύτη υποβάθρου μίγμα ακετονιτριλίου, μεθανόλης και νερού μετά το SPE. Το όριο ανάλυσης της ανάλυσης ήταν από 0,09 έως 0,42 $\mu\text{g} / \text{mL}$. Μια άλλη αναφορά περιέγραψε τον προσδιορισμό CE της κεφταζιδίμης στο ανθρώπινο πλάσμα χρησιμοποιώντας τριχοειδή στήλη και 50 mM χλωροξικό οξύ με 20%

v/v μεθανόλη και 0,5% v/v διάλυμα επικάλυψης INST. Τα δείγματα αποπρωτεϊνώθηκαν με ακετονιτρίλιο. Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε με χρήση 30 kV στους 25 ° C. Η σωστή αναγνώριση της κεφταζιδίμης σε κλινικά δείγματα είναι μια σημαντική πτυχή για τη βελτίωση της θεραπείας του διαβητικού ποδιού.

3.4 Εύχρηστα τεστ

Η παρουσία αντιβιοτικών ουσιών στο γάλα δεν είναι μόνο ζήτημα του ανθρώπινου μητρικού γάλακτος αλλά απασχολεί και τον κτηνοτροφικό τομέα. Η παρουσία υπολειμμάτων αντιβιοτικών στο γάλα θεωρείται παραβίαση των προτύπων ασφάλειας των τροφίμων. Μία βιβλιογραφική έρευνα αποκαλύπτει ότι υπάρχουν μία σειρά από εύχρηστα τεστ/κιτ με τα οποία κάποιος μπορεί να ελέγξει ανά πάσα στιγμή την παρουσία και την ποσότητα των αντιβιοτικών ουσιών στο ζωϊκό γάλα, για λόγους διασφάλισης ποιότητας. Ένα τέτοιο παράδειγμα αποτελούν τα εύχρηστα τεστ, που βασίζονται στην ανοσοχρωματογραφία. Όσον αφορά στον κτηνοτροφικό τομέα, ενδεικτικά αναφέρονται τα εξής τέστ: Τα AuroFlow™ PRIME™ Strip Tests είναι τα νεότερα προϊόντα που κυκλοφόρησαν από την PerkinElmer, στα οποία είναι δυνατό να προστεθεί γάλα απευθείας σε ένα δοκιμαστικό σωλήνα και, στη συνέχεια, να εισαχθεί μία δοκιμαστική ταινία για αποτελέσματα μέσα σε λίγα λεπτά. Το Test Reader είναι ένα φορητό σύστημα δοκιμής πλευρικής ροής που παρέχει ταχεία ποσοτική ανάλυση.

Η Ringbio Biotechnology Limited προσφέρει περισσότερα από 200 είδη γρήγορων δοκιμών γάλακτος γαλακτοκομικών (rapid tests) για να βοηθήσουν τους αγρότες και τους παραγωγούς να διατηρήσουν το γάλα τους ασφαλές, τα οποία ελέγχουν μία σειρά από ουσίες συμπεριλαμβανομένου και των αντιβιοτικών.

Αυτό εγείρει το ερώτημα του αν είναι δυνατό να εφαρμοστούν τέτοιου είδους rapid tests στο ανθρώπινο μητρικό γάλα, κάτι που θα αποτελούσε μία εύχρηστη λύση για θηλάζουσες μητέρες που πρέπει να ακολουθήσουν μία φαρμακευτική αγωγή.

Κεφάλαιο 4. Μέθοδοι Που Χρησιμοποιήθηκαν Σε Έρευνες Για Τον Προσδιορισμό Αντιβιοτικών Στο Μητρικό Γάλα

Ερευνητές	Χρονολογία	Μέθοδος	Ουσία που προσδιορίστηκε	Συμπεράσματα
Burkin et al	2021	Ανοσοχρωματογραφικός προσδιορισμός	Μακρολίδες	Η μέθοδος που αναπτύχθηκε ήταν επιτυχημένη και μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την διασφάλιση του ασφαλούς θηλασμού
Dei Cas et al	2019	UPLC/MS-MS	Δαπτομυκίνη	Επιβεβαιώθηκε η απέκκριση δαπτομυκίνης στο μητρικό γάλα. Η μέθοδος που αναπτύχθηκε μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον επιτυχή προσδιορισμό δαπτομυκίνης στο μητρικό γάλα και το ανθρώπινο πλάσμα. Επίσης, οι ερευνητές συμπέραναν ότι η δαπτομυκίνη βρίσκεται σε χαμηλή συγκέντρωση στο μητρικό γάλα και δεν αποτελεί κίνδυνο για το βρέφος.
Raysyan et al	2020	Ανοσοδοκιμασία Πλευρικής Ροής	Μακρολίδες	Επιβεβαιώθηκε η απέκκριση μακρολίδων στο μητρικό γάλα. Επικυρώθηκε η μέθοδος ως επιτυχής για τον προσδιορισμό μακρολίδων στο μητρικό γάλα.

Η έρευνα των Burkin και συνεργατών το 2021 είχε ως αντικείμενο μελέτης τις μακρολίδες, μία κατηγορία αντιβιοτικών. Συγκεκριμένα, στην έρευνα αυτή η ανοσοποίηση κουνελιού με BSA-κλαριθρομυκίνη οδήγησε σε αντισώματα έναντι κοινών τμημάτων υδατανθράκων των μακρολιδικών αντιβιοτικών. Η κλαριθρομυκίνη χρησιμοποιείται για τη θεραπεία μιας μεγάλης ποικιλίας βακτηριακών λοιμώξεων. Μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί για την πρόληψη ορισμένων βακτηριακών λοιμώξεων. Αναστέλλει την ανάπτυξη βακτηρίων, χρησιμοποιείται για την αντιμετώπιση βακτηριακών λοιμώξεων και δεν έχει αντική δράση.

Στην συγκεκριμένη έρευνα σωματίδια μπλε λατέξ επισημασμένα με αντίσωμα χρησιμοποιήθηκαν για να γίνει το πείραμα ανοσοχρωματογραφικής λωρίδας. Για τη γρήγορη ταυτόχρονη ομαδική δοκιμή έξι μακρολιδικών αντιβιοτικών, ανιχνεύθηκαν GEL-CLA και IgG αντισώματα κουνελιού σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης στις ζώνες δοκιμής και ελέγχου. Η οπτική ανίχνευση CLA, ροξιθρομυκίνης, ερυθρομυκίνης, διριθρομυκίνης, αζιθρομυκίνης και ολεαντομυκίνης σε ρυθμιστικό κυμαινόταν από 1-1000 ng/mL.

Η σύνθεση του μητρικού γάλακτος δεν παραμένει σταθερή κατά τη διάρκεια του θηλασμού, καθώς μεταβάλλεται η ποσότητα των υδατανθράκων που έχει ως αποτέλεσμα τον διπλασιασμό της περιεκτικότητας σε λίπος. Για να παγιωθεί η σύνθεση του δείγματος και να αποφευχθεί το φαινόμενο της μήτρας, δημιουργήθηκε μια συγκεκριμένη διαδικασία εκχύλισης μεθανόλης/εξανίου που είχε διάρκεια 20 λεπτών (ήταν δηλαδή εξαιρετικά ταχεία και επέτρεπε την κατάληξη σε ένα συμπέρασμα πριν γίνει μεταβολή του δείγματος). Έτσι, η αναπτυγμένη μορφή ταχείας επιτόπιας διαγνωστικής δοκιμής η οποία προτάθηκε στην έρευνα αυτή κρίθηκε κατάλληλη για την παρακολούθηση της περιεκτικότητας σε αντιβιοτικά στο μητρικό γάλα κατά τη διάρκεια της φαρμακευτικής αγωγής με οποιαδήποτε από τις έξι μακρολίδες που αναφέρονται για να διασφαλιστεί ο ασφαλής θηλασμός των βρεφών.

Χρησιμοποιήθηκε αντιγόνο επικάλυψης Gel-cmoCLA, το οποίο απορροφήθηκε σε ανθρακικό ρυθμιστικό, για ένα βράδυ στους 4 °C. Μετά από τρεις πλύσεις των πλακών, με διάλυμα φωσφορικών αλάτων, οι κυψέλες πληρώθηκαν με πρότυπα διαλύματα μακρολιδίων ROX, AZI, CLA, ERY, DIR, OLE στο εύρος των συγκεντρώσεων (1 pg mL⁻¹ - 1 g

mL-1 and 0) σε PBS-T και προστέθηκε σε 100 mL, μαζί με τη βέλτιστη συγκέντρωση αντισώματος σε PBS-T με 1% BSA και επώαστηκε για 1 ώρα στους 25°C.

Στη συνέχεια, οι πλάκες πλύθηκαν από το πλεόνασμα των αντιδραστήριων και ανιχνεύθηκαν συνδεδεμένα αντισώματα αντι-απτίνης χρησιμοποιώντας το δευτερεύον IgG κασίκας αντι-κουνελιού, συζευγμένο με υπεροξειδάση από το φυτό χρένο (*Amoracia rusticana*). Μετά το πλύσιμο, το μίγμα υποστρώματος TMB προστέθηκε στις πλάκες για να αποκαλυφθεί η δραστηριότητα του δεσμευμένου ενζύμου. Η ενζυματική αντίδραση τερματίστηκε 30 λεπτά αργότερα χρησιμοποιώντας 100 mL/1 M θειικού οξέος ανά κυψέλη και το επιχρωματισμένο προϊόν μετρήθηκε στα 450 nm χρησιμοποιώντας συσκευή ανάγνωσης StatFax 2100.

Το επίπεδο δέσμευσης αντισώματος στο αντιγόνο επικάλυψης ανιχνεύθηκε για κάθε συγκέντρωση αναλυόμενης ουσίας και μηδενική συγκέντρωση. Οι τιμές των συγκεντρώσεων αναστολής, το εύρος IC₅₀, IC₈₀ και IC₂₀-IC₈₀ χρησίμευσαν ως ευαισθησία προσδιορισμού, όριο ανίχνευσης και εύρος εργασίας του προσδιορισμού, αντίστοιχα.

Το αντίσωμα συνδέθηκε ομοιοπολικά με καρβοξυλιωμένες μικροσφαίρες από λατέξ. Οι ενεργοποιημένες μικροσφαίρες λατέξ, απομονώθηκαν από το μίγμα με φυγοκέντρηση στους 10°C για 7 λεπτά στις 14 000 rpm. Το ίζημα στη συνέχεια διαλύθηκε σε 1 mL ρυθμιστικού ενεργοποίησης (50 mM MES, pH 6.0) και υποβλήθηκε σε υπερήχους για 2 λεπτά, ακολουθούμενο από την προσθήκη 20 g αντισώματος ανά χιλιοστόλιτρο διαλύματος. Το μίγμα αφέθηκε να αντιδράσει για 2,5 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου, και στο τέλος της αντίδρασης προστέθηκαν 30 mL αιθανολαμίνης ανά 1 mL μικροσφαιρών 1% για 30 λεπτά. Κατόπιν οι μικροσφαίρες φυγοκεντρήθηκαν και επαναιωρήθηκαν στο ρυθμιστικό διάλυμα αποκλεισμού. Τα αντιδραστήρια εναποτέθηκαν στις λωρίδες μεμβράνης νιτροκυτταρίνης χρησιμοποιώντας έναν πιεζοηλεκτρικό ανιχνευτή χωρίς επαφή XYZ. Το συζυγές επίστρωσης Gel-cmOCLA προσροφήθηκε στη γραμμή δοκιμής και το IgG αντι-κουνελιού κασίκας εντοπίστηκε στη γραμμή ελέγχου.

Εάν απουσιάζει το αντιβιοτικό στο δείγμα, το αντιδραστήριο επικάλυψης θα παγιδεύσει τον ανιχνευτή και αυτό μπορεί κατά συνέπεια να δημιουργήσει μια ορατή γραμμή δοκιμής μπλε χρώματος. Εναλλακτικά, εάν υπάρχει αντιβιοτικό στο δείγμα, θα ανταγωνιστεί το συζυγές επικάλυψης για τον περιορισμένο αριθμό ανιχνευτών, οδηγώντας σε μείωση της έντασης χρώματος. Ανεξάρτητα από την παρουσία αντιβιοτικού

στο δείγμα, το IgG αντι-κουνελιού- κασίικας στη γραμμή ελέγχου θα δεσμεύσει τον ανιχνευτή και αυτό μπορεί να εξασφαλίσει την εγκυρότητα της μεθόδου ανίχνευσης.

Πρότυπα διαλύματα ROX, AZI, CLA, ERY, DIR, OLE παρασκευάστηκαν από αντίστοιχα μητρικά διαλύματα σε αιθανόλη με σειριακές αραιώσεις σε PBS-T. Η δοκιμαστική λωρίδα εισήχθη κατακόρυφα στα φρεάτια μιας πλάκας μικροτιτλοδότησης με 100 mL τυπικού διαλύματος αντιβιοτικού ή δείγματος γάλακτος. Μετά από επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 10 λεπτά, το αποτέλεσμα προσδιορίστηκε τόσο απευθείας με γυμνό μάτι όσο και με συσκευή ανάγνωσης opTrilizer . Η τιμή αποκοπής ερμηνεύτηκε ως η ελάχιστη συγκέντρωση αντιβιοτικού που προκάλεσε εξαφάνιση του χρωματισμού στη ζώνη δοκιμής. Η πλησιέστερη χαμηλότερη συγκέντρωση που παρέχει ορατό χρωματισμό της γραμμής δοκιμής λήφθηκε ως οπτικό όριο ανίχνευσης δοκιμασίας. Οι λωρίδες LFIA που δημιουργήθηκαν ήταν πλέον ικανές να ανιχνεύσουν την ύπαρξη μακρολιδίων, μέσω της ύπαρξης των μπλε μικροσωματιδίων λάτεξ.

Στην έρευνα των Dei Cas και των συνεργατών του (Dei Cas, Casagni, Gambaro, Cesari , & Roda, 2019) το αντικείμενο μελέτης ήταν ο προσδιορισμός της δαπτομυκίνης με την χρήση μεθόδου UPLC/MS-MS. Σύμφωνα με τους ερευνητές το κίνητρο για την έρευνα τους ήταν το γεγονός ότι η επιλογή του κατάλληλου αντιβιοτικού για τον θηλασμό είναι κρίσιμη, καθώς το φάρμακο μπορεί να μεταφερθεί στο μητρικό γάλα και να προκαλέσει τοξικότητα στο μωρό. Ο οργανισμός FDA ενέκρινε τη δαπτομυκίνη το 2003, για την καταπολέμηση λοιμώξεων του δέρματος σε δόση 4 mL-1/kg κάθε 24 ώρες ενδοφλεβίως και σε λοιμώξεις του κυκλοφορικού (βακτηραιμία) σε δόση 6 mL-1/kg κάθε 24 ώρες ενδοφλεβίως. Όσον αφορά την ανάλυση, η βιβλιογραφία περιλαμβάνει μεθόδους HPLC για τον προσδιορισμό της παρουσίας αυτού του αντιβιοτικού σε βιολογικά υγρά όπως ο ορός, το πλάσμα και το αίμα.

Προκειμένου να προσδιοριστεί η παρουσία της δαπτομυκίνης σε ανθρώπινο πλάσμα και στο μητρικό γάλα οι ερευνητές Dei Cas και συνεργάτες (Dei Cas, Casagni, Gambaro, Cesari , & Roda, 2019) ανέπτυξαν μια διαδικασία εκχύλισης και μια μέθοδο LC-MS/MS για τον προσδιορισμό της. Η υγρή χρωματογραφία με διαδοχική φασματομετρία μάζας (LC-MS/MS) είναι μια ισχυρή αναλυτική τεχνική που συνδυάζει τη διαχωριστική ισχύ της υγρής χρωματογραφίας με την εξαιρετικά ευαίσθητη και επιλεκτική ικανότητα ανάλυσης μάζας της τριπλής τετραπολικής φασματομετρίας μάζας. Πρέπει να σημειωθεί ότι η συγκεκριμένη μέθοδος έχει μεγάλη ευαισθησία και ειδικότητα (sensitivity &

specificity) καθώς και αναπαραγωγιμότητα (reproducibility) τα οποία είναι όλα χαρακτηριστικά μίας έγκυρης και αξιόπιστης έρευνας και έτσι προσδίδει κύρος στην έρευνα των Dei-Cas και συνεργατών (Dei Cas, Casagni, Gambaro, Cesari , & Roda, 2019).

Η διαδικασία που πρότειναν οι ερευνητές επικυρώθηκε και χρησιμοποιήθηκε στην περίπτωση μιας θηλάζουσας μητέρας που είχε μια πυώδη οξεία λοίμωξη και υποβλήθηκε σε θεραπεία με δαπτομυκίνη - αυτή είναι και η πιο συνηθισμένη χρήση της δαπτομυκίνης, δεδομένου ότι χρησιμοποιείται για λοιμώξεις του δέρματος. Λόγω της υψηλής πρωτεϊνικής δέσμευσης και του μοριακού βάρους της δαπτομυκίνης, λήφθηκαν υπόψη πολυάριθμες παράμετροι στη βελτιστοποίηση της τεχνικής εκχύλισης και των αναλυτικών συνθηκών. Παράμετροι που χρησιμοποιήθηκαν συμπεριελάμβαναν τον τύπο εκχύλισης, το εσωτερικό πρότυπο, τον τύπο του οργανικού τροποποιητή και το pH του υδατικού διαλύματος.

Η αξιοπιστία της έρευνας ενισχύθηκε από την χρήση ενός πρωτοκόλλου καθίζησης πρωτεϊνών σε συνδυασμό με στήλη C8 ανάστροφης φάσης LC-MS / MS, τα οποία έχουν ως αποτέλεσμα αξιόπιστο ποσοτικό προσδιορισμό της δαπτομυκίνης τόσο στο πλάσμα όσο και στο μητρικό γάλα, το οποίο ενδιαφέρει την συγκεκριμένη βιβλιογραφική έρευνα.

Στην ίδια έρευνα, σε νεογνό ασθενή με ερυσίπελα του αριστερού βραχίονα συλλέχθηκαν δείγματα αίματος και εννέα δείγματα μητρικού γάλακτος. Το ερυσίπελας είναι μία δερματική λοίμωξη που αποδίδεται στον στρεπτόκοκκο.

Το μητρικό γάλα αποκτήθηκε μέσω άντλησης του μαστού, ενώ το πλάσμα από το αίμα ανακτήθηκε μέσω φυγοκέντρησης. Η στρατηγική θεραπείας περιλάμβανε 14 ημέρες ενδοφλέβιας χορήγησης δαπτομυκίνης 500 mL⁻¹ την ημέρα, καθώς και 1 g μεροπενέμης 3 φορές την ημέρα. Η φαρμακολογική δοκιμή διεξήχθη μόνο για πέντε ημέρες: τις τελευταίες τέσσερις ημέρες της φαρμακευτικής αγωγής και τις επόμενες ημέρες χωρίς θεραπεία. 200 λίτρα μητρικού γάλακτος αναμίχθηκαν με 100 λίτρα IS (πρόκειται για ερυθρομυκίνη σε διάλυμα μεθανόλης 1 μg/mL) και 300 λίτρα ακετονιτριλίου. Τα υλικά υποβλήθηκαν για 15 λεπτά σε λουτρό υπερήχων και φυγοκεντρήθηκαν στα 0,805 x g για 15 λεπτά. Το υπερκείμενο αποσύρθηκε, φυγοκεντρήθηκε για άλλα 10 λεπτά στα 0,805 x g και διηθήθηκε από μια μεμβράνη φίλτρου από νάιλον, με πάχος 0,45 μm (Dei Cas, Casagni, Gambaro, Cesari , & Roda, 2019).

Στην έρευνα αυτή δοκιμάστηκαν διαφορετικές προσεγγίσεις όπως η εκχύλιση στερεάς φάσης (SPE) και η τεχνική καθίζησης με χρήση μεθανόλης και ακετονιτριλίου για τον προσδιορισμό της δαπτομυκίνης στο δείγμα. Τυποποιημένα δείγματα που περιείχαν διαφορετικές ποσότητες δαπτομυκίνης (100, 250, 500 και 750 ng/mL) και παρασκευάστηκαν με την προσθήκη κατάλληλων όγκων διαλυμάτων εργασίας δαπτομυκίνης σε γάλα χωρίς δραστική ουσία (200 μL).

Η HPLC συζεύχθηκε με ένα διαδοχικό φασματόμετρο μάζας στην αναλυτική συσκευή. Χρησιμοποιήθηκε σύστημα υγρής χρωματογραφίας UPLC με δύο χρωματογραφικές αντλίες και έναν αυτόματο δειγματολήπτη. Χρησιμοποιήθηκε κασέτα φύλακα για τον διαχωρισμό των δειγμάτων σε μια στήλη Agilent Poroshell 120 SB-C8 100 mm 2,1 mm 2,7 m αντίστροφης φάσης.

Για τα δείγματα μητρικού γάλακτος η γραμμική βαθμίδα ήταν μεταξύ του εκλούτη A (νερό +0,1% μυρμηκικό οξύ) και του εκλούτη B (ακετονιτρίλιο). Η στήλη εξισορροπήθηκε με 5% για 3 λεπτά και αυξήθηκε στο 99% σε 0,2 λεπτά, διατηρήθηκε για 3 λεπτά, επανήλθε στις αρχικές συνθήκες σε 1 λεπτό και διατηρήθηκε για 2 λεπτά στο 5%. Οι χρόνοι κατακράτησης ήταν 4,30 (δαπτομυκίνη) και 4,32 (IS) ± 0,3 λεπτά. Ο ρυθμός ροής ήταν 0,3 mL/min και ο κλίβανος στήλης διατηρήθηκε στους 40°C.

Το διαδοχικό φασματόμετρο μάζας ήταν ένα τριπλό τετραπολικό Acquity TQD με πηγή ιόντων Z-ψεκασμού ιονισμού ηλεκτροψεκασμού (ESI). Η διαχείριση των οργάνων έγινε με το αντίστοιχο λογισμικό, η τριχοειδής τάση ρυθμίστηκε στο 1,5 kV και η θερμοκρασία της πηγής ορίστηκε στους 150 °C. Ο χρόνος παραμονής ορίστηκε στα 0,3 δευτερόλεπτα και η ανάλυση MS πραγματοποιήθηκε σε λειτουργία θετικού ιόντος (ESI+). Το φάσμα ιόντων προϊόντος (MS/MS) κάθε αναλυόμενης ουσίας δημιουργήθηκε μέσω άμεσης έγχυσης για να ληφθούν βελτιστοποιημένες παράμετροι. Χρησιμοποιήθηκε η λειτουργία παρακολούθησης πολλαπλών αντιδράσεων (MRM).

Για τη βελτιστοποίηση της προτεινόμενης μεθόδου LC-MS/MS, διερευνήθηκαν τα αποτελέσματα αρκετών χρωματογραφικών παραμέτρων. Αυτά περιελάμβαναν τον τύπο του οργανικού τροποποιητή, το pH του υδατικού διαλύματος και το ρυθμό ροής. Αυτές οι παράμετροι βελτιστοποιήθηκαν με βάση μία σειρά παραγόντων. Όσον αφορά τον οργανικό τροποποιητή, αξιολογήθηκαν η μεθανόλη και η αιθανόλη, αλλά το ακετονιτρίλιο βρέθηκε να έχει καλύτερες επιδόσεις.

Πρέπει επίσης να αναφερθεί ότι έχει παρατηρηθεί ότι το σχήμα της κορυφής και η ένταση του θορύβου εξαρτώνται από τη μήτρα και συσχετίζονται με το % του εκλούτη A κατά τη διάρκεια της χρωματογραφίας. Έτσι, το έκλουσμα A άλλαξε μεταξύ δειγμάτων πλάσματος και γάλακτος χρησιμοποιώντας μυρμηκικό αμμώνιο 10 mM + 0,1% μυρμηκικό οξύ και νερό + 0,1% μυρμηκικό οξύ αντίστοιχα.

Η αναλογία βρεφικού γάλακτος/πλάσμα (M/P), η οποία κυμαινόταν από 0,002 έως 0,006, χρησιμοποιήθηκε για να προσδιοριστεί ότι η δαπτομυκίνη, η οποία ήταν επιτυχής για τη μητέρα, ήταν επί του παρόντος ασφαλής για το νεογέννητο που θήλαζε. Η απέκκριση δαπτομυκίνης επιβεβαιώθηκε στο γάλα, ωστόσο υπήρχαν σημαντικές αποκλίσεις στη συγκέντρωση μεταξύ των δύο βιολογικών μητρών. Ο λόγος M/P υπολογίστηκε και ανακαλύφθηκε η υψηλότερη τιμή 0,05. Αυτές οι αναλογίες M/P (1) υποδηλώνουν ότι δεν υπάρχει σημαντική βλάβη στο νεογέννητο λόγω της δαπτομυκίνης.

Η μέθοδος θεωρείται επικυρωμένη και η εφαρμογή της είχε επιτυχία στον προσδιορισμό της δαπτομυκίνης στο πλάσμα και το γάλα ενός ασθενούς. Ο στόχος των ερευνητών ήταν να εντοπιστεί η συσσώρευση της αντιβιοτικής ουσίας στο μητρικό γάλα και η σχετική τοξικότητα της αντιβιοτικής ουσίας της δαπτομυκίνης για το παιδί μετά το θηλασμό. Από τα αποτελέσματα της έρευνας, όπως αυτά γίνονται εμφανή παραπάνω, επιβεβαιώθηκε η απέκκριση δαπτομυκίνης στο μητρικό γάλα και οι συγκεντρώσεις της δαπτομυκίνης στο μητρικό γάλα της μετρήθηκαν για να προσδιοριστεί η έκθεση του βρέφους στην ουσία δια μέσου του μητρικού γάλακτος. Βρέθηκε ότι οι συγκεντρώσεις ήταν εξαιρετικά χαμηλές, με εκτιμώμενη αναλογία γάλακτος:πλάσμα 0,0012 και έτσι οι ερευνητές συμπεραίνουν ότι η δαπτομυκίνη μπορεί να είναι μια ασφαλής επιλογή θεραπείας.

Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε, αναφερόμενη ως LC/MS-MS αποδείχθηκε εξαιρετικά χρήσιμη στον προσδιορισμό της δαπτομυκίνης. Η σύζευξη της υγρής χρωματογραφίας (LC) με τη φασματομετρία μάζας (MS), έχει προσφέρει ένα ισχυρό εργαλείο, λόγω της ευελιξίας και της αποτελεσματικότητάς της. Έτσι, τα όργανα υγρής χρωματογραφίας-φασματομετρίας μάζας (LC-MS) βρίσκονται πλέον σε πολλά σύγχρονα αναλυτικά εργαστήρια.

Αντίστοιχα, οι Raysyan και συνεργάτες του (Raysyan, Galvidis, Schneider, Eremin, & Burkin, 2020) προσπάθησαν να προσδιορίσουν μακρολιδικά αντιβιοτικά στο μητρικό γάλα με ανοσοδοκιμασία πλευρικής ροής. Οι αντιβιοτικές ουσίες μακρολίδες

χρησιμοποιούνται συχνά από μητέρες που θηλάζουν και δεν θεωρείται να έχουν αρνητικές επιπτώσεις σε νεογνά, βρέφη και παιδιά ωστόσο στη βιβλιογραφία υπάρχουν κάποιες σπάνιες αναφορές ανεπιθύμητων ενεργειών σε βρέφη που έλαβαν μακρολίδες κατά την εγκυμοσύνη και τη γαλουχία. Για τον λόγο αυτό, γρήγορες και βολικές τεχνολογίες που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τον προσδιορισμό αντιβιοτικών ουσιών όπως οι μακρολίδες στο μητρικό γάλα είναι απαραίτητες για τον περιορισμό των αρνητικών συνεπειών.

Οι Rasyan και συνεργάτες (Rasyan, Galvidis, Schneider, Eremin, & Burkin, 2020) ανέπτυξαν μία μέθοδο για τον γρήγορο ταυτόχρονο προσδιορισμό μίας ομάδας έξι μακρολίδων αντιβιοτικών ουσιών: ροξιθρομυκίνης, της ερυθρομυκίνης, της διριθρομυκίνης, της αζιθρομυκίνης και της ολεανδομυκίνης. Κατά την έρευνά τους αναπτύχθηκε μια ανοσοδοκιμασία πλευρικής ροής (LFIA) χρησιμοποιώντας σωματίδια λατέξ επισημασμένα με αντίσωμα κατά της BSA-κλαριθρομυκίνης (CLA).

Λόγω του χαμηλού κόστους του και της απλότητας του, το LFIA είναι ένα ευρέως χρησιμοποιούμενο διαγνωστικό εργαλείο που μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον προσυμπτωματικό έλεγχο καθώς και για την παρακολούθηση μιας ποικιλίας διαταραχών. Τα τεστ αυτά είναι τόσο ευκολόχρηστα που μπορούν να χρησιμοποιηθούν από οποιονδήποτε επαγγελματία ιατρό, ακόμη και από τον ασθενή στο σπίτι, για αυτούς τους λόγους. Είναι κοινώς γνωστό ότι τα όργανα ανάλυσης πλευρικής ροής που μπορούν να χρησιμοποιηθούν στην άνεση του σπιτιού κάποιου παίζουν σημαντικό ρόλο στη θεραπεία λοιμώξεων και καρδιαγγειακών διαταραχών. Μέσα σε λίγα λεπτά μετά την έναρξη της δοκιμής, αυτή η προσέγγιση παρέχει πληροφορίες σχετικά με την παρουσία ή την απουσία μιας αναλυόμενης ουσίας στόχου.

Η απόδοση μιας ταινίας LFIA εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την αποτελεσματικότητα της διαδικασίας σύζευξης (η σύνδεση μιας ετικέτας ανίχνευσης σε ένα αντίσωμα ανίχνευσης), η οποία είναι μια εξαιρετικά περίπλοκη διαδικασία. Μέχρι στιγμής, έχει χρησιμοποιηθεί μια ποικιλία ετικετών-προσδιοριστών ανίχνευσης, συμπεριλαμβανομένων έγχρωμων σωματιδίων (όπως νανοσωματίδια χρυσού (GNP), μικροσωματιδίων λατέξ, νανοσωματιδίων άνθρακα (CNP), φωτεινών νανοσωματιδίων (όπως QDs) και μαγνητικών νανοσωματιδίων (MNP).

Στην συγκεκριμένη έρευνα των Rasyan και των συνεργατών του (Rasyan, Galvidis, Schneider, Eremin, & Burkin, 2020) η δυνατότητα οπτικής ανίχνευσης (vLOD) του

CLA, της ροξιθρομυκίνης, της ερυθρομυκίνης, της διριθρομυκίνης, της ολεανδομυκίνης και της αζιθρομυκίνης στο ρυθμιστικό διάλυμα αυξήθηκε 100 φορές βελτιστοποιώντας τη χρώση αντιγόνου στη μεμβράνη και φορτώνοντας τον ανιχνευτή λατέξ, ο οποίος ήταν 1, 1, 10, 10, 50 και 10 ng / mL, αντίστοιχα.

Μετά από 20 λεπτά προεπεξεργασίας, οι έξι μακρολίδες που υποδεικνύονται μπορούν να αναγνωριστούν οπτικά στο μητρικό γάλα σε συγκεντρώσεις 10–1000 ng/mL ή με συσκευές με cLOD 4.0, 2.5, 30, 42, 42 και 180 ng/mL. Η 20λεπτη προεπεξεργασία είναι πανομοιότυπη με εκείνη των Burkin και των συνεργατών του (2020) και είναι εύλογο ότι όπως και στην περίπτωση εκείνη έτσι και στην περίπτωση της έρευνας του Raysyan και των συνεργατών του (Raysyan, Galvidis, Schneider, Eremin, & Burkin, 2020) ένας τέτοιος τύπος γρήγορης επιτόπιας διαγνωστικής εξέτασης θα μπορούσε να είναι επωφελής για την παρακολούθηση των επιπέδων αντιβιοτικών στο μητρικό γάλα κατά τη διάρκεια της θεραπείας με μακρολίδες, προκειμένου να διασφαλιστεί η ασφάλεια των βρεφών κατά τη διάρκεια του θηλασμού.

Συμπερασματικά, οι ερευνητές ανέπτυξαν μια δοκιμή λωρίδων LFIA βασισμένη σε μικροσωματίδια λατέξ συζευγμένα με αντισώματα κατά των μακρολιδίων ειδικά για την ομάδα. Η δοκιμή με την χρήση δοκιμαστικής ταινίας ήταν ικανό να ανιχνεύσει έξι εκπροσώπους της οικογένειας των μακρολιδίων αντιβιοτικών και συγκεκριμένα, ροξιθρομυκίνη, αζιθρομυκίνη, κλαριθρομυκίνη, ερυθρομυκίνη, διριθρομυκίνη και ολεανδομυκίνη στο μητρικό γάλα. Ως αποτέλεσμα η δοκιμή αυτή πλέον μπορεί να ολοκληρωθεί εντός 10 λεπτών και να αξιολογηθεί με γυμνο μάτι ή χρησιμοποιώντας φορητό σαρωτή. Κρίθηκε κατάλληλη για τον έλεγχο της απέκκρισης αντιβιοτικών στο μητρικό γάλα και την πλήρη εξαφάνισή του διασφαλίζοντας την ασφάλεια του βρεφικού θηλασμού.

Για τις έξι μακρολίδες, το όριο ανίχνευσης οργάνων κυμαινόταν από 2,5 έως 180 ng/mL, το οποίο ήταν πολύ χαμηλότερο από την προβλεπόμενη συγκέντρωση αυτών των αντιβιοτικών στο γάλα μετά τη θεραπεία. Έτσι, το τεστ LFIA που αναπτύχθηκε μπορεί να είναι χρήσιμο για τον έλεγχο της έναρξης και της απέκκρισης οποιασδήποτε από τις έξι θηλάζουσες μητέρες μακρολίδες που θηλάζουν.

-Σύμφωνα με το άρθρο του BAM (2018) (το BAM είναι ένα ανώτερο επιστημονικό και τεχνικό ομοσπονδιακό ινστιτούτο, με ευθύνη στο Ομοσπονδιακό Υπουργείο Οικονομίας και Δράσης για το Κλίμα), εκτός από τις παραπάνω έρευνες για αντιβιοτικές

ουσίες, η Anna Raysyan, έχει αναπτύξει ένα εύχρηστο strip-test για την ανίχνευση φαρμακευτικών ουσιών γενικότερα στο μητρικό γάλα, όπου οι μητέρες θα μπορούν να χρησιμοποιούν και στο σπίτι. Ο ερευνητικός της στόχος ήταν να βοηθήσει τις γυναίκες να πάρουν τον έλεγχο της ασφάλειας του μητρικού τους γάλακτος, χωρίς να χρειαστεί να επισκεφθούν κάποιο ιατρείο.

Η συγκέντρωση του συνταγογραφούμενου φαρμάκου στο αίμα επηρεάζει την ποσότητα του στο μητρικό γάλα. Η Anna Raysyan, με τη μέθοδο της έχει κάνει δυνατή την ανίχνευση των ουσιών με μόνο μερικές σταγόνες μητρικού γάλακτος ώστε να προσδιοριστεί η παρουσία της ουσίας και το επίπεδο της, μέσα σε πέντε λεπτά, στο μητρικό γάλα. Σύμφωνα με την ίδια θα αναπτυχθεί και μια εφαρμογή στο κινητό, σύντομα.

Η δοκιμασία ταινίας (strip test) είναι η λεγόμενη ανοσοδοκιμασία πλευρικής ροής, παρόμοια με πολλά τεστ εγκυμοσύνης. Ο πρώτος μολυσματικός παράγοντας με τον οποίο ασχολήθηκε, ήταν η δισφαινόλη A, εν συντομία BPA, μια ορμονικά ενεργή ένωση που απελευθερώνεται από ορισμένα πλαστικά υλικά. Τώρα χρησιμοποίησε την ίδια τεχνική, για την έρευνα στην ταινία μέτρησης, που θα επιτρέψει σε όλους να προσδιορίσουν το παυσίπονο diclofenac στο μητρικό γάλα. Η γρήγορη δοκιμή θα επιτρέψει την ανάλυση της δικλοφενάκης στο μητρικό γάλα και τη λήψη των αποτελεσμάτων μέτρησης, σε smartphone, μέσω της εφαρμογής.

Η Raysyan αναφέρει ότι τα επόμενα βήματα, θα ήταν η επέκταση αυτής της ικανότητας, για να επιτραπεί η δοκιμή για άλλα φάρμακα στο ίδιο δείγμα. Αναμένεται όμως να πραγματοποιηθούν μελέτες διασφάλισης ποιότητας και επικύρωσης της ακρίβειας των αποτελεσμάτων, σε πραγματικά δείγματα μητρικού γάλακτος.

Στην προηγούμενη έρευνα της, κατοχύρωσε σε πατέντα ευρεσιτεχνίας, μία ανοσοχημική συσκευή και μέθοδο ανοσοδοκιμασίας πλευρικής ροής, για τον προσδιορισμό φαρμακευτικών υπολειμμάτων και μολυσματικών ουσιών στο μητρικό γάλα, για την ανίχνευση και τον ποσοτικό προσδιορισμό της δισφαινόλης A (BPA) (Rasyan, 2021). Στην έρευνα της η Raysyan χρησιμοποίησε διάφορες μεθόδους, από τις οποίες θα εστιάσουμε στην συνέχεια στην ανοσοδοκιμασία πλευρικής ροής, που χρησιμοποιήθηκε ως βάση για την δοκιμασία ταινίας, που ανέπτυξε για τις θηλάζουσες μητέρες.

Σε αυτή τη μελέτη, χρησιμοποιήθηκε ένα αντίσωμα, για τη λειτουργικότητα των νανοσωματιδίων λάτεξ και χρυσού. Ο ομοιοπολικός δεσμός των αντισωμάτων στα σωματίδια και η άμεση φυσικορόφηση των αντισωμάτων, ήταν δύο ξεχωριστές

διαδικασίες σύζευξης που εξετάστηκαν. Μια σχεδιασμένη ELISA – sandwich (ELISA: Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) χρησιμοποιήθηκε και στις δύο περιπτώσεις, για την επικύρωση της δραστηριότητας των δεσμευμένων αντισωμάτων. Τα ίδια επίπεδα συγκέντρωσης και επιφανειακής κάλυψης αντισωμάτων επιτεύχθηκαν από δύο διαλύματα: το ένα περιείχε μικροσωματίδια λάτεξ και το άλλο σωματίδια χρυσού. Δημιουργήθηκε και βελτιστοποιήθηκε μια φάση αποκλεισμού και το συζευγμένο pad, επιλέχθηκε από μια τεράστια γκάμα εμπορικά προσβάσιμων εμπορευμάτων. Επιλέχθηκε η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης (NC), μια σημαντική βάση. Κάθε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης, έχει διαφορετικό χαρακτηριστικό τριχοειδούς ροής, με βάση τα φυσικά χαρακτηριστικά της μεμβράνης και τη διαδικασία κατασκευής, η οποία επηρεάζει τη δυναμική ροής, την ευαισθησία, την ειδικότητα και τη συνέπεια της ανάλυσης. Η απόδοση της ανάλυσης εξετάστηκε και προσαρμόστηκε για τη βέλτιστη ένταση χρώματος, χρησιμοποιώντας συνθήκες κηλίδωσης χωρίς επαφή, φορτίο αντιδραστηρίου ανά λωρίδα στη μεμβράνη (αριθμός σταγόνων ανά κηλίδα, αριθμός κηλίδων ανά γραμμή και αριθμός γραμμών), φόρτωση συζευγμένου αντισώματος σωματιδίων (particle antibody conjugate loads) και διαλύματα σταθεροποίησης μεμβράνης.

Το LFIA με βάση το λάτεξ, επέτρεψε την οπτική ανίχνευση της BPA στα 10 g/L υπό τις ιδανικές συνθήκες. Λήφθηκε LOD (Limit Of Detection) (όριο ανίχνευσης) 0,14 g/L, χρησιμοποιώντας ποσοτικοποίηση βασισμένη σε σαρωτή. Σκοπός ήταν, να μπορεί να χρησιμοποιηθεί, για τον γρήγορο και οικονομικά προσιτό προσδιορισμό της BPA και έτσι αποτέλεσε τη βάση για τις επόμενες έρευνες, σχετικά με το μητρικό γάλα. Επιπλέον, η υψηλή απόδοση δείγματος και των τριών ανοσοδοκιμών, που δοκίμασε η Raysyan, εκτός του LFIA (Lateral Flow ImmunoAssay), επιτρέπουν την ανάλυση πολλών δειγμάτων ταυτόχρονα και είναι πολύ ευκολόχρηστες.

Προετοιμασία του LFIA (Lateral Flow ImmunoAssay)

Τα IgG GNP (Gold NanoParticles), αντισώματα μικροσωματιδίων χρυσού, αναπτύχθηκαν ως εξής: 20 ml διαλύματος νανοσωματιδίων χρυσού (pH 8,5), προστέθηκαν σε 80 μl purified πρωτεΐνης (20 μg) και το μίγμα αναδεύτηκε για 18 ώρες. 1 mL διαλύματος λευκωματίνης ορού βοοειδούς 10% (BSA), προστέθηκε στο μίγμα, αφού αναδεύτηκε για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Το μίγμα στη συνέχεια, αναμίχθηκε για επιπλέον 60 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.

Πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση στο ελαιώρημα, στους 4°C για 10 λεπτά. Τέλος, 1 mL ρυθμιστικού διαλύματος βορικού νατρίου 1 mM (που περιέχει 1% BSA και 1% σακχαρόζη), χρησιμοποιήθηκε για την εκ νέου ελαιώρηση των IgG GNPs και έπειτα διατηρήθηκε στους 4 °C.

Χρησιμοποιώντας την αντίδραση ενεργοποιημένου εστέρα, το αντίσωμα συνδέθηκε ομοιοπολικά με νανοσωματίδια καρβοξυλιωμένου χρυσού. 200 mM EDC και 400 mM Sulfo-NHS αναμίχθηκαν σε 1 mL 5 mM PBS, pH 6,0, μαζί με 1 mL GNP 40 nm. Το μίγμα στη συνέχεια, αναδεύτηκε και αφέθηκε να παραμείνει για 90 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Η φυγοκέντρηση χρησιμοποιήθηκε, για να διαχωριστεί το ενεργοποιημένο GNP από το μίγμα, για 10 λεπτά στους 10°C και στις 3800 rpm. Στη συνέχεια, προστέθηκαν 20 g IgG ανά χιλιοστόλιτρο διαλύματος, αφού το ίζημα είχε διαλυθεί σε 1 mL ρυθμιστικού διαλύματος αντίδρασης.

Προκειμένου να απενεργοποιηθούν τυχόν υπολειπόμενοι ενεργοί εστέρες NHS, το μίγμα αντέδρασε για 2,5 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου, σε έναν περιστρεφόμενο τροχό. Η αντίδραση στη συνέχεια σταμάτησε, με προσθήκη 30 μL αιθανολαμίνης ανά 1 mL μικροσφαιρών λάτεξ 1%, για 30 λεπτά. Το μίγμα φυγοκεντρήθηκε στις 3800 rpm στους 10°C για 10 λεπτά. Χρησιμοποιήθηκε ELISA σάντουιτς, για τη μέτρηση της ποσότητας της μη δεσμευμένης IgG στο υπερκείμενο. Μετά από αυτό, το ίζημα επαναδιαλύθηκε σε ρυθμιστικό αποκλεισμού ((1 mM BB (Borat buffer), pH 8,0, 0,5% BSA)). 100 L μικροσωματιδίων λάτεξ, αναμίχθηκαν με 1 mL ρυθμιστικού διαλύματος ενεργοποίησης/σύζευξης (50 mM MES, pH 6,0) και αναδεύτηκαν για 30 λεπτά, πριν προστεθούν 24 L 200 mM EDC και 240 L 200 mM Sulfo-NHS που είχε διαλυθεί στο διάλυμα μικροσωματιδίων λάτεξ. Με φυγοκέντρηση του μίγματος στους 10°C για 7 λεπτά στις 14 000 rpm, τα ενεργοποιημένα μικροσωματίδια λάτεξ διαχωρίστηκαν από το υπόλοιπο μίγμα. Αφού το ίζημα είχε διαλυθεί σε 1 mL ρυθμιστικού ενεργοποίησης και υποβλήθηκε σε υπερήχους για 2 λεπτά, 20 g IgG προστέθηκαν στη συνέχεια σε κάθε χιλιοστόλιτρο του μίγματος. Σε θερμοκρασία δωματίου, το μίγμα θερμάνθηκε για 2,5 ώρες σε έναν περιστρεφόμενο τροχό πριν σβήσει για 30 λεπτά, με προσθήκη 30 L αιθανολαμίνης ανά 1 mL μικροσωματιδίων λάτεξ 1%. Η φυγοκέντρηση του μίγματος πραγματοποιήθηκε στους 10°C για 7 λεπτά. στις 14 000 σ.α.λ.. Χρησιμοποιήθηκε ELISA σάντουιτς, για τη μέτρηση της ποσότητας, της μη δεσμευμένης IgG ποντικού στο υπερκείμενο.

Μετά τη φυγοκέντρηση, οι μικροσφαίρες επαναδιαλύθηκαν στο διάλυμα αποκλεισμού (50 mM Tris, pH 8,0, 0,5% BSA).

Κατασκευή δοκιμαστικών ταινιών πλευρικής ροής

Ένα από τα πιο κρίσιμα συστατικά μιας συσκευής πλευρικής ροής, είναι η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης. Χρησιμοποιώντας έναν πιεζοηλεκτρικό εκτυπωτή sciFLEXARRAYER S3, τα χημικά εκτυπώθηκαν στις ταινίες μεμβράνης νιτροκυτταρίνης και IgG αντι-ποντικού προβάτου, προσροφήθηκε στη γραμμή δοκιμής (T), ενώ το επικαλυμμένο συζυγές απτενίου-πρωτεΐνης BVA-Ahx-BSA προσροφήθηκε στη γραμμή ελέγχου (C).

Το ιδανικό πλάτος ζώνης δοκιμής, σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, θα πρέπει να είναι μεταξύ 0,5 και 1,0 mm. Οι γραμμές αποτελούνταν από πολλές σειρές κηλίδων, που απείχαν 250 microns η μία από την άλλη. Κάθε σημείο δημιουργήθηκε από τη συσσώρευση πολλών σταγονιδίων (0,35 nL). Για να ληφθεί το ιδανικό φορτίο αντιδραστηρίων στις γραμμές δοκιμής και ελέγχου, άλλαξε ο αριθμός των σειρών, ο αριθμός των κηλίδων ανά σειρά και ο αριθμός των σταγονιδίων ανά κηλίδα. Οι μεμβράνες κηλιδώθηκαν, στη συνέχεια ξηράνθηκαν στους 37°C για μία ώρα.

Η κάρτα που περιέχει τη μεμβράνη μπλοκαρίστηκε (blocked) με 1% καζεΐνη σε PBS (Phosphate – Buffered Saline) για 10 λεπτά, ακολουθούμενη από δύο πλύσεις Milli-Q 10 δευτερολέπτων και στέγνωσε για 1 ώρα στους 37°C. Χρησιμοποιώντας έναν κόφτη Dahle 502, η κάρτα χωρίστηκε σε μεμονωμένες δοκιμαστικές ταινίες πλάτους 3 mm . Διάφορες τεχνικές μπλοκαρίσματος και περιβάλλον ξήρανσης, δοκιμάστηκαν σε όλο το πείραμα.

Ένα ρυθμιστικό βορικών 20 mM (BB, pH 8,2) που περιείχε 1% καζεΐνη και 1% σακχαρόζη, εφαρμόστηκε στο συζυγές επίθεμα πριν στεγνώσει, στους 37°C για 30 λεπτά. Ο βέλτιστος όγκος και οι συγκεντρώσεις μικροσωματιδίων λάτεξ ή νανοσωματιδίων χρυσού, που ανιχνεύθηκαν με αντισώματα κατά της BPA (IgG-LMP ή IgG-GNP, αντίστοιχα), προστέθηκαν στο συζυγές επίθεμα. Τα προαναφερθέντα εξαρτήματα τοποθετήθηκαν όλα μαζί σε μια πλαστική κάρτα υποστήριξης, χρησιμοποιώντας κόλλα: πρώτα, η μεμβράνη NC (NitroCellulose) κολλήθηκε στη μέση του υποστηρικτικού μαξιλαριού (πλάκα PVC). Στη συνέχεια, το δείγμα και τα απορροφητικά επιθέματα προσκολλήθηκαν στο κάτω και στο επάνω τμήμα του συγκολλητικού υποστρώματος, με επικάλυψη 2 mm της μεμβράνης NC.

Μετρήσεις LFIA και ερμηνεία δεδομένων - Συσκευές

Με σειριακή αραιώση τυπικών διαλυμάτων δισφαινόλης A σε Milli-Q από ταιριαστά μητρικά διαλύματα (1 mg/mL) σε αιθανόλη. Ένα φρεάτιο πλάκας μικροτιτλοδότησης (microtiter plate), περιείχε 100 L, είτε του δείγματος, είτε του διαλύματος BPA αναφοράς και η δοκιμαστική ταινία, τοποθετήθηκε κατακόρυφα σε κάθε φρεάτιο. Το αποτέλεσμα μπορεί ήδη να φανεί, μετά από μια περίοδο επώασης 10 λεπτών σε θερμοκρασία δωματίου.

Δεδομένου ότι μια οπτική επιθεώρηση, δεν χρειάζεται εξειδικευμένο όργανο ανάγνωσης, είναι πρακτική για επιτόπιες διαγνώσεις. Ο περιορισμός της μεθόδου, ωστόσο, είναι ότι επιτρέπει μόνο μια ποιοτική απάντηση ναι/όχι. Το μέσο σήμα (ένταση) των γραμμών δοκιμής και ελέγχου, υπολογίστηκε χρησιμοποιώντας λογισμικό αναλυτικής επεξεργασίας εικόνας και φορητές συσκευές ανάγνωσης, για την ποσοτική απόδοση. Η συγκέντρωση, που οδήγησε σε μείωση σήματος, τριπλάσια της τυπικής απόκλισης (SD) του σήματος για το δείγμα χωρίς αναλύτη («κενό»), χρησιμοποιήθηκε για τον υπολογισμό του ορίου ανίχνευσης (LOD). Το B_0 (δείγμα χωρίς αναλύτη, δηλ. τυφλό σήμα) αφαιρέθηκε από μια τιμή ίση με τρεις φορές την τυπική απόκλιση αυτού του τυφλού σήματος ($B = B_0 - 3 \times SD$). Η σχέση μεταξύ της έντασης του χρώματος και της συγκέντρωσης BPA

Η ελάχιστη συγκέντρωση BPA που οδήγησε σε αισθητή έλλειψη χρωματισμού στη ζώνη δοκιμής σε αντίθεση με την πλησιέστερη χαμηλότερη συγκέντρωση που εμφανίζει ήδη έγχρωμη γραμμή δοκιμής ορίστηκε ως το οπτικό όριο ανίχνευσης (vLOD) της δοκιμασίας. Για την καταχώρηση και τη μέτρηση της έντασης χρώματος των γραμμών ελέγχου και δοκιμής στις δοκιμές LFIA, το opTrilyzer[®] και ο μικροαναγνώστης Cube[®] χρησιμοποιήθηκαν και οι δύο ως συσκευές ανίχνευσης.

Ο μικροαναγνώστης Cube[®] ζυγίζει 40 g και έχει κυβική μορφή με μήκος άκρης περίπου 41 mm. Μια χρωματομετρική ένδειξη σε μήκος κύματος 525 nm είναι ο τρόπος μέτρησης, στον οποίο έχει ρυθμιστεί το όργανο. Τα βασικά στοιχεία του μικροαναγνώστη opTrilyzer[®] και Cube[®] είναι τα εξής:

1. ένα απλό LED, που λειτουργεί ως πηγή φωτός
2. τη συσκευή, που ανιχνεύει το φως, που ανακλάται από την επιφάνεια δοκιμής και
3. ένα μηχανισμό οπτικής εστίασης, που βασίζεται σε φακούς

Χρησιμοποιώντας εργαλεία λογισμικού, η καταχωρημένη εικόνα υποβάλλεται σε περαιτέρω επεξεργασία. Ως συνέπεια της μέτρησης, το πρόγραμμα εκτιμά την

περιεκτικότητα σε αναλυόμενη ουσία με βάση την ένταση της γραμμής ελέγχου και της γραμμής δοκιμής. Τα πρωτογενή δεδομένα για μια σειρά σημείων, οργανωμένων σε οριζόντιες και κάθετες σειρές αντιπροσωπεύονται ως εικόνα μιας δοκιμαστικής ταινίας από την ψηφιακή οπτική καταχώρηση. Τα κόκκινα, πράσινα και μπλε κανάλια παραγωγής εικόνων (RGB) αντιπροσωπεύονται αριθμητικά με τρεις παραμέτρους που περιγράφουν κάθε pixel. Καθώς αυξάνεται η ένταση της χρώσης, τα αποτελέσματα εγγραφής, για καθένα από τα τρία κανάλια, είναι ακέραιοι. Το opTrilyzer έχει δυνατότητες απεικόνισης υψηλής ανάλυσης με εύρος τιμών σήματος από 0 έως 800 a.u. (astronomical units).

Επειδή η ένταση του σήματος είναι τυπικά ανάλογη με τον αριθμό των σωματιδίων, που συλλαμβάνονται στη γραμμή δοκιμής, η οποία συσχετίζεται επίσης με την ποσότητα BPA, το σύστημα απεικόνισης υψηλής τεχνολογίας, μπορεί να βελτιώσει την ευαισθησία ανίχνευσης και το σήμα μπορεί να ποσοτικοποιηθεί (δηλαδή, η ποσότητα της ετικέτας) χρησιμοποιώντας συστήματα ανάγνωσης.

Μια καμπύλη βαθμονόμησης, μπορεί να δημιουργηθεί με τη γραφική παράσταση της μετρούμενης έντασης γραμμής δοκιμής, σε σχέση με τη συγκέντρωση BPA.

Η τιμή σήματος για τον μικροαναγνώστη Cube®, ποικίλλει από 0 έως 300 a.u.. Ο μικροαναγνώστης Cube®, προσφέρει το προφίλ έντασης (προφίλ οπτικής πυκνότητας (OD)) μιας γραμμής δοκιμής και ελέγχου και τα ψηφιοποιημένα αποτελέσματα επεξεργασίας δεδομένων, μπορεί να είναι προσβάσιμα μέσω υπολογιστή, αν και έχουν κάπως χειρότερη ποιότητα εικόνας από το opTrilyzer®.

Αναμένεται ότι τα συστήματα αυτά, ίσως χρησιμοποιηθούν στην πορεία για την δημιουργία της εφαρμογής της Raysyan, που θα επιτρέπει την ανίχνευση των ουσιών αυτών, καθώς και άλλων ουσιών στο μητρικό γάλα.

Κεφάλαιο 5. Συμπεράσματα-Συζήτηση

Αρκετοί διεθνείς οργανισμοί υγείας και παιδιατρικές ακαδημίες υποστηρίζουν το μητρικό γάλα ως την καλύτερη πηγή τροφής για τα νεογνά, τονίζοντας τις θετικές επιπτώσεις που έχει τόσο στη σωματική όσο και στην ψυχική ανάπτυξη του παιδιού. Για την υγιή ανάπτυξη ενός μωρού, καθώς και την αντίσταση σε ιογενείς και βακτηριακές λοιμώξεις, το μητρικό γάλα έχει σχεδόν ιδανική ισορροπία πρωτεϊνών, υδατανθράκων, λιπιδίων και βιταμινών.

Ωστόσο, μια ποικιλία μεταβλητών, όπως η τροφή, η υγεία της μητέρας και η φαρμακευτική αγωγή, μπορεί να επηρεάσουν τη σύνθεση του μητρικού γάλακτος. Μελέτες έχουν δείξει ότι η πλειονότητα των φαρμάκων απεκκρίνεται στο μητρικό γάλα, θέτοντας σε κίνδυνο ένα παιδί που θηλάζει. Παραδείγματα περιλαμβάνουν αντιβιοτικά μακρολιδίων, τα οποία μπορεί να περάσουν τους φραγμούς των μαστικών κυττάρων και να εισέλθουν στο γάλα των θηλαζουσών γυναικών. Αυτό έγινε εμφανές και στην μελέτη των άρθρων που εξετάστηκαν στο τελευταίο κεφάλαιο. Δεν υπάρχει εκτεταμένη έρευνα σχετικά με τις επιδράσεις αυτών των χημικών ουσιών στα νεογνά που περνούν μέσω του μητρικού γάλακτος.

Παρά το γεγονός ότι οι μακρολίδες είναι συνήθως καλά ανεκτές από τα μωρά και τα μικρά παιδιά, ένας αριθμός μελετών έχει δείξει ότι οι μητέρες και οι θηλάζουσες μητέρες που χρησιμοποιούσαν μακρολίδες κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης ή κατά τη διάρκεια του θηλασμού παρουσίασαν ανεπιθύμητες ενέργειες. Ως αποτέλεσμα, υπάρχει ένα δίλημμα σχετικά με τη χρήση αντιβιοτικών κατά τη διάρκεια του θηλασμού ή την αναστολή του θηλασμού κατά τη διάρκεια της αντιβιοτικής θεραπείας. Απαιτούνται γρήγορες και εύκολες τεχνολογίες για τον έλεγχο αντιβιοτικών στο γάλα από θηλάζουσες μητέρες προκειμένου να διαχειριστεί την παρουσία μακρολιδίων και να διασφαλίσει την πλήρη απομάκρυνσή τους.

Στην παρούσα εργασία παρουσιάστηκαν τέσσερις αναλυτικές τεχνικές, που έχουν εφαρμοσθεί, για την παρακολούθηση της συγκέντρωσης αντιβιοτικών στο μητρικό γάλα. Κατά τη χρήση αντιβιοτικών με μακρολίδες για την εξασφάλιση ασφαλούς θηλασμού για τα νεογνά, περιγράφηκε ανοσοδοκιμασία πλευρικής ροής με βάση το λατέξ χρησιμοποιώντας ένα αντίσωμα αντι-CLA και Gel-cmoCLA ως το δοκιμαστικό αντιγόνο για τη γρήγορη μέτρηση των μακρολιδικών αντιβιοτικών στο μητρικό γάλα. Αυτή η νέα δοκιμή LFIA μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την παρακολούθηση της παρουσίας και της απέκκρισης οποιασδήποτε από τις έξι μακρολίδες στο μητρικό γάλα από γυναίκες που λαμβάνουν φάρμακα, επιτρέποντας την ασφαλή συνέχιση του θηλασμού.

Για τις μακρολίδες επίσης χρησιμοποιήθηκε πείραμα ανοσοχρωματογραφικής λωρίδας, το οποίο βρέθηκε επίσης επιτυχές για τον προσδιορισμό αντιβιοτικών ουσιών στο μητρικό γάλα με την χρήση αντιγόνου κατσίκας αντί-κουνελιού, για μία πιο άμεση και λιγότερο ακριβή δοκιμασία που χρησιμοποιεί πρωτόκολλα δοκιμασιών πλευρικής ροής.

Αυτή η ανοσοχρωματογραφική μέθοδος μπορεί, πλέον, να χρησιμοποιηθεί για να κρίνει την ασφάλεια λήψης μακρολίδων από θηλάζουσες μητέρες.

Περιγράφηκε επίσης μέθοδος UPLC/MS-MS για τον προσδιορισμό δαπτομυκίνης στο ανθρώπινο γάλα και στο πλάσμα, οι ερευνητές επινόησαν και δοκίμασαν μια διαδικασία εκχύλισης και μια μέθοδο UPLC/MS-MS σε μια θηλάζουσα γυναίκα που είχε λάβει θεραπεία με δαπτομυκίνη για πυώδη οξεία λοίμωξη του μαλακού δέρματος (PASSI). Η δαπτομυκίνη αποδείχθηκε ότι απεκκρίνεται στο γάλα και αυτή όπως και οι μακρολίδες.

Η βιβλιογραφία ανέδειξε ότι υπάρχουν μία σειρά από δοκιμασίες πλευρικής ροής με την μορφή rapid-test που είναι διαθέσιμες στους κτηνοτρόφους για την ανίχνευση αντιβιοτικών ουσιών στο ζωικό γάλα.

Η έρευνα της Raysyan έδειξε ότι οι δοκιμασίες πλευρικής ροής είναι αποτελεσματικές στην ανίχνευση αντιβιοτικών ουσιών και στο ανθρώπινο μητρικό γάλα και ότι είναι εφικτό να αναπτυχθεί μεθοδολογία rapid-testing με εύχρηστα κιτ στο σπίτι. Εφαρμόζοντας τις αρχές της μεθοδολογίας της θα είναι εφικτό τα επόμενα χρόνια οι θηλάζουσες γυναίκες να ελέγχουν την παρουσία αντιβιοτικών ουσιών στο μητρικό γάλα κατά τη διάρκεια της αγωγής με την χρήση των τεστ/κιτ χωρίς να επισκέπτονται ιατρικό εργαστήριο.

Γνωρίζοντας από τη βιβλιογραφία τα χρονικά παράθυρα ανίχνευσης των αντιβιοτικών ουσιών, θα είναι εφικτό οι γυναίκες να γνωρίζουν πότε και πόσο συχνά θα πρέπει να ελέγχουν το γάλα για την παρουσία αντιβιοτικών ουσιών.

Συμπερασματικά, με βάση τη βιβλιογραφία και τις έρευνες που παρουσιάστηκαν, είναι πιθανό οι αντιβιοτικές ουσίες να περνούν από τη μητέρα στο παιδί. Νέες έρευνες εστιάζουν πλέον στον προσδιορισμό των ουσιών αυτών στο μητρικό γάλα προκειμένου να γίνεται ορθή διαχείριση της κατάστασης.

Βιβλιογραφικές Αναφορές

- Andreas, N., Kampmann, B., & Le-Doare, K. (2015). Human breast milk: A review on its composition and bioactivity. *Early human development*, 91(11), 629-635.
- Arroyo, R., Martin, V., Maldonado, A., Jiménez, E., Fernández, L., & Rodríguez, J. (2010). Treatment of infectious mastitis during lactation: antibiotics versus oral administration of Lactobacilli isolated from breast milk. *Clinical Infectious Diseases*, 50(12), 1551-1558.
- Brown, W., Iverson, B., Anslyn, E., & Foote, C. (2013). *Organic chemistry*. Cengage Learning.
- Burkin, M. A., Galvidis, I. A., Raysyan, A., Schneider, R., & Eremin, S. A. (2021). Immunochromatographic determination of macrolides in breast milk from medicated mothers to control safe breastfeeding. *Public Health Toxicology*, 1(Supplement 1).
- Campione, E., Cosio, T., & Rosa, L. (2020). Lactoferrin as Protective Natural Barrier of Respiratory and Intestinal Mucosa against Coronavirus Infection and Inflammation. *Int. J. Mol. Sci.* doi:doi: 10.3390/ijms21144903.
- Carrey, F., & Giuliano, R. (2013). *Organic chemistry*. McGraw-Hill Education.
- Cathy, O. (2017). *Weapons of Math Destruction: How Big Data Increases Inequality and Threatens Democracy*. Chicago: Crown Random House.
- Civra, A. L. (2019). Antiviral oxysterols are present in human milk at diverse stages of lactation. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 193.
- D'angelo, V., De Luca, E., & Locatelli, M. (2016). Microextraction by packed sorbent and HPLC–PDA quantification of multiple anti-inflammatory drugs and fluoroquinolones in human plasma and urine. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 110-116 .
- Dei Cas, M., Casagni, E., Gambaro, V., Cesari, E., & Roda, G. (2019). Determination of daptomycin in human plasma and breast milk by UPLC/MS-MS. *Journal of Chromatography B*(1116), 38-43.
- Delgado, S., Arroyo, R., Jiménez, E., Marín, M., del Campo, R., Fernández, L., & Rodríguez, J. (2009). Staphylococcus epidermidis strains isolated from breast milk of women suffering infectious mastitis: potential virulence traits and resistance to antibiotics. *BMC microbiology*, 9(1), 1-11.
- Farshchi, A., Bahrami, G., & Ghiasi, G. (2009). A sensitive liquid chromatographic method for the analysis of clarithromycin with pre-column derivatization: application to a bioequivalence study. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, 25-40.
- Fitzstevens, J. (2017). Systematic review of the human milk microbiota. *Nutr Clin Pract Off Publ Am Soc Parenter Enter Nutr*, σσ. 354–64.

- González de la Huebra, M. (2005). Analysis of macrolide antibiotics by liquid chromatography. *J Pharm Biomed Analysis*, 376–398.
- Gordon, P., & Gregory, P. (2022). *Organic chemistry in colour*. De Gruyter.
- Guanglun, M. M., Yang, H., & Yan, W. (2017, October). Building resilience of students with disabilities in China: The role of inclusive education teachers. *Teacher and Teaching Education*, σσ. 125-134.
- Habib, H. (2021). The role of iron in the pathogenesis of COVID-19 and possible treatment with lactoferrin and other iron chelators. *Biomed. Pharmacother.* doi:doi: 10.1016/j.biopha.2021.111228
- He, J., & Liu, S. (2014). Human colostrum oligosaccharides modulate major immunologic pathways of immature human intestine. *Mucosal Immunol*, σσ. 1326–39.
- Hendrickson, O., Zvereva, E., Shanin, I., Zherdev, A., Tarranum, N., & Dzantiev, B. (2018). Highly sensitive immunochromatographic detection of antibiotic ciprofloxacin in milk. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 54(6), 670-676.
- Kent, J., Mitoulas, L., Cregan, M., Ramsay, D., Doherty, D., & Hartmann, P. (2006). Volume and frequency of breastfeedings and fat content of breast milk throughout the day. *Pediatrics*, 117(3), e387-e395.
- Kent, J., Prime, D., & Garbin, C. (2012). Principles for maintaining or increasing breast milk production. *Journal of Obstetric, Gynecologic & Neonatal Nursing*, 41(1), 114-121.
- Lemas, D. J. (2016). Exploring the contribution of maternal antibiotics and breastfeeding to development of the infant microbiome and pediatric obesity. *Seminars in Fetal and Neonatal Medicine*, (σσ. 406-409).
- Leonard, J., Lygo, B., & Procter, G. (2013). *Advanced practical organic chemistry*. CRC press.
- Maqsood, R., Skidmore, P., & Holland, L. (2022). Dynamic Changes in Breast Milk Microbiome in the Early Postpartum Period of Kenyan Women Living with HIV Are Influenced by Antibiotics but Not Antiretrovirals. *Microbiology Spectrum*.
- Mathew, J. (2004). Effect of maternal antibiotics on breast feeding infants. *Postgraduate medical journal*, 80(942), 196-200.
- McMurry, J. (2014). *Organic chemistry with biological applications*. Cengage Learning.
- Morrissey, J. (2018, August 2). *The New York Times*. Ανάκτηση από How to Write a Good College Application Essay: <https://www.nytimes.com/2018/08/02/education/learning/writing-college-application-essay.html?rref=collection%2Fsectioncollection%2Feducation&action=click&contentCollection=education®ion=rank&module=package&version=highlights&contentPlacement=2&pgtype=s>

- Palmeira, P., & Carneiro-Sampaio, M. (2016). Immunology of breast milk. *Revista da Associação Médica Brasileira*, 62, 584-593.
- Pannaraj, P. (2017). Association between breast milk bacterial communities and establishment and development of the infant gut microbiome. *JAMA Pediatr*, σσ. 647–54.
- Pärnänen, K., Karkman, A., Hultman, J., Lyra, C., & Bengtsson-Palme, J. (2018). Maternal gut and breast milk microbiota affect infant gut antibiotic resistome and mobile genetic element. *Nature communications*, 9(1), 1-11.
- Peris-Vicente, J., Peris-Garcia, E., Albiol-Chiva, J., Durgbanshi, A., Ochoa-Aranda, E., Carda-Broch, S., . . . Esteve-Romero, J. (2022). Liquid chromatography, a valuable tool in the determination of antibiotics in biological, food and environmental samples. *In Microchemical Journal*, 177, 107309.
doi:<https://doi.org/10.1016/j.microc.2022.107309>
- Peterson R, C. W. (2013). Glycoconjugates in human milk: protecting infants from disease. *Glycobiology*, σσ. 1425–38.
- Raysyan, A., Galvidis, I., Schneider, R., Eremin, S., & Burkin, M. (2020). Development of a latex particles-based lateral flow immunoassay for group determination of macrolide antibiotics in breast milk. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*.
- Rasyan, A. (2021) Development of immunoassays for the rapid determination of the endocrine disruptor bisphenol A released from polymer materials and products. PhD Dissertation
- Smadi, N., Jammoul, A., & El Darra, N. (2019). Assessment of antibiotic and pesticides residues in breast milk of Syrian refugee lactating mothers. *Toxics*, 7(3), 39.
- Walker, A. (2010). Breast milk as the gold standard for protective nutrients. *The Journal of pediatrics*, 156(2), S3-S7.
- Weiß, F., Van den Berg, B., Planatscher, H., Pynn, C., Joos, T., & Poetz, O. (2014). Catch and measure—mass spectrometry-based immunoassays in biomarker research. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, 1844(5), 927-932.
- Wilson, J., Brown, R., Cherek, D., Dailey, J., Hilman, B., Jobe, P., & Stewart, J. (1980). Drug excretion in human breast milk. *Clinical Pharmacokinetics*, 5(1), 1-66.
- Xiao, X., Hu, S., Lai, X., Peng, J., & Lai, W. (2012). Developmental trend of immunoassays for monitoring hazards in food samples: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 111, 68-88.

Bar-Oz, B., Bulkowstein, M., Benyamini, L., Greenberg, R., Soriano, I., Zimmerman, D., ... Berkovitch, M. (2003). Use of Antibiotic and Analgesic Drugs during Lactation. *Drug Safety*, 26(13), 925–935. doi:10.2165/00002018-200326130-00002

https://resources.perkinelmer.com/lab-solutions/resources/docs/BRO_Dairy-Testing.pdf

<https://www.ringbio.com/solutions/dairy-milk/dairy-milk-home>