ΕΘΝΙΚΟ & ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ

Α΄ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗΣ ΑΝΑΤΟΜΙΚΗΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Η ΧΡΗΣΗ ΑΝΤΙΒΙΩΣΗΣ ΣΕ ΠΑΡΑΓΩΓΙΚΑ ΖΩΑ ΩΣ ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΣ ΔΙΑΤΡΟΦΙΚΗΣ ΕΠΙΒΑΡΥΝΣΗΣ.

ΔΗΜΗΤΡΑ ΚΥΡΙΑΚΙΔΟΥ ΜΑΡΝΕΛΟΥ

Φαρμακοποιός, MSc

ΑΘΗΝΑ 2017

ΕΘΝΙΚΟ & ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ

Α΄ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗΣ ΑΝΑΤΟΜΙΚΗΣ

Η ΧΡΗΣΗ ΑΝΤΙΒΙΩΣΗΣ ΣΕ ΠΑΡΑΓΩΓΙΚΑ ΖΩΑ ΩΣ ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΣ ΔΙΑΤΡΟΦΙΚΗΣ ΕΠΙΒΑΡΥΝΣΗΣ.

ΔΗΜΗΤΡΑ ΚΥΡΙΑΚΙΔΟΥ ΜΑΡΝΕΛΟΥ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή

Δρ. Ν. Καβαντζάς, Καθηγητής, Α΄Εργαστηρίου Παθολογικής Ανατομικής, Ιατρική Σχολή, Εθνικό & Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών (Επιβλέπων)

Δρ. Α. Λάζαρης, Καθηγητής, Α΄Εργαστηρίου Παθολογικής Ανατομικής, Ιατρική Σχολή, Εθνικό & Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Δρ. Ε. Παντερή, Καθηγήτρια, Εργαστήριο Φαρμακευτικής Ανάλυσης, Τομέας Φαρμακευτικής Χημείας, Τμήμα Φαρμακευτικής, Εθνικό & Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

ΑΘΗΝΑ 2017

«Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από την Ιατρική Σχολή του Πανεπιστημίου Αθηνών δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνωμών του συγγραφέα». Σχετικές διατάξεις του άρθρου 50 του Ν.1268/82, σε συνδυασμό με το Ν.5343/32, άρθρο 202 παράγραφος 2 (νομική κατοχύρωση του Ιατρικού Τμήματος).

Στην μνήμη των γονέων μου
Κωνσταντίνου και Αικατερίνης

Στον σύζυγο μου Παναγιώτη και στα
παιδιά μας Γεώργιο και Κωνσταντίνα

ΠΡΟΛΟΓΟΣ – ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Υπηρετώντας ως κτηνιατρικός φαρμακοποιός στις Κτηνιατρικές Υπηρεσίες του Υπουργείου Γεωργίας, Αγροτικής Ανάπτυξης και Περιβάλλοντος της Κυπριακής Δημοκρατίας, από το 2005 μέχρι σήμερα, διαπίστωσα ότι η χρήση κτηνιατρικών φαρμάκων, ειδικότερα αντιμικροβιακών ουσιών σε παραγωγικά ζώα και συγκεκριμένα στους χοίρους, σημειώνει ανοδική πορεία κάθε χρόνο.

Αναλογιζόμενη τους πιθανούς κινδύνους που ενέχει η χρήση των φαρμάκων αυτών για τη Δημόσια Υγεία, ιδιαίτερα λόγω της αυξανόμενης χρήσης, σε σχέση με το ποσοστό των καταλοίπων αντιμικροβιακών ουσιών που περιέχουν τα τρόφιμα ζωικής προέλευσης και συγκεκριμένα το χοιρινό κρέας, έθεσα τους προβληματισμούς μου στους Καθηγητές Δρ. Νικόλαο Καβανζά, Δρ. Αντρέα Λάζαρη της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Αθηνών και στην Καθηγήτρια Δρ. Ειρήνη Παντερή Καθηγήτρια της Φαρμακευτικής Σχολής του Πανεπιστημίου Αθηνών, οι οποίοι και μου εμπιστεύθηκαν την παρούσα Διατριβή.

Σκοπός της διατριβής ήταν η ανάπτυξη μεθόδου εκτίμησης της διατροφικής πρόσληψης καταλοίπων αντιμικροβιακών ουσιών, μέσω του χοιρινού κρέατος, στην Κύπρο. Για τον σκοπό αυτό, χρησιμοποιήθηκαν τα διαχρονικά αποτελέσματα των αναλύσεων αντιμικροβιακών ουσιών, που παρήχθησαν στο Εθνικό Εργαστήριο Αναφοράς Υπολειμμάτων του Γενικού Χημείου του Κράτους, από το 2012 έως το 2017. Δειγματοληπτικά, η έρευνα κάλυψε όλες τις ελεύθερες περιοχές που ελέγχει το Κράτος, στις πέντε επαρχίες (Λευκωσία, Λάρνακα, Αμμόχωστο, Λεμεσό και Πάφο) της Κυπριακής Δημοκρατίας. Στα πλαίσια της διατριβής αυτής, έγινε προσπάθεια αξιολόγησης του κίνδυνου πρόσληψης καταλοίπων κτηνιατρικών φαρμάκων, μέσω του χοιρινού κρέατος, σε ενήλικες άντρες και γυναίκες >20 ετών, παιδιά και έφηβους ηλικίας 6-18 ετών. Η μελέτη αυτή, στηρίχθηκε στα συγκεντρωτικά αποτελέσματα καταλοίπων αντιμικροβιακών ουσιών που ανιχνευθήκαν μετά από δειγματοληψία και χρωματογραφική ανάλυση. Η μεθοδολογία της αξιολόγησης του κινδύνου έκθεσης σε κατάλοιπα κτηνιατρικών φαρμάκων στο κρέας, αναπτύχθηκε συνδυάζοντας δεδομένα διατροφικής κατανάλωσης όπως είναι η επί τοις εκατό (%) αναλογία της Εκτιμώμενης Ημερήσιας Πρόσληψης (Estimated Daily Intake, EDI) σε σχέση με τις τιμές αναφοράς της Αποδεκτής Ημερήσιας Πρόσληψης (Acceptable Daily Intake, ADI) των ανιχνευόμενων ουσιών, με το γεωμετρικό μέσο των συγκεντρώσεων που ανιχνεύθηκαν ανά χρονιά και αντιμικροβιακή ουσία.

Η εκπόνησή της διατριβής αυτής, δεν ήταν αποτέλεσμα μονομερούς εργασίας. Κατά τη διάρκεια της διεκπεραίωσής της, χρειάστηκε η συμβολή πολλών μελών του επιστημονικού, επαγγελματικού και οικογενειακού μου χώρου, στα οποία απευθύνεται το ακόλουθο ευχαριστήριο σημείωμα.

Ευχαριστώ τον επιβλέπων Καθηγητή του Α΄ Εργαστηρίου Παθολογικής Ανατομικής Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Αθηνών, κ. Νικόλαο Καβαντζά, ο οποίος παρείχε αμέριστα τη βοήθειά του σε όλη τη διάρκεια επίβλεψης της Διδακτορικής μου Διατριβής.
Ευχαριστώ τον Καθηγητή Α΄ Εργαστηρίου Παθολογικής Ανατομικής Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Αθηνών, κ. Αντρέα Λάζαρη, για την εμπιστοσύνη που

επέδειξε, τις πολύτιμες συμβουλές και την καθοδήγησή του, αφού από την πρώτη στιγμή αντιλήφθηκε το πρόβλημα της αλόγιστης χρήσης κτηνιατρικών φαρμάκων και με κατεύθυνε στην συγγραφή της παρούσας Διατριβής.

Ευχαριστώ ολόψυχα την Καθηγήτρια του Τομέα Φαρμακευτικής Χημείας, Φαρμακευτικής Σχολής του Πανεπιστημίου Αθηνών, κυρία Ειρήνη Παντερή, γιατί χωρίς τη δική της συμβολή, τόσο στο εργαστηριακό μέρος όσο και στην συγγραφή της παρούσας Διατριβής, δεν θα ήταν δυνατή η διεκπεραίωση του παρόντος έργου. Κορυφαία επιστήμονας, μα πάνω απ' όλα εξαίρετος άνθρωπος, ήταν πάντα διαθέσιμη να συμβάλλει με τις γνώσεις της στην επίλυση κάθε δυσκολίας που παρουσιάστηκε.

Ευχαριστώ το διευθυντή Κτηνιατρικών Υπηρεσιών κ. Χριστόδουλο Πίπη, γιατί χωρίς τη δική του συγκατάθεση δεν θα μπορούσα να έχω πρόσβαση σε σημαντικές πληροφορίες που καταχωρούνται στις βάσεις δεδομένων των Κτηνιατρικών Υπηρεσιών.

Πολύτιμη βοήθεια μου παρείχαν επίσης οι συνάδελφοί κτηνίατροι των Κτηνιατρικών Υπηρεσιών, καθώς και οι υπάλληλοι της Στατιστικής Υπηρεσίας και του επιστημονικού προσωπικού του Εργαστήριου Αναφοράς Υπολειμμάτων Κτηνιατρικών Φαρμάκων, του Γενικού Χημείου του Κράτους.

Ακόμη, θέλω να εκφράσω τις θερμές ευχαριστίες μου στα μέλη της 7 μελούς Εξεταστικής Επιτροπής:

- Δρ. Ν. Καβαντζάς, Καθηγητής, Α΄Εργαστηρίου Παθολογικής Ανατομικής, Ιατρική Σχολή, Εθνικό & Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών (Επιβλέπων)

- Δρ. Α. Λάζαρης, Καθηγητής, Α΄Εργαστηρίου Παθολογικής Ανατομικής, Ιατρική Σχολή, Εθνικό & Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

- Δρ. Ε. Παντερή, Καθηγήτρια, Εργαστήριο Φαρμακευτικής Ανάλυσης, Τομέας Φαρμακευτικής Χημείας, Τμήμα Φαρμακευτικής, Εθνικό & Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

- Δρ. Α. Νόννη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, Α΄Εργαστηρίου Παθολογικής Ανατομικής, Ιατρική Σχολή, Εθνικό & Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

- Δρ. Χ. Γακιοπούλου, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, Α΄Εργαστηρίου Παθολογικής Ανατομικής, Ιατρική Σχολή, Εθνικό & Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

- Δρ. Γ. Αγρογιάννης, Αναπληρωτής Καθηγητής, Α΄Εργαστηρίου Παθολογικής Ανατομικής, Ιατρική Σχολή, Εθνικό & Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

- Δρ. Ε. Θυμαρά, Επίκουρη Καθηγήτρια, Α΄Εργαστηρίου Παθολογικής Ανατομικής, Ιατρική Σχολή, Εθνικό & Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Τέλος, η παρούσα διατριβή δε θα είχε ολοκληρωθεί χωρίς την ουσιαστική βοήθεια, τις πολύτιμες συμβουλές, την εμψύχωση και στήριξη του συζύγου μου Δρ. Παναγιώτη Μαρνέλου τον οποίο και υπερευχαριστώ.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Ι. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ *27*

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1. 27

ΚΤΗΝΙΑΤΡΙΚΑ ΦΑΡΜΑΚΑ ΚΑΙ ΔΗΜΟΣΙΑ ΥΓΕΙΑ

1.1 *ΕΙΣΑΓΩΓΗ …….....* 27

1.2 *ΚΤΗΝΙΑΤΡΙΚΑ ΦΑΡΜΑΚΑ ……...* 30

1.2.1 *Γενικά …….* 30

1.2.2 *Οι κυριότερες κατηγορίες κτηνιατρικών φαρμάκων ……* 30

1.2.3 *Κτηνιατρικά φάρμακα και διασφάλιση της δημόσιας υγείας* 32

1.3 *ΚΡΙΣΙΜΟΙ ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΙ ΓΙΑ ΤΗ ΔΗΜΟΣΙΑ ΥΓΕΙΑ ……...* 34

1.3.1 *ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΚΟΙ ΚΙΝΔΥΝΟΙ ……...* 34

1.3.1.1 *Γονιδιακές μεταλλάξεις …….* 35

1.3.1.2 *Ο δείκτης της τοξικολογικής ουδού ανησυχίας ……* 36

1.3.2 *ΤΟΞΙΚΟΛΟΓΙΚΟΙ ΚΙΝΔΥΝΟΙ ……...* 37

1.3.2.1 *Δυσμενείς επιπτώσεις και σημεία επικινδυνότητας ……* 39

1.3.3 *ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΟΙ ΚΙΝΔΥΝΟΙ …….* 43

1.3.3.1 *Παθογόνοι μικροοργανισμοί και τροφιμογενείς διαταραχές* 43

1.3.3.2 *Οι πρωτεΐνες πράιονς ……....* 46

1.3.4 *ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΚΟΙ ΚΙΝΔΥΝΟΙ …….* 49

1.3.4.1 *Η ανοσοσφαιρίνη IgE αποτελεί καθοριστικό παράγοντα στην εκδήλωση τροφογενών αλλεργιών ……...…….* 50

1.3.4.2 *Η πρωτεωμική ανάλυση ……..……...* 52

1.3.5 *ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΟΙ ΚΙΝΔΥΝΟΙ ……* 53

1.3.5.1 *Εισαγωγή ……..…….* 53

1.3.5.2 *Γενικές αρχές της προσρόφησης ενός φαρμάκου στο έδαφος …….* 54

1.3.5.3 *Πως επηρεάζεται ο άνθρωπος από τη βιοσυσσώρευση των δραστικών ουσιών στο περιβάλλον ……* 56

1.3.5.4 *Η εδραίωση δύο σημαντικών Κατευθυντηρίων Οδηγιών* 57

1.4 *«ΜΙΑ ΚΑΙ ΕΝΙΑΙΑ ΥΓΕΙΑ* - ONE HEALTH» ….……..…… 58

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2. 61
ΤΟ ΦΑΙΝΟΜΕΝΟ ΤΗΣ ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗΣ ΑΝΤΟΧΗΣ

2.1 *ΕΙΣΑΓΩΓΗ ……..* 61

2.2 *ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ ΜΙΑ ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ ……..…..* 64

2.3 *Η ΧΡΗΣΗ ΤΩΝ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΩΝ ΣΤΗΝ ΚΤΗΝΙΑΤΡΙΚΗ ……..* 67

2.4 *ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗ ΑΝΤΟΧΗ ΣΕ ΜΟΡΙΑΚΟ ΕΠΙΠΕΔΟ ……....* 71

2.4.1 *Το βιολογικό φαινόμενο των μηχανισμών δράσης των αντιμικροβιακών ουσιών ……* 71

2.4.2 *Αναστολή της σύνθεσης του κυτταρικού τοιχώματος …….* 72

2.4.3 *Αναστολή της πρωτεϊνικής σύνθεσης των βακτηρίων …….* 73

2.4.4 *Αναστολή της σύνθεσης πυρηνικών οξέων ……..* 74

2.4.5 *Αναστολείς της φυσιολογικής λειτουργίας της κυτταρικής μεμβράνης ……....* 75

2.5 *ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΒΑΣΗ ΤΗΣ ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗΣ ΑΝΤΟΧΗΣ ……..* 75

2.5.1 *Γενετικό υπόβαθρο της αντοχής ……..* 75

2.5.2 *Ενδογενής – Επίκτητη αντοχή ……..* 76

2.5.3 *Τυχαία μετάλλαξη προϋπάρχοντος γονιδίου ……* 76

2.5.4 *Οριζόντια μεταφορά εξωγενούς γενετικού υλικού ……....* 77

2.6 *ΜΟΡΙΑΚΗ ΒΑΣΗ ΤΗΣ ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗΣ ΑΝΤΟΧΗΣ ……..* 78

2.6.1 *Η αντοχή σε μοριακό επίπεδο ……* 78

2.6.1.1 *Πλασμίδια (plasmids) ……* 71

2.6.1.2 *Μεταθετόνια ή Τρανσποζόνια (transposons) ……* 81

2.6.1.3 *Ενσωματόνια ή ιντεγκρόνια (integrons) και κασέτες γονιδίων (gene casettes) ……....* 82

2.6.2 *Μηχανισμοί μικροβιακής αντοχής σε μοριακό επίπεδο …….* 83

2.6.2.1 *Ενζυμική αδρανοποίηση ……..……..* 83

2.6.2.2 *Τροποποίηση των στόχων δράσης των αντιμικροβιακών φαρμάκων …….....* 84

2.6.2.3 *Μειωμένη Ενδοκυτταρική Συσσώρευση των Αντιβιοτικών* 84

2.7 *ΓΕΝΙΚΕΣ ΑΡΧΕΣ ΕΚΤΙΜΗΣΗΣ ΤΗΣ ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑΣ ΣΤΑ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ …….*	85
2.8 *ΤΡΟΦΙΜΟΓΕΝΗ ΒΑΚΤΗΡΙΑ ΚΑΙ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ……..…..*	89
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3.	91
ΑΝΤΙΒΙΟΑΝΤΟΧΗ ΚΑΙ ΔΗΜΟΣΙΑ ΥΓΕΙΑ	
3.1 *ΓΕΝΙΚΑ ……..…*	91
3.1.1 *Τροφιμογενείς διαταραχές της υγείας του ανθρώπου …….…*	92
3.1.2 *Παράγοντες πρόκλησης των τροφιμογενών νοσημάτων …..…..*	94
3.2 *ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΜΕΤΑΔΟΣΗΣ ΤΗΣ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΣΤΟΝ ΑΝΘΡΩΠΟ ……..…*	98
3.2.1 *Η μεταφορά μικροβιακής αντοχής με γενετικά τροποποιημένα τρόφιμα …….……..…….*	98
3.2.2 *Αυξητικοί Παράγοντες ……..……..…..*	99
3.2.3 *Κατάλοιπα ……..……*	100
3.3 *ΚΥΡΙΟΤΕΡΕΣ ΚΑΤΗΓΟΡΙΕΣ ΧΟΡΗΓΗΣΗΣ ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΩΝ ΣΕ ΠΑΡΑΓΩΓΙΚΑ ΖΩΑ – ΧΟΙΡΟΥΣ ……..…*	101
3.3.1 *Γενικά ……..……*	101
3.3.2 *Χρήση αντιμικροβιακών φαρμάκων στους χοίρους …….……*	102
3.3.3 *Ποσότητα των χρησιμοποιούμενων αντιμικροβιακών στα παραγωγικά ζώα ……..…..*	103
3.3.4 *Μετάδοση ανθεκτικών, στα αντιμικροβιακά φάρμακα, τροφιμογενών βακτηρίων στον άνθρωπο μέσω του κρέατος …..…..*	106
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4.	109
ΕΛΕΓΧΟΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ & ΑΡΜΟΔΙΕΣ ΑΡΧΕΣ	
4.1 *Η ΑΝΑΓΚΗ ΓΙΑ ΠΡΟΤΥΠΑ ΑΣΦΑΛΕΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ …….…..*	109
4.2 *Η ΣΗΜΑΣΙΑ ΤΗΣ ΑΣΦΑΛΕΙΑΣ ΤΩΝ ΤΡΟΦΙΜΩΝ …….……..*	110
4.3 *ΕΥΡΩΠΑΪΚΗ ΕΝΩΣΗ ΚΑΙ ΕΛΕΓΧΟΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ …….……*	111
4.3.1 Νομοθετικό Πλαίσιο ……..…	111

4.3.2 Κατάλοιπα κτηνιατρικών φαρμάκων στα τρόφιμα ……..….. 114
4.3.3 Φαρμακούχες Ζωοτροφές ……..….. 114
4.3.4 Σύστημα Έγκαιρης Προειδοποίησης για τα Τρόφιμα και τις Ζωοτροφές (RASFF) …….. 115

***4.4** ΕΥΡΩΠΑΪΚΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ ΚΑΤΑΝΑΛΩΤΩΝ ΚΑΙ ΑΣΦΑΛΕΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ……..…* 117

***4.5** ΤΑ ΣΥΓΧΡΟΝΑ ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ ΑΣΦΑΛΕΙΑΣ ΤΩΝ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ..…* 117
***4.5.1** Πρότυπα ασφάλειας τροφίμων ……* 117
***4.5.2** Ανάλυση κινδύνου (Risk Analysis) της ασφάλειας των τροφίμων ……..……* 119
***4.5.3** Στοιχεία του συστήματος εκτίμησης κινδύνου (Risk assessment) ……..……..* 120

***4.6** ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗ ΤΗΣ ΑΣΦΑΛΕΙΑΣ ΤΩΝ ΤΡΟΦΙΜΩΝ – HACCP ….…* 121
***4.6.1** Ασφάλεια των τροφίμων ζωικής προέλευσης ……..….* 122
***4.6.2** CCPs ενός βιομηχανικού σφαγείου ……...….* 123
***4.6.3** Παθολογοανατομικός έλεγχος και τριχινοσκόπιση ……..…….* 125

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5.
ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΟΥ ΚΙΝΔΥΝΟΥ ΤΗΣ ΔΙΑΤΡΟΦΙΚΗΣ ΠΡΟΣΛΗΨΗΣ ΥΠΟΛΕΙΜΜΑΤΩΝ ΟΥΣΙΩΝ ΣΤΑ ΤΡΟΦΙΜΑ 127

***5.1** ΕΙΣΑΓΩΓΗ ……..…* 127

***5.2** ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΕΠΙΚΙΝΔΥΝΟΤΗΤΑΣ (Hazard Assessment) ……..….* 129
***5.2.1** Συλλογή δεδομένων και αναγνώριση πηγών κινδύνου ….….* 129
***5.2.1.1** Δεδομένα κατανάλωσης τροφίμων ……..……..* 130
***5.2.2** Εκτίμηση της επικινδυνότητας (Hazard Assessment) ……..…* 131
***5.2.2.1** Αναγνώριση της επικινδυνότητας (Hazard Identification)* 132
***5.2.2.2** Χαρακτηρισμός της επικινδυνότητας (Hazard Characterization) ……..……* 133

***5.3** ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ (Toxicity Assessment) ……..……..* 134
***5.3.1** Τοξικολογικές Μελέτες ……..……* 134

5.3.2 *Επιδημιολογικές Μελέτες ……..……...* 136

5.4 *ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΗΣ ΕΚΘΕΣΗΣ (Exposure Assessment) ….……* 137

5.4.1 *Εκτίμηση της διατροφικής έκθεσης σε διάφορες χημικές ουσίες ……..…….* 139

5.4.1.1 *Επίπεδα Μη Παρατηρούμενων Επιδράσεων (No Observed Effect Levels, NOELs) ……..…….* 139

5.4.1.2 *Η Αποδεκτή Ημερήσια Πρόσληψη (Acceptable Daily Intake, ADI) ……..…….* 140

5.4.1.3 *Παράγοντες ασφάλειας/αβεβαιότητας (Safety/Uncertainty Factor) ……* 142

5.4.1.4 *Κτηνιατρικά φάρμακα και Ανώτατα Όρια Καταλοίπων (Maximum Residue Limits, MRLs) ……..…* 143

5.4.2 *Αξιολόγηση της διατροφικής πρόσληψης ….……..…* 144

5.4.2.1 *Εκτίμηση της χρόνιας διατροφικής πρόσληψης ……..…* 145

5.5 *ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΚΙΝΔΥΝΟΥ (Risk Characterization) …...* 145

ΙΙ. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ 147

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6.
ΧΗΜΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΣ ΕΚΤΙΜΗΣΗΣ ΤΗΣ ΕΠΙΚΙΝΔΥΝΟΤΗΤΑΣ ΤΗΣ ΔΙΑΤΡΟΦΙΚΗΣ ΠΡΟΣΛΗΨΗΣ ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΩΝ ΟΥΣΙΩΝ, ΜΕΣΩ ΤΟΥ ΧΟΙΡΙΝΟΥ ΚΡΕΑΤΟΣ, ΤΟΥ ΚΥΠΡΙΑΚΟΥ ΠΛΗΘΥΣΜΟΥ 147

6.1 *ΕΙΣΑΓΩΓΗ ……...* 147

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΠΑΡΟΥΣΑΣ ΜΕΛΕΤΗΣ ……..…… 149

6.2 *ΣΚΟΠΟΣ ΚΑΙ ΑΝΤΙΚΕΙΜΕΝΟ ΤΗΣ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ* 149

6.3 *ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ ……..……* 155

6.4 *ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑ ……..……...* 156

6.5 *ΧΗΜΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ……..……* 158

6.5.1 *Γενικά* ……..…… 158
6.5.2 *Αρχή της Μεθόδου* ……..……... 161
6.5.2.1 *Συσκευές – Όργανα* ……..……... 161
6.5.2.2 *Αντιδραστήρια* ……..…… 162
6.5.2.3 *Πρότυπες Ουσίες* ……..... 162
6.5.2.4 *Χρωματογραφική Ανάλυση των Διερευνώμενων Ουσιών* 162
6.5.2.5 *Όρια Ανίχνευσης και Όρια Ποσοτικής Αποτίμησης* ……..... 171
6.5.2.6 *Όριο Απόφασης (CCα) και Ικανότητα Ανίχνευσης (CCβ)* 172

6.6 *ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΚΙΝΔΥΝΟΥ ΤΗΣ ΔΙΑΤΡΟΦΙΚΗΣ ΠΡΟΣΛΗΨΗΣ ΥΠΟΛΕΙΜΜΑΤΩΝ ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΩΝ ΟΥΣΙΩΝ ΣΤΗΝ ΚΥΠΡΟ, ΜΕΣΩ ΤΗΣ ΚΑΤΑΝΑΛΩΣΗΣ ΧΟΙΡΙΝΟΥ ΚΡΕΑΤΟΣ* …….. 179
6.6.1 *Αποτελέσματα δειγματοληπτικού ελέγχου* ……..... 179
6.6.2 *Συγκριτικά αποτελέσματα δειγματοληψίας* …… 191
6.6.3 *Ο Γεωμετρικός Μέσος ένα σημαντικό εργαλείο χρήσης στον υπολογισμό της Εκτιμώμενης Ημερήσιας Πρόσληψης* ……..……... 193
6.6.4 *Υπολογισμός της Ημερήσιας Κατανάλωσης χοιρινού κρέατος για άντρες και γυναίκες >20 ετών, για παιδιά ηλικίας 6-9 ετών και εφήβους ηλικίας 10-17 ετών, στην Κύπρο* …… 195
6.6.5 *Υπολογισμός της EDI, αντιμικροβιακών καταλοίπων για άντρες και γυναίκες >20 ετών στην Κύπρο, ως ποσοστό (%) της ADI* ……..... 196
6.6.6 *Υπολογισμός της EDI, αντιμικροβιακών καταλοίπων για παιδιά και εφήβους, στην Κύπρο* ……..……..……..… 198
6.6.7 *Υπολογισμός της EDI, αντιμικροβιακών καταλοίπων για παιδιά και εφήβους, ως ποσοστό (%) της ADI και σύγκριση με ενήλικες >18 ετών στην Κύπρο* ..……..…… 201

6.7 *ΣΥΖΗΤΗΣΗ* ……..……..… 205

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7.
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΕΙΣΗΓΗΣΕΙΣ 215

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8.
EXTENDED SUMMARY (ABSTRACTS) 218

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 9. ***ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ***	220
9.1 *ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ ……..……..*	220
9.2 *ΞΕΝΟΓΛΩΣΣΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ ……..……*	224
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 10. ***ΔΗΜΟΣΙΕΥΜΕΝΕΣ ΕΡΓΑΣΙΕΣ***	242

Κατάλογος Διαγραμμάτων

Διάγραμμα 1: Αλυσίδα τροφίμων ……	113
Διάγραμμα 2: Εφαρμογή των αρχών HACCP …….……..	121
Διάγραμμα 3: Ποσοστό εκτροφής Χοίρων ανά Επαρχία, επί του Συνόλου των Χοίρων εκτροφής στην Κύπρο, για την χρονική περίοδο 2012-2017 ……	158
Διάγραμμα 4: Συχνότητα ανίχνευσης καταλοίπων αντιμικροβιακών ουσιών, σε νωπό χοίρειο μυϊκό ιστό, στο σύνολο των θετικών δειγμάτων (ΘΔ), αριθμός θετικών δειγμάτων ΝΘΔ=596 ……..	174

Διάγραμμα 5: Ποσοστό ύποπτων δειγμάτων (ΥΠΔ) με Premi-test, ποσοστό του συνόλου των θετικών δειγμάτων (ΘΔ) σε αντιμικροβιακές ουσίες, ποσοστό των ΘΔ ιδιαίτερα σε SAs (ΘΔ/SAs) με χημική ανάλυση σε χοίρειο μυϊκό ιστό, από το 2012 έως το 2017 …… 177

Διάγραμμα 6: Ποσοστό κατανομής θετικών/μη-συμμορφούμενων δειγμάτων (Θ/ΜΣΔ), που υπερβαίνουν το ΑΟΚ, επί του συνόλου καταλοίπων των θετικών δειγμάτων (ΘΔ). Αριθμός θετικών δειγμάτων ΝΘΔ=596 …… 177

Διάγραμμα 7: Ποσοστιαία χρονική διακύμανση για το σύνολο των θετικών δειγμάτων (ΘΔ) ανά ουσία, με ταυτόχρονη παρουσίαση της ποσοστιαίας διακύμανσης των θετικών συμμορφούμενων (κάτω από το ΑΟΚ) και των θετικών μη συμμορφούμενων δειγμάτων (πάνω από το ΑΟΚ) …… 178

Διάγραμμα 8. EDI ως % της ADI, 6 αντιμικροβιακών καταλοίπων κτηνιατρικής χρήσης που ανιχνεύθηκαν σε νωπό χοιρινό κρέας, για παιδιά, εφήβους και ενήλικες του Κυπριακού πληθυσμού …… 204

Διάγραμμα 9. EDI ως % της ADI, των αντιμικροβιακών καταλοίπων δοξυκυκλίνης, τριμεθοπρίμης και λινκομυκίνης, όπως ανιχνεύθηκαν σε νωπό χοιρινό κρέας, για παιδιά, εφήβους και ενήλικες του Κυπριακού πληθυσμού …….…… 204

Διάγραμμα 10. Παραγωγή σφάγιου (τόνοι) χοιρινού κρέατος, για τα έτη 2004-2017 …….… 214

Κατάλογος Πινάκων

Πίνακας 1: Κατηγορίες κτηνιατρικών φαρμάκων ……..… 30

Πίνακας 2: Κριτήρια αξιολόγησης τοξικότητας και σύστημα βαθμονόμησης Αποδεκτής Ημερήσιας Πρόσληψης Καταλοίπου (Acceptable Daily Intake, ADI) ……..…… 40

Πίνακας 3: Τρόποι μετάδοσης παθογόνων μικροοργανισμών στον άνθρωπο …….. 45

Πίνακας 4: Ομάδες αντιβιοτικών …….. 61

Πίνακας 5: Εξελικτική πορεία της ανακάλυψης και χρήσης αντιμικροβιακών ουσιών για ιατρική και κτηνιατρική χρήση ……. 67

Πίνακας 6: Είδη πρόσθετου γενετικού υλικού στο βακτηριακό κύτταρο 75

Πίνακας 7: Παθογόνοι μικροοργανισμοί αίτια τροφιμογενών διαταραχών ……. 93

Πίνακας 8: Παρασιτικές νόσοι που μεταδίδονται με τα τρόφιμα και το νερό …….. 95

Πίνακας 9: Ποσότητες (τόνοι) και δοσολογία αντιμικροβιακών που πουλήθηκαν στην Ε.Ε. και Ελβετία σε ανθρώπους και ζώα τα έτη 1997 και 1999 ……. 104

Πίνακας 10: Ποσότητες αντιμικροβιακών που πουλήθηκαν στην Ε.Ε συμπεριλαμβανόμενης και της Ελβετίας το 1997 ……. 105

Πίνακας 11: Ποσότητες αντιμικροβιακών (τόνοι) που πουλήθηκαν (για θεραπεία και αύξηση της ανάπτυξης) σε διαφορετικές χώρες-μέλη της Ε.Ε. το 1997 ……. 105

Πίνακας 12: Τιμές αναφοράς διατροφικής έκθεσης σε κατάλοιπα φαρμακολογικώς ενεργών ουσιών, για κτηνιατρική χρήση ……... 141

Πίνακας 13: Ταξινόμηση αντιμικροβιακών ουσιών, που ανιχνεύθηκαν σε χοίρειο μυϊκό ιστό, σε σχέση με τον Κανονισμό 37/2010/ΕΚ Παράρτημα Ι, όσον αφορά τα ΑΟΚ στα τρόφιμα ζωικής προέλευσης …. 150

Πίνακας 14: Ποσοστά του Συνολικού Αριθμού Χοίρων κατά Επαρχία επί του Συνόλου των Χοίρων της Κύπρου ……... 157

Πίνακας 15: Ο μοριακός τύπος και η χημική δομή των διερευνώμενων αντιμικροβιακών ουσιών, κατάλοιπα των οποίων ανιχνεύθηκαν σε δείγματα χοίρειου μυϊκού ιστού ……. 159

Πίνακας 16: Βέλτιστες φασματομετρικές παράμετροι μάζας λειτουργίας σε λειτουργία θετικού ιόντος (ESI) για την ανάλυση 19 κτηνιατρικών αντιμικροβιακών (εκχύλιση Ε1) σε δείγματα χοίρειου μυϊκού ιστού ……. 163

Πίνακας 17: Βέλτιστες φασματομετρικές παράμετροι μάζας σε λειτουργία θετικού ιόντος (ESI) για την ανάλυση 26 αντιμικροβιακών ουσιών (Extraction 2) σε δείγματα χοίρειου μυϊκού ιστού …….. 165

Πίνακας 18: Όρια ανίχνευσης (LOD) και όρια ποσοτικής αποτίμησης (LOQ) των διερευνώμενων ουσιών, σε δείγματα χοίρειου μυϊκού ιστού 171

Πίνακας 19: Όριο απόφασης (CCα) της μεθόδου, ως σημείο αναφοράς της ανίχνευσης των διερευνώμενων ουσιών σε σχέση με το AOK, σε δείγματα χοίρειου μυϊκού ιστού ..……..……..…..……..…..…... 173

Πίνακας 20: Ποσοστό – Συνολικού Αριθμού Δειγμάτων (N), Ύποπτων (με Premi-Test), Συνολικών Θετικών (με LC-MS/MS) και Θετικών Ειδικά Σε SAs (με LC-MS/MS) – από το 2012 έως το 2017, για τον έλεγχο αντιμικροβιακών ουσιών σε δείγματα χοίρειου μυϊκού ιστού στην Κύπρο ..……..……..……..…....……..…… 176

Πίνακας 21: Συγκεντρωτικά αποτελέσματα ($N_{ΘΔ}$=596) καταλοίπων κτηνιατρικών φαρμάκων σε χοίρειο μυϊκό ιστό, για τα έτη 2012 έως 2017, με χρωματογραφική ανάλυση ..……..……..…… 179

Πίνακας 22: Ποσοστό δειγμάτων, που βρέθηκαν θετικά (ΘΔ) σε 13 αντιμικροβιακές ουσίες, από το 2012 έως το 2017, στην Κύπρο …… 191

Πίνακας 23: Ποσοστό θετικών συμμορφούμενων (κάτω από AOK) και θετικών μη-συμμορφούμενων δειγμάτων (πάνω από AOK), από το 2012 έως το 2017 ..……..……..……..…....……..…….. 192

Πίνακας 24: Θετικά δείγματα χοιρινού κρέατος, γεωμετρικός μέσος και εύρος συγκεντρώσεων των διερευνώμενων αντιμικροβιακών ουσιών, ανά ουσία και έτος ..……..……..……..…....……..…… 193

Πίνακας 25: Εκτιμώμενη ημερήσια πρόσληψη (EDI) καταλοίπων αντιμικροβιακών φαρμάκων, μέσω της κατανάλωσης χοιρινού κρέατος στην Κύπρο, ως ποσοστό της αποδεκτής ημερήσιας πρόσληψης (ADI) για άντρες >20 ετών (μέσο σωματικό βάρος 80,9 kg) …… 197

Πίνακας 26: Εκτιμώμενη ημερήσια πρόσληψη (EDI) καταλοίπων αντιμικροβιακών φαρμάκων, μέσω της κατανάλωσης χοιρινού κρέατος στην Κύπρο, ως ποσοστό της αποδεκτής ημερήσιας πρόσληψης (ADI) για γυναίκες >20 ετών (μέσο σωματικό βάρος 64,57 kg) …….. 198

Πίνακας 27: Γεωμετρικός Μέσος, σε κιλά (kg), του βάρους παιδιών ηλικίας 6-9 ετών και έφηβων ηλικίας 6-17 ετών, στην Κύπρο ……..… 199

Πίνακας 28: Τιμές εκτιμώμενης ημερήσιας πρόσληψης (EDI) αντιμικροβιακών ουσιών σε παιδιά και έφηβους γένους αρσενικού, ανά μg / kg σ.β. / ημέρα, στην Κύπρο μεταξύ 2012 και 2017 …… 200

Πίνακας 29: Τιμές εκτιμώμενης ημερήσιας πρόσληψης (EDI) αντιμικροβιακών ουσιών σε παιδιά και έφηβους γένους θηλυκού, ανά μg / kg σ.β. / ημέρα, στην Κύπρο μεταξύ 2012 και 2017 …… 200

Πίνακας 30: Τιμές της εκτιμώμενης ημερήσιας πρόσληψης (EDI) και επί της % ποσοστιαία αναλογία της EDI ως προς την ADI για ενήλικες >18 ετών, παιδιά και εφήβους γένους αρσενικού, χρησιμοποιώντας τον μέγιστο γεωμετρικό μέσο συγκέντρωσης στο σχετικό έτος …….. 202

Πίνακας 31: Τιμές της εκτιμώμενης ημερήσιας πρόσληψης (EDI) και επί της % ποσοστιαία αναλογία της EDI ως προς την ADI για ενήλικες >18 ετών, παιδιά και εφήβους γένους θηλυκού, χρησιμοποιώντας τον μέγιστο γεωμετρικό μέσο συγκέντρωσης στο σχετικό έτος ……. 202

Κατάλογος Εικόνων

Εικόνα 1: Σύγχρονο χοιροστάσιο για χοιρομητέρες …… 28

Εικόνα 2: Πτηνοτροφείο με νεοσσούς …… 28

Εικόνα 3: Παθογόνα βακτηρίδια υπεύθυνα για τροφιμογενείς λοιμώξεις 44

Εικόνα 4: Οι πρωτεΐνες PrP (prions) υπάρχουν τουλάχιστον σε δύο χωροταξικές καταστάσεις με ευδιάκριτες φυσικοχημικές ιδιότητες και η μετατροπή της κανονικής πράιον σε μια πιο ανθεκτική σε πρωτεάσες ισόμορφή, είναι το σημείο κλειδί της παθογένειας των ασθενειών που οφείλονται σε prions …….. 46

Εικόνα 5: Τα λοιμογόνα prions προκαλούν διαφορετικές μορφές μεταδοτικής σπογγώδους εγκεφαλοπάθειας …….. 48

Εικόνα 6: Δεκαετία του ’90, μια μολυσμένη αγελάδα αγωνίζεται να σταθεί όρθια ……. 49

Εικόνα 7: Η δομή της IgE …….…… 52

Εικόνα 8: Η είσοδος των κτηνιατρικών φαρμάκων στο περιβάλλον …… 54

Εικόνα 9: «Μία και Ενιαία Υγεία» - «One Health», σφαιρική αντιμετώπιση της παγκόσμιας υγείας με συμβουλευτικές διεπιστημονικές ομάδες και άξονα την αλληλεπίδραση ……. 59

Εικόνα 10: Ο Σερ A. Fleming στο εργαστήριο του ……. 65

Εικόνα 11: Αναστολή της σύνθεσης του κυτταρικού τοιχώματος (NAG N-ακετυλογλυκοζαμίνη, NAMA N-ακετυλομουραμικό οξύ, ala αλανίνη, glu γλουταμικό οξύ, lys λυσίνη, gly γλυκίνη, mDAP μεσοδιαμινοπιμελικό οξύ) ……..…… 73

Εικόνα 12: Γενετικά καθορισμένα χαρακτηριστικά των μικροοργανισμών: πλασμίδια (resistance plasmids), τρανσποζόνια (transposons), ιντεγκρόνια (integrons), γονιδιακές κασέτες (gene casettes). Επιτρέπουν στα γονίδια να μετακινούνται μέσα στο γονιδίωμα ενός βακτηρίου ή μεταξύ των γονιδιωμάτων διαφορετικών βακτηρίων …… 78

Εικόνα 13: Στα πλασμίδια τα γονίδια αντοχής βρίσκονται στα επίκτητα κομμάτια DNA ……..... 80

Εικόνα 14: Σύμπλεγμα γονιδίων tra. Τα πλασμίδια είναι οχήματα φορείς, πολλών σημαντικών μηχανισμών αντοχής (β-λακταμάσες τροποποιητικά αμινογλυκοσιδών, σύμπλεγμα tra γονιδίων κτλ) ……. 81

Εικόνα 15: Αλληλουχίες ένθεσης (insertion sequence IS) υπεύθυνες για την μετάθεση ...……..…… 81

Εικόνα 16: Τα ιντεγκρόνια είναι συστήματα παγίδευσης γονιδίων αντοχής …… 83

Εικόνα 17: Γκρίζα περιοχή κάτω από την καμπύλη συγκέντρωσης φαρμάκου (AUC) στο πλάσμα του αίματος, σε σχέση με το χρόνο. C_{max} είναι η μέγιστη συγκέντρωση του φαρμάκου στο πλάσμα του αίματος, σε χρόνο t_{max} …… 87

Εικόνα 18: Το αντιβιόγραμμα ……..…… 88

Εικόνα 19: Μολυσματικοί παράγοντες …… 92

Εικόνα 20: Ετικέτα που χρησιμοποιείται για τις κοινοποιήσεις προειδοποίησης ……. 116

Εικόνα 21: Ετικέτα που χρησιμοποιείται για τις κοινοποιήσεις πληροφόρησης ……... 116

Εικόνα 22: Κοινοποιήσεις κατά γεωγραφική περιοχή, από το 1997-2006 …….. 116

Εικόνα 23: Τριχινοσκόπιο …… 126

Εικόνα 24: Η Κυπριακή Δημοκρατία, για διοικητικούς λόγους, είναι διαιρεμένη σε έξι επαρχίες ……. 155

Εικόνα 25: Σφαγείο ερυθρού κρέατος …… 156

Εικόνα 26: Χρωματογραφήματα σουλφαδιαζίνης σε – (Α) πρότυπο δείγμα, (Β) λευκό δείγμα και (Γ) θετικό δείγμα νωπού χοίρειου μυϊκού ιστού σε σουλφαδιαζίνη …… 166

Εικόνα 27: Χρωματογραφήματα σουλφαδιμιδίνης σε – (Α) πρότυπο δείγμα, (Β) λευκό δείγμα και (Γ) θετικό δείγμα νωπού χοίρειου μυϊκού ιστού σε σουλφαδιμιδίνη …… 166

Εικόνα 28: Χρωματογραφήματα σουλφαμεθοξαζόλης σε – (Α) πρότυπο δείγμα, (Β) λευκό δείγμα και (Γ) θετικό δείγμα νωπού χοίρειου μυϊκού ιστού σε σουλφαμεθοξαζόλη …… 167

Εικόνα 29: Χρωματογραφήματα τριμεθοπρίμης σε – (Α) πρότυπο δείγμα, (Β) λευκό δείγμα και (Γ) θετικό δείγμα νωπού χοίρειου μυϊκού ιστού σε τριμεθοπρίμη …… 167

Εικόνα 30: Χρωματογραφήματα λινκομυκίνης σε – (Α) πρότυπο δείγμα, (Β) λευκό δείγμα και (Γ) θετικό δείγμα νωπού χοίρειου μυϊκού ιστού σε λινκομυκίνης …… 168

Εικόνα 31: Χρωματογραφήματα τιλμικοσίνης σε – (Α) πρότυπο δείγμα, (Β) λευκό δείγμα και (Γ) θετικό δείγμα νωπού χοίρειου μυϊκού ιστού σε τιλμικοσίνη ……... 168

Εικόνα 32: Χρωματογραφήματα δοξυκυκλίνης σε – (Α) πρότυπο δείγμα, (Β) λευκό δείγμα και (Γ) θετικό δείγμα νωπού χοίρειου μυϊκού ιστού σε δοξυκυκλίνης …… 169

Εικόνα 33: Χρωματογραφήματα οξυτετρακυκλίνης σε – (Α) πρότυπο δείγμα, (Β) λευκό δείγμα και (Γ) θετικό δείγμα νωπού χοίρειου μυϊκού ιστού σε οξυτετρακυκλίνη …….. 169

Εικόνα 34: Χρωματογραφήματα τετρακυκλίνης σε – (Α) πρότυπο δείγμα, (Β) λευκό δείγμα και (Γ) θετικό δείγμα νωπού χοίρειου μυϊκού ιστού σε τετρακυκλίνη …… 170

Εικόνα 35: Χρωματογραφήματα χλωροτετρακυκλίνης σε – (Α) πρότυπο δείγμα, (Β) λευκό δείγμα και (Γ) θετικό δείγμα νωπού χοίρειου μυϊκού ιστού σε χλωροτετρακυκλίνη …… 170

Συντομογραφίες

ΑΟΚ	Ανώτατο Όριο Καταλοίπων
ΓΔ SANTE	Γενική Διεύθυνση Υγείας και Ασφάλειας των Τροφίμων της Επιτροπής
ΓΤΤ	Γενετικά Τροποποιημένα Τρόφιμα
ΓΧΚ	Γενικό Χημείο του Κράτους
Ε.Ε.	Ευρωπαϊκή Ένωση
ΕΕΤΖΠ	Εργαστήριο Ελέγχου Τροφίμων Ζωικής Προέλευσης
ΕΚΠΕΝ	Ευρωπαϊκό Κέντρο Πρόληψης και Ελέγχου Νόσων
ΕΟΚ	Ευρωπαϊκή Οικονομική Κοινότητα

ΗΠΑ	Ηνωμένες Πολιτείες
ΚΥ	Κτηνιατρικές Υπηρεσίες
ΠΟΥ	Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας
ADI	Acceptable Daily Intake (Αποδεκτή Ημερήσια Πρόσληψη)
ALOP	Appropriate level of protection
AMP	Adenosine monophosphate
AMX	Αμοξικιλλίνη
ANEC	European Association for the Coordination of Consumer Representation in Standardisation
ARfD	Acute Reference Dose (Οξεία Δόση Αναφοράς)
AUC	Area Under the Concentration Curve
BEUC	Bureau Européen des Unions des Consommateurs
BMDL	Benchmark Dose Level
BRC	British Retail Consortium
BSE	Bovine Spongiform Encephalopathy
CCFH	Codex Committee on Food Hygiene
CCPs	Critical Control Points
CPF	Cancer Potency Factors
CTC	Χλωροτετρακυκλίνη
CVMP	Committee for Veterinary Medicinal Products (Επιτροπή για τα Κτηνιατρικά Φαρμακευτικά Προϊόντα)
DHSTMCN	Διυδροστρεπτομυκίνη
DNA	Deoxyribonucleic acid
DXC	Δοξυκυκλίνη
EDI	Estimated Daily Intake (Εκτιμώμενη Ημερήσια Πρόσληψη)
EC	European Commission
ECDC	European Centre for Disease Prevention and Control (Ευρωπαϊκό Κέντρο Πρόληψης Νοσημάτων)
EFSA	European Food Safety Authority (Ευρωπαϊκή Αρχή για την Ασφάλεια των Τροφίμων)
EIA	Environmental Impact Assessment (Μελέτη της Εκτίμησης των Περιβαλλοντικών Επιπτώσεων)

ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
EMA	European Medicines Agency (Ευρωπαϊκός Οργανισμός Φαρμάκων)
EPA	Environmental Protection Agency
ESI	Electrospray Ionization
ESVAC	European Surveillance of Veterinary Antimicrobial Consumption
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations (Διεθνής Οργάνωση Τροφίμων και Γεωργίας)
FARAD	Food Animal Residue Avoidance Databank
FDA	The United States Food and Drug Administration
FEDESA	European Federation of Animal Health Industries
FFQs	Food Frequency Questionnaires
FLMQ	Φλουμεκίνη
FSIS	Food Safety & Inspection Service
FSOs	Food Safety Objectives (Αντικειμενικοί Στόχοι Ασφάλειας Τροφίμων)
FSPS	Food Safety Performance Standards (Προδιαγραφών Ασφάλειας των Τροφίμων)
FSSC	Food Safety Standard Certification
GAP	Good Agriculture Practices (Κανόνες Ορθής Γεωργικής Πρακτικής)
GHPs	Good Hygienic Practices
GL	Guideline
Global G.A.P	Global Good Agriculture Practices
GRMS	Global Red Meat Standard
GMO's	Genetically Modified Organisms
GMPs	Good Manufacturing Practices
GSS	Gerstman, Staüssler και Scheinker
HACCP	Hazard Analysis and Critical Control Points
ICMSF	International Commission on Microbiological Specifications for Foods (Διεθνής Επιτροπή για τις Μικροβιολογικές Προδιαγραφές των Τροφίμων)

IFS	International Food Standard
ISO	International Organization for Standardization
JECFA	The Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives
JMPR	The Joint FAO/WHO Meeting on Pesticide Residues
LD_{50}	Dose Lethal
LNMC	Λινκομυκίνη
LOEL	Lowest Observed Effect Level (Χαμηλότερη Παρατηρούμενης Επίδρασης Δόση)
MBC	Minimum Bacteriocidal Concentration
MDD	Maximum Daily Dose
MIC	Minimum Inhibitory Concentration
MOE	Margin Of Exposure
MOS	Margin Of Safety
MRL	Maximum Residue Level
MRSA	Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*
NOAEL	No Observed Adverse Effect Levels
NRI	Negligible Risk (Ασήμαντος/μηδαμινός κίνδυνος)
OIE	World Organisation for Animal Health (Παγκόσμιος Οργανισμός για την Υγεία των Ζώων)
Omps	Outer membrane proteins
ORF	Open Reading Frame
OTC	Οξυτετρακυκλίνη
PBPs	Penicillin Binding Proteins
PCBs	Polychlorinated biphenyls
PD	Pharmacodynamics
PEC	Predicted Environmental Concentration (Προβλεπόμενη Περιβαλλοντική Συγκέντρωση)
PK	Pharmacokinetics
PNEC	Predicted No Environmental Concentration (Προβλεπόμενη Χωρίς Επιπτώσεις Περιβαλλοντική Συγκέντρωση)
PTWI	Provisional Tolerable Weekly Intake (Προσωρινή Ανεκτή Εβδομαδιαία Πρόσληψη)

QRA	Quantitative Risk Assessment (Ποσοτικοποιημένη Ανάλυση Επικινδυνότητας)
RASFF	Rapid Alert System for Food and Feed
REACH	Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals
RfDs	Reference Doses
RNA	Ribonucleic acid
SDD	Σουλφαδιμιδίνη
SDZ	Σουλφαδιαζίνη
SF	Safety Factor
SMX	Σουλφαμεθοξαζόλη
SPS	The Sanitary and Phytosanitary Measures Agreement
SQF	Safe Quality Food
SSOPs	Sanitation Standard Operating Procedures
TC	Τετρακυκλίνη
TDI	Tolerance Daily Intake (Ανοχή Ημερήσιας Πρόσληψης)
TDS	Total Diet Studies
TLMCN	Τιλμικοσίνη
TMP	Τριμεθοπρίμη
TSE	Transmissible Spongiform Encephalopathy
UF	Uncertainty Factor
VICH	International Cooperation on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Veterinary Medicinal Products (Οργανισμό της Εναρμόνισης των Κτηνιατρικών Φαρμακευτικών Προϊόντων)
WHO	World Health Organization
WTO	World Trade Organization

Ι. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1. ΚΤΗΝΙΑΤΡΙΚΑ ΦΑΡΜΑΚΑ ΚΑΙ ΔΗΜΟΣΙΑ ΥΓΕΙΑ

1.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η ασφάλεια και η υγιεινή των τροφίμων σε όλο το φάσμα της τροφικής αλυσίδας, από το στάδιο της πρωτογενούς παραγωγής μέχρι την συντήρηση και την τελική διάθεση των τροφίμων στον καταναλωτή, διαδραματίζουν θεμελιώδη ρόλο στην υγεία του ανθρώπου. Συχνά, η κατανάλωση τροφίμων, μπορεί να εκθέσει τον καταναλωτή σε διατροφικούς κινδύνους. Ως διατροφικός κίνδυνος, καθορίζεται κάθε βιολογικός, φυσικός ή χημικός παράγοντας ενός τρόφιμου, η κατανάλωση του οποίου μπορεί να έχει δυσμενείς επιπτώσεις στην

υγεία του καταναλωτή [Αρβανιτογιάννης και Τζούρος 2006]. Σήμερα, εκτός των διάφορων σημαντικών χημικών κινδύνων, όπως συντηρητικά, χρωστικές και διοξίνες, υπάρχει και ο κίνδυνος εμφάνισης καταλοίπων κτηνιατρικών φαρμάκων σε τρόφιμα ζωικής προέλευσης, όπου λόγω της εκτεταμένης χρήσης των φαρμάκων στη ζωική παραγωγή, είναι δυνατό, το ίδιο το φάρμακο ή οι μεταβολίτες του, να εμφανισθούν υπολειμματικά σε εδώδιμα ζωικά προϊόντα.

Η ανάπτυξη ανθεκτικότητας των βακτηρίων στα αντιμικροβιακά φάρμακα, είναι ένα πολυσύνθετο θέμα με άμεσο αντίκτυπο στην υγεία των ανθρώπων και ζώων. Τα προβλήματα που προκύπτουν για τη δημόσια υγεία από την υπέρμετρη χορήγηση φαρμάκων στα ζώα, εστιάζονται κυρίως στην ανάπτυξη ανθεκτικών βακτηρίων, στις λοιμώξεις του ανθρώπου που δεν ανταποκρίνονται στην συνηθισμένη θεραπευτική αγωγή με αντιμικροβιακά φάρμακα και στην μετάδοση ανθεκτικών κλώνων βακτηρίων (κινητών γενετικών γονιδιακών στοιχείων) από τα ζώα στον άνθρωπο [Aarestrup και Schwarz 2006]. Η μετάδοση των ανθεκτικών βακτηρίων, γίνεται κυρίως από τις πρωτογενείς πηγές μόλυνσης, όπως είναι το νερό, τα φυτά και τα άγρια ζώα (κυρίως τρωκτικά και πτηνά). Τα άγρια ζώα λειτουργούν ως ξενιστές ανθεκτικών βακτηριδιακών στελεχών, τα οποία αρχικά υιοθετούν από το περιβάλλον και στη συνέχεια μολύνουν, μέσω των εκκρίσεων τους, τις ζωοτροφές των ζώων. Έρευνες αναφέρουν ότι, εντερόκοκκοι ανθεκτικοί στη βανκομυκίνη (*Vancomycin-Resistant Enterococci-VRE*) εντοπίστηκαν σε άγρια τρωκτικά και κατοικίδια ζώα. Επιπλέον, οι δευτερογενείς παράγοντες μόλυνσης από βακτήρια ανθεκτικά στα αντιμικροβιακά φάρμακα, όπως είναι τα απόβλητα εκτροφής των ζώων, τα οικιακά απόβλητα και τα απόβλητα των νοσοκομείων, παίζουν σημαντικό ρόλο στην μόλυνση του νερού και γενικότερα του περιβάλλοντος [Segura κ.ά. 2009].

Τις τελευταίες δεκαετίες, λόγω της εντατικοποίησης των κτηνοτροφικών μονάδων και παράλληλα της αυξημένης χρήσης φαρμάκων, ο κίνδυνος κατανάλωσης ‘μολυσμένων’ προϊόντων, έχει επεκταθεί και στα χορτοφαγικά προϊόντα. Αυτό συμβαίνει γιατί συνήθως τα απόβλητα των ζώων, τα οποία περιέχουν κατάλοιπα δραστικών ουσιών, χρησιμοποιούνται ως λιπάσματα στη γεωργία. Κρίσιμη θεωρείται και η συμβολή της ύπαρξης στο υδάτινο περιβάλλον, αντιμικροβιακών φαρμάκων και βακτηρίων ανθεκτικών σε αυτά, σε σχέση με την μετάδοση της ανθεκτικότητας, φαινόμενο που εδώ και πολύ καιρό αποτελεί αντικείμενο μελέτης των επιστημόνων [Segura κ.ά. 2009]. Η κατάληξη των φαρμάκων στο περιβάλλον είναι αναπόφευκτη, λόγω διείσδυσης των χορηγούμενων φαρμάκων σε αυτό, είτε με το ξέπλυμα των ζώων λόγω βροχής, είτε με την είσοδο τους σε υδατοσυλλογές. Επιπλέον, απόβλητα των ζώων τα οποία περιέχουν υπολείμματα φαρμάκων, πολλές φορές σε υψηλές συγκεντρώσεις, καταλήγουν απευθείας στο έδαφος ή στα επιφανειακά νερά. Αυτό οδηγεί στην άμεση προσρόφηση των δραστικών ουσιών και στην έκθεση, σε ουσίες, οργανισμών μη στόχων που διαβιούν φυσιολογικά στο περιβάλλον

[Halling-Sorenson κ.ά. 1998 και Pope κ.ά. 2009]. Ένας άλλος παράγοντας που ενισχύει την εμφάνιση ανθεκτικότητας στα αντιμικροβιακά φάρμακα, είναι και η μεταφορά *ζώων-φορέων* μεταξύ διαφορετικών παραγωγικών μονάδων ή ακόμη και μεταξύ διαφορετικών κρατών. Ακόμη, η συγκέντρωση μεγάλου αριθμού ζώων σε περιορισμένους και κλειστούς χώρους όπως και η διάθεση σε υποστατικά εκτροφής ζώων, μολυσμένων ζωοτροφών, συντελεί στην μεταφορά βακτηρίων και στην εμφάνιση ανθεκτικότητας στα αντιμικροβιακά φάρμακα.

Εικόνα 1: Σύγχρονο χοιροστάσιο για χοιρομητέρες.

Εικόνα 2: Πτηνοτροφείο με νεοσσούς.

Μια άλλη σημαντική πτυχή του προβλήματος, είναι οι τροφογενείς λοιμώξεις οι οποίες ονομάζονται και τοξιλοιμώξεις. Οι λοιμώξεις αυτές, είναι σύνδρομα γαστρεντερικά που παρατηρούνται μετά την κατανάλωση ενός τρόφιμου, μολυσμένου με παθογόνα μικρόβια (μικροοργανισμούς). Τροφογενείς ζωοανθρωπονόσοι καλούνται νόσοι των ζώων και του ανθρώπου που οφείλονται σε βακτήρια, ιούς, πρωτόζωα και ελμίνθες και μπορούν να μεταδοθούν με την κατανάλωση μολυσμένων τροφίμων [Μαστρονικολή 2007]. Γενικά, βακτήρια ζωικής προέλευσης, ανθεκτικά στα αντιμικροβιακά φάρμακα, μπορούν να μολύνουν τους ανθρώπους με διάφορους τρόπους όπως μέσω της προσωπικής επαφής με τα ζώα (κτηνίατροι, κτηνοτρόφοι, εκδοροσφαγείς), μέσω της επαφής μολυσμένων με βακτήρια υλικών (σάλιο, κόπρανα) και τέλος λόγω της κατανάλωσης μολυσμένων, μέσω αέρα ή νερού, τρόφιμων [Segura κ.ά. 2009]. Ειδικότερα, η μόλυνση του ανθρώπου μέσω της τροφικής αλυσίδας με βακτήρια ανθεκτικά στα αντιμικροβιακά φάρμακα, οφείλεται στην κατανάλωση

βασικών προϊόντων ζωικής παραγωγής, όπως είναι το κρέας, το γάλα και τα αυγά. Σήμερα, η υπέρμετρη κατανάλωση εδώδιμων προϊόντων ζωικής παραγωγής, κυρίως κρέατος, έχει οδηγήσει σε σοβαρές τροφολοιμώξεις από διάφορους παθογόνους μικροοργανισμούς οι οποίοι προέρχονται από τα ζώα, όπως *Escherichia coli O157:H7, Campylobacter jejuni, Salmonella enteritidis* και *Listeria monocytogenes*. Μέσω της τροφικής αλυσίδας οι μικροοργανισμοί αυτοί μεταφέρονται και μπορεί να αποικίσουν ή να μολύνουν τον άνθρωπο αφού τα γονίδια ανθεκτικότητας μεταδίδονται, μέσω των βακτηριδίων των ζώων και κατ΄επέκταση των ζωικών προϊόντων τους, κυρίως στα παθογόνα βακτήρια της εντερικής χλωρίδας του ανθρώπου.

Η Ε.Ε. με στόχο την προστασία της υγείας των καταναλωτών, έχει θεσπίσει ένα ευρύτατο φάσμα μέτρων απαραίτητων για τη βελτίωση των πρότυπων ασφάλειας όλων των ειδών τροφίμων, κατοχυρώνοντας ταυτόχρονα ένα παγκόσμιο διατροφικό κώδικα το '*Codex Alimentarius'*, που στα Λατινικά σημαίνει 'Κώδικας Τροφίμων'. Ο κώδικας αυτός, αφορά μια συλλογή διεθνώς αποδεκτών προτύπων για τα τρόφιμα, στοχεύοντας στην καθοδήγηση και προώθηση της επεξεργασίας, του καθορισμού και της επικύρωσης των όρων και των απαιτήσεων για τα τρόφιμα, μέσα στα πλαίσια ενός κοινού διεπιστημονικού προγράμματος του Οργανισμού Επισιτισμού και Γεωργίας (Food and Agriculture Organization of the United Nations, FAO) και του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας (World Health Organization, WHO) [Τυρπένου, 2002]. Η κεντρική ιδέα πάνω στην οποία βασίστηκε ο κώδικας αυτός είναι πως τα τρόφιμα που διατίθενται στην αγορά είτε για τοπική κατανάλωση είτε για εξαγωγή, πρέπει να είναι καλής ποιότητας, ασφαλή προς βρώση και ελεύθερα από νοσογόνους μικροοργανισμούς που θα μπορούσαν να βλάψουν τα ζώα ή τα φυτά στις χώρες εισαγωγής.

1.2 ΚΤΗΝΙΑΤΡΙΚΑ ΦΑΡΜΑΚΑ

1.2.1 Γενικά

Η χρήση φαρμακευτικών ουσιών στην εκτροφή αγροτικών ζώων, γίνεται με σκοπό τη θεραπεία, την πρόληψη νοσημάτων και τον συγχρονισμό του οίστρου. Εξαιτίας του γεγονότος ότι οι διάφορες ουσίες που χρησιμοποιούνται στις εκτροφές δεν έχουν απαραιτήτως θεραπευτική δράση, συνηθίζεται όλες οι φαρμακολογικά δραστικές ουσίες και τα εμβόλια που χρησιμοποιούνται, είτε σε ζώα συντροφιάς είτε σε παραγωγικά ζώα, να αναφέρονται στην Ευρωπαϊκή Ένωση ως «*κτηνιατρικά φάρμακα»* [Woodward 2008]. Ειδικότερα, σύμφωνα με τις πρόνοιες του Κανονισμού (ΕΕ) 2019/6 του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου της 11ης Δεκεμβρίου 2018 για τα κτηνιατρικά φάρμακα και την κατάργηση της Οδηγίας 2001/82/ΕΚ, κάθε ουσία ή συνδυασμός ουσιών, η οποία χαρακτηρίζεται ως προϊόν με θεραπευτικές ή προληπτικές ιδιότητες

έναντι νόσων των ζώων, ή κάθε ουσία ή συνδυασμός ουσιών η οποία δύναται να χρησιμοποιηθεί ή να χορηγηθεί σε ζώα με στόχο την αποκατάσταση, βελτίωση ή τροποποίηση φυσιολογικών λειτουργιών με την άσκηση φαρμακολογικής, ανοσολογικής ή μεταβολικής δράσης, είτε για λόγους ιατρικής διάγνωσης ή ευθανασίας ζώων, ονομάζεται κτηνιατρικό φάρμακο [Καν. 2019/6].

1.2.2 Οι κυριότερες κατηγορίες κτηνιατρικών φαρμάκων

Τα κτηνιατρικά φάρμακα έχουν γίνει πλέον αναπόσπαστο κομμάτι του ζωικού κεφαλαίου και ανήκουν σε διάφορες κατηγορίες όπως τα: αναισθητικά, ανθελμινθικά, αντιϊσταμινικά, στεροειδή και μη-στεροειδή αντιφλεγμονώδη, αντιβακτηριακά, αντιμικροβιακά, αντιπαρασιτικά, αντισηπτικά, βρογχοδιασταλτικά, διουρητικά, ουσίες συγχρονισμού του οίστρου, προωθητικά φάρμακα της ανάπτυξης, συμπληρώματα διατροφής, καταπραϋντικά, ηρεμιστικά και άλλα. Οι κυριότερες κατηγορίες κτηνιατρικών φαρμάκων που χρησιμοποιούνται ευρέως στη θεραπεία και αρωγή της υγείας των ζώων, περιλαμβάνονται στον Πίνακα 1 [Boxall 2003]. Πολλές από τις ουσίες αυτές, όπως η κυπερμεθρίνη, η διαζινόνη και η οξυτετρακυκλίνη, χρησιμοποιούνται ως παρασιτοκτόνα ή φάρμακα ανθρώπινης χρήσης.

***Εικόνα 1* 1. Κατηγορίες κτηνιατρικών φαρμάκων** [Boxall 2003].

Κατηγορία φαρμάκων	**Θεραπεία / Χρήση**	**Δραστικές Ουσίες**
Αντιμικροβιακά	Θεραπεία και πρόληψη βακτηριακών ασθενειών	Amoxicillin Dihydrostreptomycin Enrofloxacin Lincomycin Oxytetracycline Sulfadiazine Tylosin
Αντιπαρασιτικά (ένδο/έξω-παρασιτοκτόνα)	Θεραπεία και έλεγχος μολύνσεων από γαστρεντερικά παράσιτα και της ηπατικής διστομίασης	Ivermectin Pyrantel Triclabendazole
Κοκκιδιοστατικά και αντιπρωτοζωικά	Πρόληψη της κοκκιδίωσης και της δυσεντερίας των χοίρων	Amprolium Clopidol Dimetridazole Narasin Nicarbazin
Ανθελμινθικά	Δραστικά έναντι μιας ή έναντι όλων των παρασιτικών ομάδων που ανήκουν στους έλμινθες	Albendazole Mebendazole Thiabendazole Fenbendazole Triclabendazole Flubendazole

		Abamectin Diethylcarbamazine Ivermectin Praziquantel
Αντιμυκητιασικά	Θεραπεία μολύνσεων από μύκητες και ζυμομύκητες	Chlorhexidine Griseofulvin Miconazole
Θεραπείες υδατοκαλλιέργειας	Θεραπεία των παρασιτικών ιχθύων και της δοθιήνωσης (*furunculosis*)	Amoxicillin Azamethiphos Cypermethrin Emamectin Florfenicol Hydrogen peroxide Oxolinic acid Oxytetracycline
Ορμόνες	Επαγωγή ωοθηκικού οίστρου, καταστολή οίστρου, συστηματική θεραπεία με προγεστερόνη	Altrenogest Estradiol Ethinyl estradiol Benzoate Methylestosterone Melatonin Progesterone
Αυξητικοί παράγοντες	Αύξηση της πέψη των τροφίμων	Flavophospholipol Monensin Salinomycin
β-αδρενεργικοί αγωνιστές	Βρογχοδιασταλτικά φάρμακα για την αντιμετώπιση βρογχικού άσθματος και χρόνιων αποφρακτικών πνευμονοπαθειών	Epinephrine (adrenaline) Isoproterenol Terbutaline Albuterol (salbutamol) Clenbuterol
Αναισθητικά	Για την αναισθησία των ζώων	Halothane Isoflurane Lidocaine/lignocaine Procaine
Φάρμακα ευθανασίας	Για την ευθανασία των ζώων	Phenobarbitone sodium
Ηρεμιστικά	Χρησιμοποιούνται για να καταπραΰνουν τα ζώα	Phenobarbitone
Μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη	Μη στεροειδή αντιφλεγμονώδης παράγοντες, οι οποίοι αναστέλλουν την παραγωγή προσταγλανδινών	Phenyl butazone
Τυμπανισμός των μηρυκαστικών	Για την θεραπεία του τυμπανισμού, που παρατηρείται κυρίως στα βοοειδή.	Dimethicones Ploxalene

Τα φάρμακα αυτά χορηγούνται στα ζώα, με την τροφή ή το νερό, με ένεση, με εμφυτεύματα, με εμποτισμό, με αλοιφές, από το στόμα, τοπικά, με επίπαση σκόνης και με βώλους ανάλογα με το είδος του ζώου. Οι πιο ενδιαφέρουσες χρήσεις των κτηνιατρικών φαρμάκων, αφορούν τον έλεγχο και την παρεμπόδιση των λοιμώξεων και παρασιτώσεων, τον έλεγχο της παραγωγικής διαδικασίας, με πιο σημαντική, όμως, τη χορήγηση αντιμικροβιακών ουσιών στα ζώα [Tyrpenou 2009].

1.2.3 Κτηνιατρικά φάρμακα και διασφάλιση της δημόσιας υγείας

Τα κτηνιατρικά φάρμακα, δύναται να χρησιμοποιηθούν μετά από συνταγογράφηση εγγεγραμμένου κτηνίατρου για συγκεκριμένη εφαρμογή και για συγκεκριμένο είδος ζώου. Η διαπίστωση της παρουσίας υπολειμμάτων δραστικών ουσιών σε εδώδιμα προϊόντα, είναι άρρηκτα συνδεδεμένη με την ορθή κτηνιατρική πρακτική και κατ΄επέκταση την ορθή χορήγηση κτηνιατρικών φαρμάκων στα ζώα, από τους κτηνοτρόφους. Κοινός στόχος κάθε κτηνίατρου και κτηνοτρόφου, πρέπει να είναι η ευζωία του ζωικού κεφαλαίου και η διασφάλιση της δημόσιας υγείας. Από τα διάφορα κτηνιατρικά φάρμακα που χρησιμοποιούνται στην κτηνοτροφία, ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν οι αντιμικροβιακές ουσίες, οι οποίες χορηγούνται σε θεραπευτικές δόσεις, ατομικά σε κάθε ζώο ή ομαδικά για προληπτικούς λόγους, με την τροφή ή το νερό. Γενικά οι αντιμικροβιακές ουσίες, χρησιμοποιούνται στην κτηνοτροφία για την πρόληψη της διασποράς επιδημικών λοιμώξεων στα ζώα με στόχο τη διασφάλιση της υγείας και της ευζωίας των ζώων, την πρόληψη της μετάδοσης των ζωονόσων από τα ζώα στον άνθρωπο, τη διασφάλιση της ποιότητας των ζωοκομικών προϊόντων και τέλος για την πρόληψη και την καταπολέμηση διαφόρων τροφιμογενών λοιμώξεων στον άνθρωπο [Ungemach 2000]. Κατά κύριο λόγο, οι αντιμικροβιακές ουσίες που χρησιμοποιούνται στα ζώα, ανήκουν στις ίδιες ομάδες αντιμικροβιακών φαρμάκων που χρησιμοποιούνται και στον άνθρωπο [Guardabass και Courvalin 2006]. Ανάλογα με τη σημασία που έχουν για την υγεία του ανθρώπου διακρίνονται σε:

- πολύ μεγάλης σπουδαιότητας όπως δεύτερης γενιάς φθοριοκινολόνες, ριφαμυκίνες, λινκομυκίνη, ερυθρομυκίνη, κεφαλοσπορίνες 3^{ης} και 4^{ης} γενιάς,
- μεγάλης σπουδαιότητας όπως γενταμικίνη, κεφαλοσπορίνες 1^{ης} και 2^{ης} γενιάς,
- μέτριας σπουδαιότητας όπως καναμυκίνη, αμπικιλλίνη, αμοξικιλλίνη και κινολόνες στενού φάσματος,
- μικρής σπουδαιότητας όπως κολιστίνη, πενικιλλίνη G και V και σπεκτινομυκίνη
- πολύ μικρής σπουδαιότητας όπως βακιτρακίνη και πολυμυξίνη.

Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι, για κάθε φαρμακευτική ουσία έχει καθοριστεί συγκεκριμένος χρόνος αναμονής ανάμεσα στη χορήγηση, τη σφαγή και το

άρμεγμα, με σκοπό την αποφυγή παρουσίας καταλοίπων στα εδώδιμα προϊόντα ζωικής παραγωγής. Έχοντας ως δεδομένο ότι, τα εγκεκριμένα κτηνιατρικά φάρμακα χρησιμοποιούνται σύμφωνα με τις εγκεκριμένες οδηγίες χρήσης, καθώς και ότι οι χρόνοι αναμονής τηρούνται από τους κτηνοτρόφους, δεν θα πρέπει να εμφανίζονται κατάλοιπα στα τρόφιμα και ιδιαίτερα σε επίπεδα συγκέντρωσης επικίνδυνα για τον άνθρωπο. Με τον όρο χρόνος αναμονής, ορίζεται ως το αναγκαίο χρονικό διάστημα μεταξύ της τελευταίας χορήγησης του κτηνιατρικού προϊόντος σε ζώα, υπό συνήθεις συνθήκες χρήσης και της παραγωγής τροφίμων από τα εν λόγω ζώα. Ο χρόνος αναμονής καθορίστηκε με σκοπό την προστασία της δημόσιας υγείας, διά της διασφαλίσεως ότι τα τρόφιμα αυτά δεν περιέχουν κατάλοιπα σε ποσότητες που υπερβαίνουν τα καθορισμένα ανώτατα όρια καταλοίπων δραστικών ουσιών [Schwarz και Chaslus-Dancla 2001]. Εντούτοις, λόγο της εκτεταμένης χρήσης των κτηνιατρικών φαρμάκων στη ζωική παραγωγή, είναι δυνατό, το ίδιο το φάρμακο ή οι μεταβολίτες του να παρουσιαστούν υπολειμματικά σε εδώδιμα ζωικά προϊόντα. Οι περιπτώσεις που έχουν καταγραφεί διεθνώς και αφορούν την εκδήλωση κάποιας ασθένειας στον άνθρωπο, η οποία έχει πιστοποιηθεί ότι οφείλεται σε κατανάλωση καταλοίπων κτηνιατρικών φαρμάκων, μέσω της τροφής, είναι ελάχιστες. Παρόλα αυτά, οι συνέπειες της τοξικότητας πολλών κτηνιατρικών φαρμάκων, λόγω καταλοίπων, στον άνθρωπο έχουν μελετηθεί και καταγραφεί [Baynes 1999]. Κατάλοιπα κτηνιατρικών φαρμάκων μπορεί να εμφανιστούν στο κρέας, το γάλα, τα αυγά και το μέλι σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις. Μεμονωμένα περιστατικά παρενεργειών έχουν καταγραφεί, όπως αλλεργικές αντιδράσεις σε ευαισθητοποιημένους καταναλωτές [Botsoglou και Fletouris 2000:269–98], τα οποία όμως δεν σχετίζονται με την ποσότητα κατανάλωσης προϊόντων που μπορεί να περιέχουν κατάλοιπα. Αντιθέτως, σε περιπτώσεις όπου γίνεται υπερβολική χρήση φαρμάκων ή μη συμμόρφωση στην εφαρμογή και διατήρηση των καθορισμένων χρόνων αναμονής, τότε πολύ μεγαλύτερες συγκεντρώσεις υπολειμμάτων μπορεί να εμφανισθούν σε εδώδιμους ιστούς και προϊόντα. Το γεγονός αυτό έχει δυσμενές αντίκτυπο στη δημόσια υγεία, συντείνοντας στην εμφάνιση τοξικολογικών, μικροβιολογικών, φαρμακολογικών και άλλων κινδύνων [Botsoglou και Fletouris 2000:269–98].

1.3 ΚΡΙΣΙΜΟΙ ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΙ ΓΙΑ ΤΗ ΔΗΜΟΣΙΑ ΥΓΕΙΑ

1.3.1 Φαρμακολογικοί κίνδυνοι

Ο καθορισμός των ανώτατων ορίων καταλοίπων και κατ΄επέκταση η αξιολόγηση της ασφάλεια των καταλοίπων στην τροφή, βασίζεται σε αποτελέσματα εργαστηριακών μελετών με πειραματόζωα (*in-vivo*), σε σχέση με *in vitro* και *in-silico* μελέτες, σε ανθρώπινους ιστούς. Η αξιολόγηση αυτή κρίνεται αναγκαία λόγω της χρόνιας έκθεσης των ανθρώπων σε κατάλοιπα, μέσω της τροφής, με σκοπό τον καθορισμό της Αποδεκτής Ημερήσιας Πρόσληψης καταλοίπου (*Acceptable Daily Intake,* ADI). Η αποδεκτή

συγκέντρωση δόσης, η οποία δεν προκαλεί παρενέργειες στην υγεία του καταναλωτή, περιγράφεται στη διεθνή ορολογία ως «NOAEL – *no observed adverse effect level*». Η ADI καθορίζεται από το NOAEL και παρέχει ένα πρότυπο αξίας για την ανθρώπινη υγεία, το «*HBGV – Human Health-Based Guidance Value*», σχετικά με τη χρόνια ή μακροπρόθεσμη έκθεση του ανθρώπου σε κατάλοιπα στα τρόφιμα.

Σε ορισμένες περιπτώσεις, υπάρχει πιθανότητα τα κατάλοιπα αυτά να προκαλέσουν ανεπιθύμητες ενέργειες στον άνθρωπο μετά από ένα μόνο γεύμα. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η οξεία δηλητηρίαση σε κλενβουτερόλη, που παρατηρήθηκε μετά την κατανάλωση αρνίσιου και βοδινού κρέατος ή μοσχαρίσιου ήπατος, στην Ευρώπη [WHO 2016]. Η κλενβουτερόλη είναι βρογχοδιασταλτικό φάρμακο που δρα με εκλεκτική διέγερση των β-2 υποδοχέων. Το περιστατικό της οξείας δηλητηρίασης σε κλενβουτερόλη, συνδέθηκε με τη χορήγηση ενέσιμου κτηνιατρικού φαρμάκου σε παραγωγικά ζώα, λόγο αυξημένης συγκέντρωσης της δραστικής ουσίας τοπικά στο σημείο έγχυσης του ζώου. Σε αυτές τις περιπτώσεις, η κατανάλωση (μεγάλων ποσοτήτων) τροφής υψηλής σε κατάλοιπα, με ένα μόνο γεύμα, μπορεί να προκαλέσει περιστατικά οξείας τοξικότητας στον άνθρωπο. Επομένως, ο δείκτης ADI δεν αποτελεί κατάλληλο δείκτη για τον ποσοτικό προσδιορισμό του επιπέδου πάνω από το οποίο μία μόνο έκθεση (μετά από ένα μόνο γεύμα ή κατά τη διάρκεια μιας ημέρας), μπορεί να προκαλέσει ανεπιθύμητες ενέργειες. Το HBGV παρέχει μια ιδιαίτερη προσέγγιση για την αντιμετώπιση του προβλήματος αυτού, καθορίζοντας την οξεία δόση αναφοράς *ARfD, Acute Reference Dose*, σε βραχυπρόθεσμες περιπτώσεις οξείας τοξικότητας. Τόσο η ADI όσο και ARfD συντείνουν στην προστασία των καταναλωτών από έντονα φαινόμενα τοξικών καταλοίπων στα τρόφιμα [WHO 2016]. Με βάση τα στοιχεία αυτά, πολλές από τις δυσμενείς φαρμακολογικές επιπτώσεις καταλοίπων κτηνιατρικών φαρμάκων στον άνθρωπο έχουν περιοριστεί, με εξαίρεση αυτές της βενζυλοπενικιλλίνης για την οποία δεν έχει καθοριστεί τιμή ADI, ενώ συστήνεται η ημερήσια πρόσληψη πενικιλλίνης από τα τρόφιμα να διατηρείται όσο το δυνατόν χαμηλότερη και πάντοτε κάτω από 30mg της πρόδρομης ουσίας, ανά άτομο (0,5mg/kg) [Cunningham κ.ά. 2010].

Η χορήγηση ενός φαρμάκου είτε άμεσα για θεραπευτικούς λόγους είτε έμμεσα υπό την μορφή καταλοίπων, πέρα από την επιθυμητή φαρμακολογική δράση, μπορεί να οδηγήσει στην εμφάνιση διαφόρων δευτερεύουσων ενεργειών οι οποίες δεν εντάσσονται στα πλαίσια του επιδιωκόμενου βιολογικού αποτελέσματος και γι' αυτό ονομάζονται ανεπιθύμητες ενέργειες ή παρενέργειες. Η ένταση των παρενεργειών καθορίζει την τοξικότητα και την ασφάλεια χορήγησης ενός φαρμάκου, επειδή ακριβώς αντικατοπτρίζει τον κλινικό δείκτη ασφαλείας. Όταν εξετάζεται ένα φαρμακολογικό αποτέλεσμα, καταγράφεται η *διάμεση αποτελεσματική* ή η *διάμεση δραστική δόση* (Median Effective Dose, ED50). Στα πειραματόζωα, είναι δυνατόν να προσδιορισθεί και

η τοξική δόση που θα προκαλέσει το θάνατο στο 50% του πληθυσμού. Η τιμή αυτή ονομάζεται *διάμεση θανατηφόρα δόση* (Median Lethal Dose, LD50). Τόσο η ED50, όσο και η LD50, μπορούν να απεικονισθούν σε λογαριθμική κλίμακα, ως αθροιστική σιγμοειδής καμπύλη. Προκειμένου για ασθενείς, εκτός από την ED50, αξία έχει και η *διάμεση τοξική δόση* (Median Toxic Dose, TD50), η οποία αναφέρεται στην εμφάνιση κάποιας ανεπιθύμητης ενέργειας. Επιπλέον, κατά την μελέτη ενός φαρμάκου σε πειραματόζωα, καθορίζεται και ο πειραματικός δείκτης ασφαλείας, που αντιστοιχεί στο λόγο της LD50 προς την ED50. Για τον άνθρωπο, αντί αυτού έχει χρησιμοποιηθεί ο λόγος της TD50 προς την ED50 (θεραπευτικός δείκτης). Είναι αυτονόητο πως, όσο μεγαλύτερος είναι αυτός ο λόγος, τόσο ασφαλέστερο είναι το φάρμακο. Πρακτικό ενδιαφέρον αποκτά ο θεραπευτικός δείκτης μόνο ως ο λόγος της ελάχιστης τοξικής προς την μέγιστη αποτελεσματική δόση (TD 0,1/ED 99,9). Δηλαδή, πόσο μπορεί να αυξηθεί η δόση χωρίς την πιθανή εμφάνιση τοξικών εκδηλώσεων (θεραπευτικό εύρος ή θεραπευτικό παράθυρο ή κλινικός δείκτης ασφαλείας) [Μαρσέλος Μ.].

1.3.1.1 Γονιδιακές μεταλλάξεις

Μια άλλη σημαντική παράμετρος κρίσιμη για τη δημόσια υγεία, είναι τα κατάλοιπα φαρμάκων που στοχεύουν το DNA. Τα κατάλοιπα αυτά, έχουν τη δυνατότητα ακόμη και σε χαμηλές συγκεντρώσεις να προκαλέσουν άμεσα βλάβη στο DNA οδηγώντας σε μεταλλάξεις και κατ΄επέκταση σε πιθανό καρκίνο. Τέτοιες επιδράσεις, ονομάζονται γονοτοξικές, αφορούν το γενετικό υλικό των κυττάρων και εκδηλώνονται ως μεταλλαξιογένεση, τερατογένεση ή καρκινογένεση. Ο όρος μεταλλαξιογένεση αναφέρεται σε πειραματικά δεδομένα από καλλιέργειες προκαρυωτικών κυττάρων, που υποδηλώνουν ότι ένα φάρμακο ενδέχεται να επηρεάζει επίσης το γονιδίωμα των ευκαρυωτικών κυττάρων. Σε επίπεδο οργανισμού, η μεταλλαξιογόνος δράση μπορεί να οδηγήσει σε καρκινογένεση (πρόκληση νεοπλασματικής εξαλλαγής, σε συγκεκριμένο τύπο ώριμων κυττάρων), ή σε τερατογένεση. Ο όρος τερατογένεση, αφορά την εντοπισμένη αλλοίωση του γενετικού υλικού ή της φυσιολογικής έκφρασής του σε αναπτυσσόμενα εμβρυϊκά κύτταρα, που μπορεί να οδηγήσει σε κάποια μικρή ή μεγάλη ανατομική ανωμαλία. Βασική προϋπόθεση για να είναι κάποιος παράγοντας μεταλλαξιογόνος, καρκινογόνος ή τερατογόνος είναι η ικανότητα να αντιδρά με τις πυρηνικές πρωτεΐνες (ιστόνες, όξινες πρωτεΐνες) ή με τα πυρηνικά οξέα (DNA, RNA). Από άποψη μηχανισμού, οι μεταβολές του γονότυπου μπορούν να συμβούν είτε στο μοριακό επίπεδο του DNA ή στο οργανιδιακό επίπεδο των χρωματοσωμάτων. Σε μοριακό επίπεδο, οι συχνότερες μεταβολές είναι η αλλαγή, η προσθήκη ή η εξάλειψη ενός ζεύγους βάσεων, ενώ σε οργανιδιακό επίπεδο, είναι δυνατό να συμβεί ρήξη χρωματοσωμάτων και λανθασμένος ή ελλιπής ανασυνδυασμός, καθώς και ανισοκατανομή των χρωματοσωμάτων μεταξύ των θυγατρικών κυττάρων [Μαρσέλος].

1.3.1.2 Δείκτης Ουδού Τοξικολογικής Ανησυχίας

Η ιδέα δημιουργίας ενός δείκτη Ουδού Τοξικολογικής Ανησυχίας (*Threshold of Toxicological Concern*, *TTC*) αναπτύχθηκε ώστε να καθορίσει το ελάχιστο αποδεκτό όριο πρόσληψης μιας χημικής ουσίας, που ενέχει αμελητέο κίνδυνο για καρκινογένεση ή για άλλες τοξικές επιδράσεις. Ο καθορισμός του δείκτη TTC βασίζεται σε πολύ συντηρητικές μεθόδους. Προκύπτει από μια απλή γραμμική καμπύλη που αφορά την μείωση από την τιμή της δόσης, του τοξικού παράγοντα που προκαλεί καρκινογένεση με πιθανότητα 50% (TD50) εμφάνισης όγκου, στην δόση εκείνη που δίνει πιθανότητα καρκινογένεσης $1/10^6$, χρησιμοποιώντας τα TD50 δεδομένα από τα πιο ευαίσθητα είδη και για τις πιο ευαίσθητες θέσεις ανάπτυξης κακοήθειας. Κατά την εφαρμογή του TTC για την αξιολόγηση των επιτρεπτών ορίων προϊόντων αποδόμησης φαρμάκων ή φαρμακευτικών παραγώγων, μια τιμή 1,5 μικρογραμμαρίων/ημέρα που αντιστοιχεί σε ένα θεωρητικό κίνδυνο καρκινογένεσης 10^{-5} για το υπόλοιπο της ζωής, θεωρείται αποδεκτό. Ωστόσο, κάποιες δομικές ομάδες ουσιών θεωρούνται τέτοιου υψηλού κινδύνου, που η πρόσληψη τους ακόμα και σε ποσότητες μικρότερες του TTC, θεωρητικά μπορεί να σχετίζεται με σημαντικό κίνδυνο καρκινογένεσης. Αυτή η ομάδα υψηλής μεταλλαξιογόνου δυναμικής, αναφέρεται ως *«cohort of concern»* (ομάδα ανησυχίας) και περιλαμβάνει ουσίες όπως οι αφλατοξίνες, οι νιτροενώσεις και οι αλκυλ-αζωτούχες ενώσεις. Οι στρατηγικές ελέγχου, αναμένεται ότι θα είναι λιγότερο αναπτυγμένες κατά την πρώιμη κλινική φάση ανάπτυξης ενός προϊόντος, καθώς η εμπειρία είναι μικρότερη. Η σχετική Οδηγία για τα αποδεκτά όρια πρόσληψης μεταλλαξιογόνων προϊόντων αποδόμησης, βασίζεται σε καθιερωμένες στρατηγικές εκτίμησης κινδύνου. Ο αποδεκτός κίνδυνος κατά την πρώιμη φάση ανάπτυξης, υπολογίζεται σε θεωρητικό επίπεδο ως η εμφάνιση ενός επιπλέον περιστατικού καρκίνου στο ένα εκατομμύριο. Στα μετέπειτα στάδια ανάπτυξης, καθώς και στα εμπορικά προϊόντα, ως αποδεκτά αυξημένος θεωρείται ο κίνδυνος που υπολογίζεται θεωρητικά ως 1/100,000 περίπου. Αυτός ο αριθμός αντιπροσωπεύει μια μικρή θεωρητική αύξηση κινδύνου, σε σύγκριση με τον κίνδυνο που έχει ο άνθρωπος να εκδηλώσει κάποια μορφή καρκινογένεσης σε κάποια φάση της ζωής του που είναι μεγαλύτερος από το 1/3. Να σημειωθεί ότι τα καθιερωμένα μοντέλα αξιολόγησης του κινδύνου καρκινογένεσης, βασίζονται στην υπόθεση της έκθεσης στο προϊόν καθ' όλη τη διάρκεια της ζωής. Έκθεση στο προϊόν, τόσο κατά τη φάση ανάπτυξης όσο και κατά την εμπορική κυκλοφορία του, για μικρότερη διάρκεια (Less Than Lifetime exposure, LTL), μας επιτρέπει να αποδεχτούμε υψηλότερα επίπεδα πρόσληψης των προϊόντων αποδόμησης διατηρώντας συγκρίσιμο επίπεδο κινδύνου. Η χρησιμοποίηση του αριθμού 1/100,000 ως αριθμητικού δείκτη καρκινικού κινδύνου και η μετάφρασή του σε δόση ασφαλείας (TTC), είναι μια εντόνως υποθετική ιδέα που δεν θα έπρεπε να θεωρείται ρεαλιστική ένδειξη του πραγματικού κινδύνου. Ωστόσο, ο δείκτης TTC μας δίνει μια εκτίμηση των επιπέδων ασφαλούς έκθεσης σε μεταλλαξιογόνες ενώσεις. Παρόλα αυτά, η

υπέρβαση του TTC δεν σημαίνει απαραίτητα ότι σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο για καρκίνο με βάση τις συντηρητικές υποθέσεις που χρησιμοποιούνται για τον καθορισμό του δείκτη αυτού. Στην πραγματικότητα, η πιθανή αύξηση του κινδύνου για καρκίνο είναι πολύ μικρότερη από 1/100,000. Στις περιπτώσεις που μια μεταλλαξιογόνος ένωση δεν εμφανίζει καρκινογόνο δράση στους επίμυες τότε η προβλεπόμενη αύξηση κινδύνου είναι μηδενική. Με βάση όλες τις προηγούμενες υποθέσεις, οποιαδήποτε έκθεση σε ένα προϊόν αποδόμησης που αποδεικνύεται σε κατοπινό στάδιο ως μεταλλαξιογόνο, δεν αυξάνει απαραίτητα και τον κίνδυνο καρκινογένεσης στον πληθυσμό που έχει ήδη εκτεθεί σε αυτό. Πρέπει να γίνει περαιτέρω εκτίμηση κινδύνου για να αποφασιστεί αν θα ληφθούν επιπρόσθετα μέτρα. Όπου διαπιστωθεί δυνητικός κίνδυνος για ένα προϊόν αποδόμησης, πρέπει να ενεργοποιηθεί ο κατάλληλος μηχανισμός κατανόησης και αναλυτικού ελέγχου ώστε να επιβεβαιωθεί ότι το προϊόν αποδόμησης βρίσκεται στα αποδεκτά επίπεδα σε ότι αφορά τον καρκινικό κίνδυνο. Σε περιπτώσεις που το προϊόν αποδόμησης προέρχεται από το μεταβολισμό ενός φαρμάκου, τότε η εκτίμηση κινδύνου που αφορά τη μεταλλαξιογένεση του μεταβολίτη, μπορεί να χαρακτηρίσει το προϊόν [M7 2015].

1.3.2 Τοξικολογικοί κίνδυνοι

Η τοξικότητα ενός φαρμάκου ποικίλει και εκτός της ομάδας στην οποία ανήκει, εξαρτάται από τη δόση, τη διάρκεια έκθεσης, τις συνθήκες θερμοκρασίας και υγρασίας, τον τρόπο εφαρμογής και βέβαια τον τρόπο έκθεσης στο φάρμακο. Στα ευρήματα μιας οξείας τοξικότητας συγκαταλέγονται δηλητηριάσεις, δυσφορία, ερεθισμοί ματιών, δέρματος και αναπνευστικού συστήματος. Το γεγονός ότι ο πιο επικίνδυνος τρόπος έκθεσης σε μία δραστική ουσία είναι μέσω της κατάποσης, καταδεικνύει την σημασία που έχουν για τον καταναλωτή τα ελεύθερα από υπολείμματα ουσιών τρόφιμα.

Οι τοξικολογικές ιδιότητες των δραστικών ουσιών που χρησιμοποιούνται στα κτηνιατρικά φάρμακα, καθορίστηκαν λαμβάνοντας υπόψη κρίσιμους παράγοντες όπως ο δείκτης ADI, διάφορες τοξικολογικές παραμέτρους επικινδυνότητας, το βαθμό βιοσυσσώρευσης και την παρουσία βιολογικά δραστικών μεταβολιτών στους ιστούς. Οι παράγοντες αυτοί μελετήθηκαν με σκοπό να ληφθεί υπόψη η χρόνια τοξικολογική επιβάρυνση στον άνθρωπο, μέσω της τροφικής αλυσίδας, από κατάλοιπα κτηνιατρικών φαρμάκων σε ζωικά προϊόντα, τα οποία μπορεί να ανιχνευθούν σε χαμηλές δόσεις. Οι τοξικολογικές δοκιμές και οι δοκιμές καρκινογένεσης, μεταλλαξιογένεσης, τερατογένεσης που διεξάγονται, έχουν ως κύριο στόχο τον προσδιορισμό ενός επιπέδου δόσης, στον οποίο δεν παρατηρείται καμία δυσμενής επίπτωση σε ζωικούς οργανισμούς [Botsoglou και Fletouris 2000:299–407]. Επιπλέον, η συγκέντρωση NOAEL, σε συνδυασμό με ένα συντελεστή ασφαλείας, μπορεί να καθορίσει μία τιμή ADI, η οποία αντιστοιχεί στην ποσότητα που μπορεί ο άνθρωπος να εκτίθεται ημερησίως για όλη τη διάρκεια της ζωής του, χωρίς την πιθανότητα

εκδήλωσης παρενεργειών [EFSA 2011]. Το μέγεθος αυτού του συντελεστή ασφαλείας είναι 100 και προκύπτει από το γινόμενο δύο άλλων συντελεστών καθένας από τους οποίους ισούται με 10. Ο ένας συντελεστής αφορά το γεγονός ότι οι άνθρωποι θεωρούνται 10 φορές πιο ευαίσθητοι από τα πειραματόζωα και ο άλλος αφορά την πιθανή διαφορά στην ευαισθησία μεταξύ των ανθρώπων. Αφού ορισθεί η ADI, καθορίζεται το Ανώτατο Όριο Καταλοίπου - ΑΟΚ (*Maximum Residue Limit, MRL*), σε κάθε εδώδιμο ιστό και προϊόν ζωικής προέλευσης. Αυτό γίνεται με στόχο την αποφυγή συσσώρευσης καταλοίπων τα οποία μπορεί να υπερβούν την ADI με κίνδυνο τη δημόσια υγεία. Η κατανάλωση ζωικών προϊόντων με επίπεδα συγκέντρωσης καταλοίπων κοντά στα ΑΟΚ, έχει ως αποτέλεσμα την μικρή συγκέντρωση ADI. Αντιθέτως, η συγκέντρωση καταλοίπων στα τρόφιμα, θα πρέπει συνήθως να είναι μεγαλύτερη των καθορισμένων ΑΟΚ για να προσεγγισθεί η τιμή της ADI από τον καταναλωτή [Botsoglou και Fletouris 2000:299–407].

Οι πληροφορίες που είναι αναγκαίες για την αξιολόγηση της ασφάλειας των καταλοίπων, πρέπει να υποβάλλονται σύμφωνα με τις αρχές που καθορίζονται στην Οδηγία 81/852/ΕΟΚ για την προσέγγιση των νομοθεσιών των κρατών μελών σχετικά με τα αναλυτικά, φαρμακοτοξικολογικά και κλινικά πρότυπα και πρωτόκολλα στον τομέα του ελέγχου των κτηνιατρικών φαρμάκων [Οδηγία 81/852/ΕΟΚ], για τους σκοπούς της οποίας εφαρμόζονται οι ακόλουθοι ορισμοί. Ως «*κατάλοιπα κτηνιατρικών φαρμάκων*», ορίζονται όλες οι φαρμακολογικώς ενεργές ουσίες, είτε πρόκειται για ενεργά συστατικά, είτε για έκδοχα, είτε για προϊόντα αποικοδόμησης, καθώς και τα προϊόντα μεταβολισμού τους που παραμένουν στα τρόφιμα που λαμβάνονται από ζώα, στα οποία χορηγήθηκε το εν λόγω κτηνιατρικό φάρμακο. Ως «*ανώτατο όριο καταλοίπων*» (Maximum Residue Limit, MRL) ορίζεται η μέγιστη συγκέντρωση καταλοίπων που προκύπτει από τη χρήση κτηνιατρικού φαρμάκου (εκφραζόμενη σε mg/kg ή σε μg/kg, με βάση το βάρος του νωπού προϊόντος), η οποία μπορεί να θεωρείται ως νομίμως επιτρεπτή από την Κοινότητα ή να αναγνωρίζεται ως αποδεκτή εντός ή επί τρόφιμου. Το εν λόγω όριο βασίζεται στον τύπο και την ποσότητα καταλοίπων που θεωρείται ότι δε συνεπάγονται τοξικολογικό κίνδυνο για την υγεία του ανθρώπου, όπως εκφράζονται με την αποδεκτή ημερήσια δόση, ή σε προσωρινή αποδεκτή ημερήσια δόση, που χρησιμοποιεί πρόσθετο παράγοντα ασφαλείας. Το όριο αυτό λαμβάνει επίσης υπόψη άλλους κινδύνους για τη δημόσια υγεία, καθώς και την τεχνολογία τροφίμων και επίσης μπορεί να μειώνεται, ώστε να συμβιβάζεται με την ορθή πρακτική κατά τη χρήση κτηνιατρικών φαρμάκων και στο βαθμό που υφίστανται πρακτικές αναλυτικές μέθοδοι.

1.3.2.1 Δυσμενείς επιπτώσεις και σημεία επικινδυνότητας

Έρευνες τοξικολογικού ενδιαφέροντος έδειξαν ότι οι δυσμενείς επιπτώσεις των φαρμακευτικών ουσιών κτηνιατρικής χρήσης, αξιολογούνται κυρίως βάση οκτώ

σημείων επικινδυνότητας, τα οποία είναι ιδιαίτερα σημαντικά και παρουσιάζονται πιο κάτω (Πίνακας 2). Τα αποτελέσματα τέτοιων δοκιμών δημοσιεύονται συνήθως στο ευρύ κοινό, από διεθνείς οργανισμούς όπως ο Ευρωπαϊκός Οργανισμός Φαρμάκων (*European Medicines Agency, EMA*), το Διεθνές Πρόγραμμα Σχετικά με τη Χημική Ασφάλεια (*International Programme on Chemical Safety*), το TOXNET (*Toxicology Data Netwok*) και το FDA (*Food and Drug Administrations Center for Veterinary Medicine*), δίνοντας ιδιαίτερη έμφαση στις χρόνιες επιπτώσεις στον άνθρωπο, όπως είναι η καρκινογένεση και η μεταλλαξιογένεση.

Στην έρευνα που συνέταξε τον Πίνακα 2, χρησιμοποιήθηκε μια γενική προσέγγιση ως προς την κατηγοριοποίηση των γνωστών δραστικών ουσιών που χρησιμοποιούνται σε κτηνιατρικά φάρμακα, με αντίστοιχες βαθμολογίες, οι οποίες αποδόθηκαν στις ουσίες οι οποίες παρουσιάζουν ιδιαίτερα τοξικολογικά αποτελέσματα. Όσον αφορά την καρκινογένεση και μεταλλαξιογένεση, η κατηγορία «*Αποδεδειγμένο*», χρησιμοποιήθηκε μόνο στην περίπτωση όπου ένα δραστικό συστατικό έχει ήδη κατηγοριοποιηθεί ως καρκινογόνο ή μεταλλαξιογόνο, από έγκυρες πηγές, όπως το *The International Agency for Research on Cancer* (IARC) [Capleton κ.ά. 2006].

Πίνακας 2: Κριτήρια αξιολόγησης τοξικότητας και σύστημα βαθμονόμησης Αποδεκτής Ημερήσιας Πρόσληψης Καταλοίπου (Acceptable Daily Intake, ADI) [Capleton κ.ά. 2006].

Τοξικολογικά κριτήρια	Συγκέντρωση	Βαθμο-λογία	Επεξήγηση
ADI	< 0,0001 mg/kg/ημέρα	20	Η ADI προσδιορίζεται με μέγιστη βαθμολογία το 20, όπως γενικά προκύπτει με βάση την χρόνια έκθεση, σε χαμηλά επίπεδα δραστικής ουσίας, παρέχοντας έτσι μια ένδειξη του βαθμού κινδύνου του γενικού πληθυσμού.
	<0,001 mg/kg/ημέρα	16	
	< 0,01 mg/kg/ημέρα	12	
	< 0,1 mg/kg/ημέρα	8	
	> 0,1 mg/kg/ημέρα	4	
Σημεία τοξικολογικού ενδιαφέροντος			
Καρκινογένεση	Μη καρκινογόνο	0	Οι δραστικές ουσίες οι οποίες ταξινομούνται, από έγκυρη πηγή, ως καρκινογόνες βαθμολογήθηκαν με 5 ως μέγιστη βαθμολογία, ενώ αυτές με κάποιες ενδείξεις καρκινογένεσης
	Αποδεδειγμένο	5	

Μεταλλαξιο-γένεση	Υπάρχει υποψία	4	βαθμολογήθηκαν με 4 και τέλος αυτές για τις οποίες δεν υπάρχουν πληροφορίες σχετικά με ενδείξεις πιθανής καρκινογένεσης βαθμολογήθηκαν με 2.
	Άγνωστο	2	
	Μη μεταλλαξιογόνο	0	Όταν οι δραστικές ουσίες ταξινομούνται, από έγκυρη πηγή ως μεταλλαξιογόνες, βαθμολογούνται με 5 ως μέγιστη βαθμολογία, ενώ ουσίες με κάποιες ενδείξεις μεταλλαξιογένεσης βαθμολογήθηκαν με 4 και ουσίες χωρίς πληροφορίες σχετικά με ενδείξεις πιθανής μεταλλαξιογένεσης βαθμολογήθηκαν με 2.
	Αποδεδειγμένο	5	
	Υπάρχει υποψία	4	
	Άγνωστο	2	
Αναπαραγωγική τοξικότητα	Μη αναπαραγωγική τοξικότητα	0	Δραστικές ουσίες με σαφείς ενδείξεις αναπαραγωγικής τοξικότητας βαθμολογήθηκαν με 5, άλλες με κάποιες ενδείξεις αναπαραγωγικής τοξικότητας βαθμολογήθηκαν με 4 και ουσίες χωρίς πληροφορίες σχετικά με ενδείξεις πιθανής αναπαραγωγικής τοξικότητας βαθμολογήθηκαν με 2.
	Αποδεδειγμένο	5	
	Υπάρχει υποψία	4	
	Άγνωστο	2	
Νευροτοξικό-τητα	Απόδειξη	3	Οι δραστικές ουσίες που παρουσιάζουν ενδείξεις νευροτοξικότητας βαθμολογήθηκαν με 3.
	Μη απόδειξη	0	
Ανοσοτοξικό-τητα	Απόδειξη	3	Οι δραστικές ουσίες που παρουσιάζουν ενδείξεις ανοσοτοξικότητας βαθμολογήθηκαν με 3.
	Μη απόδειξη	0	
Ενδοκρινική τοξικότητα	Απόδειξη	3	Οι δραστικές ουσίες που παρουσιάζουν ενδείξεις
	Μη απόδειξη	0	

			ενδοκρινικής τοξικότητας βαθμολογήθηκαν με 3.
Μικροβιολογικά αποτελέσματα	Απόδειξη Μη απόδειξη	3 0	Οι δραστικές ουσίες που παρουσιάζουν παρενέργειες σε βακτηρίδια του εντέρου, βαθμολογήθηκαν με 3.
Γενική τοξικότητα	Απόδειξη Μη απόδειξη	3 0	Οι δραστικές ουσίες που παρουσιάζουν ενδείξεις άλλων μορφών τοξικότητας (π.χ. νεφρική τοξικότητα) βαθμολογήθηκαν με 3.
Βιολογικός χρόνος ημιζωής	Δεν υπάρχουν δεδομένα <7 ημέρες 8–28 ημέρες >28 ημέρες	1 0 2 5	Οι δραστικές ουσίες που παρουσιάζουν μεγάλες περιόδους ημιζωής, θεωρείται ότι έχουν μεγαλύτερο δυνητικά κίνδυνο από εκείνες που αποβάλλονται σχετικά γρήγορα.
Μεταβολική δραστηριότητα	Δεν υπάρχουν δεδομένα ≤ πρόδρομη ουσία > πρόδρομη ουσία	1 0 2	Όπου υπάρχει ένδειξη ότι ο(οι) μεταβολίτης(ες) έχει(ουν) μεγαλύτερη βιολογική δραστικότητα από την(ις) πρόδρομη(ες) ουσία(ες), βαθμολογήθηκε(αν) με 2.

Το δυναμικό βιοσυσσώρευσης κάθε δραστικής ουσίας, αξιολογείται με βάση το χρόνο ημίσειας ζωής του. Ουσίες με μεγαλύτερο χρόνος ημιζωής και μακρόχρονη έκθεση στον άνθρωπο, έχουν μεγαλύτερο τοξικολογικό κίνδυνο λόγω μεγαλύτερης πιθανότητας βιοσυσσώρευσης στους ιστούς και παίρνουν υψηλότερη βαθμολογία, από ουσίες με μικρότερο χρόνο ημιζωής. Βιοσυσσώρευση, είναι το φαινόμενο κατά το οποίο η συγκέντρωση μη μεταβολιζόμενων χημικών ουσιών αυξάνεται στους ιστούς των οργανισμών. Πάνω από ένα κρίσιμο όριο συγκέντρωσης, οι ουσίες αυτές γίνονται τοξικές. Το φαινόμενο έχει πολύ μεγάλη σημασία για τον άνθρωπο, καθώς αυτός βρίσκεται στην κορυφή της τροφικής αλυσίδας. Επιπλέον, σημαντικό ρόλο παίζει και η βιολογική δραστηριότητα διαφόρων μεταβολιτών των δραστικών ουσιών, επομένως οι μεταβολίτες που εμφανίζουν μεγαλύτερη βιολογική δραστηριότητα από την πρόδρομη ουσία, παίρνουν υψηλότερη βαθμολογία. Παρόλα αυτά, η μεταβολική δραστηριότητα των δραστικών ουσιών παίζει μικρό ρόλο στη συνολική βαθμολογία του επιπέδου τοξικότητας, όπως και όσον αφορά το

μέγεθος σημαντικότητας των παραγόντων τοξικολογικού ενδιαφέροντος, που απαρτίζουν τον Πίνακα 2 [Capleton κ.ά. 2006].

Τις τελευταίες δεκαετίες, έχουν επιτευχθεί τεράστιες εξελίξεις αναπτύσσοντας πληθώρα νέων τεχνολογιών σε σχέση με την παρασκευή και χρήση φαρμάκων, χρωστικών, παρασιτοκτόνων και γενικά διαφόρων χημικών ουσιών. Πολλές από τις οποίες, χρησιμοποιούνται απευθείας στις βιοχημικές διαδικασίες, φέρνοντας έτσι τον άνθρωπο άμεσα ή έμμεσα σε μεγαλύτερη επαφή με τις ουσίες αυτές. Η έκθεση του ανθρώπου στις χημικές ουσίες, πέρα από την πρόσληψη υπολειμμάτων μέσω της τροφής, μπορεί να γίνει και μέσω εισπνοής ή δερματικής απορρόφησης. Η τοξικότητα, δεν εξαρτάται μόνο από την έκθεση του ανθρώπου σε δραστικές ουσίες, αλλά και από την πραγματική δόση του τοξικού παράγοντα και της συγκέντρωσης που πραγματικά απορροφήθηκε. Ακόμη, πολλές χημικές ουσίες, έχουν επίπεδο ανοχής κάτω από το οποίο δεν μπορεί να διαπιστωθεί η τοξικότητα τους. Τέλος, ο παράγοντας ηλικία παίζει σημαντικό ρόλο στο μέγεθος της τοξικής απόκρισης που μπορεί να έχει μια δραστική ουσία σε ένα οργανισμό. Τα παιδιά, σε σχέση με τους ενήλικες, ανήκουν στις ευαίσθητες ομάδες αυξημένης τοξικολογικής επικινδυνότητας και επειδή αναπτύσσονται ταχέως, προσλαμβάνουν μεγαλύτερες ποσότητες τροφής επομένως και περισσότερους ρύπους [Τυρπένου 2002].

1.3.3 Μικροβιολογικοί κίνδυνοι

Ο υγειονομικός έλεγχος των τροφίμων ζωικής παραγωγής, πρέπει να εφαρμόζεται απαραιτήτως σ' όλα τα στάδια της παραγωγής συμπεριλαμβανομένων και της σφαγής, της άμελξης και της αλιείας, πριν την τελική διάθεση στον καταναλωτή. Περαιτέρω, οι έλεγχοι αυτοί πρέπει να προσαρμόζονται και να αναβαθμίζονται με βάση τις νέες συνθήκες που προκύπτουν από τις κοινοτικές νομοθεσίες για την ασφάλεια των τροφίμων. Οι παθογόνοι μικροοργανισμοί που προέρχονται από τα ζώα και μεταφέρονται στον άνθρωπο μέσω της τροφής, έχουν ως αποτέλεσμα την ανάπτυξη διαφόρων τροφιμογενών διαταραχών. Σήμερα, οι διαταραχές αυτές έχουν περιοριστεί με εντατικούς ελέγχους, των αρμόδιων φορέων, τόσο της υγείας των ζώων όσο και της ποιότητας των προϊόντων παραγωγής, με συνεχή ενημέρωση του καταναλωτικού κοινού και εκπαίδευση του κτηνοτροφικού κόσμου και γενικά των παραγωγών τροφίμων.

Τις τελευταίες δεκαετίες, ενδεχομένως λόγω της παγκοσμιοποίησης και της εξάπλωσης πολλαπλών βιολογικών κινδύνων, με την παρουσία παθογόνων μικροοργανισμών στα τρόφιμα, κυρίως σε επίπεδο πρωτογενούς παραγωγής, έχουν καθιερωθεί διάφορα επιδημιολογικά προγράμματα εκτίμησης του μεγέθους επικινδυνότητας. Σκοπός των προγραμμάτων αυτών είναι, η συστηματική παρακολούθηση και καταγραφή υφιστάμενων αλλά και πρωτοεμφανιζόμενων ζωονόσων και ζωονοτικών παραγόντων, με στόχο την

ασφάλεια των τροφίμων ζωικής παραγωγής και τη θωράκιση της δημόσιας υγείας. Η Ευρωπαϊκή Αρχή για την Ασφάλεια των Τροφίμων (EFSA), ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας (WHO), ο Παγκόσμιος Οργανισμός για την Υγεία των Ζώων (OIE), το Ευρωπαϊκό Κέντρο Πρόληψης Νοσημάτων (ECDC) και ο Ευρωπαϊκός Οργανισμός Φαρμάκων (EMA), λαμβάνοντας υπόψη τις σύγχρονες απαιτήσεις των ευρωπαίων καταναλωτών, έχουν υιοθετήσει μια κοινή πολιτική διεπιστημονικής συνεργασίας, με σκοπό την άμεση συμβολή στην θέσπιση κανονισμών, οδηγιών και αποφάσεων της Ευρωπαϊκής Επιτροπής, για τα κράτη-μέλη. Παράλληλα, εντείνονται οι προσπάθειες ανταλλαγής στοχευμένων πληροφοριών και με άλλους εμπλεκόμενους φορείς, με στόχο την αξιολόγηση ετήσιων αποτελεσμάτων σχετικά με την επιτήρηση των ζωονόσων και την καταγραφή των διαφόρων τροφολοιμώξεων που παρατηρούνται στους ανθρώπους.

1.3.3.1 Παθογόνοι μικροοργανισμοί και τροφιμογενείς διαταραχές

Γενικά, οι τροφιμογενείς διαταραχές διακρίνονται σε τροφικές λοιμώξεις και σε τροφικές τοξινώσεις. Οι τροφικές λοιμώξεις οφείλονται σε παθογόνους μικροοργανισμούς που αποικίζουν τον εντερικό σωλήνα, πολλαπλασιάζονται και όταν φθάσουν σε επίπεδα μολυσματικής δόσης προσβάλλουν τον οργανισμό. Τα συμπτώματα μιας τροφολοίμωξης, οφείλονται είτε σε υψηλές συγκεντρώσεις τοξικών ενώσεων (μεταβολιτών), είτε σε μεταβολή της σύστασης της φυσιολογικής μικροχλωρίδας του εντέρου, είτε σε δομικές μεταβολές του επιθηλίου του εντέρου. Οι μικροοργανισμοί μπορεί να είναι βακτηρίδια, ιοί και μύκητες, με σημαντικότερα παραδείγματα βακτηριδίων την *Salmonella* και το *Campylobacter*. Αντιθέτως, οι τροφικές τοξινώσεις οφείλονται στην τοξίνη μικροοργανισμών, η οποία αναπτύσσεται στα εδώδιμα προϊόντα ή στον γαστρεντερικό σωλήνα του ανθρώπου. Χαρακτηριστικά παραδείγματα αποτελούν η τροφική τοξίνωση, λόγο πρόσληψης της τοξίνης του βακτηρίου *Staphylococcus aureus*, το οποίο αναπτύσσεται στα τρόφιμα και η κατανάλωση τοξινών που υπάρχουν σε φυσικά τρόφιμα όπως είναι τα τοξικά μανιτάρια και τα τοξικά φυτά [Γενηγιώργης 2004]. Οι παράγοντες που προκαλούν τις τροφιμογενείς διαταραχές διαχωρίζονται σε τρεις κατηγορίες: φυσικούς, χημικούς και βιολογικούς. Ως φυσικοί παράγοντες καθορίζονται οποιαδήποτε ξένα σωματίδια (π.χ. τεμάχια από την συσκευασία του τρόφιμου, μεταλλικά θραύσματα και ρινίσματα, γυαλί, πέτρες, πλαστικά και έντομα) τα οποία μπορεί να εντοπιστούν στα τρόφιμα. Οι φυσικοί παράγοντες έχουν μικρές δυσμενείς επιπτώσεις και δεν θέτουν σε κίνδυνο την υγεία των καταναλωτών. Ως χημικοί παράγοντες, χαρακτηρίζονται ουσίες που χρησιμοποιούνται κατά την παρασκευή ή την επεξεργασία των τροφίμων, όπως συντηρητικά, χρωστικές, φυσικές ή συνθετικές βιταμίνες και φυσικές ή συνθετικές αρωματικές και γλυκαντικές ουσίες. Επιπλέον, ως χημικοί παράγοντες χαρακτηρίζονται και τα καθαριστικά χώρου, παρασιτοκτόνα, λιπάσματα, φάρμακα και ορμόνες. Οι διοξίνες είναι χημικοί παράγοντες που εντοπίζονται στα τρόφιμα και είναι

ιδιαίτερα επικίνδυνες για την υγεία του ανθρώπου [Βάσσος 2004]. Στην κατηγορία των διοξινών περιλαμβάνονται διάφορες τοξίνες όπως αφλατοξίνες, ωχρατοξίνες, ζεαραλανόνη και κατάλοιπα βαρέων μετάλλων (μόλυβδος, υδράργυρος, κάδμιο, αρσενικό) [Beckalski 2003]. Οι βιολογικοί παράγοντες αποτελούν την τρίτη κατηγορία των παραγόντων που προκαλούν την εμφάνιση τροφιμογενών διαταραχών και οφείλονται στην παρουσία παθογόνων μικροοργανισμών στα τρόφιμα. Οι μικροοργανισμοί αυτοί διαχωρίζονται σε ιούς, παράσιτα ή μύκητες και βακτηρίδια, εκ των οποίων τα τελευταία ευθύνονται κυρίως για την πρόκληση τροφιμογενών διαταραχών. Ενδεικτικά αναφέρονται τα είδη των βακτηριδίων *Salmonella, Shigella, Campylobacter jejuni και Escherichia coli* [EFSA 2006].

Εικόνα 3: Παθογόνα βακτηρίδια υπεύθυνα για τροφιμογενείς λοιμώξεις.

Οι παθογόνοι μικροοργανισμοί που μπορούν να μεταδοθούν μέσω των προϊόντων ζωικής παραγωγής στον άνθρωπο, περιλαμβάνονται στον Πίνακα 3 [Todd 2003]:

Πίνακας 3: Τρόποι μετάδοσης παθογόνων μικροοργανισμών στον άνθρωπο [Todd 2003].

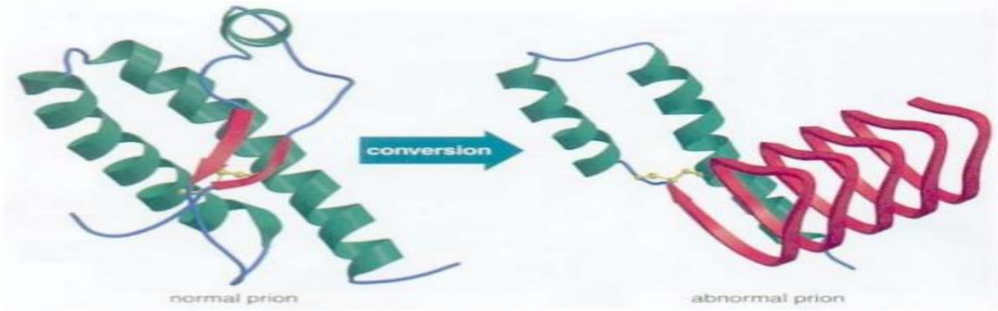
Μετάδοση παθογόνων μικροοργανισμών, από το κρέας των ζώων στον άνθρωπο –			
Βακτήρια	**Ιοί**	**Παράσιτα**	**Πρωτόζωα**
Bacillus anthracis	*Ιός της λύσσας*	*Trichinella ssp.*	*Sarcocystis spp.*
Brucella spp.	*Ιοί γρίπης*	*Echinococcus granulosus*	*Toxoplasma gondii*
Campylobacter jejuni	*Rota virus (διάρροιες μικρών μηρυκαστικών)*	*Taenia saginata*	
Salmonella spp.	*Arbo virus (Κρωτονογενής εγκεφαλοπάθεια)*	*Taenia solium*	
Escherichia coli O157:H7			
Fransilella tularensis			
Leptospira spp.			

Mycobacterium spp.
Closdridium tetani
Erysipelothrix insidiosa
Μετάδοση παθογόνων μικροοργανισμών, από το γάλα των ζώων στον άνθρωπο –
Βρουκέλλωση (*Brucella spp.*)
Φυματίωση (*Mycobacterium spp.*)
Σαλμονέλες (*Salmonella spp.*)
Λιστερίωση (*Listeria monocytogenes*)
Εντεροπαθογόνα στελέχη της *Escherichia coli*
Στρεπτόκοκκοι (*Streptococcus pyogenes*)
Σταφυλόκοκκοι (*Staphylococcus aureus*)
Μετάδοση παθογόνων μικροοργανισμών, από το κρέας ή τα αυγά των πουλερικών στον άνθρωπο –
Salmonella spp.
Campylobacter jejuni
Escherichia coli O157:H7
Mycobacterium spp.
Erysipelothrix insidiosa
Clamydia psitaci
Clostridium botilinum

1.3.3.2 Οι πρωτεΐνες πράιονς

Τέλος, αξίζει να αναφερθούμε στις πρωτεΐνες πράιονς, «*proteinaceus infectious particles, prions*». Τα πράιονς είναι πρωτεΐνες οι οποίες βρίσκονται κυρίως στο νευρικό σύστημα και που στη φυσιολογική τους κατάσταση επιτελούν σημαντικές λειτουργίες. Τα λοιμογόνα πράιονς είναι ανώμαλες μορφές πρωτεϊνικών πράιονς, τα οποία αναπαράγονται μέσα στον ξενιστή μετατρέποντας τις φυσιολογικές πρωτεΐνες του ιδίου τύπου ώστε να αποκτήσουν την ανώμαλη δομή. Αυτό έχει την επίδραση του 'ντόμινο', με αποτέλεσμα ένας μικρός αριθμός πρωτεϊνικών πράιονς να επηρεάζει πολλές φυσιολογικές πρωτεΐνες και να οδηγήσει τελικά σε ασθένεια [The European journal for Science Teachers 2010]. Τα λοιμογόνα πράιονς, ελεύθερα από DNA ή RNA γενετικό υλικό, αποτελούν το βασικό αιτιολογικό παράγοντα μιας ομάδας θανατηφόρων νευροεκφυλιστικών νόσων τόσο στον άνθρωπο όσο και στα ζώα. Συγκεκριμένα, τα πράιονς προκαλούν διαφορετικές μορφές μεταδοτικής σπογγώδους εγκεφαλοπάθειας (*Transmissible Spongiform Encephalopathy, TSE*) του κεντρικού νευρικού συστήματος, με χαρακτηριστικές παθολογοανατομικές αλλοιώσεις και σταδιακά χαρακτηριστική σπογγώδη εκφύλιση του εγκεφάλου [Prusiner και Hsia 1994]. Τη θεωρία αυτή υποστήριξε

πρώτος ο Dr. Stanley Prusiner, η οποία και του χάρισε το βραβείο Nobel το 1997, θεμελιώνοντας έτσι στην επιστημονική κοινότητα το εύρημα ότι οι σπογγώδεις εγκεφαλοπάθειες οφείλονται σε μη συμβατικούς λοιμώδεις παράγοντες που αναπαράγονται χωρίς την μεσολάβηση DNA ή RNA.

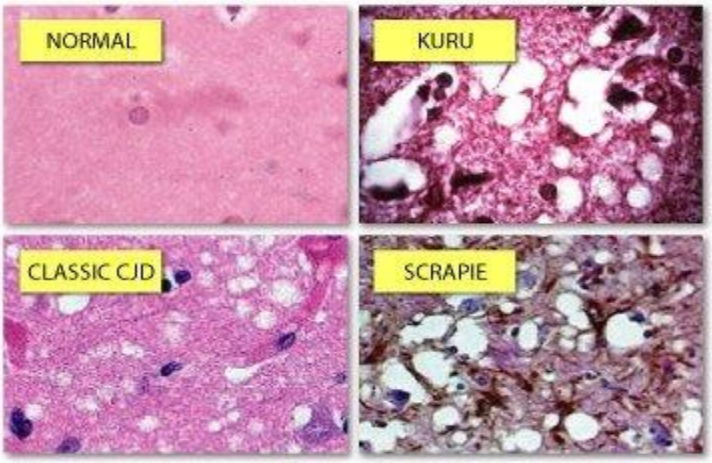


Εικόνα 4: Οι πρωτεΐνες PrP (*prions*) υπάρχουν τουλάχιστον σε δύο χωροταξικές καταστάσεις με ευδιάκριτες φυσικοχημικές ιδιότητες και η μετατροπή της κανονικής πράιον σε μια πιο ανθεκτική σε πρωτεάσες ισομορφή, είναι το σημείο κλειδί της παθογένειας των ασθενειών που οφείλονται σε prions.

Τα πράιονς δεν εμφανίζουν αντιφλεγμονώδη δράση και δεν διεγείρουν το ανοσοποιητικό σύστημα. Είναι ιδιαίτερα ανθεκτικά στην έκθεση τους σε φυσικοχημικούς και περιβαλλοντικούς παράγοντες, ο χρόνος επώασης τους μπορεί να πάρει χρόνια, ενώ η προϊούσα επιδείνωση της υγείας του ασθενούς επιφέρει τον θάνατο σε διάστημα 5 έως 15 μηνών από την εκδήλωση της νόσου [Prusiner και Hsia 1994].

Οι χαρακτηριστικές μεταδοτικές και γενετικά νευροεκφυλιστικές ασθένειες που συνδέονται με τις πρωτεΐνες αυτές στα ζώα, είναι η τρομώδης νόσος των αιγοπροβάτων (ασθένεια "σκράπη") και η σπογγώδης εγκεφαλοπάθεια στα βοοειδή (*Bovine Spongiform Encephalopathy, BSE*) ή αλλιώς γνωστή και ως ασθένεια των "τρελών αγελάδων". Αντίστοιχα στον άνθρωπο, οι ασθένειες της σπογγώδους εγκεφαλοπάθειας ονομάστηκαν *Creutzfeldt-Jakob* και *Gerstmann-Straussler-Scheinker* [Prusiner 1991]. Ήταν το 1920, όταν δύο Γερμανοί επιστήμονες οι *Creutzfeldt* και *Jakob*, εκ των οποίων η ασθένεια πήρε και το όνομα τους, θα περιέγραφαν για πρώτη φορά στον άνθρωπο πέντε περιστατικά μιας σποραδικά εμφανιζόμενης ταχέως εξελισσόμενης άνοιας. Στην συνέχεια μεταξύ του 1928 και 1936, περιγράφηκε από τους *Gerstman, Staüssler* και *Scheinker* (GSS), μια κληρονομική βραδέως εξελισσόμενη πάθηση που χαρακτηριζόταν κυρίως από παρεγκεφαλιδική σημειολογία (αδυναμία κυρίως στάσης και βάδισης) [Johnson και Gibbs 2004, Budka 1995]. Αργότερα το 1957 στη Νέα Γουινέα, ο Αμερικανός επιστήμονας Gajdusek, μελέτησε το έθιμο του κανιβαλισμού των νεκρών, της φυλής Fore και παρατήρησε ότι ειδικά οι γυναίκες της φυλής οι οποίες έτρωγαν τον εγκέφαλο των νεκρών, σε αντίθεση με τους άντρες που έτρωγαν τη σάρκα, παρουσίαζαν

τη θανατηφόρο νόσο Kuru. Η νόσος Kuru, μια κλινική εκδήλωση που χαρακτηρίζεται κυρίως με αστάθεια, αταξία και πλήρη αποδυνάμωση του νευρικού και μυϊκού συστήματος, αποτέλεσε την πρώτη μορφή σπογγώδους εγκεφαλοπάθειας αποσαφηνίζοντας έτσι τον μηχανισμό μετάδοσης των τοξικών αυτών πρωτεϊνών, στον άνθρωπο [Gajdusek κ.ά. 1957]. Στην πορεία ακολούθησε η περιγραφή κι άλλων ανάλογων παθήσεων, όπως η θανατηφόρος οικογενής αϋπνία (*Fatal Familiar Insomnia*), η προϊούσα οικογενής υποφλοιώδης γλοίωση (*Familiar Progressive Subcortical Gliosis*) και πρόσφατα η νέα μετεξέλιξη της νόσου *Creutzfeldt-Jakob (nvCJD*) [Johnson και Gibbs 2004, Budka 1995].



Εικόνα 5: Τα λοιμογόνα prions προκαλούν διαφορετικές μορφές μεταδοτικής σπογγώδους εγκεφαλοπάθειας.

Είναι πλέον βέβαιο ότι η μετάδοση των πρωτεϊνούχων λοιμογόνων σωματιδίων, στα ζώα, γίνεται μέσω της τροφικής αλυσίδας με κρεατοστεάλευρα που χρησιμοποιούνται στις ζωοτροφές. Επιπλέον, υπάρχουν επιστημονικά ευρήματα ότι τα prions μεταδίδονται και από την μητέρα του ζώου στους απογόνους της. Μικροσκοπική εξέταση του εγκέφαλου του ζώου, αποκαλύπτει χαρακτηριστική σπογγιόμορφη αλλοίωση του ιστού, που είναι και το κύριο διαγνωστικό στοιχείο της ασθένειας. Αν και δεν είναι ακόμα γνωστός ο ακριβής τρόπος διάχυσης του μολυσματικού παράγοντα μέσα στο σώμα του ζώου που νοσεί, από τις έρευνες που έχουν γίνει μέχρι σήμερα φαίνεται ότι το μόλυσμα υπάρχει στο κεντρικό νευρικό σύστημα το οποίο θεωρείται για το λόγο αυτό ως υλικό υψηλού κινδύνου (μυαλό, νωτιαίος μυελός, μάτια κ.λπ.) για τη μετάδοση της ασθένειας. Αντιθέτως, δεν φαίνεται να υπάρχει στο κρέας (μυϊκός ιστός) και στο γάλα, αφού πειράματα μετάδοσης της ασθένειας, από τέτοια υλικά, σε ποντίκια ήταν αρνητικά [Prusiner 1991]. Η πρώτη απόπειρα σύνδεσης της σπογγώδους εγκεφαλοπάθειας των βοοειδών με τη νόσο *Creutzfeldt-Jakob*, έγινε το 1988. Από το 1989 και μετά, η ασθένεια θεωρείται ότι μπορεί να μεταδοθεί στον άνθρωπο με την κατανάλωση κρέατος μολυσμένων ζώων και το 1996 η Βρετανική κυβέρνηση ανακοίνωσε επίσημα ότι η νόσος των τρελών αγελάδων μπορεί να μεταβιβαστεί από τα βοοειδή στον άνθρωπο.

Εικόνα 6: Δεκαετία του ’90, μια μολυσμένη αγελάδα αγωνίζεται να σταθεί όρθια.

1.3.4 Ανοσολογικοί κίνδυνοι

Οι αλλεργικές αντιδράσεις, που μπορεί να εκδηλωθούν στον άνθρωπο μετά τη χορήγηση φαρμακευτικών ουσιών και ιδιαίτερα αντιμικροβιακών φαρμάκων, χαρακτηρίζονται ως παρενέργειες και αποτελούν ένα είδος ανεπιθύμητης ενέργειας στη δημιουργία των οποίων ενέχονται ανοσολογικοί (αμυντικοί) μηχανισμοί. Κλινικά, οι φαρμακευτικές αλλεργικές αντιδράσεις χαρακτηρίζονται από ένα ευρύ φάσμα αντιδράσεων, με εμφανείς εκδηλώσεις στον άνθρωπο, όπως δερματικό εξάνθημα ήπιας μορφής, αλλά και αγγειοοίδημα, αναφυλαξία, σοβαρές αλλεργικές αντιδράσεις επικίνδυνες για τη ζωή του ανθρώπου [Dewdney κ.ά. 1991]. Η παρουσία καταλοίπων κτηνιατρικών φαρμάκων στο κρέας και σε άλλα τρόφιμα, ενδέχεται να προκαλεί αντιδράσεις υπερευαισθησίας, σε μικρό αριθμό ατόμων. Στη διεθνή βιβλιογραφία εντοπίζονται πολύ λίγες καλά τεκμηριωμένες περιπτώσεις ανθρώπων με αντιδράσεις υπερευαισθησίας σε φάρμακα ζωικής χρήσης, ωστόσο η επιστημονική τεκμηρίωση τέτοιων ευρημάτων κρίνεται αναγκαία. Η χρήση φαρμακούχων ζωοτροφών είναι ζωτικής σημασίας για τη βιομηχανία της κτηνοτροφίας. Αναπόφευκτα, η χρήση κτηνιατρικών αντιβιοτικών και συνθετικών ουσιών ως αυξητικών παραγόντων, υπό μορφή φαρμακούχων προμιγμάτων για την παρασκευή φαρμακούχων ζωοτροφών, μεταβάλλει τις φυσιολογικές διατροφικές συνήθειες των ζώων αυξάνοντας την πιθανότητα συσσώρευσης καταλοίπων στα ζώα (κρέας, γάλα και αυγά), ενισχύοντας έτσι την εμφάνιση τροφογενών αλλεργιών.

Ως αντιβιοτικοί αυξητικοί παράγοντες, μπορούν να χαρακτηριστούν οποιαδήποτε φάρμακα παρεμποδίζουν ή αναστέλλουν τη βακτηριδιακή ανάπτυξη, χορηγούμενα σε υπό-θεραπευτικές δοσολογίες. Η χρήση των

αντιβιοτικών, ως αυξητικών παραγόντων, έχει αυξηθεί με την εντατικοποίηση της κτηνοτροφικής παραγωγής και ιχθυοτροφίας, ως συνέπεια της αυξημένης ζήτησης των καταναλωτών και της εξέλιξης της βιομηχανίας τροφίμων στην μετατροπή των φυσικών πόρων του ζωικού κεφαλαίου, σε εδώδιμα προϊόντα ζωικής παραγωγής. Δυστυχώς σήμερα η χρήση αντιβιοτικών, ως αυξητικών παραγόντων, θεωρείται δεδομένη και λειτουργεί πλέον ταυτόχρονα με την έννοια της προληπτικής θεραπείας. Ως εκ τούτου, αυξάνεται η πιθανότητα ανίχνευσης καταλοίπων και διαφόρων κινδύνων όπως η εμφάνιση τροφογενών αλλεργιών. Επιπλέον, η φυσική περιβάλλουσα αντίσταση στα αντιμικροβιακά φάρμακα κάμπτεται, ενισχύοντας με τον τρόπο αυτό τους κίνδυνους που ελλοχεύουν για τη δημόσια υγεία.

Πολλές φαρμακευτικές ουσίες έχουν τη δυνατότητα πρόκλησης ανοσο-αλλεργικών αντιδράσεων, εντούτοις οι αντιμικροβιακές ουσίες είναι αυτές που βρίσκονται στην κορυφή της πυραμίδας επικινδυνότητας των ουσιών, που δύνανται να προκαλέσουν αλλεργίες. Έτσι, στις σημαντικότερες ουσίες αντιμικροβιακής χρήσης με αλλεργιογόνο δράση, συγκαταλέγονται οι β-λακτάμες (πενικιλλίνες, κεφαλοσπορίνες και οι νεότερες β-λακτάμες) και σε μικρότερο βαθμό τα μακρολίδια, οι τετρακυκλίνες, οι σουλφοναμίδες και κάποιες αμινογλυκοσίδες [Dewdney κ.ά. 1991]. Όπως έχει προαναφερθεί, οι επιβεβαιωμένες περιπτώσεις αλλεργίας από υπολείμματα κτηνιατρικών φαρμάκων στα τρόφιμα, είναι σπάνιες αν και οι ανεπιθύμητες αντιδράσεις στα αντιβιοτικά έχουν συνδεθεί με αντιδράσεις υπερευαισθησίας όπως είναι η χρόνια κνίδωση. Επιπλέον, πέρα των περιπτώσεων αλλεργίας, υπολείμματα χλωραμφαινικόλης στα τρόφιμα έχουν ενοχοποιηθεί για την εκδήλωση μιας σπάνιας και θανατηφόρου μορφής δυσκρασίας του αίματος, σε άτομα με υπερευαισθησία στην χλωραμφενικόλη [Barton 2000].

1.3.4.1 Η ανοσοσφαιρίνη IgE αποτελεί καθοριστικό παράγοντα στην εκδήλωση τροφογενών αλλεργιών

Γενικά, οι τροφικές αλλεργίες είναι ένα αυξανόμενο πρόβλημα παγκοσμίως και επί του παρόντος επηρεάζουν το 2-4% των ενηλίκων και το 5-8% των μικρών παιδιών. Η ανοσοσφαιρίνη IgE αποτελεί καθοριστικό παράγοντα και στην εκδήλωση τροφογενών αλλεργιών. Κατά συνέπεια, έχουν καταβληθεί μεγάλες προσπάθειες σχετικά με την ανάπτυξη δοκιμών ανίχνευσης, της παρουσίας μορίων IgE, των υποδοχέων δέσμευσης τους στο αλλεργιογόνο, της λειτουργικότητάς τους, προκειμένου να αξιολογηθούν όλες οι πληροφορίες σχετικά με την τροφική αλλεργία του ασθενούς. Ο απώτερος στόχος των δοκιμών αυτών, είναι να αναπτυχθούν εξειδικευμένα πρωτόκολλα δοκιμών ανάλυσης, ικανά να διακρίνουν μια ασυμπτωματική ευαισθητοποίηση του οργανισμού, από μια κλινικά σχετιζόμενη τροφογενή αλλεργία, μεταξύ διαφορετικών αλλεργικών φαινοτύπων, με ακριβή και αξιόπιστο τρόπο [Henrike CH κ.ά. 2016]. Η ανοσοσφαιρίνη Ε (IgE), είναι ένας από τους πέντε ισότυπους

της ανθρώπινης ανοσοσφαιρίνης. Ταυτοποιήθηκε το 1966 από τους ερευνητές Otto Prausnitz και Heinz Küstner, ως αντιδρασίνη (*reagin*). Αρχικά η IgE είχε συσχετιστεί με αλλεργικές αντιδράσεις τύπου I, όμως πρόσφατες έρευνες καταδεικνύουν την συμμετοχή της σε πολλές φλεγμονώδεις καταστάσεις. Ο τύπος I, είναι γνωστός ως αντίδραση άμεσης υπερευαισθησίας, γιατί μπορεί να συμβεί μέσα σε λίγα δευτερόλεπτα από την έκθεση στο αλλεργιογόνο και συνδέεται με αλλεργικό άσθμα, αλλεργική ρινίτιδα, τροφική αλλεργία και ορισμένους τύπους χρόνιας κνίδωσης και ατοπικής δερματίτιδας. Η IgE παίζει επίσης καθοριστικό ρόλο σε αλλεργικές καταστάσεις, όπως, αναφυλακτικές αντιδράσεις σε ορισμένα φάρμακα, τσιμπήματα μέλισσας και σε παρασκευάσματα αντιγόνων που χρησιμοποιούνται σε ειδική ανοσοθεραπεία απευαισθητοποίησης [Γερμενής 2000, Gould 2003].

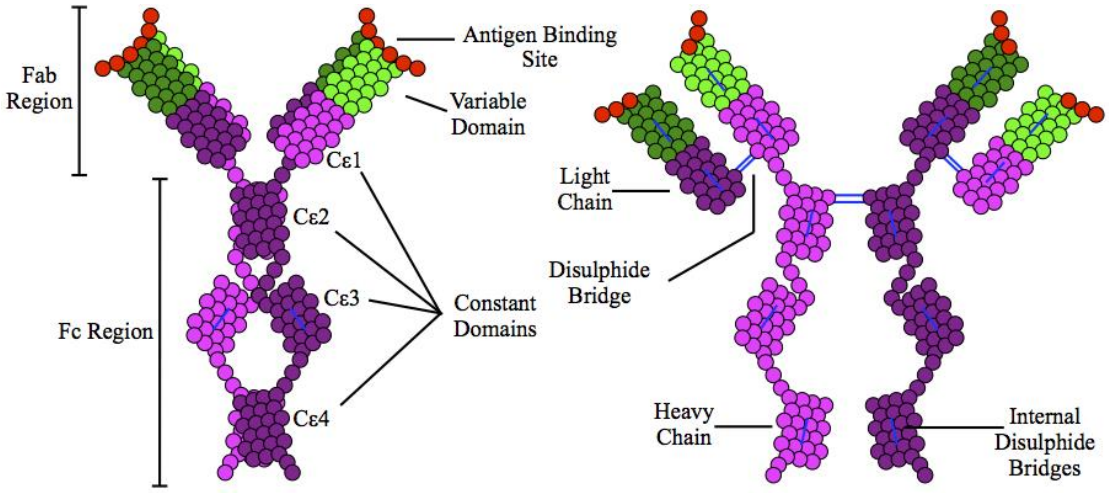
Γενικά οι ανοσοσφαιρίνες συγκαταλέγονται στην κατηγορία των αντισωμάτων, παράγονται από τα Β κύτταρα και αποτελούνται από δύο βαριές και δύο ελαφριές αλυσίδες [βαριές άλυσοι (H), και ελαφρύς άλυσοι (L)]. Η περιοχή Fc της IgE (που αποτελείται από τις H αλυσίδες), δεσμεύεται μέσω του Fc-υποδοχέα υψηλής συγγένειας (FceRI) σε άλλα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος, ενώ η περιοχή Fab (μερικώς H και μεταβλητά L αλυσίδες) δεσμεύεται στο αντιγόνο. Σε περίπτωση αλλεργίας σ΄ένα αλλεργιογόνο, η θέση πρόσδεσης της Fab περιοχής ονομάζεται παράτοπος (antigen-binding site or paratope) και δεσμεύεται σε ένα συγκεκριμένο τμήμα του αντιγόνου, το οποίο ονομάζεται επίτοπος (αντιγονικός καθοριστής). Όταν ένα αλλεργιογόνο αλληλοσυνδέει δύο δεσμευμένα με FceRI IgE αντισώματα, είτε σε μαστοκύτταρα είτε σε βασεόφιλα, αυτά τα κύτταρα “τελεστές” αποκοκκιώνονται και απελευθερώνουν μεσολαβητές όπως ισταμίνη, προσταγλανδίνες και λευκοτριένια, προκαλώντας έτσι αλλεργικά συμπτώματα [Henrike κ.ά. 2016]. Η ταχεία απελευθέρωση μεσολαβητών οδηγεί σε αύξηση της αγγειακής διαπερατότητας, αγγειοδιαστολή, σύσπαση των λείων μυϊκών ινών των βρόγχων και των σπλάχνων και τοπική φλεγμονή. Η υπερευαισθησία, εμφανίζεται σε ελάχιστο χρόνο από τη στιγμή του αντιγονικού ερεθισμού. Η IgE υπάρχει φυσιολογικά στον ορό του ανθρώπου σε πολύ μικρές ποσότητες συγκριτικά με τις άλλες ανοσοσφαιρίνες. Οι συγκεντρώσεις της ολικής IgE ορού ποικίλλει ηλικιακά από 2 έως και 100 IU/ml, συνήθως. Η παραγωγή της IgE, φυσιολογικά, υπόκειται σε ισχυρούς ρυθμιστικούς μηχανισμούς, με αποτέλεσμα την ελάχιστη συγκέντρωσή της στα υγρά του σώματος. Τα περισσότερα πλασματοκύτταρα (β-λέμφοκυτταρα) που παράγουν IgE βρίσκονται στο λεμφικό ιστό του γαστρεντερικού και αναπνευστικού συστήματος, κυρίως στις αδενοειδείς εκβλαστήσεις και στις αμυγδαλές. Οι μηχανισμοί στους οποίους εμπλέκεται η IgE στις τροφικές αλλεργίες, συνίστανται στη φάση ευαισθητοποίησης και ενεργοποίησης. Η ευαισθητοποίηση μπορεί να συμβεί κατά την πρώτη επαφή με το αλλεργιογόνο των τροφίμων και έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία μιας ειδικής για αλλεργιογόνα sIgE (*allergen-specific IgE*) ανοσοσφαιρίνης. Οι διεργασίες της

άμεσης υπερευαισθησίας και κατά ακολουθία τα φαινόμενα που συμμετέχουν στην εκδήλωση της αναφυλαξίας μπορούν να διακριθούν σε τρεις φάσεις:

- Την Φάση Ευαισθητοποίησης κατά την οποία παρατηρείται παραγωγή IgE από τα β-λέμφοκυτταρα, εις απάντηση στην πρώτη επαφή με το αντιγόνο και σύνδεση με τους ειδικούς FcR της μεμβράνης των μαστοκυττάρων και των βασεόφιλων.

- Την Φάση Ενεργοποίησης, με σύνδεση του εκ νέου εισερχόμενου στον οργανισμό αντιγόνου με την IgE που βρίσκεται προσκολλημένη στη μεμβράνη των μαστοκυττάρων και των βασεόφιλων, ενεργοποίηση τους και απελευθέρωση μεσολαβητών.

- Την Δραστική Φάση με την εκδήλωση των φαρμακολογικών δράσεων των μεσολαβητών. Η παρουσία των συμπτωμάτων εμφανίζεται κατά την επακόλουθη επαφή με το αντίστοιχο αλλεργιογόνο και οδηγεί σε κλινικά συμπτώματα [Γερμενής 2000 και Gould 2003].



Εικόνα 7: Η δομή της IgE.

1.3.4.2 Η πρωτεωμική ανάλυση

Η πρωτεωμική (proteomics) ασχολείται με την ανάλυση του συνόλου των πρωτεϊνών οι οποίες παράγονται από το γονιδίωμα ενός οργανισμού. Με τον όρο πρωτεωμική ανάλυση εννοούμε την μελέτη και ταυτοποίηση των αλλαγών στο πρωτέωμα του κυττάρου. Το πρωτέωμα ενός κυττάρου παρέχει πληροφορίες σχετικά με το σύνολο των εκφραζόμενων πρωτεϊνών, υπό δεδομένες φυσιολογικές συνθήκες και σε συγκεκριμένο χρόνο. Η συγκεκριμένη μέθοδος παρέχει την δυνατότητα αποσαφήνισης βιοχημικών και φυσιολογικών μηχανισμών πολλών ασθενειών, σε μοριακό επίπεδο. Έτσι, η πρωτεωμική είναι ένα πολύ χρήσιμο εργαλείο με το οποίο δύναται να ταυτοποιηθούν τα προϊόντα

γονιδίων που πιθανόν να εμπλέκονται σε πολύπλοκες βιοχημικές διαδικασίες, προκύπτουσες εκ της επίδρασης των διατροφικών συστατικών. Παράλληλα, η Διατροφογενομική (*Nutrigenomics*), μέσω της πρωτεωμικής, ασχολείται με το αποτέλεσμα της ενέργειας που έχει η δράση διαφόρων διατροφικών συστατικών στο πρωτέωμα του κυττάρου. Συγκεκριμένα, ο τομέας αυτός διερευνά τις ενεργοποιούμενες βιοχημικές μεταβολές, οι οποίες προκαλούνται λόγω των διατροφικών συστατικών, σε μοριακό επίπεδο και μελετά την παραγωγή των κυτταρικών πρωτεϊνών, την μεταγραφή και μετάφραση των γονιδίων, φωσφορυλιώσεις και γλυκοζυλιώσεις των παραγόμενων πρωτεϊνών και γενικά τη βιοχημική και μεταβολική δραστηριοποίηση, η οποία επιφέρει δομικές αλλαγές στα κύτταρα του οργανισμού [Valazquez-Arellano και Encarnation 2008]. Η πρωτεωμική βρίσκει όλο και περισσότερο εφαρμογή στη βιομηχανία τροφίμων, με τον όρο '*foodomics'*, σχετικά με την αξιολόγηση της ποιότητας και ασφάλειας των τροφίμων, μέσω της εφαρμογής σύγχρονων εργαστηριακών τεχνολογιών. Έτσι, μέσω της πρωτεωμικής είναι πλέον δυνατό να καθοριστούν στα τρόφιμα τα χαρακτηριστικά τους (π.χ. τρυφερότητα, οπός, γεύση, οσμή), να διαπιστωθούν ενδεχόμενοι περιβαλλοντικοί παράγοντες επιμόλυνσης των πρώτων υλών τους αλλά και να εξακριβωθούν τυχόν μεταβολές/αλλοιώσεις στα χαρακτηριστικά μετά την παραγωγή τους. Στην κτηνιατρική δημόσια υγεία, η πρωτεωμική βρίσκει εφαρμογή στην αξιολόγηση της ποιότητας των τροφίμων ζωικής παραγωγής, την ταυτοποίηση στελεχών παθογόνων βακτηρίων ανθεκτικών στα αντιβιοτικά και τον εντοπισμό ενδεχόμενων κινδύνων για την υγεία των καταναλωτών [Κατσαφάδου κ.ά.].

1.3.5 Περιβαλλοντικοί κίνδυνοι

1.3.5.1 Εισαγωγή

Τα κτηνιατρικά φάρμακα, τόσο κατά τη διαδικασία παρασκευής τους όσο και κατά τη χορήγηση τους στην κτηνοτροφική παραγωγή, δύναται να εισέλθουν στα χερσαία και υδάτινα οικοσυστήματα επηρεάζοντας δυσμενώς, άμεσα ή έμμεσα, οργανισμούς που διαβιούν φυσιολογικά στο περιβάλλον και δεν αποτελούν στόχο της προληπτικής ή θεραπευτικής φαρμακευτικής αγωγής [Schiermeier, 2003]. Έρευνες έδειξαν ότι οι δραστικές ουσίες οι οποίες προσροφούνται στο περιβάλλον δύναται να διαταράξουν τους βιογεωχημικούς κύκλους, να συμβάλλουν στην ανάπτυξη ανθεκτικότητας των παθογόνων μικροοργανισμών στις ουσίες αυτές και εντέλει να προκαλέσουν τοξικότητα στους οργανισμούς. Σήμερα γίνονται επισταμένες έρευνες για να διαπιστωθεί εάν και πως οι ουσίες αυτές επηρεάζουν τους οργανισμούς του περιβάλλοντος και τι σημαίνει αυτό για την περιβαλλοντική υγεία και την υγεία στο σύνολο της. Η πιο συνήθης μέθοδος διαχείρισης των απόβλητων κτηνοτροφικής παραγωγής, όπως μίγμα κοπράνων, ούρων και πιθανόν αχυροστρωμνής (κοπριά), είναι η διοχέτευση τους στο έδαφος ως εδαφοβελτιωτικών υλών λιπασματικής χρήσης. Εδώ και πολλά χρόνια, ο κίνδυνος της διασποράς των

κτηνιατρικών φαρμάκων στο περιβάλλον παρουσιάζει πλασματική αύξηση, είτε λόγω της αφομοίωσης τους μέσω της κοπριάς στο έδαφος, είτε λόγω της έκπλυσης των φαρμάκων ενστάλαξης ή επίπασης, από την επιφάνεια του σώματος του ζώου [Boxall, 2010]. Η διασπορά των δραστικών ουσιών προκαλεί την ρύπανση του εδάφους και των επιφανειακών και υπόγειων υδατοσυλλογών, είτε άμεσα στην περίπτωση χορήγησης κτηνιατρικών φαρμάκων σε υπό θεραπεία ιχθυοκαλλιεργειών, είτε έμμεσα με την έκπλυση του εδάφους στο οποίο έχει εναποτεθεί κοπριά. Έρευνες έχουν δείξει ότι η ρύπανση του περιβάλλοντος, προκαλεί δυσμενείς επιπτώσεις στην μικροβιακή πανίδα και αποτελεί κίνδυνο για τους μικροοργανισμούς που εμπλέκονται στις διαδικασίες αποδόμησης της οργανικής ύλης και την μετατροπή της σε ανόργανη (σαπροφυτική τροφική αλυσίδα). Η οξεία και χρόνια έκθεση των μικροοργανισμών (χερσαίων, υδρόβιων και βενθικών) σε υψηλές συγκεντρώσεις δραστικών ουσιών, μπορεί να προκαλέσει διαταραχή της ισορροπίας του οικοσυστήματός. Αυτό οφείλεται, είτε λόγω της διαταραχής της αναπαραγωγικής ικανότητας των μικροοργανισμών, είτε λόγω της αποβίωσης τους, είτε λόγω της δημιουργίας ανθεκτικών στελεχών στις εναποθέσαντες στο περιβάλλον δραστικές ουσίες [Εργαστήριο Οικολογίας και Προστασίας Περιβάλλοντος]. Είναι πλέον εμφανές ότι ακόμα και η είσοδος των κτηνιατρικών φαρμάκων στους οργανισμούς που βρίσκονται στα υψηλότερα επίπεδα της τροφικής πυραμίδας μπορεί να προκαλέσει διαταραχή της ισορροπίας μεταξύ των ειδών στις βιοκοινότητες.

Εικόνα 8: Η είσοδος των κτηνιατρικών φαρμάκων στο περιβάλλον.

1.3.5.2 Γενικές αρχές της προσρόφησης ενός φαρμάκου στο έδαφος

Ο βαθμός προσρόφησης ενός φαρμάκου στο έδαφος, δηλαδή η δέσμευση του σε αυτό, εκτιμάται από το συντελεστή κατανομής (K_d). Ο συντελεστής αυτός καθορίζει το πηλίκο συγκέντρωσης του φαρμάκου στην στερεά φάση, ως προς την συγκέντρωση του φαρμάκου στην υδατική φάση [Tolls, 2001]. Το αποτέλεσμα υπολογισμού του συντελεστή αυτού, δείχνει ότι όσο μεγαλύτερη είναι η τιμή του τόσο περισσότερο το φάρμακο δεσμεύεται στο έδαφος. Η διαίρεση της τιμής του K_d με την επί τοις εκατό περιεκτικότητα του εδάφους σε οργανικό άνθρακα,

προσδιορίζει τον συντελεστή K_{oc}. Ο συντελεστής K_{oc}, είναι ένας συντελεστής διαχωρισμού μεταξύ της υδατικής φάσης και του οργανικού κλάσματος της στερεής φάσης, ο οποίος περιγράφει την συγγένεια του ρύπου προς το οργανικό εδαφικό κλάσμα, δίνοντας έτσι τη δυνατότητα υπολογισμού του βαθμού προσρόφησης ενός φαρμάκου στο έδαφος [OECD 2000, Tolls 2001, Schwarzenbach κ.ά. 2003]. Όσο αυξημένη είναι η τιμή του K_{oc} τόσο περισσότερο δυσκίνητο είναι το φάρμακο στο έδαφος και τόσο περισσότερο δεσμεύεται σε αυτό. Η διεθνής βιβλιογραφία δείχνει ότι από τις υπολογιζόμενες τιμές του συντελεστή K_{oc}, οι σουλφοναμίδες και τα οργανοφωσφορικά παρασιτοκτόνα συγκαταλέγονται στα φάρμακα με ευκίνητο εδαφικό προφίλ. Αντιθέτως οι τετρακυκλίνες, τα μακρολίδια και οι φθοροκινολόνες θεωρούνται φάρμακα δυσκίνητα στο έδαφος. Επιπρόσθετα, η διείσδυση των φαρμάκων στο περιβάλλον εξαρτάται και από άλλους σημαντικούς παράγοντες, όπως τις φυσικοχημικές ιδιότητες του εδάφους αλλά και της δραστικής ουσίας. Ιδιαίτερα, τα χαρακτηριστικά του εδάφους που επηρεάζουν την προσρόφηση των φαρμάκων είναι το ποσοστό της περιεκτικότητάς σε οργανικό άνθρακα, η μηχανική του σύσταση, το *pH*, η περιεκτικότητά του σε οξείδια δισθενών και τρισθενών μετάλλων (π.χ. Ca, Fe) και το μέγεθος ανταλλαγής κατιόντων [OECD 2000]. Τέλος, η προσρόφηση των φαρμάκων στο έδαφος εξαρτάται σημαντικά από το βαθμό ιονισμού κάθε ουσίας, ενώ οι τιμές *pKa* των φαρμάκων και το *pH* των εδαφών καθορίζουν το βαθμό ιονισμού τους, με αποτέλεσμα τα φάρμακα να εντοπίζονται στο έδαφος είτε ως ουδέτερα είτε ως ιονισμένα μόρια. Στην μελέτη των περιβαλλοντικών επιπτώσεων, από τη προσρόφηση δραστικών ουσιών, σημαντικός παράγοντας μέτρησης είναι ο χρόνος που απαιτείται για την αποδόμηση τους. Για τον σκοπό αυτό καθιερώθηκε ο Χρόνος Ημίσειας Ζωής (*Degradation Time 50%*, DT_{50}), ως ο απαιτούμενος χρόνος μείωσης στο μισό της αρχικής τιμής της συγκέντρωσης ενός φαρμάκου στο έδαφος. Ο χρόνος αποδόμησης των διαφόρων φαρμάκων στο έδαφος είναι ετερογενής, αφού χαρακτηρίζεται από φάρμακα που αποδομούνται μέσα σε λίγες ώρες μέχρι φάρμακα που η διάσπασή τους μπορεί να διαρκέσει έτη. Είναι λοιπόν προφανές ότι η διάσπαση των φαρμάκων στο έδαφος ενέχει δυσμενείς μακροχρόνιες επιπτώσεις για το περιβάλλον. Το φαινόμενο αυτό ενέχει διάφορους κινδύνους, όπως τη δημιουργία νέων χημικών ουσιών (μεταβολιτών) στο έδαφος μεγαλύτερης περιβαλλοντικής τοξικότητας από τις πρόδρομες ουσίες, αλλά και μεταβολιτών μεγαλύτερης ευκινησίας στο εδαφικό υπόστρωμα ή και μεγαλύτερης ανθεκτικότητας σε περαιτέρω διάσπαση.

1.3.5.3 Πως επηρεάζεται ο άνθρωπος από την βιοσυσσώρευση των δραστικών ουσιών στο περιβάλλον

Πέρα από τις επιπτώσεις στους υδρόβιους και χερσαίους οργανισμούς, η είσοδος των κτηνιατρικών φαρμάκων στο περιβάλλον επηρεάζει σημαντικά και την υγεία του ανθρώπου. Η βιοσυσσώρευση δραστικών ουσιών στο

περιβάλλον καταλήγει στον άνθρωπο μέσω της κατανάλωσης φυτικών προϊόντων εμπλουτισμένων με εδαφικούς ρύπους, της κατανάλωσης ψαριών και προϊόντων ζωικής παραγωγής, τα οποία περιέχουν κατάλοιπα μέσω της τροφικής αλυσίδας και λόγω της πόσης επιφανειακού και υπόγειου νερού στο οποίο διοχετεύονται οι δραστικές ουσίες. Ιδιαίτερα τα αντιμικροβιακά φάρμακα, κυρίως λόγο της αυξημένης τους κτηνιατρική χρήσης, παρουσιάζουν αυξημένο κίνδυνο στη διαταραχή της ισορροπίας των οικοσυστημάτων. Αυτό οφείλεται κυρίως στην ανασταλτική τους δράση έναντι των μικροοργανισμών, οι οποίοι αποτελούν βασικούς συντελεστές αποδόμησης οργανικής ύλης και ως εκ τούτου της ανακύκλωσης των θρεπτικών στοιχείων. Πρέπει να σημειωθεί ότι απ' όσα κτηνιατρικά φάρμακα χρησιμοποιούνται ευρέως για την καταπολέμηση ασθενειών των ζώων, τα αντιβιοτικά είναι τα φάρμακα τα οποία απορροφούνται λιγότερο από το πεπτικό σύστημα των ζώων. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα το μεγαλύτερο ποσοστό συγκέντρωσης της αντιμικροβιακής ουσίας να απεκκρίνεται αμετάβλητο από τα κόπρανα και τα ούρα. Δεδομένου δε ότι τα απόβλητα των ζώων συνεχίζουν να χρησιμοποιούνται στην συμπληρωματική λίπανση του εδάφους, ως μια πολύ κοινή πρακτική μεταξύ των διαφόρων χωρών, αυτό καθιστά ορατό τον κίνδυνο διείσδυσης των αντιβιοτικών στο περιβάλλον και ακόμη ιδιαίτερα λόγο της προβλεπόμενης ανάπτυξης της μικροβιακής αντιβιοαντοχής [Sarmah κ.ά. 2006]. Συγκεκριμένα, μελέτες των Heuer and Smalla (2007) κατέδειξαν ότι η εφαρμογή στο έδαφος κοπριάς χοίρων στους οποίους χορηγήθηκαν θεραπευτικές δόσεις σουλφαδιαζίνης, οδήγησε στην εμφάνιση ανθεκτικών μικροβίων στο έδαφος [Heuer και Smalla, 2007]. Επιπρόσθετα, οι Hughes κ.ά. (2006) μελέτησαν την πρόσληψη κτηνιατρικών φαρμάκων από τον άνθρωπο μέσω της τροφής και του νερού, καταγράφοντας ότι η συγκέντρωση πρόσληψης σε σχέση με τις ουσίες που μελετήθηκαν, ήταν κατά 20% μικρότερη από την τιμή της Αποδεκτής Ημερήσιας Πρόσληψης (*Acceptable Daily Intake, ADI*), ευνοώντας έτσι την ανάπτυξη αντιβιοαντοχής. Από τις ουσίες που συμπεριλήφθηκαν στην μελέτη αυτή, οι ουσίες: αλμπενταζόλη, δελταμετρίνη, φθορφενικόλη, μεδροξυπρογεστερόνη, τυλοσίνη, διυδροστρεπτομυκίνη, σαλινομυκίνη, τολτραζουρίλ και νιτροξινιλίνη, κρίθηκαν ως οι πλέον επικίνδυνες για τη δημόσια υγεία [Hughes κ.ά. 2006]. Υπολογίζεται ότι είναι χιλιάδες τα φάρμακα που καταναλώνονται σε παγκόσμια κλίμακα κάθε χρόνο, με τον αριθμό να αυξάνεται δραματικά κυρίως λόγω της σύνθεσης νέων χημικών μορίων με σκοπό την αντικατάσταση των παλιών. Επιπλέον, το μέγεθος της φαρμακευτικής ρύπανσης διαφέρει σημαντικά από χώρα σε χώρα, με αποτέλεσμα να χρειάζονται συστηματικοί περιβαλλοντικοί έλεγχοι εκτίμησης της επικινδυνότητας, ανά περιοχή, λόγω της μεταβλητότητας των ποσοτήτων χρήσης. Σε παγκόσμια κλίμακα, έρευνες έδειξαν ότι η κατανάλωση φαρμακευτικών ουσιών ανέρχεται σε περισσότερο από 100.00 τόνους ετησίως, ενώ η χρήση τους ποικίλει μεταξύ των διαφόρων κρατών. Μόνο στη Γερμανία το 2001, καταμετρήθηκαν 50.000 εγκεκριμένα φάρμακα εκ των οποίων τα 2.700 κατείχαν το 90% της συνολικής κατανάλωσης η οποία αντιστοιχούσε σε 900 διαφορετικές δραστικές ουσίες, δηλαδή 38.000 τόνους

δραστικών ουσιών [Kummerer 2004]. Οι επιστήμονες σε παγκόσμια κλίμακα κρούουν τον κώδωνα του κινδύνου και επισημαίνουν ότι η υπερβολική κατανάλωση φαρμάκων μπορεί να αποβεί επιζήμια για τον άνθρωπο, είτε λόγω της άμεσης έκθεσης του σε αυτά, είτε έμμεσα μέσω του περιβαλλοντικού αποτυπώματος που αυτά αφήνουν. Οι βασικοί άξονες περιορισμού του προβλήματος αυτού αφορούν την ανάπτυξη περιβαλλοντικής συνείδησης με την υιοθέτηση της «πράσινης φαρμακευτικής πρακτικής», την καθιέρωση σωστών στρατηγικών ελέγχων για τη διαχείριση της χρόνιας οικοτοξικότητας και την αποτίμηση της περιβαλλοντικής θεώρησης στη διαχείριση των κινδύνων.

1.3.5.4 Η εδραίωση δύο σημαντικών Κατευθυντηρίων Οδηγιών

Το 2000 ο Ευρωπαϊκός Οργανισμός Φαρμάκων (*European Medicines Agency, EMA*) και η Επιτροπή για τα Κτηνιατρικά Φαρμακευτικά Προϊόντα (*Committee for Veterinary Medicinal Products, CVMP*), προχώρησαν στην αποδοχή δύο Κατευθυντηρίων Οδηγιών όπως αυτές διατυπώθηκαν από τον Οργανισμό της Εναρμόνισης των Κτηνιατρικών Φαρμακευτικών Προϊόντων (VICH, *International Cooperation on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Veterinary Medicinal Products*) με σκοπό την εκτίμηση των περιβαλλοντικών επιπτώσεων από τα κτηνιατρικά φάρμακα. Οι Οδηγίες που καθορίζουν τον βαθμό έκθεσης, την πιθανή δράση και τις επιπτώσεις από τη χρήση των κτηνιατρικών φαρμάκων, είναι η **CVMP/VICH Topic GL6** [*Ecotoxicity Phase I – Guideline on Environmental Impact Assessment (EIAs) for Veterinary Medicinal Products - Phase I (2000)*], γνωστή ως **Φάση Ι** και η **CVMP/VICH Topic GL38** [*Guideline on Environmental Impact Assessment for Veterinary Medicinal Products - Phase II (2005)*], γνωστή ως **Φάση ΙΙ**. Η μελέτη της Εκτίμησης των Περιβαλλοντικών Επιπτώσεων (*Environmental Impact Assessment, EIA*) από τη χρήση των δραστικών φαρμακευτικών ουσιών ή/και τα έκδοχα τους, πρέπει να περιλαμβάνει όλα τα δεδομένα που απαιτούνται από τις κατευθυντήριες Οδηγίες: Φάση Ι (GL6) ή και Φάση ΙΙ (GL38) για την/τις δραστική/ές ουσία/ες του σκευάσματος και σε καμία περίπτωση παρόμοιες ή συγγενείς ουσίες. Τέλος, σύμφωνα με τις Οδηγίες αυτές, η συνολική εκτίμηση του κινδύνου υπολογίζεται από το λόγο της Προβλεπόμενης Περιβαλλοντικής Συγκέντρωσης (*Predicted Environmental Concentration, PEC*) ως προς την Προβλεπόμενη Χωρίς Επιπτώσεις Περιβαλλοντική Συγκέντρωση (*PNEC – Predicted No Environmental Concentration*) της δραστικής ουσίας στο περιβάλλον [VICH 2000].

1.4 «ΜΙΑ ΚΑΙ ΕΝΙΑΙΑ ΥΓΕΙΑ» («*ONE HEALTH*»)

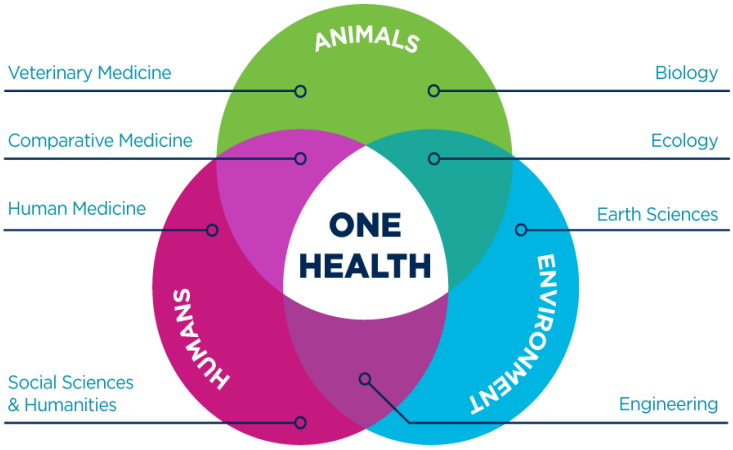
Η προφανής ανάγκη για τη διασφάλιση της υγείας του ανθρώπινου πληθυσμού, σε αρμονία με το περιβάλλον στο οποίο ζει, οδήγησε Διεθνείς και Εθνικούς Οργανισμούς στην ανάπτυξη και προώθηση μιας νέας παγκόσμιας

στρατηγικής, στον τομέα της υγείας, η οποία ονομάστηκε «Μία και Ενιαία Υγεία» («*One Health*»). Ο όρος αυτός χαρακτηρίζει την ανάπτυξη κοινών συστημάτων παρακολούθησης, με σκοπό τη συστηματική συσχέτιση, επικύρωση, ανάλυση, ερμηνεία δεδομένων και μετάδοση των πληροφοριών που συλλέγονται για τον άνθρωπο, τα ζώα και το περιβάλλον. Απώτερος σκοπός της στρατηγικής αυτής είναι, η λήψη αποτελεσματικών παρεμβατικών ενεργειών κρίσιμων για τη δημόσια υγεία. Όπως έχει αποδειχτεί, η οποιαδήποτε προσπάθεια επιτήρησης με σκοπό τη διατήρηση της ευζωίας ενός πληθυσμού, δεν μπορεί να επιτευχθεί εάν αυτή δεν συνδυάζεται πρωτίστως με μια αντίστοιχη πολιτική διασφάλισης και προαγωγής της υγείας των ζώων, με τα οποία ο πληθυσμός αυτός έρχεται σε επαφή, αλλά και γενικότερα του περιβάλλοντος [Stärk κ.ά. 2015]. Η ιδέα της Μίας και Ενιαίας Υγείας, είναι μια καινοτόμος ιδέα που κάτω από μια κοινή ομπρέλα στοχεύει στη βελτίωση της υγείας όλων των ζωντανών οργανισμών του πλανήτη. Τα οφέλη προσέγγισης της ιδέας αυτής αποσκοπούν στην:

- Βελτίωση της υγείας των ανθρώπων και ζώων παγκοσμίως, μέσω της συνεργασίας όλων των επιστημόνων, με σκοπό την αντιμετώπιση κρίσιμων αναγκών στον τομέα της υγείας.

- Ανάπτυξη εξειδικευμένων εκπαιδευτικών κέντρων για την κατάρτιση νέων επιστημόνων, μέσω της ενισχυμένης συνεργασίας μεταξύ Διεθνών Οργανισμών και Σχολών Επιστημών Υγείας.

- Διεύρυνση γενικά της επιστημονικής γνώσης με σκοπό τη δημιουργία καινοτόμων προγραμμάτων βελτίωσης της υγείας [American Veterinary Medical Association 2008].



Εικόνα 9: «Μία και Ενιαία Υγεία» - «One Health», σφαιρική αντιμετώπιση της παγκόσμιας υγείας με συμβουλευτικές διεπιστημονικές ομάδες και άξονα την αλληλεπίδραση ανθρώπων, ζώων και περιβάλλοντος.

Η επιτυχής περισυλλογή και επεξεργασία δεδομένων, απαιτεί την διεπιστημονική συνεργασία διαφόρων Οργανισμών όχι μόνο σε τοπικό ή εθνικό επίπεδο, αλλά και σε παγκόσμια κλίμακα. Για τον σκοπό αυτό, η στενή συνεργασία της ιατρικής επιστήμης με την κτηνιατρική, τη βιολογία, τη χημική/υγειονομική μηχανική και τις διάφορες επιστήμες του περιβάλλοντος, κρίνεται αναγκαία, υπογραμμίζοντας ταυτόχρονα την πολυεπιστημονικότητα που διέπει τον έλεγχο της Δημόσιας Υγείας. Η Ευρωπαϊκή Ένωση έχει αναγνωρίσει την σπουδαιότητα του εγχειρήματος αυτού και το ίδιο έχει συμβεί και με το Κέντρο Ελέγχου και Πρόληψης Ασθενειών των ΗΠΑ αλλά και την Παγκόσμια Τράπεζα η οποία μελετά την αποτελεσματικότητα της μείωσης του κόστους για την παγκόσμια υγεία μέσω της εφαρμογής της ιδέας αυτής. Η ενεργοποίηση ενός κοινού προγράμματος επιτήρησης της υγείας, προωθείται σήμερα από τους επιστήμονες πολλών χωρών και υποστηρίζεται από σημαίνοντες οργανισμούς, όπως είναι η WHO, η FAO, ο OIE, η Διεθνής Ομοσπονδία για την Υγεία των Ζώων, η Παγκόσμια Συμμαχία για τον έλεγχο της Λύσσας και πολλά άλλα επιστημονικά κέντρα σε όλο τον κόσμο, όπως το Κέντρο «One Health» του Πανεπιστημίου της Καλιφόρνιας [Μια και Ενιαία Υγεία].

Το καίριο θέμα της ανθεκτικότητας των μικροβίων στα αντιβιοτικά, παρόλο που σε πρώτη ανάγνωση θεωρείται κυρίως πρόβλημα των νοσηλευόμενων στα νοσοκομεία, όπως έχει ήδη αναφερθεί, πολύ συχνά τόσο η κτηνοτροφία όσο και το ευρύτερο περιβάλλον (λύματα και υπόνομοι) συμμετέχουν στην επιδημιολογία της. Παράλληλα, τα υψηλά ποσοστά των υφιστάμενων και αναπτυσσόμενων ζωοανθρωπονόσων, μαζί με τις ραγδαίες κλιματικές αλλαγές και τις τακτικές μετακινήσεις πληθυσμών, έχουν επίπτωση όχι μόνο στην υγεία των ανθρώπων και ζώων αλλά και σε οικονομικό επίπεδο. Οι επιπτώσεις αυτές, καθιστούν πλέον επιτακτική την ανάγκη διαχείρισης της δημόσιας υγείας κάτω από την ολιστική θεώρηση της Ενιαίας Υγείας. Σήμερα, η ποσοστιαία σύγκλιση των πληθυσμιακών ομάδων, ανθρώπων και ζώων, έχει δημιουργήσει μια νέα δυναμική στην οποία η υγεία κάθε ομάδας είναι άρρηκτα συνδεδεμένη. Οι προκλήσεις που συνδέονται με τη δυναμική αυτή είναι απαιτητικές και πρωτοφανής, αφού προβλέπεται ότι η κατανάλωση κρέατος αναμένεται να αυξηθεί κατά 50% έως το 2020, την στιγμή που οι ζωικοί πληθυσμοί υφίστανται τεράστιες πιέσεις αύξησης της παραγωγής αλλά και επιβίωσης τους. Επιπλέον, από τις 1,461 ασθένειες που αναγνωρίζονται πλέον στους ανθρώπους, περίπου το 60% οφείλεται σε παθογόνα πολλαπλών-ξενιστών τα οποία μεταφέρονται μεταξύ των διαφόρων ειδών ζώων. Τις τελευταίες τρεις δεκαετίες, περίπου το 75% των νέων αναδυόμενων μολυσματικών νόσων στον άνθρωπο χαρακτηρίστηκαν ως ζωονοτικές παθήσεις. Η αυξανόμενη εξάρτηση του ανθρώπου από τα ζώα και τα προϊόντα παραγωγής τους, μπορεί να είναι ο πιο κρίσιμος παράγοντας κινδύνου, όσον αφορά τις μολυσματικές ασθένειες, για την υγεία και την ευημερία μας [American Veterinary Medical Association 2008].

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2. ΤΟ ΦΑΙΝΟΜΕΝΟ ΤΗΣ ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗΣ ΑΝΤΟΧΗΣ

2.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Μια από τις μεγαλύτερες καινοτομίες στην ιστορία της ιατρικής, είναι χωρίς αμφιβολία, η ανακάλυψη και η χρήση των αντιβιοτικών. Τα αντιβιοτικά είναι είτε φυσικές ουσίες, παράγονται δηλαδή στη φύση συνήθως από μικροοργανισμούς (βακτήρια, μύκητες), ή είναι συνθετικές ουσίες που έχουν παρασκευαστεί στο εργαστήριο. Για να θεωρηθεί ένα αντιβιοτικό κλινικά δραστικό και συνεπώς χρήσιμο στην ιατρική, θα πρέπει η αναστολή ανάπτυξης του μικροοργανισμού να επιτυγχάνεται σε συγκεντρώσεις αντιβιοτικού αντίστοιχες με τις συγκεντρώσεις που επιτυγχάνονται στον ανθρώπινο οργανισμό [Βατόπουλος]. Με την παραγωγή ημισυνθετικών παραγώγων, ο όρος «αντιβιοτικά» έχει σήμερα αντικατασταθεί από τον πληρέστερο όρο «αντιμικροβιακά», περιλαμβάνοντας έτσι φυσικές, συνθετικές ή ημισυνθετικές ουσίες, ικανές να αναστείλουν τον πολλαπλασιασμό των μικροβίων και να τα

καταστρέψουν. Τα αντιβιοτικά δεν έχουν δράση έναντι των ιών, αφού η δράση τους προϋποθέτει την ικανότητα του παθογόνου μικροοργανισμού να έχει δικό του μεταβολισμό, ενώ αντιθέτως οι ιοί αποτελούν παράσιτα εις βάρος του ανθρώπινου κυττάρου.

Υπάρχουν πολλές ομάδες αντιβιοτικών (Πίνακας 4). Κάθε ομάδα αντιβιοτικών δρα με συγκεκριμένο τρόπο σε συγκεκριμένο στόχο μέσα στο μικροβιακό κύτταρο. Κάθε αντιμικροβιακή ουσία, διαθέτει συγκεκριμένη φαρμακοκινητική που χαρακτηρίζει τα τμήματα του ανθρώπινου σώματος στα οποία εισέρχεται και τις συγκεντρώσεις που επιτυγχάνονται σε αυτά. Επίσης, κάθε αντιβιοτικό έχει συγκεκριμένο φάσμα, καταστρέφει δηλαδή συγκεκριμένες ομάδες μικροοργανισμών. Έτσι η πενικιλλίνη αναστέλλει τον στρεπτόκοκκο όχι όμως το *E. Coli*, ενώ η αμπικιλλίνη αναστέλλει το *E. Coli* όχι όμως την ψευδομονάδα [Αλκιβιάδης Βατόπουλος]. Στον πιο κάτω πίνακα, περιγράφονται οι κυριότερες ομάδες αντιβιοτικών που χρησιμοποιούνται σήμερα.

Πίνακας 4: Ομάδες αντιβιοτικών [Βατόπουλος].

Ομάδες Αντιβιοτικών	
β-Λακτάμες	**Αμινογλυκοσίδες**
Πενικιλλίνες	Γενταμικίνη
Κεφαλοσπορίνες	Τομπραμυκίνη
‘Παλαιότερες’	Αμικασίνη (παράγωγο καναμυκίνης)
Αντισταφυλοκοκκικές	Νετελμικίνη
Αντιψευδομοναδικές	Στρεπτομυκίνη
Μακρολίδες	**Κινολόνες**
Παλαιότερες	Παλαιότερες
Νεότερες	Νεότερες (φθόριο-)
Κετολίδες	Νορφλοξασίνη
Κιπροφλοξασίνη	
Άλλες ομάδες	**Γλυκοπεπτίδια**
Τριμεθοπρίμη	Βανκομικίνη
Τετρακυκλίνες	Τεϊκοπλανίνη
Χλωραμφαινικόλη	

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, τα αντιβιοτικά χρησιμοποιούνται και στην κτηνιατρική με αποτέλεσμα τη βελτίωση της υγείας και της ευζωίας των ζώων και την αύξηση της απόδοσης και της παραγωγής τους. Όμως, όπως και στους ανθρώπους, από την πρώτη κιόλας χρήση της πενικιλλίνης άρχισε η αντίστροφη μέτρηση της αντοχής στα αντιβιοτικά. Η ανθεκτικότητα των

μικροβίων στα αντιβιοτικά, θεωρείται σήμερα ένα από τα πιο σοβαρά προβλήματα της δημόσιας υγείας, καθώς ο αριθμός των ανθεκτικών στα αντιβιοτικά στελεχών έχει αυξηθεί τόσο πολύ την τελευταία δεκαετία που πολλές βακτηριακές λοιμώξεις έχουν γίνει ανθεκτικές στις θεραπείες των πιο συχνά συνταγογραφούμενων αντιβιοτικών. Αυτό συμβαίνει γιατί οι μηχανισμοί που προκαλούν την μικροβιακή αντοχή, πολλές φορές μεταβιβάζονται στις επόμενες γενιές μικροβίων δημιουργώντας ανθεκτικά στελέχη που έχουν περισσότερες πιθανότητες να επιζήσουν και να πολλαπλασιαστούν. Η ορθολογική χρήση των αντιβιοτικών είναι ο πιο ενδεδειγμένος τρόπος για την αντιμετώπιση της αντιβιοαντοχής, που αποτελεί μείζον πρόβλημα της δημόσιας υγείας.

Είναι πλέον δεδομένο ότι, η χρήση αντιβιοτικών στην κτηνοτροφική παραγωγή και πιο συγκεκριμένα στο κλάδο της χοιροτροφίας και της πτηνοτροφίας αυξάνεται δραματικά στις αναπτυσσόμενες χώρες, με αποτέλεσμα να επιδεινώνεται ο κίνδυνος της εμφάνισης ανθεκτικών μικροβίων. Πολλά αντιβιοτικά χρησιμοποιούνται καθημερινά για την πρόληψη ασθενειών ή για την διαχείριση των κρουσμάτων κάποιας νόσου που θα μπορούσε να αποφευχθεί ή να αντιμετωπισθεί με άλλα ενδεδειγμένα μέσα. Αυτό γίνεται λόγω της εντατικής παραγωγής, όταν χιλιάδες αγροτικά ζώα εκτρέφονται μαζί, σε κλειστούς χώρους, με αποτέλεσμα τα κρούσματα μιας νόσου να είναι αναπόφευκτα. Παράλληλα, τα αντιβιοτικά που χορηγούνται σε χαμηλές δόσεις στα περισσότερα εκτρεφόμενα ζώα, αφενός προλαμβάνουν την εκδήλωση ασθενειών, αφετέρου μπορούν να επιταχύνουν την ανάπτυξη των ζώων και να αυξήσουν το σωματικό τους βάρος [Λαΐνας 2015]. Αυτή η άσκοπη χρήση συνεχίζεται, αυξάνεται ραγδαία και είναι δύσκολο να γνωρίζει κάποιος με πλήρη βεβαιότητα πόσα αντιβιοτικά έχουν χρησιμοποιηθεί και σε ποια είδη. Αυτό όμως που είναι πλέον ξεκάθαρο είναι ότι η μικροβιακή αντοχή στα αναπαραγωγικά ζώα αποτελεί μια σημαντική απειλή και μάστιγα για την ανθρώπινη υγεία [Davies 2014].

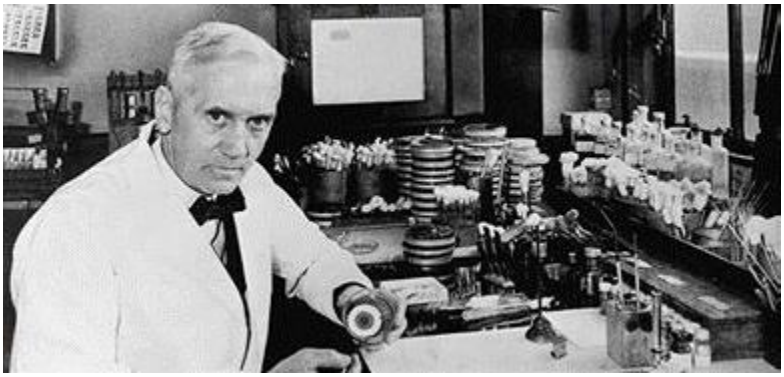
Τα βακτήρια είναι εξαιρετικά ανθεκτικές μορφές ζωής και έχουν αποδείξει την ικανότητά τους να επιβιώνουν σε ακραίες περιβαλλοντικές συνθήκες. Υπάρχουν παραδείγματα βακτηριδιακών ειδών, που μπορούν να επιβιώσουν σε θερμοκρασίες ψύξης και άλλων που μπορούν να επιβιώσουν πάνω από το σημείο βρασμού του ύδατος. Επιπλέον, υπάρχουν είδη που επιβιώνουν σε πολύ όξινα περιβάλλοντα ή σε αλκαλικές συνθήκες με τιμές pH μεγαλύτερες από 12, άλλα και είδη που μπορούν να αναπτυχθούν σε υδάτινα μέσα με περιεκτικότητα 30% *NaCl*. Μεγάλο ενδιαφέρον παρουσιάζει το βακτήριο *Deinococcus radiodurans* το οποίο μπορεί να επιβιώσει σε επίπεδο έκθεσης ακτινοβολίας, χίλιες φορές περισσότερη από ότι μπορεί να είναι ανεκτή για τον άνθρωπο. Τα βακτήρια, κατευθυνόμενα από την δυνατότητα τους για ταχεία ανάπτυξη, επιβιώνουν σε δυσμενείς συνθήκες και εξελίσσονται, σε μικρά χρονικά διαστήματα, σε βακτηριδιακούς πληθυσμούς. Τυπικό χαρακτηριστικό

αυτής της εξελικτικής ικανότητας των βακτηριδίων, είναι η αντοχή και η προσαρμοστικότητα τους στην παρουσία αντιμικροβιακών παραγόντων, όπου, η ανάπτυξη των μηχανισμών αντίστασης διασφαλίζει την εξέλιξη τους. Επιπλέον, τα βακτήρια μπορούν να επικοινωνούν μεταξύ τους μέσω περίπλοκων μηχανισμών σηματοδότησης, οι οποίοι διευκολύνουν την επιβίωσή τους στην περίπτωση παρουσίας εχθρικού περιβάλλοντος. Οι μηχανισμοί επικοινωνίας, είτε προωθούν αναδιαμορφώσεις στην δομή και σύνθεση των βακτηριδίων (π.χ. το σχηματισμό βιομεμβρανών) με σκοπό την προστασία και επιβίωση τους, σε δυσμενείς συνθήκες, είτε σηματοδοτούν την παρουσία περιβαλλοντικών συνθηκών ευνοϊκών για την ανάπτυξη αποικιών [Boxall 2010]. Δεδομένης της πληθώρας των πιθανών μηχανισμών επιβίωσης των βακτηριδίων, είναι αδύνατον να χρησιμοποιηθούν φάρμακα για να αποτρέψουν την ανάπτυξη αντιμικροβιακής αντοχής. Ωστόσο, ο κίνδυνος ανάπτυξης ανθεκτικών μικροβιακών στελεχών μπορεί να ελαχιστοποιηθεί, με προσεκτική επιλογή του κατάλληλου αντιμικροβιακού παράγοντα, σωστού δοσολογικού σχήματος και διάρκειας θεραπείας. Η οποιαδήποτε θεραπευτική στρατηγική πρέπει να βασίζεται στην αναγνώριση των παθογόνων παραγόντων, στην κατανόηση των χαρακτηριστικών ευαισθησίας του παθογόνου παράγοντα και στην γνώση της σχέσης μεταξύ της δόσης του φαρμάκου και του αποτελέσματος. Το τελευταίο παρουσιάζει ένα φάσμα ποικίλων μεταβλητών οι οποίοι περιλαμβάνουν τον μηχανισμό δράσης του φαρμάκου, τη φαρμακοκινητική (*PK - pharmacokinetics*) του αντιμικροβιακού παράγοντα σε στοχευμένο πληθυσμό ασθενών, τη φαρμακοδυναμική (*PD - pharmacodynamics*) απόκριση του βακτηριδίου στον αντιμικροβιακό παράγοντα, τη σχέση PK/PD η οποία επηρεάζει την επιλογή της δόσης χορήγησης και την ακεραιότητα του ανοσοποιητικού συστήματος του ξενιστή [Boxall 2010]. Η αξιοποίηση της γνώσης των φαρμακοδυναμικών ιδιοτήτων των αντιμικροβιακών φαρμάκων οδηγεί σε θεραπευτική επιτυχία και αποφυγή της ανάπτυξης αντοχής.

2.2 ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ ΜΙΑ ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ

Σήμερα γνωρίζουμε ότι αν και οι ισχυρές αντιβιοτικές ενώσεις για τη θεραπεία των ανθρώπινων ασθενειών που προκαλούνται από βακτηρίδια, όπως η φυματίωση, η βουβωνική πανώλη και η λέπρα, δεν ήταν απομονωμένες και προσδιορισμένες μέχρι τον εικοστό αιώνα, η πρώτη γνωστή χρήση αντιβιοτικών έγινε από τους αρχαίους Κινέζους πάνω από 2.500 έτη πριν. Μια σύντομη αναδρομή στην ιστορία της ιατρικής, φανερώνει ότι πολλοί άλλοι αρχαίοι πολιτισμοί, συμπεριλαμβανομένων των αρχαίων Αιγυπτίων και των αρχαίων Ελλήνων, χρησιμοποιούσαν ήδη μύκητες και φυτά για να θεραπεύσουν μολύνσεις, εξ αιτίας της παραγωγής των αντιβιοτικών ουσιών από αυτούς τους οργανισμούς. Το 1935 ο Gerhard Domagk, ανακάλυψε πως η ερυθρά χρωστική προντοζίλη (*prontosil*), η οποία χρησιμοποιείτο στα παλιά χρόνια ως χρωστική για τη βαφή νημάτων, εκδήλωνε αντιμικροβιακές ιδιότητες

in-vivo χωρίς να παρουσιάζει τοξικές ενέργειες έναντι του ξενιστή. Συγκεκριμένα, ο Domagk διαπίστωσε τη θεραπευτική δράση της προντοζίλης, σε ζώα με λοίμωξη από αιμολυτικό στρεπτόκοκκο και όπως αποδείχθηκε αργότερα στο ινστιτούτο Pasteur στο Παρίσι, η προντοζίλη μεταβολιζόταν στον οργανισμό του ζώου σε σουλφανιλαμίδη. Η σουλφανιλαμίδη παρουσίαζε αντιμικροβιακή δράση, γι΄αυτό και αποτέλεσε πρόδρομη ουσία της οικογένειας των σουλφοναμιδών. Στην σύγχρονη επιστήμη της ιατρικής, χρησιμοποιήθηκαν πρωτίστως αντιβιοτικές ουσίες που παρήχθησαν και απομονώθηκαν σε εργαστήριο από ζωντανούς οργανισμούς. Στην πραγματικότητα πρόκειται για τοξικές ουσίες (ενδοτοξίνες), οι οποίες απομονώθηκαν από μικροοργανισμούς και χρησιμοποιήθηκαν στον αγώνα επιβίωσης έναντι άλλων μικροοργανισμών. Η έρευνα της ανταγωνιστικής δράσης μεταξύ μικροοργανισμών, άρχισε χρόνια πριν όταν το 1877 οι Pasteur και Joubert διαπίστωσαν ότι το βακτηρίδιο του άνθρακα σταματά να πολλαπλασιάζεται εν τη παρουσία καλλιέργειας *B. subtilis* στο τρυβλίο. Παρομοίως, λίγα χρόνια αργότερα ο Garre διαπίστωσε ότι η ψευδομονάδα αναστέλλει την ανάπτυξη αποικίας σταφυλόκοκκου. Η ουσιαστική έρευνα όμως για την αντιβιοτική θεραπεία άρχισε στη Γερμανία, όταν ο Paul Ehrlich επινόησε τον όρο «χημειοθεραπεία» με σκοπό τον προσδιορισμό της χρήσης των αντιμικροβιακών ενώσεων στη θεραπεία των μικροβιακών λοιμώξεων. Το 1910 ο Paul Ehrlich ανακάλυψε το στενού φάσματος αντιβιοτικό Salvarsan, παρέχοντας παγκοσμίως και για πρώτη φορά μια αποδοτική θεραπεία κατά της διαδεδομένης τότε σύφιλης. Ο Paul Ehrlich αφιέρωσε την καριέρα του στην ανακάλυψη παραγόντων που κατείχαν επιλεκτική τοξικότητα και που χαρακτηρίζονταν ως μαγικές σφαίρες. Η σημαντικότερη όμως ανακάλυψη στο χώρο των αντιβιοτικών, έμελλε να γίνει το 1928 από τον Alexander Fleming.



Εικόνα 10: Ο Σερ Α. Fleming στο εργαστήριο του.

Ο Σερ Αλεξάντερ Φλέμινγκ δεν χρειάζεται ιδιαίτερες συστάσεις. Ήταν Σκωτσέζος βιολόγος και φαρμακολόγος που ασχολήθηκε ερευνητικά με τη βακτηριολογία, την ανοσολογία και τη χημειοθεραπεία. Ανακάλυψε το φαινόμενο ανάσχεσης της ανάπτυξης μιας καλλιέργειας σταφυλόκοκκων, απομονώνοντας έτσι τυχαία την πενικιλλίνη. Αυτό προέκυψε όταν κατά την διάρκεια των πειραμάτων του, εκ παραδρομής άφησε μια καλλιέργεια

σταφυλόκοκκου ακάλυπτη για μερικές μέρες και ενώ ετοιμαζόταν να πετάξει το τριβλίο με την καλλιέργεια, διαπίστωσε ότι σε ορισμένα σημεία είχαν αναπτυχθεί μύκητες (μούχλα). Εξακρίβωσε έτσι, ότι σε μικρή ακτίνα γύρω από τους μύκητες δεν υπήρχαν πια βακτήρια και δεν αναπτύχθηκαν νέα. Ο Fleming τότε απομόνωσε και μελέτησε το μύκητα αυτό και διαπίστωσε ότι πρόκειται για το είδος *Penicillium notatum*, ένα μύκητα που σχετίζεται με τους συνήθεις μύκητες του ψωμιού. Κατέληξε λοιπόν στο συμπέρασμα ότι ο μύκητας αυτός απελευθερώνει κάποια ουσία, η οποία αναστέλλει την παραγωγή και ανάπτυξη των βακτηρίων και την ονόμασε πενικιλλίνη. Πέρα βέβαια από το φάρμακο που θα γινόταν κοινός τόπος και απάνω του θα χτιζόταν αυτό που ονομάζουμε σήμερα σύγχρονη φαρμακολογία, ο Φλέμινγκ μνημονεύεται και για τη συνεισφορά του στην ίδια τη βακτηριολογία, νεοσύστατο κλάδο στα χρόνια του περίφημου γιατρού, που τόσο ο ίδιος βοήθησε στην ανάπτυξη του προσδιορίζοντας την ιδιαίτερη ύπαρξή του. Ωστόσο ο Fleming, δεν προχώρησε περισσότερο τις έρευνές του για την πενικιλλίνη και θα περνούσε περισσότερο από μια δεκαετία, μέχρις ότου το 1939 οι Florey και Chain απομόνωσαν την εν λόγο ουσία και δημιούργησαν με βάση αυτή νέα αντιβιοτικά φάρμακα, τα οποία χρησιμοποιήθηκαν ευρέως στην επούλωση των τραυμάτων κατά τη διάρκεια του 2ου Παγκοσμίου Πολέμου. Γι΄αυτές τις παγκοσμίου αξίας εργασίες τους, οι Fleming, Florey και Chain τιμήθηκαν με το Βραβείο Νόμπελ Ιατρικής και Φυσιολογίας το 1945.

Το ιστορικό αυτό γεγονός αποτέλεσε το έναυσμα μιας συνεχούς προσπάθειας των απανταχού επιστημόνων, για τον εντοπισμό μικροοργανισμών ικανών να παράγουν ουσίες με αντιμικροβιακές ιδιότητες. Η αναζήτηση αυτή έγινε ακόμη πιο έντονη σε περιοχές με πλούσιο μικροβιακό υπόστρωμα. Έτσι, το 1944 οι επιστήμονες του Πανεπιστημίου Rutgers, στο New Jersey των ΗΠΑ, εντόπισαν σε αγροτικά εδάφη επιβαρυμένα από κοπριά ζώων, τον μύκητα *Streptomyces griseus* από τον οποίο και απομονώθηκε η στρεπτομυκίνη. Στην συνέχεια, το 1947 ένας βοτανολόγος του Πανεπιστημίου Yale, μετά από ανάλυση χιλιάδων δειγμάτων εδάφους, κατάφερε να απομονώσει τον ακτινομύκητα *Actinomyces venezuelae*, ο οποίος ξεχώρισε για την παραγωγή μιας ουσίας με έντονες αντιμικροβιακές ιδιότητες την χλωρομυκετίνη. Η χλωρομυκετίνη, αποτέλεσε τη πρόδρομη ουσία για την παραγωγή της χλωραμφενικόλης, της πρώτης συνθετικής αντιμικροβιακής ουσίας. Ένα χρόνο αργότερα, απομονώθηκε η χλωροτετρακυκλίνη από τον ακτινομύκητα *Streptomyces aurofaciens*, η οποία και αποτέλεσε το πρωταρχικό βήμα της παραγωγής των υπόλοιπων τετρακυκλινών.

Οι τρέχουσες εξελίξεις μας φέρνουν στο 1958, όπου η επίτευξη διαφόρων χημικών παρεμβάσεων στο 6-αμινοπενικιλλανικό οξύ, οδηγεί στην παραγωγή των πρώτων ημισυνθετικών πενικιλλινών. Τέλος, το 1960 αρχίζει η σύνθεση των κεφαλοσπορινών, μετά την ανακάλυψη του μύκητα *Cephalosporium* και του παραγώγου του, 7-αμινοκεφαλοσπορανικού οξέος. Σήμερα γνωρίζουμε ότι

οι κύριες πηγές παραγωγής αντιμικροβιακών παραγόντων, μπορούν να διαχωρισθούν σε μεταβολίτες μυκητών (π.χ. *Penicillium spp., Streptomyces spp.,* κ.λ.π.), σε ημισυνθετικές παραλλαγές φυσικών ουσιών (π.χ. παραγωγή ημισυνθετικών πενικιλλινών από τη βενζυλοπενικιλλίνη), σε συνθετικές ουσίες (π.χ. χλωραμφενικόλη) και σε βακτηρίδια (π.χ. *Bacillus spp.*). Οι ημισυνθετικές πενικιλλίνες, όπως η μεθικιλλίνη, η αμπικιλλίνη και η αμοξυκιλλίνη, φάνηκε να δίνουν τη λύση στο πρόβλημα της αντοχής των βακτηρίων στην πενικιλλίνη. Όμως και πάλι τα βακτήρια είχαν τον τελευταίο λόγο, αφού μέχρι σήμερα υπάρχει το μεγάλο πρόβλημα των στελεχών που είναι ανθεκτικά στην μεθικιλλίνη. Σχετικά πρόσφατα αναπτύχθηκε μια νέα κατηγορία αντιβιοτικών, ευρέως φάσματος, οι φλουοροκινολόνες οι οποίες έχουν την ικανότητα να φθάνουν γρήγορα στο αίμα σε υψηλές συγκεντρώσεις. Σήμερα, η εργαστηριακή έρευνα για την ανάπτυξη νέων πιο δραστικών αντιβιοτικών έχει επιβραδυνθεί, λόγω διαφόρων ανασταλτικών παραμέτρων. Δεδομένου ότι πλέον οι φαρμακοβιομηχανίες δύσκολα παίρνουν έγκριση για νέα φάρμακα, σε συνδυασμό με το τεράστιο χρονικό διάστημα που μεσολαβεί μεταξύ της ανακάλυψης ενός νέου αντιβιοτικού και της έγκρισης του για μαζική παραγωγή και χρήση, ωθεί μερικές εταιρείες να εγκαταλείπουν τον τομέα της έρευνας. Βέβαια, ο κυριότερος ανασταλτικός παράγοντας στην ανάπτυξη της έρευνας νέων αντιβιοτικών είναι οι ταχείς ρυθμοί με τους οποίους τα βακτήρια αναπτύσσουν αντοχές στα νέα αντιβιοτικά, καταδικάζοντας έτσι την οποιαδήποτε προσπάθεια έρευνας με απώλειες σε επενδύσεις ετών [De Kruif Paul 1926, Anonymous 2006].

2.3 Η ΧΡΗΣΗ ΤΩΝ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΩΝ ΣΤΗΝ ΚΤΗΝΙΑΤΡΙΚΗ

Εδώ και μισό αιώνα, τα αντιβιοτικά τυχαίνουν ευρείας χρήσης τόσο στη κτηνιατρική όσο και στη κτηνοτροφία, κυρίως για τη θεραπεία ζώων που ασθενούν λόγο κάποιας βακτηριακής λοίμωξης αλλά και για την προφύλαξη των ζώων από πιθανές ασθένειες. Αρχικά στην κτηνιατρική, η χρήση των αντιβιοτικών γινόταν εμπειρικά χωρίς να καθορίζεται η πρέπουσα χορηγούμενη δόση σύμφωνα με τα πειραματικά δεδομένα. Χρειάστηκαν περίπου σαράντα με πενήντα χρόνια μέχρις ότου γίνει εφικτός ο σωστός προσδιορισμός της δοσολογίας με βάση τα πειραματικά ποσοτικά δεδομένα πολλαπλών ανεξάρτητων μελετών, συμπεριλαμβανομένου του συνδυασμού φαρμακοκινητικών με φαρμακοδυναμικές παραμέτρους, την *in vitro* ευαισθησία του κάθε αντιβιοτικού και τα κλινικά δεδομένα της χρήσης των φαρμάκων [Prescott 2006]. Με τον ίδιο τρόπο με τον οποίο τα αντιβιοτικά αποτέλεσαν επανάσταση στην ιατρική, αποτέλεσαν επανάσταση και στην κτηνιατρική. Έτσι η χρήση των αντιβιοτικών στην κτηνιατρική πράξη, έδωσε την θεραπεία σε πολλά λοιμώδη νοσήματα, περιορίζοντας την εμφάνιση και εξάπλωση των μεταδοτικών νοσημάτων τα οποία παλιά προκαλούσαν εκτεταμένες επιζωοτίες (επιδημίες ή ενδημίες). Η χρήση των αντιβιοτικών στην κτηνιατρική με τις

σημαντικότερες ιστορικές αναφορές και αντίστοιχα σε ιατρική και κτηνιατρική χρήση παρουσιάζεται στον πίνακα 5 [Prescott 2006].

Πίνακας 5: Εξελικτική πορεία της ανακάλυψης και χρήσης αντιμικροβιακών ουσιών για ιατρική και κτηνιατρική χρήση [Prescott 2006]**.**

Έτος	Ιατρική Χρήση	Κτηνιατρική Χρήση
1925-30	Ανακάλυψη της πενικιλλίνης, του πρώτου β-λακταμικού αντιβιοτικού.	
1931-35	Ανακάλυψη των σουλφοναμιδών.	
1936-40	Πρώτη χρήση της πενικιλλίνης στον άνθρωπο.	Πρώτη χρήση των σουλφοναμιδών στη ζωική παραγωγή.
1941-45	Ανακάλυψη της στρεπτομυκίνης, της πρώτης αμινογλυκοσίδης.	Β' Παγκόσμιος Πόλεμος και χρήση αντιμικροβιακών για την θεραπεία δερματικών πληγών.
1946-50	Ανακάλυψη της βακιτρακίνης, της χλωραμφενικόλης, της νεομυκίνης, της πολυμυξίνης, της στρεπτογραμμίνης και της τετρακυκλίνης.	Η πενικιλλίνη εκτός από τους στρατιώτες χορηγείται τώρα και σε απλούς πολίτες. Ευρεία, αλλά εμπειρική χρήση στα ζώα μέχρι τη δεκαετία του '50.
1951-55	Ανακάλυψη της ερυθρομυκίνης, του πρώτου μακρολιδίου.	Χρήση της νεομυκίνης στα ζώα. Τετρακυκλίνες και χλωραμφενικόλη χορηγούνται εμπειρικά στα ζώα. Ενδομαστική χορήγηση αντιβιοτικών σε αγελάδες.
1956-60	Ανακάλυψη της βανκομυκίνης, του πρώτου γλυκοπεπτιδίου, και της τυλοζίνης, ενός νέου μακρολιδίου	Η επιλογή της δόσης στα ζώα συνεχίζει να γίνεται εμπειρικά. Η Δανία γίνεται η πρώτη χώρα που παρουσιάζει επίσημα μελέτες για τη διασπορά των φαρμάκων σε τρόφιμα και στο περιβάλλον.
1961-65	Ανακάλυψη της μεθικιλλίνης και άλλων ανθεκτικών στις Πενικιλλινάσες πενικιλλινών. Ανακάλυψη της γενταμικίνης.	Ανακάλυψη του μεταφερόμενου πλασμιδίου –R–, και της πολλαπλούς αντοχής των εντεροβακτηριοειδών. Δημοσιεύονται οι πρώτες μελέτες για τα κατάλοιπα φαρμάκων και γίνονται αποσύρσεις.

1966-70	Ανακάλυψη της κεφαλοθίνης. Η αμικασίνη χρησιμοποιείται ως υποκατάστατο για τις ανθεκτικές στη γενταμικίνη μολύνσεις.	Χρήση αμπικιλλίνης στα ζώα. Πολυανθεκτικά στελέχη σαλμονέλας μεταδίδονται από τα βοοειδή στον άνθρωπο. Στη Βρετανία προτείνεται η κατάργηση χρήσης στην τροφή των ζώων σημαντικών για τον άνθρωπο αντιβιοτικών. Τα φάρμακα χορηγούνται στα ζώα μόνο με κτηνιατρική συνταγή.
1971-75	Ανακάλυψη της καρμπενικιλλίνης. Πρώτη χρήση του συνδυασμού τριμεθοπρίμης-σουλφοναμίδων.	Το 1972 ο FDA προτείνει την κατάργηση της χορήγησης πενικιλλίνης και τετρακυκλίνης, μέσω τροφής, σε υποθεραπευτικές δόσεις στα ζώα. Οι ΗΠΑ απαγορεύουν την χρήση χλωραμφενικόλης στα ζώα, λόγω τοξικότητας των καταλοίπων στον άνθρωπο.
1976-80	Ανακάλυψη της κεφοξιτίνης.	Μετάδοση πολυανθεκτικής *S. Enterica* από βοοειδή στον άνθρωπο. Μελέτες φαρμακοκινητικής και μεταβολισμού των φαρμάκων στα ζώα. Απαγόρευση της χρήσης νιτροφουρανίων σε παραγωγικά ζώα.
1981-85	Ανακάλυψη της κεφοταξίμης.	Κτηνιατρική χρήση των ευρέος φάσματος αναστολέων των β-λακταμασών σε συνδυασμό με αμινοπενικιλλίνες. Η δόση των αντιμικροβιακών φαρμάκων στα ζώα προσδιορίζεται βάση πειραματικών μελετών.
1986-90	Γίνεται η πρώτη χρήση κινολονών και φθοριοκινολονών στον άνθρωπο.	Χρησιμοποιείται για πρώτη φορά η κεφτιοφούρης στα ζώα. Αντενδείκνυται η χρήση αμινογλυκοσιδών σε παραγωγικά ζώα, λόγω παρουσίας καταλοίπων στους νεφρούς.
1991-95	Χορηγείται αζιθρομυκίνη και άλλες βελτιωμένες μακρολίδες στον άνθρωπο.	Χορηγείται στα ζώα η τιλμικοσίνη (μακρολίδιο), η τιαμουλίνη (πλευρομουτιλλίνες) και η φορφενικόλη. Οι φθοριοκινολόνες χορηγούνται εκλεκτικά σε ζώα (πρώτη

		χρήση φθοριοκινολονών σε πτηνά στις ΗΠΑ).
1996-2000	Χορηγούνται πλέον ευρέος φάσματος κεφαλοσπορίνες στον άνθρωπο.	Πρώτη χορήγηση φθοριοκινολονών στα βοοειδή για οξεία πνευμονία, στις ΗΠΑ. Παρουσία ανθεκτικών στην βανκομυκίνη στελεχών εντεροκόκκων, συσχετιζόμενών με τη χρήση αβοπαρσίνης σε παραγωγικά ζώα στην Ευρώπη. Ο WHO προτείνει την απόσυρση όλων των αντιμικροβιακών ουσιών που χρησιμοποιούνται ως αυξητικοί παράγοντες στη διατροφή των ζώων. Παγκόσμια ανησυχία για πολυανθεκτική *S. Enterica*.
2001-2005	Συναγερμός λόγω μικροβιακής αντοχής. Παγκόσμια προσπάθεια για καταστολή του φαινομένου.	Ο WHO συνιστά την καθιέρωση της κτηνιατρικής συνταγής, του εθνικού προγράμματος επιτήρησης και της απαγόρευσης προσθήκης στις ζωοτροφές αντιβιοτικών σημαντικών για την ιατρική.
2006-2008	Προσπάθειες για αντιμετώπιση του φαινομένου της μικροβιακής αντοχής.	Προσπάθειες για αντιμετώπιση του φαινομένου της μικροβιακής αντοχής.

Τα αντιβιοτικά πέρα της θεραπευτικής τους χρήσης στην ιατρική και κτηνιατρική, χρησιμοποιούνται ευρέως και στη γεωργία, κτηνοτροφία και τις ιχθυοκαλλιέργειες, με στόχο τη διασφάλιση της βιωσιμότητας των ζώων και ιχθύων, αλλά και την αύξηση της παραγωγής ζωικών και γεωργικών προϊόντων. Στις περισσότερες ευρωπαϊκές χώρες, τα αντιβιοτικά αποτελούν τη δεύτερη σημαντικότερη χρησιμοποιούμενη κατηγορία φαρμάκων μετά από τα απλά αναλγητικά. Δυστυχώς, σήμερα η ανθρωπότητα πληρώνει ένα ιδιαίτερα υψηλό τίμημα εξαιτίας της προσέγγισης αυτής, με ανησυχητική αύξηση των αντιβιοανθεκτικών στελεχών που απομονώνονται από τρόφιμα και προορίζονται για ανθρώπινη κατανάλωση. Η υπερβολική και σε πολλές περιπτώσεις ακατάλληλη χρήση τους στην ιατρική και κτηνιατρική, καθώς και στη γεωργία, οδήγησε στην ταχεία αύξηση της εξάπλωσης ανθεκτικών μικροοργανισμών. Το γεγονός αυτό έχει δυσμενείς συνέπειες στη δημόσια υγεία, με σημαντικό παράδειγμα την ανάπτυξη τροφιμογενών παθογόνων

μικροοργανισμών, ανεπτυγμένης ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά, με συνέπειες όπως –

- Την ενίσχυση της παθογόνου δράσης του βακτηρίου, με αποτέλεσμα την ενίσχυση μιας νόσου και της επέκτασης του χρόνου νόσησης.
- Την αύξηση του κινδύνου μόλυνσης, με παθογόνα, ανθρώπων που κάνουν ήδη χρήση αντιμικροβιακών φαρμάκων, για την καταπολέμηση άλλων νόσων (λόγω μείωσης της ανθεκτικότητας αποικισμού), φαινόμενο που παρατηρείται πολύ συχνά στα ανθεκτικά στελέχη *Salmonella spp*. και την ανάπτυξη αντοχής σε μη παθογόνα βακτήρια.
- Τη δημιουργία μιας δεξαμενής γονιδίων αντιβιοαντοχής, που μπορούν να μεταφερθούν σε άλλα παθογόνα του ανθρώπου.
- Την αναποτελεσματικότητα δράσης του αντιβιοτικού, με αποτέλεσμα την αύξησης της δόσης του, παράταση του χρόνου χορήγησης και αύξηση του κόστους της θεραπείας.
- Την ανάπτυξη ανθεκτικών παθογόνων βακτηρίων που προκαλούν ζωονόσους και την διασπορά ζωονόσων στο ζωικό κεφάλαιο, με κίνδυνο την άμεση ή έμμεση μόλυνση του ανθρώπου [Γούσια και Παπαδοπούλου 2009].

Από τις αρχές της δεκαετίας του '50, τα αντιβιοτικά έγιναν το πρώτο εργαλείο χρήσης των κτηνοτρόφων στην εκτροφή των ζώων. Κι αυτό γιατί, η ικανότητα των αντιβιοτικών να καταπολεμούν και σε μεγάλο βαθμό να θεραπεύουν λοιμώδεις ασθένειες, που προηγουμένως ήταν μοιραίες, δημιούργησε την εντύπωση ότι είναι 'θαυματουργά φάρμακα' με δυνατότητες που υπερβαίνουν σε μεγάλο βαθμό εκείνες που μπορούν να αποδοθούν στις πραγματικές φαρμακευτικές ιδιότητές τους. Έκτοτε, η προσθήκη αντιβιοτικών στην τροφή των ζώων σημείωσε σημαντική αυξητική πορεία, ως μέτρο αντιμετώπισης της φτωχής διαβίωσης των ζώων λόγω συνωστισμού, των κακών συνθήκων υγιεινής και της επιδιωκόμενης αύξησης του σωματικού τους βάρους. Τρανταχτό παράδειγμα αποτελούν οι ΗΠΑ, όπου έρευνες κατέδειξαν ότι το 40% της συνολικής κατανάλωσης αντιβιοτικών προορίζεται για τα εκτρεφόμενα ζώα. Η αμετροεπής ακριβώς χρήση των αντιβιοτικών, ευθύνεται απόλυτα για την ανάπτυξη της αντίστασης των παθογόνων μικροβίων έναντι των αντιμικροβιακών ουσιών, ενώ την χλωρίδα των ζώων αποικίζουν πλέον ανθεκτικά στα αντιβιοτικά μικρόβια, τα οποία κυρίως με την επαφή και πολύ λιγότερο με τη βρώση κρέατος, είναι δυνατό να μεταφερθούν στον άνθρωπο. Η κατανάλωση προϊόντων ζωικής παραγωγής, που περιέχουν υπολείμματα αντιβιοτικών, συντείνει εντέλει στην μείωση της αποτελεσματικότητας των αντιμικροβιακών ουσιών οδηγώντας έτσι σε μια αποτυχημένη αντιμετώπιση των βακτηριακών λοιμώξεων. Τέτοιες ατυχείς θεραπείες, ευνοούν τελικά την ανάπτυξη ζωονόσων, από ανθεκτικά παθογόνα βακτήρια, αλλά και την μεταφορά ανθεκτικών βακτηρίων, παθογόνων για τον άνθρωπο. Τραγική ειρωνεία αποτελεί το γεγονός ότι ο ίδιος ο Φλέμινγκ είχε δει την αχίλλειο πτέρνα του αντιβιοτικού του από τα πρώτα κιόλας χρόνια της χρήσης του, καθώς το

1946 σημείωσε ότι «η χορήγηση πενικιλλίνης, ακόμη και σε μικρές δόσεις, οδηγούσε σε ανάπτυξη ανθεκτικότητας στους μικροοργανισμούς».

2.4 ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗ ΑΝΤΟΧΗ ΣΕ ΜΟΡΙΑΚΟ ΕΠΙΠΕΔΟ

2.4.1 Το βιολογικό φαινόμενο των μηχανισμών δράσης των αντιμικροβιακών ουσιών

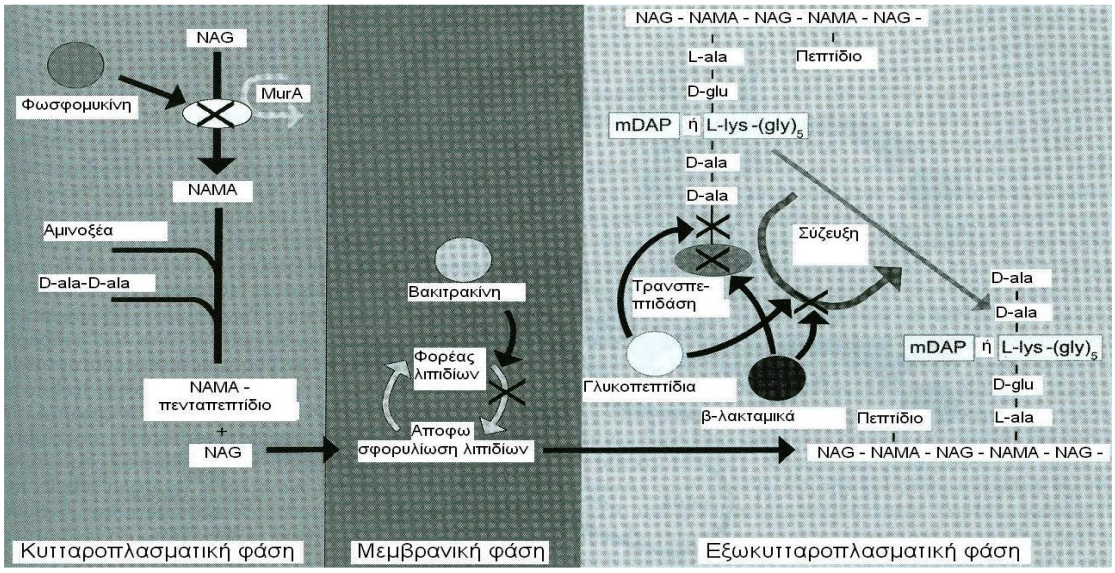
Με τον όρο 'αντίσταση' ενός βακτηριδίου, έναντι ενός η περισσοτέρων αντιμικροβιακών, ορίζεται ως η ικανότητα του βακτηριδίου να εξουδετερώνει τη δράση του αντιμικροβιακού εναντίον του. Ο κύριος μηχανισμός αυτής της δράσης έχει δύο εκφάνσεις και αφορά την αλλαγή της μεταβολικής αλυσίδας, η οποία αποτελεί το σημείο εκδήλωσης της δράσης του αντιμικροβιακού, αλλά και την παραγωγή ενζύμων που διασπούν το αντιμικροβιακό. Χαρακτηριστικό παράδειγμα του τελευταίου τρόπου δράσης, αποτελούν τα ένζυμα β-λακταμάσες, τα οποία διασπούν ορισμένα β-λακταμικά αντιμικροβιακά. Οι μεταβολές αυτές είναι μόνιμες και πρόκειται για αλλαγές που μεταβιβάζονται στις επόμενες γενιές και επιπρόσθετα, πολλές φορές η αντίσταση που αναπτύσσεται έναντι ενός αντιμικροβιακού, αφορά συγχρόνως και άλλα αντιμικροβιακά που διαθέτουν τον ίδιο μηχανισμό δράσης. Το φαινόμενο αυτό αποκαλείται «*διασταυρούμενη αντίσταση*» και παρατηρείται μεταξύ αντιμικροβιακών ίδιας ομάδας, π.χ. τετρακυκλινών ή μακρολιδίων. Η ανάπτυξη αντίστασης δεν είναι ικανότητα που χαρακτηρίζει όλα τα μικρόβια και υπάρχουν μικρόβια που δεν ανέπτυξαν αντίσταση σε κάποιο αντιβιοτικό, παρά τη χρόνια χρήση αντιμικροβιακών εναντίον τους. Τέτοιο παράδειγμα αποτελεί ο στρεπτόκοκκος της πνευμονίας *Streptococcus pneumoniae* που παρά τη χρήση της πενικιλλίνης G για 30 χρόνια δεν κατάφερε να αναπτύξει αντίσταση εναντίον της.

Σχετικά με τον μηχανισμό δράσης, ο αντιμικροβιακός παράγοντας προκειμένου να αναχαιτίσει την ανάπτυξη ενός μικροοργανισμού, πρέπει να αλληλοεπιδράσει με κάποια ζωτικής σημασίας δομή του βακτηριακού κυττάρου, ή να εμποδίσει την ομαλή λειτουργία κάποιας μεταβολικής οδού. Η αντιβακτηριακή δράση οφείλεται στην αναστολή των βιοχημικών οδών που σχετίζονται με τη βιοσύνθεση των βιολογικών μακρομορίων του βακτηριακού κυττάρου. Σημαντικό κλινικό ενδιαφέρον παρουσιάζει η ταξινόμηση των αντιμικροβιακών, βάση του μηχανισμού δράσης τους. Οι κυριότεροι βακτηριακοί στόχοι των αντιμικροβιακών παραγόντων είναι η βιοσύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος, η βιοσύνθεση των πρωτεϊνών, η βιοσύνθεση των πυρηνικών οξέων και η αναστολή της φυσιολογικής λειτουργίας της κυτταροπλασματικής τους μεμβράνης [Guardabassi και Courvalin 2006].

2.4.2 Αναστολή της σύνθεσης του κυτταρικού τοιχώματος

Τα μικρόβια περιβάλλονται από προστατευτικό τοίχωμα, το οποίο τα θωρακίζει έναντι των μεταβολών της ωσμωτικής πίεσης του περιβάλλοντος και άλλων μηχανικών επιδράσεων που μπορεί να έχουν αντίκτυπο σε αυτά. Επιπλέον, το κυτταρικό τοίχωμα προσδίδει σχήμα και σχετική ακαμψία και αποτελεί απαραίτητο οργανίδιο για την ακεραιότητα και κινητικότητα του κυττάρου, την μόλυνση του ξενιστή και την οριζόντια μεταφορά γενετικού υλικού. Τυχόν λύση του τοιχώματος, καθιστά τα μικρόβια ευάλωτα στις επιβλαβείς αυτές επιδράσεις.

Με βάση τη χημική σύσταση του μικροβιακού τοιχώματος, τα μικρόβια διαχωρίζονται σε κατά Gram θετικά και κατά Gram αρνητικά. Συγκεκριμένα, το τοίχωμα των κατά Gram θετικών συνίσταται κυρίως από μια ετεροπολυμερή ουσία το μουκοπεπτίδιο πεπτιδογλυκάνη (μουρεϊνη), ενώ αντιθέτως στο τοίχωμα των κατά Gram αρνητικών η ουσία αυτή παρατηρείται σε ποσοστό μόλις 4-5%. Η λιποπολυσακχαριτική στιβάδα πεπτιδογλυκάνης αποτελείται από δύο παράγωγα σακχάρων, την N-ακετυλο-γλυκοζαμίνη (NAG) και το N-ακετυλο-μουραμικό οξύ (NAM) και από μια μικρή ομάδα αμινοξέων [Madigan κ.ά. 2005]. Το ένζυμο τρανσπεπτιδάση ενώνει την πενταγλυκίνη ενός μορίου NAM με την D-αλανίνη του πενταπεπτιδίου ενός άλλου μορίου NAM, στο ελεύθερο άκρο του οποίου βρίσκεται το διπεπτίδιο D-αλανίνη-D-αλανίνη. Με το μηχανισμό αυτό επιτυγχάνεται δεσμός και ο σχηματισμός του κυτταρικού τοιχώματος, ενώ παράλληλα η τελευταία D-αλανίνη αποβάλλεται.



Εικόνα 11: Αναστολή της σύνθεσης του κυτταρικού τοιχώματος
(**NAG** N-ακετυλογλυκοζαμίνη, **NAMA** N-ακετυλομουραμικό οξύ, **ala** αλανίνη, **glu** γλουταμικό οξύ, **lys** λυσίνη, **gly** γλυκίνη, **mDAP** μεσοδιαμινοπιμελικό οξύ).

Οι αντιμικροβιακές ουσίες της κατηγορίας αυτής, δρουν μέσω αναστολής του σχηματισμού της πεπτιδογλυκάνης σε διάφορα στάδια σύνθεσης, δικαιολογώντας έτσι την κυρίαρχη δράση τους έναντι των κατά Gram θετικών μικροβίων. Συγκεκριμένα, στην κατηγορία αυτή ανήκουν τα β-λακταμικά

αντιμικροβιακά (πενικιλλίνες, κεφαλοσπορίνες), η βανκομυκίνη, η κυκλοσερίνη, η ριστοσετίνη, η βακιτρακίνη και η νοβοβιοκίνη. Τα β-λακταμικά αντιβιοτικά παρεμποδίζουν την τρανσπεπτιδίωση της πεπτιδογλυκάνης, στο τελικό στάδιο της σύνθεσης του κυτταρικού τοιχώματος. Η τρανσπεπτιδίωση είναι ο σχηματισμός πεπτιδικών δεσμών μεταξύ καταλοίπων μουραμικού (NAM) σε παρακείμενες αλυσίδες γλυκάνης [Madigan κ.ά. 2005]. Τα β-λακταμικά αντιβιοτικά συνδέονται χαρακτηριστικά με έναν αριθμό πρωτεϊνών, απαραίτητων για την σύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος, γνωστές ως πενικιλλινο-δεσμευτικές πρωτεΐνες (*Penicillin Binding Proteins, PBPs*). Τα γλυκοπεπτίδια βανκομυκίνη, τεϊκοπλανίνη και ο αυξητικός παράγοντας αβοπαρσίνη, σχηματίζουν ισχυρούς δεσμούς με το διπεπτίδιο D-αλανίνη-D-αλανίνη, με αποτέλεσμα την αναστολή της δράσης των τρανσπεπτιδασών [Guardabassi και Courvalin 2006].

2.4.3 Αναστολή της πρωτεϊνικής σύνθεσης των βακτηρίων

Ουσίες όπως η σπεκτινομυκίνη, οι λινκοσαμίδες, οι τετρακυκλίνες, η χλωραμφενικόλη, οι αμινογλυκοσίδες και τα μακρολίδια, αναστέλλουν την πρωτεϊνοσύνθεση επεμβαίνοντας κυρίως στη ριβοσωμική λειτουργία σε διάφορα στάδιά μέσα στο κυτταρόπλασμα. Οι πρωτεΐνες είναι απαραίτητες για την επιβίωση ενός βακτηρίου λόγω της πρωτεϊνικής φύσεως των ενζύμων και των κυτταρικών του δομών. Η βιοσύνθεση των πρωτεϊνών δεν είναι ένας απλός μηχανισμός, ξεκινά με την μεταγραφή του DNA σε mRNA και ολοκληρώνεται με την μετάφραση και την μετάθεση του mRNA. Από αυτές τις βιολογικές διαδικασίες ο συχνότερος στόχος των αντιμικροβιακών φαρμάκων είναι η μετάφραση. Στο στάδιο αυτό το βακτηριακό ριβόσωμα διαβάζει το mRNA και το μεταφράζει σε αμινοξική αλυσίδα. Τα περισσότερα φάρμακα δρουν ως αναστολείς της μετάφρασης, δημιουργώντας δεσμούς σε ειδικές θέσεις του ριβοσώματος με άμεση συνέπεια την αναστολή της λειτουργίας του [Guardabassi και Courvalin 2006].

Τα ριβοσωμάτια των μικροβίων με βάση το μέτρο πυκνότητας κατατάσσονται στην ομάδα 70S, ενώ των θηλαστικών στην ομάδα 80S. Οι δύο αυτοί τύποι ριβοσωμάτων χωρίζονται σε υποομάδες οι οποίες διαφέρουν ως προς τη χημική σύνθεση και λειτουργία τους. Η επιλεκτική δράση των αντιμικροβιακών ουσιών στα μικροβιακά κύτταρα, γίνεται ακριβώς βάση του διαχωρισμού των ριβοσωμάτων χωρίς να δρουν στα κύτταρα του ξενιστή. Συγκεκριμένα, οι αμινογλυκοσίδες, η σπεκτινομυκίνη και οι τετρακυκλίνες ενώνονται με την 30S ριβοσωμική υποομάδα του 70S-μέλους του ριβοσώματος των μικροβίων, αναστέλλοντας την παραγωγή πρωτεϊνικής φύσης ουσιών, όπως είναι τα ένζυμα. Αντίθετα, η χλωραμφενικόλη, τα μακρολίδια και οι λινκοσαμίδες δρουν εκλεκτικά στην υποομάδα 50S, αναστέλλοντας τη δράση της πεπτιδυλοτρανσφεράσης και την παραγωγή διπεπτιδίων.

2.4.4 Αναστολή της σύνθεσης πυρηνικών οξέων

Ο μηχανισμός δράσης των αντιμικροβιακών παραγόντων που ανήκουν στην κατηγορία αυτή γίνεται μέσω αναστολής, σε κάποιο στάδιο, της σύνθεσης των πυρηνικών οξέων. Η βιοσύνθεση των πυρηνικών οξέων είναι ζωτικής σημασίας

για το βακτηριακό κύτταρο. Συγκεκριμένα, η βιοσύνθεση του DNA επιτρέπει την αντιγραφή του βακτηριακού χρωμοσώματος κατά την κυτταρική διαίρεση, ενώ η βιοσύνθεσή του RNA επιτρέπει την έκφραση γονιδίων και την πρωτεϊνοσύνθεση με την μεταγραφή του DNA σε RNA [Guardabassi και Courvalin 2006]. Στην ομάδα αυτή ανήκουν οι κινολόνες, η τριμεθοπρίμη, η νοβοβιοκίνη, η ριφαμπικίνη και οι σουλφοναμίδες. Οι κινολόνες και τα κουμαρινικά αναστέλλουν την σύνθεση του DNA, ενώ οι ριφαμπικίνες επηρεάζουν την σύνθεση του RNA [Guardabassi και Courvalin 2006]. Οι διάφορες κατηγορίες αντιμικροβιακών ουσιών της κατηγορίας αυτής στοχεύουν κυρίως σε δύο ένζυμα την τοποϊσομεράση ΙΙ, αλλιώς DNA-γυράση και την τοποϊσομεράση IV. Τα ένζυμα αυτά είναι απαραίτητα για την αποδιάταξη του DNA. Έτσι, μοιραία η αναστολή της σύνθεσης του DNA προκαλεί και το θάνατο του κυττάρου.

Η DNA–γυράση αποτελείται από δύο υπομονάδες A (GyrA) και δύο B (GyrB), που κωδικοποιούνται αντίστοιχα από τα γονίδια gyrA και gyrB. Η τοποϊσομεράση IV έχει την ίδια τετραμερή δομή, με την διαφορά ότι οι δύο A υπομονάδες και οι δύο B κωδικοποιούνται αντίστοιχα από τα parC και parE γονίδια. Η DNA-γυράση αποτελεί τον κύριο στόχο στα Gram αρνητικά βακτήρια, όπως φαίνεται από τη συχνότητα μετάλλαξης του γονιδίου gyrA. Αντιθέτως, η τοποϊσομεράση IV αποτελεί τον κύριο στόχο των αντιβιοτικών στα Gram θετικά βακτηρία, καθώς η αντοχή έναντι αυτών των φαρμάκων σχετίζεται με μεταλλάξεις του γονιδίου parC [Schmitz κ.ά 2002]. Οι κινολόνες συγκεκριμένα, δεν αναστέλλουν άμεσα τη δράση της τοποϊσομεράσης, αλλά αλληλεπιδρούν με το ενζυμο-εξαρτώμενο σύμπλεγμα DNA. Ενώ, ο μηχανισμός που οδηγεί στην συσσώρευση αυτών των συμπλεγμάτων και στην επερχόμενη θανάτωση του κυττάρου δεν είναι ακόμη σαφής [Guardabassi και Courvalin 2006].

2.4.5 Αναστολείς της φυσιολογικής λειτουργίας της κυτταρικής μεμβράνης

Το βακτηριακό τοίχωμα, περικλείει την κυτταροπλασματική μεμβράνη, η οποία λειτουργεί ως βιολογικός φραγμός και μέσω της παθητικής διάχυσης ή ενεργής μεταφοράς, συντελεί στην διάβαση διαφόρων μορίων από και προς το κυτταρόπλασμα. Οποιαδήποτε διαταραχή της λειτουργίας αυτής, επιφέρει λύση και καταστροφή του μικροβιακού κυττάρου. Η νυστατίνη, η τυροσετίνη, η πολυμυξίνη B, η αμφοτερικίνη B και η πολυμυξίνη E (κολιστίνη), έχουν την ικανότητα να διαταράσσουν με διάφορους τρόπους τη λειτουργία της μικροβιακής κυτταρικής μεμβράνης. Το γεγονός ότι η δομή της κυτταρικής μεμβράνης των βακτηρίων διαφέρει μεταξύ μικρο- και μακρο-οργανισμών, αποτελεί τη βάση της επιλεκτικής δράσης των αντιμικροβιακών επί των διάφορων μικροβίων. Χαρακτηριστικό παράδειγμα της κατηγορίας αυτής αποτελούν οι πολυμυξίνες, οι οποίες καταστρέφουν εκλεκτικά τη λιποπρωτεϊνική δομή της μεμβράνης των κατά Gram αρνητικών μικροβίων, δρώντας ως κατιονικά απορρυπαντικά.

2.5 ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΒΑΣΗ ΤΗΣ ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗΣ ΑΝΤΟΧΗΣ

2.5.1 Γενετικό υπόβαθρο της αντοχής

Η εισαγωγή στη θεραπευτική κάθε νέας αντιμικροβιακής ουσίας έχει ως φυσικό επακόλουθο την ανάπτυξη μικροβιακής αντοχής. Μικροβιακή αντοχή ονομάζεται η κατάσταση όπου ένας μικροοργανισμός παρουσιάζει ανθεκτικότητα σε κάποιο ή κάποια αντιβιοτικά του φάσματος του. Η κατάσταση αυτή οφείλεται σε μεταβολές στο γενετικό υλικό του μικροοργανισμού, που εμφανίζονται είτε ως μεταλλαγές σε κάποιο ή κάποια γονίδια ή, συνηθέστερα, με την μεταφορά πλασμιδίων, μεταθετών στοιχείων (τρανσποζονίων), ιντεγρονίων, φάγων και άλλων, στο νέο(-α) γονίδιο(-α) μέσω 'μόλυνσης' του μικροοργανισμού (Πίνακας 6) [Βατόπουλος]. Τα βακτήρια έχουν αναπτύξει στρατηγικές επιβίωσης, ώστε να υπερνικήσουν την καταστρεπτική δράση των αντιβιοτικών. Οι στρατηγικές αυτές βασίζονται στη έκφραση γονιδίων και προσδίδουν αντοχή στα αντιβιοτικά συμβάλλοντας γενικότερα στην εξέλιξη του γονιδιώματος των βακτηρίων [Davies 1994].

Πίνακας 6: Είδη πρόσθετου γενετικού υλικού στο βακτηριακό κύτταρο.

Είδος Γενετικού Υλικού	Περιγραφή
Πλασμίδιο	Κυκλικό τμήμα DNA, μέσα στο μικροβιακό κύτταρο. Υπάρχει αυτόνομα από το «χρωμόσωμα» του μικροοργανισμού και έχει τη δυνατότητα να μεταφέρεται από κύτταρο σε κύτταρο.
Μεταθετό Στοιχείο	Τμήμα μορίου DNA (χρωμοσώματος ή πλασμιδίου) που έχει την ικανότητα να μετακινείται από μόριο σε μόριο.
Ιντεγρόνιο	Τμήμα μεταθετού στοιχείου στο οποίο μπορούν και ενσωματώνονται γονίδια.
Φάγος	Ιός που μολύνει βακτηριακό κύτταρα.

2.5.2 Ενδογενής – Επίκτητη αντοχή

Η αντοχή στα αντιβιοτικά διακρίνεται σε δύο τύπους.

(α) Την **ενδογενή αντοχή (*intrinsic resistance*)** όταν τα βακτήρια εκ φύσεως τους είναι ανθεκτικά σε κάποιο αντιβιοτικό, χωρίς να χρειάζεται να υποστούν τροποποίηση του γενετικού τους υλικού. Σε τέτοια περίπτωση, είναι ανθεκτικά όλα τα στελέχη ενός συγκεκριμένου είδους ή γένους [Mazel και Davies 1999]. Η ενδογενής αντοχή είναι κληρονομικό χαρακτηριστικό του μικροβίου και προκύπτει από τη φυσική, γενετική και δομική κατάσταση του. Χαρακτηριστικό παράδειγμα ενδογενούς αντοχής, αποτελεί το γένος *Klebsiella* που μέσω της παραγωγής β-λακταμασών είναι ανθεκτικό στη αμπικιλλίνη.

(β) Την **επίκτητη αντοχή (*acquired resistance*)** η οποία προκύπτει από αλλαγές της δομής και της φυσιολογίας, του γενετικού υλικού του βακτηρίου. Αυτό το είδος αντοχής, απαντάται σε ένα μόνο είδος ή γένος και βασίζεται

- στην τυχαία μετάλλαξη προϋπάρχοντος γονιδίου και

- στην οριζόντια μεταφορά εξωγενούς γενετικού υλικού.

Τα βακτήρια, χαρακτηρίζονται είτε από επίκτητη είτε από ενδογενή αντοχή αναπτύσσοντας ένα κοινό μονοπάτι άμυνας, έναντι των αντιμικροβιακών ουσιών. Οι μηχανισμοί μικροβιακής αντοχής μπορούν να χωριστούν στις ακόλουθες βασικές κατηγορίες:

- Την ενζυμική αδρανοποίηση του αντιμικροβιακού φαρμάκου
- Την τροποποίηση των στόχων δράσης των αντιμικροβιακών φαρμάκων και
- Τον περιορισμό της εισόδου του αντιμικροβιακού στο εσωτερικό του μικροβίου [Salyers και Whitt 2002].

Ο τελευταίος μηχανισμός αντοχής περιλαμβάνει την τροποποίηση των πορινών των Gram-αρνητικών βακτηρίων και την ενεργητική απέκκριση του αντιμικροβιακού φαρμάκου με τις αντλίες απέκκρισης, με τις οποίες τα αντιβιοτικά αντλούνται εκτός βακτηριακού κυτταροπλάσματος [Salyers και Whitt 2002, Guardabassi και Courvalin 2006].

2.5.3 Τυχαία μετάλλαξη προϋπάρχοντος γονιδίου

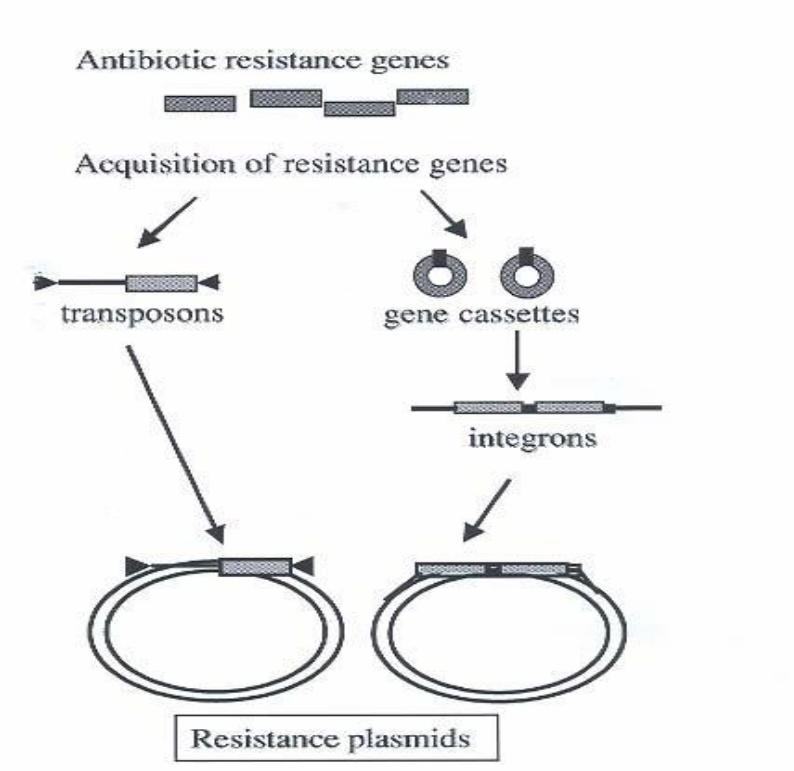
Στην περίπτωση αυτή, η μετάλλαξη των γονίδιων των μικροοργανισμών και ο ρόλος τους είναι περιορισμένος δεδομένου ότι αφορά ένα είδος ή μόνο μια ιδιότητα. Η μετάλλαξη περιλαμβάνει είτε μια απλή σημειακή μετάλλαξη σε μια μοναδική βάση του DNA, ή ένα ολόκληρο γονίδιο ή πολλά γονίδια μαζί που προκαλούν αλλαγή στο γονότυπο του βακτηρίου. Η μετάλλαξη αυτή μπορεί να είναι θανατηφόρος για το βακτήριο, αλλά μπορεί να είναι και 'σιωπηρή' χωρίς αλλαγές στο φαινότυπο του βακτηρίου, οπλίζοντας το απλά με την ικανότητα αντοχής και επιβίωσης. Μια απλή τυχαία μετάλλαξη σε ένα γονίδιο του βακτηρίου, μπορεί να οδηγήσει σε αντιβιοαντοχή χωρίς να επηρεάζεται η λοιμογόνος του δράση. Έτσι, η αντοχή σε αντιφυματικούς παράγοντες, όπως η στρεπτομυκίνη, οφείλεται σε μια απλή μετάλλαξη και η αντοχή στις κινολόνες οφείλεται σε μεταλλάξεις απλές – ενός βήματος –. Οι μεταλλάξεις αυτές, αλλάζουν την DNA γυράση ή προκαλούν αλλαγές στις πρωτεΐνες που σχηματίζουν πόρους στην εξωτερική μεμβράνη, με αποτέλεσμα την μείωση της διαπερατότητας του φαρμάκου [Hooper 2001, Hopkins κ.ά. 2005]. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι τα βακτήρια εμφανίζουν μεγάλο ποσοστό μεταλλάξεων, είτε γιατί έχουν ελαττωματικό σύστημα επιδιόρθωσης DNA είτε γιατί έχουν μικρή ικανότητα επαλήθευσης της ορθότητας αντιγραφής (*proofreading*) [Müller κ.ά. 1996, Bridges 2001]. Η συχνότητα μεταλλάξεων των βακτηρίων με μεγάλη αντιβιοαντοχή, είναι 1000 φορές μεγαλύτερη από ότι σε φυσιολογικά στελέχη, προδίδοντας έτσι την μεγάλη ικανότητα προσαρμογής των μεταλλαγμένων στελεχών (*mutators*) [Chopra κ.ά. 2003, Miller κ.ά. 2002].

Οι αυτόματες, τυχαίες μεταλλάξεις εμφανίζονται με συχνότητα μιας μετάλλαξης ανά 10^8 έως 10^9 κυτταρικές διαιρέσεις [Γιαμαρέλλου 2000]. Στην περίπτωση αυτή, οι μικροοργανισμοί παράγουν ένζυμα όπως ακετυλ-, αδενυλ-, ή φωσφοτρανσφεράσες, που επιφέρουν αδρανοποίηση των αντιμικροβιακών φαρμάκων (π.χ. αμινογλυκοσίδες ή χλωραμφενικόλη) [Davies 1994]. Επιπλέον, παρατηρείται τροποποίηση της δομής των στόχων-υποδοχέων των αντιμικροβιακών φαρμάκων, είτε με σημειακή μετάλλαξη (ανθεκτικότητα στη στρεπτομυκίνη) ή με σταδιακές μεταλλάξεις (ανθεκτικότητα στις φθοριοκινολόνες) [Roberts 1996], ή ακόμα με τροποποίηση της διαμόρφωσης

των ενζύμων που καταλύουν τη σύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος του βακτηρίου (ανθεκτικότητα στις β-λακτάμες) [Alekshun και Levy 2000]. Ένα απ' τα σημαντικότερα παραδείγματα μηχανισμών αντοχής στα αντιβιοτικά, είναι η υδρολυτική εξουδετέρωση του β-λακταμικού δακτυλίου των πενικιλλινών και των κεφαλοσπορινών, από τα ένζυμα β-λακταμάσες [Walsh 2000]. Επίσης, βακτήρια ανθεκτικά στις αμινογλυκοσίδες παράγουν μια σειρά ενζύμων, όπου μέσω εναπόθεσης διαφόρων χημικών ομάδων στην επιφάνεια τους τις τροποποιούν, καθιστώντας τις ανενεργές, μέσω παρεμπόδισης της πρόσδεσης τους στο RNA [Shaw κ.ά. 1993]. Άλλο παράδειγμα είναι οι αδενυλ-τρανφεράσες, οι οποίες προσθέτουν μόρια AMP, οι φωσφορυλ-τρανφεράσες που προσθέτουν φωσφορικές ομάδες, ενώ οι ακετυλ-τρανφεράσες ακετυλιώνουν τις αμινομάδες του αντίστοιχου αντιβιοτικού. Παρομοίως, αντοχή στη χλωραμφενικόλη επιτυγχάνεται μέσω παραγωγής μιας ακετυλ-τρανφεράσης, που την απενεργοποιεί [Shaw 1984].

2.5.4 Οριζόντια μεταφορά εξωγενούς γενετικού υλικού

Ο τρόπος αυτός περιλαμβάνει την απόκτηση γονιδίων ανθεκτικότητας μέσω μεταφοράς των, από έναν μικροοργανισμό σε άλλο. Η μεταφορά των γονιδίων ανθεκτικότητας από ένα βακτήριο σε άλλο, περιλαμβάνει την ενσωμάτωση τους σε κινητά γενετικά στοιχεία όπως είναι τα πλασμίδια (*plasmids*), τα μεταθετόνια ή τρανσποζόνια (*transposons*) και τα ενσωματόνια ή ιντεγκρόνια (*integrons*) που φέρουν γονιδιακές κασέτες (*gene casettes*). Αυτοί οι τύποι στοιχείων αποτελούνται από δίκλωνο DNA, αλλά διαφέρουν ευδιάκριτος στο μέγεθος, τη δομή, τις βιολογικές ιδιότητες καθώς επίσης και στους τρόπους μεταφοράς. Τα πλασμίδια, τα τρανσποζόνια και τα ενσωματόνια με τις γονιδιακές κασέτες, μεταδίδονται κάθετα κατά τη διάρκεια της διαίρεσης του κυττάρου ξενιστή. Παράλληλα, είναι δυνατόν να μεταφερθούν και οριζόντια μεταξύ βακτηρίων του ίδιου ή διαφορετικού είδους και γένους μέσω της μεταγωγής, της σύζευξης/κινητοποίησης ή του μετασχηματισμού [Bennett 1995, Schwarz και Noble 1999], που είναι διαδικασίες φυσικές μέσω των οποίων τα κύτταρα ανταλλάζουν γενετικό υλικό. Όταν τέτοια γονίδια ανθεκτικότητας μεταφέρονται μεταξύ διαφορετικών ειδών ή ακόμη και διαφορετικών γενών βακτηρίων, τότε είναι δυνατόν να υποστούν περαιτέρω μεταλλάξεις στον καινούργιο τους ξενιστή. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να προκύπτει μια ευρεία ποικιλία δομικά ετερογενών, αλλά λειτουργικά ομόλογων παραγόντων που επισφραγίζουν την ανθεκτικότητα [Roberts 1996]. Απόληξη των παραπάνω είναι η ταχεία διασπορά της αντοχής και η επικράτηση ανθεκτικών στα αντιβιοτικά στελεχών.



Εικόνα 12: Γενετικά καθορισμένα χαρακτηριστικά των μικροοργανισμών: πλασμίδια (resistance plasmids), τρανσποζόνια (transposons), ιντεγκρόνια (integrons), γονιδιακές κασέτες (gene casettes). Επιτρέπουν στα γονίδια να μετακινούνται μέσα στο γονιδίωμα ενός βακτηρίου ή μεταξύ των γονιδιωμάτων διαφορετικών βακτηρίων.

2.6 ΜΟΡΙΑΚΗ ΒΑΣΗ ΤΗΣ ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗΣ ΑΝΤΟΧΗΣ

2.6.1 Η αντοχή σε μοριακό επίπεδο

Η επικράτηση ανθεκτικών στελεχών οφείλεται σε κάποιες παραμέτρους, οι οποίες ουσιαστικά αποτελούν το γενετικό υπόβαθρο της ανθεκτικότητας. Ως γνωστόν, η γενωμική δεξαμενή των βακτηρίων, περιλαμβάνει τα σταθερά στοιχεία δηλαδή το βακτηριακό χρωμόσωμα και τα μεταθετά «ευέλικτα» στοιχεία τα πλασμίδια, τρανσποζόνια και ιντεγκρόνια που φέρουν γονιδιακές κασέτες. Τα γονίδια αντοχής, εδρεύουν τόσο στο βακτηριακό χρωμόσωμα όσο και στα μεταθετά στοιχεία και διακρίνονται σε –
(α) γονίδια αντοχής που αρχικά υπήρχαν σε βακτήρια ή μύκητες που παράγουν αντιβιοτικά για αυτοπροστασία, ή σε βακτήρια και μύκητες που δεν παράγουν αντιβιοτικά αλλά χρειάζονται τέτοιου είδους γονίδια για προστασία έναντι αντιμικροβιακών ουσιών που παράγονται από άλλους μικροοργανισμούς και (β) γονίδια αντοχής που έχουν προέλθει από βασικά γονίδια κλασσικών βιοχημικών διεργασιών και τα οποία πλέον έχουν την ικανότητα να τροποποιούν και να απενεργοποιούν τα αντιβιοτικά (π.χ. κινάσες σακχάρων και ακετυλτρανσφεράσες) [Davies 1994, Hawkey 2000].

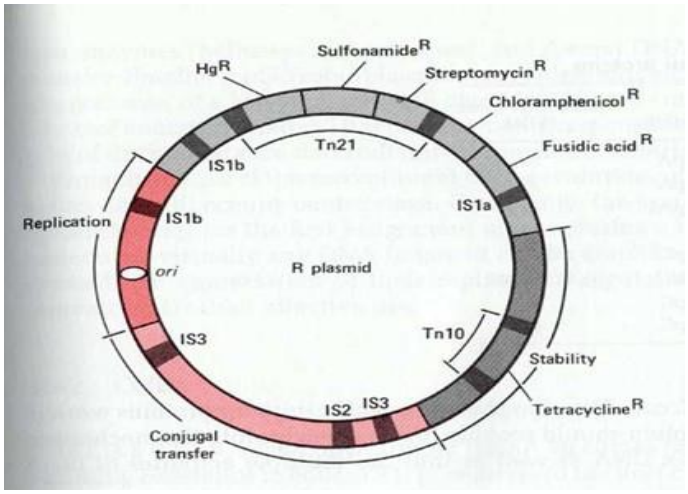
2.6.1.1 Πλασμίδια (plasmids)

Οι σημαντικότεροι και γνωστότεροι μηχανισμοί αντοχής στα αντιβιοτικά, εδρεύουν στα πλασμίδια. Τα πλασμίδια είναι εξωχρωμοσωμικά γενετικά

στοιχεία τα οποία έχουν ανιχνευθεί στα περισσότερα γένη βακτηρίων ιατρικής ή κτηνιατρικής σημασίας, αλλά και σε βακτήρια της φυσιολογικής χλωρίδας του δέρματος και των βλεννογόνων στον άνθρωπο και στα ζώα. Το τυπικό πλασμίδιο είναι ένα δίκλωνο κυκλικό μόριο DNA (υπάρχουν και αρκετά γραμμικά) μεγέθους 1-300 κιλοβάσεων (kbp) [Couturier 1998]. Είναι δηλαδή μικρότερο από το 1/20 του μεγέθους του χρωμοσώματος. Το πλασμιδιακό DNA βρίσκεται σε μεγάλο ποσοστό σε υπερελικωμένη στερεοαπεικόνιση, που είναι και η πλέον συμπυκνωμένη μορφή του μέσα στο κύτταρο [Modigan κ.ά. 2003].

Οι ιδιότητες του πλασμιδίου δεν είναι απαραίτητες για την επιβίωση των βακτηρίων κάτω από φυσιολογικές συνθήκες, αλλά μπορεί να καταστούν επωφελείς σε ειδικές περιπτώσεις όπως να προσφέρουν π.χ. ανθεκτικότητα στα αντιμικροβιακά φάρμακα, στα απολυμαντικά, στα κατιόντα βαρέων μετάλλων, στα ανιόντα, ή στις βακτηριοσίνες [Harbottle κ.ά. 2006]. Τα πλασμίδια αντιγράφονται αυτόνομα, ανεξάρτητα από το χρωμόσωμα του ξενιστή λόγω της ύπαρξης δικών τους συστημάτων αντιγραφής. Πλασμίδια που ανήκουν σε διαφορετικές ομάδες μπορούν σταθερά να συνυπάρξουν μέσα στο ίδιο βακτηριακό κύτταρο και είναι δυνατόν να φέρουν γονίδια για:

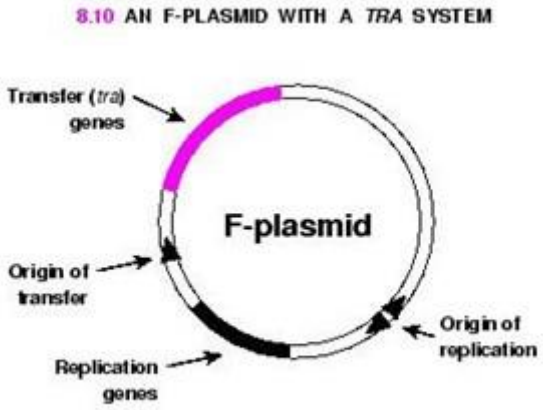
i) την αναπαραγωγή του πλασμιδίου,
ii) το σχηματισμό της φυλετικής φίμπριας (*sex pili*),
iii) την ικανότητα σύζευξης και μεταφοράς DNA (*conjugal transfer*) σε άλλο μικρόβιο,
iv) την αντίσταση στα αντιβιοτικά,
v) την παραγωγή κολισίνης-βακτηριοσίνης,
vi) την σύνθεση εντεροτοξίνης, αιμολυσίνης και έξωτοξίνης
vii) την ανθεκτικότητα έναντι βαρέων μετάλλων (Hg, Ni) [Couturier M. 1998].



Εικόνα 13: Στα πλασμίδια τα γονίδια αντοχής βρίσκονται στα επίκτητα κομμάτια DNA.

Τα πλασμίδια που φέρουν γονίδια ανθεκτικότητας ονομάζονται **R πλασμίδια** (*Resistant plasmids*) ή *R factors* [Harbottle κ.ά. 2006]. Η μεταφορά των πλασμιδίων R επιτρέπει την ταχεία διάδοση της ανθεκτικότητας και επιτυγχάνεται μέσω της σύζευξης βακτηρίων. Τα πλασμίδια μπορεί να φέρουν ένα ή περισσότερα γονίδια ανθεκτικότητας εκτός από τα γονίδια που κωδικοποιούν τις άλλες λειτουργίες. Τα R πλασμίδια ανακαλύφθηκαν στην Ιαπωνία τη δεκαετία του

1950, σε στελέχη των *Enterobacteriaceae sp.* που είχαν αποκτήσει ανθεκτικότητα σε πλήθος αντιμικροβιακών φαρμάκων (πολλαπλή ανθεκτικότητα) και στη συνέχεια εντοπίστηκαν και σε όλες τις άλλες χώρες. Εκτός από τα γονίδια ανθεκτικότητας, διάφορα άλλα γονίδια φέρονται με τα πλασμίδια, όπως τα γονίδια που κωδικοποιούν τις λειτουργίες μεταβολισμού, τη λοιμογόνο δύναμη και τις λειτουργίες γονιμότητας του βακτηρίου [Stanisich 1988]. Μεγάλα πλασμίδια μπορεί να φέρουν ένα **tra**[2] σύμπλεγμα γονιδίων (Εικόνα 14). Τα *tra* γονίδια, αποτελούν ομάδα γονιδίων του πλασμιδίου τα οποία κωδικοποιούν πρωτεΐνες οι οποίες συμμετέχουν στην μεταφορά και αντιγραφή του DNA, καθώς και άλλες που συμμετέχουν στον σχηματισμό κυτταρικών ζευγών [Bager και Helmuth 2001]. Τέτοια πλασμίδια αναφέρονται ως συζευτικά (*conjugative*) πλασμίδια. Τα πλασμίδια είναι δυνατόν να συγχωνευθούν με άλλα πλασμίδια, να ενσωματωθούν είτε εν μέρει είτε στο σύνολο τους μέσα στο χρωμοσωμικό DNA και να ενεργήσουν ως μεταφορείς τρανσποζονίων ή ενσωματονίων [Bennett 1995].
Χαρακτηριστικό παράδειγμα αντοχής σε αντιβιοτικό που βασίζεται σε πλασμιδιακό γονίδιο είναι η αντοχή στα β-λακταμικά αντιβιοτικά, λόγω της πλασμιδιακής παραγωγής των β-λακταμασών ευρέως φάσματος [Shah κ.ά. 2004, Odeh κ.ά. 2002]. Οι β-λακταμάσες, προσφέρουν αντοχή σε όλα τα β-λακταμικά αντιβιοτικά εκτός από τις καρβαπενέμες και τις κεφαμυκίνες. Επίσης το πλασμίδιο pMG252 προσφέρει αντοχή στις κινολόνες και το ναλιδιξικό οξύ στην *Klebsiella pneumonia*, ενώ πλασμιδοεξαρτώμενη ακετυλοτρανφεράση απενεργοποιεί τη χλωραμφενικόλη [Shaw 1984, Martinez-Martinez κ.ά. 1998].

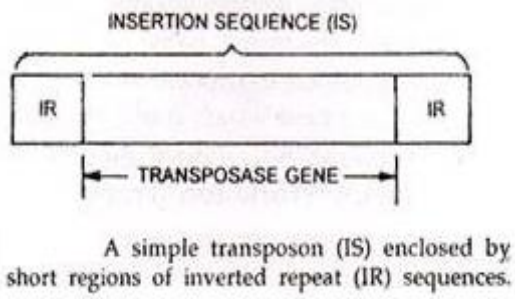


Εικόνα 14: Σύμπλεγμα γονιδίων *tra*.
Τα πλασμίδια είναι οχήματα φορείς, πολλών σημαντικών μηχανισμών αντοχής (β-λακταμάσες τροποποιητικά αμινογλυκοσιδών, σύμπλεγμα *tra* γονιδίων κτλ).

2.6.1.2 Μεταθετόνια ή Τρανσποζόνια (transposons)

Μια άλλη κατηγορία κινητών γενετικών στοιχείων, τα τρανσποζόνια, φέρουν γονίδια αντοχής στα αντιβιοτικά. Τα τρανσποζόνια δε διαθέτουν συστήματα αντιγραφής, επομένως ενσωματώνονται σε γενετικά στοιχεία ικανά για αντιγραφή, όπως είναι τα πλασμίδια στο κύτταρο και το χρωμοσωμικό DNA, προκειμένου να επιβιώσουν. Έχουν εκατέρωθεν των γονιδίων ειδικές αλληλουχίες ενθέσεως (*insertion sequences*) (Εικόνα 15), οι οποίες διαθέτουν μόνο γονίδια που είναι υπεύθυνα για την μετάθεση. Με τον τρόπο αυτό, καθιστούν το DNA του τρανσποζονίου ικανό να παρεμβάλλεται στο DNA του πλασμιδίου ή στο DNA του βακτηριακού χρωμοσώματος ή ακόμη και στο DNA

βακτηριοφάγων [Bailey και Scott 2002, Labigne-Roussel κ.ά. 1983]. Τα τρανσποζόνια ποικίλλουν στο μέγεθος (<1kb-60kbp) και τη δομή τους. Τα μικρότερα τρανσποζόνια, επίσης γνωστά ως ακολουθίες ένθεσης (*insertion sequence, IS elements*), φέρουν απλώς το γονίδιο της *μεταθετάσης* που είναι υπεύθυνη για την μετακίνηση του γενετικού στοιχείου. Τα μεγαλύτερα τρανσποζόνια φέρουν συνήθως ένα ή περισσότερα πρόσθετα γονίδια, τα περισσότερα από τα οποία κωδικοποιούν ιδιότητες της ανθεκτικότητας στα αντιμικροβιακά φάρμακα [Harbottle κ.ά. 2006].



Εικόνα 15: Αλληλουχίες ένθεσης (*insertion sequence IS*) υπεύθυνες για την μετάθεση. Φέρουν το γονίδιο της μεταθετάσης (*transposase gene*), υπεύθυνο για την μετακίνηση του γενετικού στοιχείου.

Σε αντίθεση με τα πλασμίδια που αντιγράφονται αυτόνομα, τα τρανσποζόνια αντιγράφονται μόνο μαζί με το γενετικό υλικό στο οποίο έχουν ενσωματωθεί [Παπαπαναγιώτου και Κυριαζοπούλου-Δαλαΐνα 2005]. Επιπρόσθετα, υπάρχουν και συζευκτικά τρανσποζόνια τα οποία διαθέτουν γονίδια που τους επιτρέπουν όχι μόνο να μετακινούνται από μία θέση του βακτηριακού γονιδιώματος σε άλλη, αλλά να μεταφέρονται ολόκληρα από ένα βακτήριο σε άλλο. Τα συζευκτικά τρανσποζόνια φαίνονται σαν να είναι υβρίδια μεταξύ τρανσποζόνιων και πλασμιδίων και έχουν ταυτοποιηθεί τόσο σε Gram αρνητικά όσο και Gram θετικά βακτήρια [Harbottle κ.ά. 2006]. Τα μεγάλα συζευκτικά τρανσποζόνια φέρουν επίσης τα γονίδια *tra*.

Παράδειγμα γονιδιακής αντοχής λόγω τρασποζονίων, στα αντιβιοτικά, αποτελεί η αντοχή της *Salmonella Panama* στην καναμυκίνη, βασίζεται στο τρανσποζόνιο *Tn1525* που εδρεύει στο πλασμίδιο *pIP112 (IncI1)* [Labigne-Roussel κ.ά. 1983]. Στο *Tn1525* βρίσκεται το γονίδιο της φωσφοτρανσφεράσης των αμονιγλυκοσιδών, η οποία τροποποιεί και απενεργοποιεί την καναμυκίνη. Άλλο παράδειγμα αποτελεί το τρανσποζόνιο *Tn2610*, το οποίο εδρεύει στο πλασμίδιο κλινικών στελεχών *E.Coli pCS200* και φέρει το γονίδιο β-λακταμασών που υδρολύουν την καρβενικιλλίνη, καθώς και τα γονίδια αντοχής σε σουλφοναμίδη και στρεπτομυκίνη [Yamamoto 1983].

2.6.1.3 Ενσωματόνια ή ιντεγκρόνια (integrons) και κασέτες γονιδίων (gene casettes)

Τα ιντεγκρόνια αντιπροσωπεύουν τα κινητά γενετικά στοιχεία, που βρίσκονται στο βακτηριακό χρωμόσωμα, τα πλασμίδια και τα τρανσποζόνια. Τα στοιχεία αυτά, έχουν την δυνατότητα να ενσωματώνουν εξωγενή γονίδια αλλά και να τα αποκόπτουν [Lianou και Sofos 2007, Kathariou 2002]. Αντιπροσωπεύουν συχνά,

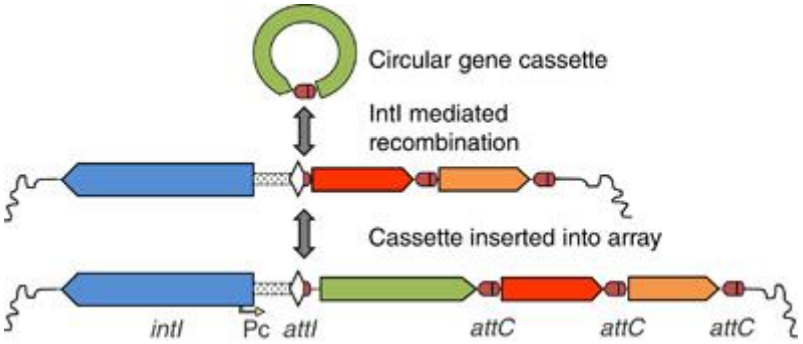
άθικτα ή ελαττωματικά τρανσποζόνια και αποτελούνται συνήθως από δύο συντηρημένες περιοχές στις θέσεις 5' και 3' (*conserved regions*):

- Η περιοχή 5' φέρει το γονίδιο intI που κωδικοποιεί την ενσωματάση (*integrase*) υπεύθυνη για την ειδική περιοχή ενσωμάτωσης των γονιδιακών κασετών στη θέση ανασυνδυασμού *attI* που αναγνωρίζεται από την ενσωματάση καθώς και τον υποκινητή *Pc* που είναι υπεύθυνος για την έκφραση των γονιδίων των γονιδιακών κασετών (Εικόνα 16).

- Η περιοχή 3' μπορεί να αντιπροσωπεύει ένα άλλο γονίδιο ανθεκτικότητας, όπως το γονίδιο ανθεκτικότητας στις σουλφοναμίδες *sulI* [Recchia και Hall 1995], ένα γονιδιακό τόπο αντοχής στο βρωμιούχο αιθίδιο (*qacEΔ1*) και μια περιοχή *orf5* (*ORF, Open Reading Frame*) [Levesque κ.ά. 1995, Grape 2003].

Έχουν ανακαλυφθεί τουλάχιστον πέντε κλάσεις ενσωματωνίων I, II, III, IV και V με βάση την ακολουθία των γονιδίων που κωδικοποιούν την ενσωματάση (*integrase coding sequence*). Η ύπαρξη των ενσωματονίων σε βακτήρια που απομονώνονται από λοιμώξεις ανθρώπων και ζώων συνδέεται με την ανθεκτικότητά τους σε πλέον του ενός αντιμικροβιακού φαρμάκου. Ο όρος "*superintegron*" επινοήθηκε από τον Mazel και τους συνεργάτες του το 1998 για ενσωματόνια (*integrons*) που έχουν ενσωματώσει εκατοντάδες γονιδιακές κασέτες. Ο ρόλος τους δεν έχει πλήρως διευκρινισθεί αλλά πιθανόν να παίζουν έναν σημαντικό ρόλο στην εξέλιξη των βακτηρίων.

Οι μονάδες γενετικού υλικού που ενσωματώνονται στα ιντεγκρόνια, ονομάζονται κασέτες γονιδίων. Έχουν μέγεθος λιγότερο από 2 kbp (συνήθως 500-1000 bp) και συνήθως περιέχουν γονίδια αντοχής σε αντιβιοτικά (έχουν ανιχνευθεί μόνο στα Gram αρνητικά βακτήρια) [Recchia και Hall 1995]. Αποτελούνται συνήθως από μια μόνο περιοχή ανασυνδυασμού σε ειδική θέση, *attC* και ένα γονίδιο ανθεκτικότητας στα αντιμικροβιακά φάρμακα. Οι γονιδιακές κασέτες, δεν θεωρούνται τυχαία γονίδια που απλά μπορεί να μεταφερθούν. Αντιθέτως, είναι γονίδια μέσα σε συγκεκριμένες αλληλουχίες του DNA (περιοχές ανασυνδυασμού), που αναγνωρίζονται από την *ενσωματάση* των ιντεγκρονίων και δεν εκφράζονται έως ότου ενσωματωθούν κοντά σε έναν υποκινητή του ιντεγκρονίου. Σε σχέση με τα πλασμίδια, οι γονιδιακές κασέτες διαφέρουν στην έλλειψη συστημάτων αντιγραφής, ενώ σε σχέση με τα τρανσποζόνια στην έλλειψη συστημάτων μετάθεσης. Κινούνται μέσω της περιοχής ανασυνδυασμού σε ειδική θέση και συνήθως βρίσκονται σε συγκεκριμένες θέσεις μέσα σε ένα ιντεγκρόνιο.



Εικόνα 16: Τα ιντεγκρόνια είναι συστήματα παγίδευσης γονιδίων αντοχής. Έχουν δύο συντηρημένα τμήματα που χωρίζονται από μια μεταβλητή περιοχή, η οποία περιλαμβάνει ενσωματωμένα γονίδια ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά ή κασέτες. Χαρακτηρίζονται από την παρουσία τριών δομικών στοιχείων: την ιντεγκράση (intI), την ειδική θέση ανασυνδυασμού (attI) για την ενσωμάτωση της κασέτας και τον κοινό υποκινητή (P) για την έκφραση των ενσωματωμένων γονιδιακών κασετών.

2.6.2 Μηχανισμοί μικροβιακής αντοχής σε μοριακό επίπεδο

Οι μηχανισμοί μικροβιακής αντοχής, με τους οποίους τα βακτήρια αποκτούν ανθεκτικότητα στα αντιμικροβιακά φάρμακα, μπορούν να χωριστούν σε τρείς βασικές κατηγορίες. Την ενζυμική αδρανοποίηση του αντιμικροβιακού φαρμάκου, την μειωμένη ενδοκυτταρική συσσώρευση των αντιμικροβιακών φαρμάκων και την τροποποίηση των κυτταρικών υποδοχέων των αντιμικροβιακών φαρμάκων [Quintiliani κ.ά. 1999, Schwarz και Noble 1999].

2.6.2.1 Ενζυμική αδρανοποίηση

Η μικροβιακή αντοχή επιτυγχάνεται με δύο τρόπους:

(α) Την ενζυματική τροποποίηση των αντιμικροβιακών φαρμάκων. Τα ένζυμα προσθέτουν ακετυλικές, αδενυλικές ή φωσφορικές ομάδες σε συγκεκριμένες περιοχές των αντιβιοτικών, έτσι ώστε αυτά να χάνουν την αντιμικροβιακή τους δράση. Ο σπουδαιότερος μηχανισμός ενζυματικής τροποποίησης των αντιμικροβιακών φαρμάκων που χαρακτηρίζει την κατηγορία αυτή, είναι η ακετυλίωση [Wright 2005].

(β) Την ενζυματική υδρόλυση των αντιβιοτικών φαρμάκων. Τα ένζυμα προκαλούν υδρόλυση του μορίου του αντιβιοτικού με αποτέλεσμα αυτό να χάνει τη δράση του. Χαρακτηριστικό παράδειγμα την κατηγορίας αυτής είναι οι β-λακταμάσες, οι οποίες προκαλούν την υδρόλυση της αμινοομάδας του λακταμικού δακτυλίου των β-λακταμών, οι υδρολάσες και οι εστεράσες.

2.6.2.2 Τροποποίηση των στόχων δράσης των αντιμικροβιακών φαρμάκων

Η εμφάνιση ανθεκτικότητας, παρατηρείται μετά από χημική τροποποίηση της περιοχής στόχου-υποδοχέα των αντιμικροβιακών φαρμάκων. Σχετικό παράδειγμα αποτελεί η μεθυλίωση του 23S RNA της υπομονάδας 50S του ριβοσώματος του βακτηρίου, η οποία μειώνει τη δυνατότητα σύνδεσης των μακρολιδίων με αποτέλεσμα την εμφάνιση ανθεκτικότητας σε αυτή την κατηγορία φαρμάκων [Leclercq και Courvalin 1991]. Η αντικατάσταση των περιοχών στόχων-υποδοχέων, από νέους στόχους οι οποίοι έχουν μειωμένη συγγένεια με τα αντιμικροβιακά φάρμακα, αντιπροσωπεύουν ακόμα ένα μηχανισμό με τον οποίο τα βακτήρια αναπτύσσουν ανθεκτικότητα [Quintiliani κ.ά. 1999]. Γνωστό παράδειγμα αποτελεί η εμφάνιση των πενικιλλινο-δεσμευτικών πρωτεϊνών (PBPs) οι οποίες σχετίζονται με την εμφάνιση ανθεκτικών στελεχών βακτηρίων στις β-λακτάμες. Η ανθεκτικότητα στις τετρακυκλίνες, επιτυγχάνεται μέσω κάλυψης περιοχών στόχων, στο ριβόσωμα, από ειδικές και συγκεκριμένες προστατευτικές πρωτεΐνες που θεωρούνται ότι εμποδίζουν την σύνδεση των εν λόγω αντιμικροβιακών φαρμάκων [Roberts 1996]. Έντονο ενδιαφέρον παρατηρείται επίσης στις μεταλλάξεις των γονιδίων που κωδικοποιούν τους

στόχους-υποδοχείς, με αποτέλεσμα την ανάπτυξη αντοχής στα αντιβιοτικά. Τέλος αξίζει να αναφερθεί ότι, εκτός από τους προαναφερόμενους μηχανισμούς ανθεκτικότητας, έχει ανακαλυφθεί και ένας ακόμη μηχανισμός ανθεκτικότητας με τα βακτήρια να σφετερίζονται εναλλακτικούς μεταβολικούς δρόμους διαφορετικούς από αυτούς που αναστέλλονται από τα αντιμικροβιακά [McDermott κ.ά. 2003]. Έτσι παρατηρούνται πλέον βακτήρια ανθεκτικά στις σουλφοναμίδες τα οποία, όπως συμβαίνει με τα θηλαστικά, αντί να συνθέτουν φολικό οξύ το προσλαμβάνουν εναλλακτικά με την τροφή τους.

2.6.2.3 Μειωμένη Ενδοκυτταρική Συσσώρευση των Αντιβιοτικών

Η μειωμένη ενδοκυτταρική συσσώρευση επιτυγχάνεται με δύο διαφορετικούς τρόπους, την αυξημένη απέκκριση ή την μειωμένη είσοδο των αντιμικροβιακών φαρμάκων. Τα βακτήρια διαθέτουν ένα ιδιαίτερο ενεργοεξαρτώμενο μηχανισμό απέκκρισης ή μεταφοράς (active efflux), προκειμένου να μειώσουν την συγκέντρωση των αντιμικροβιακών φαρμάκων, ενδοκυττάρια. Ο μηχανισμός αυτός λειτουργεί μέσω ενός ειδικού μεταφορέα, μιας πρωτεΐνης, του αντιμικροβιακού φαρμάκου έξω από το βακτηριακό κύτταρο, με τις αντλίες της ενεργητικής απέκκρισης (active efflux pumps) να εντοπίζονται τόσο στα ευαίσθητα, όσο και στα ανθεκτικά βακτήρια [Piddock 2006]. Ειδικότερα, παρατηρείται ότι στα Gram αρνητικά βακτήρια οι αντλίες της ενεργητικής απέκκρισης κωδικοποιούνται χρωμοσωμικά. Έτσι τα περισσότερα βακτηριακά στελέχη φέρουν γενετικούς καθοριστές για πολλές αντλίες, δημιουργώντας με αυτόν τον τρόπο ένα επίπεδο εγγενούς αντοχής για πολλά αντιβιοτικά. Επιπλέον, διάφορες μεταλλάξεις στα ρυθμιστικά γονίδια είναι υπεύθυνες για την αυξημένη έκφραση των πρωτεϊνών απέκκρισης, ή για αντικαταστάσεις των αμινοξέων τους, με τελικό αποτέλεσμα η πρωτεΐνη απέκκρισης να γίνεται πιο αποτελεσματική στην απομάκρυνση των αντιμικροβιακών φαρμάκων από το εσωτερικό του κυττάρου. Τέλος, υπάρχει ένας μεγάλος αριθμός multidrug μεταφορέων (multidrug-transporters) που είναι γνωστός τόσο στα Gram θετικά, όσο και στα Gram αρνητικά βακτήρια, οι περισσότεροι από τους οποίους εξάγουν ένα ευρύ φάσμα δομικά ετερογενών τοξικών ενώσεων συμπεριλαμβανομένων και των αντιμικροβιακών φαρμάκων [Paulsen κ.ά. 1996, Putman κ.ά. 2000]. Το *multidrug efflux system* ή *multidrug efflux pump* είναι ένας πολύ σπουδαίος μηχανισμός ανθεκτικότητας, δεδομένου ότι προσφέρει στο βακτηριακό κύτταρο ανθεκτικότητα απέναντι σε ένα μεγάλο αριθμό αντιμικροβιακών φαρμάκων.

Η μειωμένη είσοδος συνήθως δεν οφείλεται στην ύπαρξη γονιδίων ανθεκτικότητας, απλά η εξωτερική μεμβράνη των Gram αρνητικών βακτηρίων αποτελεί εκ φύσεως φραγμό για ορισμένα αντιβιοτικά [Salyers και Whitt 1994]. Οι διάφορες μεταλλάξεις των γονιδίων επηρεάζουν την σύνθεση και προκαλούν δομικές αλλαγές οι οποίες μειώνουν την είσοδο των αντιμικροβιακών φαρμάκων στο βακτηριακό κύτταρο [Quintiliani κ.ά. 1999]. Συγκεκριμένα, οι πρωτεΐνες της εξωτερικής μεμβράνης (*Outer membrane proteins, Omps*) σχηματίζουν κανάλια εισόδου μορίων, τις πορίνες, από τις οποίες τα αντιμικροβιακά φάρμακα εισέρχονται στο κύτταρο. Η διέλευση των φαρμάκων από τις πορίνες εξαρτάται από διάφορους παράγοντες όπως είναι το σχήμα, το ηλεκτρικό φορτίο και το μέγεθος τους. Σχετικό παράδειγμα αποτελεί το βακτήριο *E. Coli* όπου η απώλεια της λειτουργίας μιας εκ των πορινών του

(*OmpF, OmpC, OmpE*), εξαιτίας κάποιας μετάλλαξης, μπορεί να προκαλέσει ανθεκτικότητα σε πολλά αντιβιοτικά. Η πορίνη *OmpF* αποτελεί το κύριο κανάλι διέλευσης μορίων της *E. coli*, οποιαδήποτε τροποποίηση της πορίνης αυτής μπορεί να προκαλέσει μειωμένη ευαισθησία σε διάφορα αντιμικροβιακά φάρμακα [Goodtz 2006]. Ένας άλλος σημαντικός παράγοντας που μπορεί να συνεισφέρει στην ανθεκτικότητα στα αντιμικροβιακά φάρμακα, είναι οι μεταλλάξεις των γονιδίων που κωδικοποιούν τον λιποπολυσακχαρίτη (*LPS*) της εξωτερικής μεμβράνης.

2.7 ΓΕΝΙΚΕΣ ΑΡΧΕΣ ΕΚΤΙΜΗΣΗΣ ΤΗΣ ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑΣ ΣΤΑ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ

Η ανθεκτικότητα των μικροοργανισμών δεν είναι ένας απόλυτος όρος, αφού υπάρχουν διάφοροι ορισμοί οι οποίοι δεν αλληλεπικαλύπτονται απαραιτήτως και βασίζονται σε γενετικά, βιοχημικά, μικροβιολογικά και κλινικά κριτήρια. Οι πιο ενδεδειγμένοι όροι που χαρακτηρίζουν την ανθεκτικότητα, βασίζονται κυρίως σε κλινικά (*in-vivo*) και μικροβιολογικά (*in-vitro*) δεδομένα.

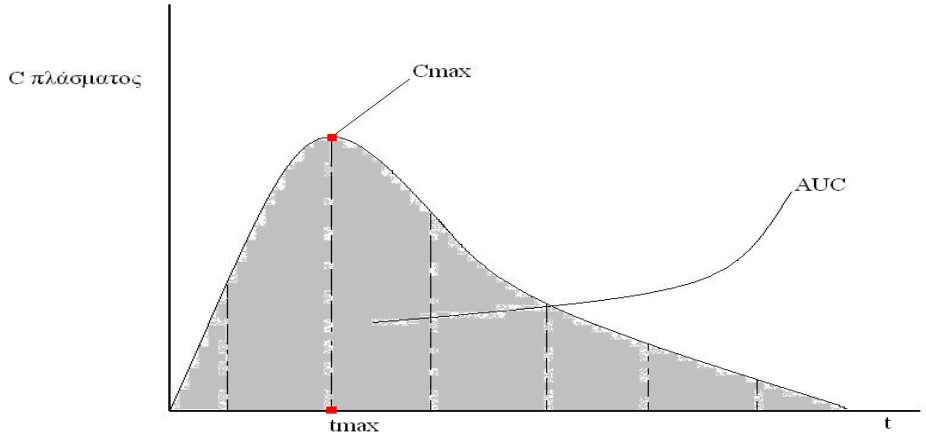
Μικροβιολογικά, ένα βακτηριακό στέλεχος καλείται ανθεκτικό σε συγκεκριμένο αντιμικροβιακό φάρμακο, όταν πολλαπλασιάζεται σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις από αυτές του φαρμάκου, ενώ ταυτόχρονα αναστέλλεται ο πολλαπλασιασμός άλλων στελεχών του ίδιου είδους ή γένους. Με βάση τον ορισμό αυτό, είναι φανερό ότι η ανθεκτικότητα δεν είναι μια ιδιότητα που μπορεί να ορισθεί μελετώντας μόνο ένα στέλεχος. Εφόσον τα φυσιολογικά επίπεδα της ευαισθησίας σε ένα φάρμακο ποικίλλουν αισθητά μεταξύ των διαφορετικών ειδών ή γενεών βακτηρίων, η ανθεκτικότητα μπορεί να εκτιμηθεί μόνο με τη σύγκριση στελεχών του ίδιου είδους και γένους κάτω από τις ίδιες συνθήκες. Οι εργαστηριακές μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για το σκοπό αυτό είναι οι μέθοδοι αραίωσης του αντιβιοτικού σε άγαρ ή σε ζωμό και οι μέθοδοι διάχυσης σε άγαρ [Mims κ.ά. 2004].

Κλινικά, ένα στέλεχος θεωρείται ανθεκτικό όταν επιβιώνει μετά τη θεραπεία με αντιμικροβιακά φάρμακα. Σε *in-vivo* συνθήκες, ένα στέλεχος μπορεί να είναι ανθεκτικό ή ευαίσθητο στη θεραπεία ανάλογα με τη δοσολογία και τον τρόπο χορήγησης του φαρμάκου, την κατανομή του φαρμάκου στους ιστούς και την κατάσταση του ανοσοποιητικού συστήματος του υπό θεραπεία ασθενούς. Η ανθεκτικότητα μπορεί να υπολογισθεί *in-vitro*, σε συνθήκες εργαστηρίου, με βάση την ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση του φαρμάκου (Minimum Inhibitory Concentration – MIC). Τα ανθεκτικά στελέχη εμφανίζουν μεγαλύτερη *MIC* σε σύγκριση με στελέχη που δεν έχουν υποστεί 'πίεση' επιλογής από τη χρήση αντιμικροβιακών φαρμάκων. Ακόμη μια χρήσιμη παράμετρος στον υπολογισμό της ανθεκτικότητας ενός βακτηρίου είναι, η ελάχιστη συγκέντρωση του αντιβιοτικού που εξολοθρεύει το μικροοργανισμό (Minimum Bacteriocidal Concentration, MBC) [Isenberg 2004]. Προσδιορίζεται, αν από τις αραιώσεις του αντιβιοτικού στις οποίες δεν υπάρχει ορατή ανάπτυξη μικροοργανισμού εκτελέσουμε ανακαλλιέργειες σε στερεά υποστρώματα, επωάσουμε και σημειώσουμε το τρυβλίο για το οποίο δεν υπάρχει ανάπτυξη [Mims κ.ά. 2004]. Κλινικά όμως η εκτίμηση της ανθεκτικότητας είναι ένα πολύπλοκο θέμα και πρέπει να υπολογίζεται λαμβάνοντας υπόψη, το φαρμακοκινητικό και φαρμακοδυναμικό προφίλ του φαρμάκου, το μέγεθος κατανομής του βακτηρίου στον ξενιστή, καθώς και την αναλογική συσχέτιση της MIC με τον επιπολασμό

της νόσου. Η σχέση μεταξύ της συγκέντρωσης του αντιμικροβιακού φαρμάκου και του χρόνου ή αλλιώς η ποσότητα του φαρμάκου η οποία διαχέεται στον οργανισμό, σε συγκεκριμένο χρονικό διάστημα, ορίζεται ως η περιοχή κάτω από την καμπύλη AUC (Area Under the Concentration Curve).

Η AUC είναι μια πολύ σημαντική φαρμακοκινητική παράμετρος για τη θανάτωση του βακτηρίου, καθώς και ο λόγος C_{max}/MIC [Nightingale κ.ά. 2001]. Η βασική φαρμακοκινητική πορεία ενός φαρμάκου εξαρτάται από διάφορους παράγοντες, με κυριότερο παράγοντα τη βιοδιαθεσιμότητα. Με τον όρο βιοδιαθεσιμότητα εννοούμε την έκταση και το ρυθμό με τον οποίο μία δραστική ουσία ή το δραστικό μοριακό της τμήμα, αποδίδεται από μία φαρμακοτεχνική μορφή στη γενική κυκλοφορία του αίματος [EMEA 2000 CPMP/EWP/QWP/1401/98]. Όταν ένα φάρμακο χορηγείται από το στόμα, η βιοδιαθεσιμότητα υπολογίζεται από την πιο κάτω εξίσωση [Κουνενής 1997:13-27] (Εικόνα 17):

Βιοδιαθεσιμότητα = AUC από το στόμα / AUC ενδοφλεβίως × 100%



Εικόνα 17: Γκρίζα περιοχή κάτω από την καμπύλη συγκέντρωσης φαρμάκου (AUC) στο πλάσμα του αίματος, σε σχέση με το χρόνο. C_{max} είναι η μέγιστη συγκέντρωση του φαρμάκου στο πλάσμα του αίματος, σε χρόνο t_{max}.

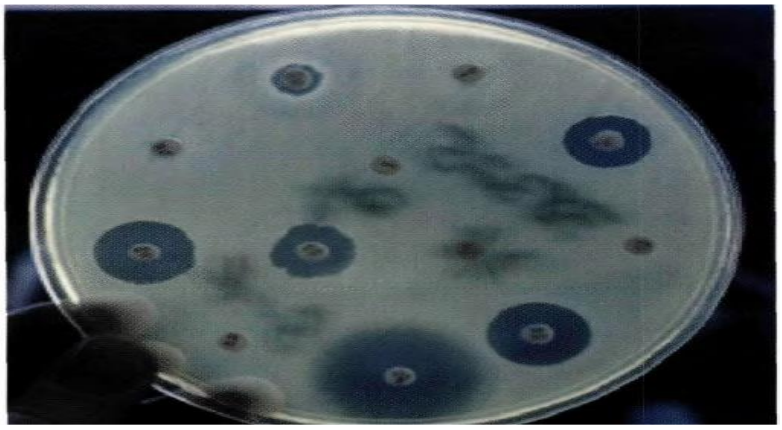
Δυστυχώς, δε γνωρίζουμε την συγκέντρωση του αντιμικροβιακού στην περιοχή-στόχο που βρίσκεται το βακτήριο, με αποτέλεσμα να χρησιμοποιούμε για την εκτίμηση της αποτελεσματικότητας των αντιμικροβιακών φαρμάκων την φαρμακοκινητική παράμετρο AUC του ορού του αίματος, που είναι εύκολα μετρήσιμη, αλλά σε ορισμένες περιπτώσεις δεν είναι αντιπροσωπευτική. Όπως έχει προαναφερθεί, εκτός από την AUC και C_{max} λαμβάνεται υπόψη και η παράμετρος MIC, για την εκτίμηση της αποτελεσματικότητας των αντιμικροβιακών φαρμάκων. Η ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση του φαρμάκου MIC, αποτελεί μονάδα μέτρησης της αντιμικροβιακής δραστηριότητας του φαρμάκου έναντι του παθογόνου μικροοργανισμού [Nightingale κ.ά. 2001]. Αντιπροσωπεύει την ελάχιστη συγκέντρωση του φαρμάκου που αναστέλλει την ανάπτυξη του 50% (MIC_{50}) ή 90% (MIC_{90}) των στελεχών του μικροοργανισμού, μετά την έκθεση τους στο αντιμικροβιακό φάρμακο, για συγκεκριμένο διάστημα [Μπατζίας 2005]. Η σχέση μεταξύ C_{max}-AUC και MIC, αποτελούν την κυρίαρχη φαρμακοκινητική/φαρμακοδυναμική παράμετρο (*PK/PD correlation*) και καθορίζουν την αποτελεσματικότητα του αντιμικροβιακού φαρμάκου (δοσοεξαρτώμενου και χρόνο-δοσοεξαρτώμενου).

Έτσι, η αναλογία αυτή δηλώνει το μέγεθος της συγκέντρωσης του αντιμικροβιακού στον ορό του αίματος και τον απαραίτητο χρόνο έκθεσης του μικροβίου στο φάρμακο, ώστε να αναστείλει τον κύκλο ζωής του μικροοργανισμού.

Οι πιο πάνω βασικές αρχές συσχέτισης φαρμακοκινητικών και φαρμακοδυναμικών παραμέτρων ενός αντιμικροβιακού φαρμάκου μπορούν να εφαρμοσθούν στην πράξη όσον αφορά τη χρήση των αντιμικροβιακών φαρμάκων στα παραγωγικά ζώα [Lees και Aliabadi 2002]. Ωστόσο είναι απαραίτητο σε κάθε χρήση να προσδιορίζονται οι αναλογίες AUC/MIC και C_{max}/MIC, προκειμένου να εξασφαλίζεται το μέγιστο της αποτελεσματικότητας του φαρμάκου και η ελάχιστη δυνατή ανάπτυξης ανθεκτικότητας. Όσο μεγαλύτερη είναι η αναλογία AUC/MIC και C_{max}/MIC τόσο μεγαλύτερη είναι η πιθανότητα εκρίζωσης του μικροοργανισμού, ενώ αντίθετα χαμηλή αναλογία, δηλαδή χρήση αντιμικροβιακών φαρμάκων σε χαμηλές δόσεις, ευνοεί την εμφάνιση ανθεκτικότητας, καθώς επιβιώνουν μικροοργανισμοί οι οποίοι έχουν υψηλές τιμές MIC (ανθεκτικά στελέχη) [Tenover 2001].

Οι ορθολογικές αρχές, που επιβάλλεται να διέπουν την επιλογή του αποτελεσματικότερου αντιμικροβιακού παράγοντα για την αντιμετώπιση των βακτηριακών λοιμώξεων, πρωτίστως, αφορούν την ταυτοποίηση του παθογόνου παράγοντα και τον προσδιορισμό της ευαισθησίας του έναντι συγκεκριμένων αντιμικροβιακών ουσιών. Ακόμη, η διασφάλιση της ιδανικής συγκέντρωσης του αντιμικροβιακού στο σημείο δράσης για μέγιστη δράση και επαρκές χρονικό διάστημα, θεωρείται κρίσιμος παράγοντας για την αποφυγή αντιβιοαντοχής. Ενώ, ιδανική χαρακτηρίζεται η περίπτωση εξασφάλισης σημαντικά ανώτερων συγκεντρώσεων από την κατώτατη συγκέντρωση ανάσχεσης (MIC). Επιπλέον, σημαντικός θεωρείται ο ακριβής προσδιορισμός της συχνότητας, του ύψους της δόσης και της οδού χορήγησής, καθώς επίσης και της διάρκειας θεραπείας, ώστε να εξασφαλίζεται πλήρης αποθεραπεία με αποκλεισμό κάθε ενδεχόμενης υποτροπής, ή εκδήλωσης τοξικών παρενεργειών. Σε κάποιες περιπτώσεις, απαιτείται και η εφαρμογή επιπρόσθετης ενισχυτικής θεραπείας, ώστε να δίνεται η δυνατότητα στον ξενιστή να εκδηλώσει τις αμυντικές του δυνάμεις. Εδώ αξίζει να σημειωθεί ότι τα αντιμικροβιακά φάρμακα με βακτηριοστατική δράση, εξυπηρετούν το στόχο αυτό, αφού ο ρόλος τους επιλεκτικά αφορά μόνο την αναστολή του πολλαπλασιασμού των μικροβίων, τα οποία στην συνέχεια εξουδετερώνονται από τους φαγοκυτταρικούς μηχανισμούς του μακροοργανισμού. Στην κτηνοτροφία ωστόσο, παρατηρείται ότι σε συνθήκες καθημερινής κτηνιατρικής πρακτικής, δεν διεξάγονται αντιβιογράμματα (Εικόνα 18) και πολλές από τις πιο πάνω προϋποθέσεις είναι δύσκολο να εκπληρωθούν. Οι συνηθέστερες των περιπτώσεων που παρατηρούνται, αφορούν τη διάγνωση μιας λοίμωξης, χωρίς να έχει προηγηθεί προσδιορισμός του λοιμογόνου παράγοντα και ακόμη περισσότερο της ευαισθησίας του στα χορηγούμενα αντιμικροβιακά. Στην περίπτωση αυτή, εναπόκειται στην κρίση του κάθε κτηνίατρου να αποφασίσει την επιλογή του αντιμικροβιακού παράγοντα και κατά πόσο αυτός θα είναι στενού ή ευρέος φάσματος ή εάν θα είναι βακτηριοκτόνο ή βακτηριοστατικό. Σε περιπτώσεις μικτών λοιμώξεων, όπως πολύ συχνά συμβαίνει στις εντατικές κτηνοτροφικές εκμεταλλεύσεις ή όταν δεν έχει προσδιοριστεί ο παθογόνος

παράγοντας, συνηθίζεται η χρήση αντιμικροβιακών ευρέος φάσματος ή συνδυασμός δύο ή περισσοτέρων αντιβιοτικών.



Εικόνα 18: Το αντιβιόγραμμα.

2.8 ΤΡΟΦΙΜΟΓΕΝΗ ΒΑΚΤΗΡΙΑ ΚΑΙ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ

Η εμφάνιση ανθεκτικότητας στα αντιμικροβιακά φάρμακα των τροφιμογενών βακτηρίων που μολύνουν τον άνθρωπο και προέρχονται από τα ζώα, είναι ένα πολύπλοκο θέμα με σοβαρές επιπτώσεις στη δημόσια υγεία. Τα παθογόνα βακτήρια μεταδίδονται συχνά από τα ζώα στον άνθρωπο μέσω της τροφικής αλυσίδας, ειδικά σε περιοχές που το υγειονομικό επίπεδο δεν είναι ιδανικό. Ανησυχία προκαλεί το γεγονός ότι η χρήση αντιβιοτικών στα παραγωγικά ζώα οδηγεί στην επιλογή των εντερικών βακτηρίων που εμφανίζουν αντοχή σε συγκεκριμένους αντιμικροβιακούς παράγοντες. Σήμερα γνωρίζουμε ότι τα προβλήματα που προκύπτουν από τη χρήση αντιμικροβιακών φαρμάκων στα ζώα αφορούν:

- Την ανάπτυξη ανθεκτικών βακτηρίων
- Την μετάδοση ανθεκτικών κλώνων βακτηρίων, μέσω κινητών γενετικών στοιχείων και γονιδίων, από τα ζώα στον άνθρωπο, με γενετικό υλικό που κωδικοποιεί την αντοχή και
- Τις λοιμώξεις του ανθρώπου που δεν ανταποκρίνονται στην συνηθισμένη θεραπευτική αγωγή με αντιμικροβιακά φάρμακα.

Κρίσιμη θεωρείται η δυνατότητα μεταφοράς γονιδίων αντοχής, από συμβιωτικά τροφιμογενή βακτήρια σε ευαίσθητα στελέχη της εντερικής χλωρίδας του ανθρώπου, λόγω ανάπτυξης μικροβιακής αντοχής και ως εκ τούτου ανεπάρκεια στη θεραπευτική αγωγή [Piddock 1996]. Από το 2002, έχουν δοθεί στη δημοσιότητα τα ευρήματα των McDermott και Swartz σχετικά με τη χρήση αντιμικροβιακών φαρμάκων στα ζώα, την ανάπτυξη αντιβιοανθεκτικών στελεχών σε τρόφιμα ζωικής προέλευσης και τις επιπτώσεις του φαινομένου αυτού στη δημόσια υγεία. Οι δύο αυτοί επιστήμονες επισήμαναν ότι –

- Τα ανθεκτικά στα αντιβιοτικά παθογόνα στελέχη μολύνουν το τρόφιμο κατά τη διάρκεια της σφαγής ή της επεξεργασίας του. Ως εκ τούτου, η ενδεχόμενη λοίμωξη που ακολουθεί την κατανάλωση μολυσμένων τροφίμων, χρήζει θεραπείας με αντιβιοτικά.

- Στα τρόφιμα ζωικής προέλευσης ενίοτε εντοπίζονται κατάλοιπα αντιβιοτικών κτηνιατρικών φαρμάκων προκαλώντας την επιλογή των πιο ανθεκτικών τροφιμογενών παθογόνων στα αντιβιοτικά.
- Τα συμβιωτικά βακτήρια των ζώων επιμολύνουν την τροφική αλυσίδα, μεταφέροντας έτσι στον άνθρωπο γενετικούς παράγοντες αντιβιοαντοχής, μέσω άλλων βακτηρίων που αποικίζουν το γαστρεντερικό σωλήνα του ανθρώπου και είναι παθογόνα ή συμβιωτικά [McDermott κ.ά. 2002].

Στην συνέχεια, ο Walters (2003) παρέθεσε μια σειρά γεγονότων υπεύθυνων για την ανάπτυξη ανθεκτικότητας των τροφιμογενών παθογόνων στα αντιβιοτικά, με άμεσες συνέπειες στην υγεία των ανθρώπων. Συγκεκριμένα, υποστήριξε την θεωρεία ότι σε μια ομάδα ζώων προϋπάρχουν βακτήρια ανθεκτικά στα αντιβιοτικά, είτε λόγω επιλογής ενός προϋπάρχοντος στελέχους που φέρει γονίδια αντοχής, είτε λόγω κάποιας μετάλλαξης που οδήγησε σε μικροβιακή αντοχή. Υποστήριξε ακόμη ότι, μπορεί να προκληθεί κοπρανώδης επιμόλυνση του σφαγίου κρέατος κατά τη διαδικασία της κατεργασίας, με αποτέλεσμα την πώληση επιμολυσμένου κρέατος. Επιπλέον, περιπτώσεις ατελούς θερμικής επεξεργασίας (μαγείρεμα) μικρής διάρκειας ή σε χαμηλότερες θερμοκρασίες από τις ενδεδειγμένες, έχουν ως αποτέλεσμα την επιβίωση των θερμοανθεκτικών βακτηριδίων. Η επιμόλυνση μετά το μαγείρεμα λόγω κακών συνθηκών υγιεινής είναι ένας ακόμη παράγοντας που μπορεί να οδηγήσει σε ανθεκτικότητα, με αποτέλεσμα την κατανάλωση μολυσμένων τρόφιμων και κατ΄επέκταση την αποίκιση ή την μόλυνσή του ανθρώπου με βακτήρια αντιβιοανθεκτικά. Τέλος το πόρισμα που εξέδωσε, βάση όλων των πιο πάνω γεγονότων, είναι η επίσκεψη στον ιατρό, η νοσηλεία ανάλογα με την σοβαρότητα της λοίμωξης, η πιθανή χρήση αντιβιοτικού της ίδιας κατηγορίας με εκείνο που χρησιμοποιήθηκε στην εκτροφή των ζώων, η αύξηση του χρόνου θεραπείας ή και σε ακραίες περιπτώσεις, το θάνατο του ασθενούς [Walters J. 2003]. Η προέλευση των γονιδίων που προσδίδουν αντοχή στα αντιβιοτικά δεν είναι γνωστή. Πιστεύεται ότι τέτοια γονίδια ίσως απαντούνται στο περιβάλλον, σε μια ποικιλία οργανισμών που δεν είναι απαραιτήτως παθογόνοι. Θεωρείται επίσης, ότι προϋπήρχαν των αντιβιοτικών και κάτω από την επιλεκτική πίεση της χρήσης αντιβιοτικών για θεραπευτική ή προληπτική χρήση, σε ανθρώπους και ζώα, ευνοήθηκε η επικράτηση των οργανισμών φορέων καθώς και η οριζόντια μεταφορά τους. Αυτό προώθησε την εξάπλωση τους, αλλά και την εμφάνιση τους σε είδη που αρχικά δεν υπήρχαν [Mazel και Davies 1999, Davies 1994, Alonso 2001]. Χαρακτηριστικό παράδειγμα, αποτελεί το πλασμίδιο *pTP10* του πολυανθεκτικού κλινικά απομονωμένου *Corynebacterium striatum M82B*, που αποτελείται από τμήματα DNA προερχόμενα από βακτήρια εδάφους π.χ. *Corynebacterium glutamicum*, καθώς και διάφορους άλλους παθογόνους μικροοργανισμούς, όπως *Corynebacterium diphtheria, Mycobacterium tuberculosis,* φυτοπαθογόνος *Pseudomonas* και *Xanthomonas* και το παθογόνο των ιχθύων *Pasteurella piscicida* [Tauch κ.ά. 2000].

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3. ΑΝΤΙΒΙΟΑΝΤΟΧΗ ΚΑΙ ΔΗΜΟΣΙΑ ΥΓΕΙΑ

3.1 ΓΕΝΙΚΑ

Πολλά από τα λοιμώδη και παρασιτικά νοσήματα των ζώων, είναι δυνατόν να μεταδοθούν από τα ζώα στον άνθρωπο. Αυτά ανήκουν στην κατηγορία των ζωονόσων ή ζωοανθρωπονόσων. Σύμφωνα λοιπόν με τον ορισμό της Παγκόσμιας Οργάνωσης Υγείας (1967), «ζωονόσοι» (*zoonoses*) είναι οι μικροβιακές λοιμώξεις και οι παρασιτώσεις, που κάτω από φυσικές συνθήκες μεταδίδονται μεταξύ σπονδυλωτών ζώων και ανθρώπων. Οι ζωονόσοι προκαλούνται από βακτήρια, ρικέτσιες, ιούς, μύκητες, πρωτόζωα, έλμινθες και αρθρόποδα και ο αριθμός τους συνολικά υπερβαίνει τις διακόσιες, επηρεάζοντας σημαντικά τη δημόσια υγεία αλλά και την οικονομία των χωρών. Η σημασία τους ποικίλλει, ανάλογα με την σοβαρότητα της νόσου που προκαλούν στον άνθρωπο, καθώς επίσης ανάλογα και με την συχνότητά εμφάνισης τους τοπογραφικά. Τα τελευταία χρόνια παρατηρείται μία αύξηση στην συχνότητα εμφάνισης τους καθώς και η επανεμφάνιση εξαλειφθέντων ζωονόσων, γεγονός που οφείλεται σε διάφορες κοινωνικό-οικονομικές και περιβαλλοντικές μεταβολές, καθώς και σε αλλαγές του σύγχρονου τρόπου ζωής. Ορισμένες από τις ζωονόσους είναι δυνατόν να μεταδοθούν με την ίδια συχνότητα σε όλες τις πληθυσμιακές ομάδες, ενώ άλλες προσβάλλουν ιδιαίτερα άτομα που λόγω επαγγέλματος έρχονται σε επαφή με μολυσμένα ζώα, τα προϊόντα τους, ή τα αρθρόποδα-μεταδότες (επαγγελματικές νόσοι).

Οι ζωονόσοι χωρίζονται σε: **Ευζωονόσους** ασθένειες που παρατηρούνται με την ίδια συχνότητα σε ανθρώπους και ζώα αποθηκευτικούς-ξενιστές, σε **Παραζωονόσους** όταν νοσούν κυρίως τα ζώα ενώ ο άνθρωπος είναι συνήθως τυχαίος ξενιστής και τέλος σε **Ζωοανθρωπονόσους** όταν νοσεί κυρίως ο άνθρωπος και για τις οποίες τα ζώα είναι συνήθως σποραδικοί ή τυχαίοι ξενιστές. Ειδικότερα, οι παρασιτικές ζωονόσοι μεταδίδονται στον άνθρωπο υποχρεωτικά με τις διακριτές λοιμογόνες μορφές των παρασίτων (σπόροι, κύστεις, ωοκύστεις, αβγά, νύμφες και εγκυστωμένες μορφές), είτε άμεσα μεταξύ επαφής ανθρώπου-ζώου, μέσω επαφής με μολυσμένα κόπρανα ζώου

στο χώμα, είτε μέσω του μολυσμένου νερού (πόσιμο νερό ή αρδευτικό) και των τροφών (φρούτα, λαχανικά, ζωικά κρέατα, κρέατα ψαριών, οστρακόδερμων κ.ά.). Σε μια παρασιτική νόσο, ο άνθρωπος μπορεί να είναι ο κύριος, ενδιάμεσος, αποθηκευτικός ή τυχαίος ξενιστής του παράσιτου. Οι ζωονόσοι μεταδίδονται στον άνθρωπο με διάφορους τρόπους, όπως με προϊόντα ζωικής παραγωγής (βρουκέλλωση, σαλμονέλωση), μέσω μολυσμένου περιβάλλοντος (εχινοκοκκίαση/υδατίδωση) από νοσούντα ζώα και μέσω της επαφής του ανθρώπου με τα ζώα (λύσσα). Η μετάδοση μπορεί να γίνει από ένα άρρωστο ζώο αλλά και από ένα κλινικά φυσιολογικό φορέα-ζώο, το οποίο μπορεί να μεταδώσει παθογόνους μικροοργανισμούς στον άνθρωπο (όπως το καμπυλοβακτηρίδιο και *E. coli* που παράγει τοξίνη *shiga* ή βεροτοξίνη). Μεταξύ των ευρέως γνωστών παραδειγμάτων, μολυσματικών παραγόντων, που μεταδίδονται μέσω των τροφίμων και του νερού περιλαμβάνονται τα βακτήρια (*Salmonella* και *Campylobacter*), τα παράσιτα (*Trichinella*), οι ιοί (νοροϊός και ηπατίτιδα Α) και οι πράιονς πρωτεΐνες (μολυσματικοί παράγοντες υπεύθυνοι για τη σπογγώδη εγκεφαλοπάθεια των βοοειδών) [Rantsios 2016]. Ειδικότερα, με τις ζωονόσους που μεταδίδονται στον άνθρωπο με τα τρόφιμα, ασχολείται η υγιεινή τροφίμων ζωικής προέλευσης.

Τα τελευταία χρόνια, τα τροφιμογενή νοσήματα και η μικροβιολογική ασφάλεια των τροφίμων, βρίσκονται στο επίκεντρο της επιστημονικής και κοινής γνώμης περισσότερο από ποτέ. Οι προκλήσεις για την ασφάλεια των τροφίμων είναι πολλές και αυξάνονται διαρκώς με απρόβλεπτους τρόπους. Αυτό οφείλεται κυρίως σε παράγοντες που επηρεάζουν άμεσα την ποιότητα της τροφής, όπως σημαντικές αλλαγές στις σύγχρονες μεθόδους παραγωγής και βιομηχανικής επεξεργασίας τροφίμων, την μεταποίηση, τη διακίνηση υπό ψύξη σε συσκευασία τροποποιημένης ατμόσφαιρας και τις περιβαλλοντικές αλλαγές. Επιπλέον, η ανάπτυξη νέων μικροβίων και τοξινών, σε συνδυασμό με τις συνθήκες που δημιουργούνται στις νέες εφαρμογές τεχνολογίας τροφίμων, όπως η ελάχιστη επεξεργασία τρόφιμων και η μακροχρόνια συντήρηση υπό θερμοκρασίες ψύξης, έχουν δυσμενείς επιπτώσεις στην ασφάλεια των τροφίμων. Ωμά ή μη σωστά ψημένα κρέατα, μη παστεριωμένο γάλα, ωμά οστρακοειδή και θερμικά επεξεργασμένα τρόφιμα που επιμολύνονται εξαιτίας της επαφής τους με ωμά τρόφιμα ζωικής προέλευσης ή με μολυσμένες επιφάνειες τεμαχισμού και επεξεργασίας ωμών κρεάτων, αποτελούν την κυριότερη πηγή μόλυνσης του ανθρώπου.

Τα βακτήρια, οι ιοί και τα παράσιτα, αποτελούν σοβαρό κίνδυνο για τη δημόσια υγεία εάν δεν τηρούνται οι αυστηρές διαδικασίες υγιεινής. Τα παράσιτα έχουν τη δυνατότητα παραγωγής μεγάλων ποσοτήτων λοιμογόνων μορφών, τα οποία μπορούν να επιβιώσουν για μακρά χρονικά διαστήματα, εμφανίζοντας εξαιρετική αντοχή σε ακραίες περιβαλλοντικές συνθήκες. Παράλληλα, η υπέρμετρη εκμετάλλευση των φυσικών πηγών διατροφής και ύδρευσης αυξάνει ευθέως ανάλογα και τον κίνδυνο μόλυνσης με λοιμογόνα παράσιτα των περιβαλλοντικών χώρων, αφού το νερό και το χώμα αποτελούν σημαντικές πηγές μόλυνσης με πολλά πρωτόζωα και έλμινθες.

Εικόνα 19: Μολυσματικοί παράγοντες.

3.1.1 Τροφιμογενείς διαταραχές της υγείας του ανθρώπου

Η παρουσία παθογόνων μικροοργανισμών στα τρόφιμα, οι οποίοι μπορεί να είναι βακτηρίδια, ιοί, παράσιτα ή μύκητες, ευθύνονται κυρίως για την πρόκληση τροφιμογενών διαταραχών. Από αυτούς, τα βακτηρίδια είναι η συνηθέστερη αιτία, με σημαντικότερα τα είδη *Salmonella*, *Shigella, Campylobacter jejuni* και *Escherichia coli* [EFSA 2006]. Επιπλέον, οι τροφικές τοξινώσεις οφείλονται στην κατανάλωση της τοξίνης των μικροοργανισμών, η οποία παράγεται στο τρόφιμο ή στον εντερικό σωλήνα του καταναλωτή. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η τροφική τοξίνωση από την τοξίνη του βακτηρίου *Staphylococcus aureus* όπου η τοξίνη παράγεται στο τρόφιμο και ο καταναλωτής προσλαμβάνει έτοιμη την προσχηματισμένη τοξίνη. Τροφική τοξίνωση μπορεί επίσης να προκληθεί, από την κατανάλωση τοξινών οι οποίες υπάρχουν φυσικά στα τρόφιμα, όπως συμβαίνει για παράδειγμα στα τοξικά μανιτάρια και στα τοξικά φυτά [Γενηγιώργης 2004].

Μερικοί από τους συχνότερους μικροοργανισμούς, οι οποίοι δυνητικά μπορούν να προκαλέσουν τροφικές διαταραχές, καταγράφονται στον Πίνακα 7.

Πίνακας 7: Παθογόνοι μικροοργανισμοί αίτια τροφιμογενών διαταραχών [EFSA 2006]**.**

Βιολογικοί παράγοντες	Μολυσματικοί παράγοντες
Βακτηρίδια	*Clostridium perfrigens* *Salmonella spp* *Campylobacter jejuni* *Escherichia coli spp* *Bacillus cereus* *Listeria monocytogenes* *Shigella spp* *Staphylococcus spp*

Ιοί	*Streptococcus spp*
	Brucella spp
	Corynebacterium spp
	Coxiella burnetii
	Enterovirus
	Rotavirus
	Norovirus
	Hepatitis A
	Hepatitis E
Παράσιτα	*Fasciola hepatica*
	Taenia solium
	Taenia saginata
	Trichinella spiralis
	Ascaris lumbricoides
	Giardia lamblia
	Toxoplasma gondii
	Cryptosporidium parvum
	Entamoeba histolytica
Τοξίνες	Εξωτοξίνη *Clostridium botulinum*
	Εξωτοξίνη *Clostridium perfrigens*
	Εξωτοξίνη *Staphylococcus aureus*
	Εξωτοξίνη *Bacillus cereus*
	Aflatoxins
	Ochratoxins
	Τοξίνες μανιταριών

	Scombrotoxin
	Tetrodotoxin

3.1.2 Παράγοντες πρόκλησης των τροφιμογενών νοσημάτων

Τα πρωτόζωα *Cryptosporidium, Giardia, Toxoplasma* και *Microsporidium,* αποτελούν τις συνηθέστερες παρασιτικές μορφές που μεταδίδονται με το μολυσμένο νερό. Όσον αφορά τα τρόφιμα, αυτά μολύνονται είτε εξωγενώς στους τόπους παραγωγής, συσκευασίας και διακίνησης τους, είτε ενδογενώς (*Trichinella spirallis*). Οι σημαντικότερες παρασιτικές ζωονόσοι που μεταδίδονται με το ζωικό κρέας είναι η κυστικέρκωση, η τριχίνωση, η τοξοπλάσμωση και η ταινίαση, ενώ με το κρέας των ψαριών, η ανισακίαση και η μικροσποριδίωση (*pleistophora-like* μικροσπορίδια). Σήμερα, η εξέλιξη της τεχνολογίας με την ανάπτυξη σύγχρονων εργαστηριακών μεθόδων τυποποίησης των λοιμογόνων μορφών (ανοσολογικών και μοριακών), ρίχνει φως στην επιδημιολογική συμπεριφορά των παρασιτικών ζωονόσων και στον πραγματικό κίνδυνο που ενέχουν για τη δημόσια υγεία. Οι σπουδαιότερες από τις παρασιτικές νόσους, που μεταδίδονται στον άνθρωπο μέσω νερού και τροφίμων παρατίθενται στον Πίνακα 8 [Kapotas 2003].

Πίνακας 8: Παρασιτικές νόσοι που μεταδίδονται με τα τρόφιμα και το νερό.

ΠΡΩΤΟΖΩΑ			
Μικρόσπορα			
Παράσιτο	**Τρόπος μετάδοσης**	**Μολυσμένο υπόστρωμα**	**Τελικοί ξενιστές**
Enterocytozooan bieneusi	Νερό(;), τρόφιμα	Σπόρια στο νερό και σε ωμά ή μισοψημένα τρόφιμα(;)	*Άνθρωπος*, πίθηκος *rhesus*
Encephalitozoon cuniculi	Νερό(;), τρόφιμα	Σπόρια στο νερό και σε ωμά ή μισοψημένα τρόφιμα (;)	*Άνθρωπος*, οικόσιτα ζώα,
Encephalitozoon intestinalis *Encephalitozoon hellem*			
"Pleistophora-like organisms"	Τρόφιμα	Ωμά ή μισοψημένα θαλασσινά ή οστρακόδερμα	Παπαγάλοι, *άνθρωπος*, ψάρια, οστρακόδερμα
Άλλα πρωτόζωα			
Cryptosporiditan parvum (γονότυπος 2)	Νερό, τρόφιμα	Ωοκύστεις σε νερό και σε ωμά ή μισοψημένα τρόφιμα	*Άνθρωπος*, άλλα θηλαστικά

Giardia duodenalis	Νερό, τρόφιμα	Κύστεις σε νερό και σε ωμά ή μισοψημένα τρόφιμα	*Άνθρωπος*, άλλα θηλαστικά και πουλιά
Toxoplasma gondii	Νερό, τρόφιμα	Ωοκύστεις σε νερό και σε ωμά ή μισοψημένα τρόφιμα. Ιστικές κύστεις σε ωμά ή μισοψημένα τρόφιμα.	Αιλουροειδή
Balantidium coli	Νερό, τρόφιμα	Κύστεις σε νερό και σε ωμά ή μισοψημένα τρόφιμα	*Άνθρωπος*, χοίροι, άλλα πρώτιστα θηλαστικά, γάτες, τρωκτικά
Blastocystis hominis, Blastocystis sp	Νερό, τρόφιμα	Κύστεις σε νερό και σε ωμά ή μισοψημένα τρόφιμα	*Άνθρωπος*, άλλα θηλαστικά
ΜΕΤΑΖΩΑ			
Τρηματώδεις σκώληκες			
Παράσιτο	**Τρόπος μετάδοσης**	**Μολυσμένο υπόστρωμα**	**Τελικοί ξενιστές**
Clonorchis spp Opisthorchis spp	Κρέας και ψάρια του γλυκού νερού	Μετακερκάρια στους μυς των ψαριών	*Άνθρωπος*, γάτες, σκύλοι
Metagonimus yokogawai	Κρέας και ψάρια του γλυκού νερού (sweetfish)	Μετακερκάρια στους μυς των ψαριών	*Άνθρωπος*, γάτες, σκύλοι
Heterophyes spp	Ψάρια υφάλμυρων νερών		
Echinostoma spp	Κρέας, βατράχια, σαλιγκάρια	Νεφροί βατράχων, κεφαλή, χιτώνας και ήπαρ σαλιγκαριών	*Άνθρωπος*, σκύλοι, ποντίκια, πουλιά κ.ά.
Fasciola hepatica	Υδρόβια φυτά (είδη *Nasturtium Mentha*)	Μετακερκάρια εγκυστωμένα στα φύλλα (περίπου 10% των μετακερκαρίων επιπλέουν στο νερό)	Μηρυκαστικά ζώα*
Fasciolopsis buski	Υδρόβια φυτά	Μετακερκάρια εγκυστωμένα στα φύλλα	*Άνθρωπος*, χοίροι

Paragonimus spp	Καβούρια υφάλμυρων νερών, γαρίδες	Μετακερκάρια στους πνεύμονες και στους μυς των καβουριών	*Άνθρωπος*, ήμερα και άγρια ζώα
Schistosoma spp	Νερό, ενεργητική διείσδυση διαμέσου του δέρματος	Κερκάρια στο νερό	*Άνθρωπος*, ήμερα και άγρια ζώα
Schistosome dermatitis	Νερό, ενεργητική διείσδυση διαμέσου του δέρματος	Κερκάρια στο νερό (γλυκά νερά, νερά σε μαρίνες)	Πουλιά, θηλαστικά (όχι *άνθρωπος*)
Κεστώδεις σκώληκες			
Diphyllobothrium latum	Σολωμός και άλλα ψάρια	Κερκοειδείς νύμφες, στους μυς ψαριών-μεταφορέων ξενιστών	*Άνθρωπος*, γάτες, σκύλοι, χοίροι, αλεπούδες και άλλα ιχθυοφάγα ζώα
Marine diphyllobothriasis	Ψάρια που ζουν σε μαρίνες. *Ceviche* (παρασκευάζεται από ωμό ψάρι, στο Περού και στη Χιλή)	Κερκοειδείς νύμφες, στους μυς ψαριών-μεταφορέων ξενιστών	Θηλαστικά
Taenia saginata	Βόειο κρέας	Κυστίκερκοι στους μυς	*Άνθρωπος*
Taenia solium	Χοιρινό κρέας, κρέας κουνελιού, καμήλας, αρκούδας	Κυστίκερκοι στους μυς	*Άνθρωπος*
Echinococcus spp	Νερό	Αβγά στο νερό	Κυνοειδή
Νηματέλμινθες			
Ascaris suum	Μολυσμένα λαχανικά	Λοιμογόνα αβγά	Χοίροι
Toxocara canis	Μολυσμένα λαχανικά, ήπαρ. Αποθηκευτικοί ξενιστές (σαλιγκάρια)	Λοιμογόνα αβγά σε μολυσμένα λαχανικά, λοιμογόνες νύμφες στους ιστούς	Κυνοειδή
Toxascaris leonina	Μολυσμένα λαχανικά	Λοιμογόνα αβγά σε μολυσμένα λαχανικά	Κυνοειδή
Toxocara cati	Μολυσμένα λαχανικά	Λοιμογόνα αβγά σε μολυσμένα λαχανικά	Αιλουροειδή
Lagochilascaris minor	Μολυσμένα λαχανικά	Λοιμογόνα αβγά σε μολυσμένα λαχανικά	Αιλουροειδή, racoons

Anisakis simplex, Pseudoterranova decipiens	Έντερο και μυς ψαριών υφάλμυρων νερών, καλαμαράκια	Λοιμογόνος νύφη 3ου σταδίου στους ιστούς των ψαριών	Δελφίνια, φάλαινες
Angiostrongylus spp	Μολυσμένα λαχανικά, βατράχια, καραβίδες, καβούρια	Λοιμογόνος νύφη 3ου σταδίου στα λαχανικά, λοιμογόνος νύφη 3ου σταδίου στα οστρακοειδή	Τρωκτικά (ποντίκια)
Gnathostoma spinigerum (και άλλα είδη)	Κρέας, ψάρια γλυκών νερών	Λοιμογόνος νύφη 3ου σταδίου στους ιστούς	Κυνοειδή και αιλουροειδή
Trichinella spp	Κρέας	Λοιμογόνος νύφη στους μυς	*Άνθρωπος*, χοίροι, αρκούδες, κ.ά.
Άλλα			
Marcoacanthorhynchus hirudinaceus	Σκαθάρια	Κυστάκανθος στη σωματική κοιλότητα	Χοίροι
Armillifier armillatus	Νερό, τρόφιμα	Αβγά στο νερό ή στα λαχανικά	Πύθωνας και άλλα ερπετά
Armillifer moniliformis	Κρέας ερπετού, μολυσμένο με αβγά	Νύμφες στο κρέας του ερπετού	
Linguatula serrata	Εσωτερικά όργανα (ειδικά ήπαρ) φυτοφάγων ζώων	Νύμφες στους ιστούς φυτοφάγων ζώων	Κυνοειδή

3.2 ΑΝΤΙΒΙΟΑΝΤΟΧΗ ΚΑΙ ΤΡΟΦΙΜΑ

3.2.1. Η μεταφορά μικροβιακής αντοχής με γενετικά τροποποιημένα τρόφιμα

Η επέμβαση στο γενετικό υλικό των οργανισμών και των μικροοργανισμών, με την τεχνολογία του ανασυνδυασμένου DNA, αποτέλεσε μια βιολογική επανάσταση στην ανθρωπότητα, με τεράστιες δυνατότητες για το μέλλον. Ως γενετικά τροποποιημένοι οργανισμοί (*Genetically Modified Organisms, GMO's*), χαρακτηρίζονται οι ζωντανοί οργανισμοί, το γονιδίωμα των οποίων έχει τροποποιηθεί με την εισαγωγή κάποιου γονιδίου υπεύθυνου για την έκφραση μιας πρωτεΐνης, η οποία προσδίδει νέες ιδιότητες στον οργανισμό. Αντίστοιχα, το γενετικό υλικό (DNA) των γενετικά τροποποιημένων φυτών, τροποποιείται ύστερα από εισαγωγή σ' αυτό γενετικού υλικού που προέρχεται από άλλους μικρό- και μεγάλο-οργανισμούς (GMMO's ή GMO's). Έτσι με τον τρόπο αυτό, τα τρόφιμα που λαμβάνονται από γενετικά τροποποιημένα φυτά ονομάζονται γενετικά τροποποιημένα τρόφιμα (ΓΤΤ). Αυτή η γενετική αλλαγή έχει ως αποτέλεσμα τη μεταβολή ορισμένων φυσικών χαρακτηριστικών και ιδιοτήτων των φυτών και των παραγώγων τους, τροφίμων και ζωοτροφών,

ευνοώντας την ανθεκτικότητα τους σε διάφορους παράγοντες, όπως ακραίες καιρικές συνθήκες, συντελώντας έτσι στη βραχυπρόθεσμη αύξηση της παραγωγής με μεγάλα οικονομικά οφέλη [Gotham 2000].

Η επικινδυνότητα των ΓΤΤ για τα ζώα και για τους πληθυσμούς, που μπορεί να εκτεθούν σε αυτά μέσω της διατροφής, περιλαμβάνει την πιθανότητα εκδήλωσης πλειοτρόπων ενεργειών. Οι ενέργειες αυτές περιλαμβάνουν την ενσωμάτωση γονιδίων, τις επιδράσεις στα ζώα και στην ανθρώπινη υγεία από την αύξηση των αντιδιατροφικών ουσιών (*anti-nutrients*), τις επιδράσεις στην ανθρώπινη υγεία που οφείλονται στη χρήση ιικού DNA στα φυτά, την πιθανή μεταφορά γονιδίων αντίστασης στα αντιβιοτικά από βακτήρια που βρίσκονται στο γαστρεντερικό και τη δυνητική συμμετοχή των ΓΤΤ στις αλλεργικές αντιδράσεις [Dona 2009]. Καθώς τα ΓΤΤ έχουν πλέον εισβάλει στη διατροφή μας, υπάρχουν ανησυχίες σχετικά με την ασφάλειά τους και ειδικότερα την αύξηση του κίνδυνου εμφάνισης υπερανθεκτικών στελεχών μικροβίων στον άνθρωπο και στα παραγωγικά ζώα. Η θεωρία της μεταφοράς γονιδίων αντίστασης στα αντιβιοτικά, αποδεικνύεται με τα γονίδια ιχνηθέτες, *marker genes*, τα οποία έχουν την ικανότητα να μεταφέρουν αντοχή ως προς ένα αντιβιοτικό. Τα *marker genes* προσκολλώνται στο γονίδιο που μεταφέρεται για να μπορεί να εξακριβωθεί εάν η μεταφορά ήταν επιτυχής. Οι ανησυχίες αφορούν την πιθανή μετάδοση της αντοχής στα αντιβιοτικά μέσω των ΓΤΤ στον ανθρώπινο ή το ζωικό οργανισμό, κάνοντας ακόμη δυσκολότερη την αντιμετώπιση των λοιμωδών νοσημάτων [Παπαδοπούλου 2006]. Η δυνατότητα παραγωγής ΓΤΤ, θεωρείται ότι στο εγγύς μέλλον θα αποτελέσει το κλειδί για την σωτηρία των υπανάπτυκτων χωρών από την πείνα και την εξαθλίωση. Εντούτοις, υπάρχει μια γενική ανησυχία, με αντικρουόμενες απόψεις, για τους κινδύνους που κρύβει η παραγωγή και η κατανάλωση ΓΤΤ, δημιουργώντας ένα κλίμα φόβου και σύγχυσης ως προς το θέμα αυτό. Πολλοί είναι αυτοί που έχουν χαρακτηρίσει τα ΓΤΤ ως «*Frankenstein Food*», ενώ οι καταναλωτές αδυνατούν να σχηματίσουν σαφή γνώμη για το όλο θέμα μέσα από τις αλλεπάλληλες επίσημες και ανεπίσημες ανακοινώσεις και σχόλια που διατίθενται καθημερινά στον τύπο.

3.2.2 Αυξητικοί Παράγοντες

Οι τομείς που σε παγκόσμια κλίμακα παρατηρείται η μεγαλύτερη κατανάλωση αντιβιοτικών, μεγαλύτερη και από την ιατρική χρήση, είναι η γεωργία, η κτηνοτροφία και οι ιχθυοκαλλιέργειες. Στους τομείς αυτούς, τα αντιβιοτικά εκτός από τη θεραπεία και πρόληψη των λοιμώξεων, έχουν χρησιμοποιηθεί και ως αυξητικοί παράγοντες με απώτερο στόχο την αύξηση της παραγωγής των ζωικών προϊόντων (κρέας, γάλα και αβγά). Η επιτάχυνση του ρυθμού ανάπτυξης των ζώων, λόγω της χρήσης αντιμικροβιακών φαρμάκων ως αυξητικών παραγόντων, παρατηρήθηκε αρχικά σε χοίρους και πτηνά που σιτίζονταν με υπολείμματα μυκήτων που είχαν χρησιμοποιηθεί για την παραγωγή αντιβιοτικών.

Ο μηχανισμός με τον οποίο τα αντιβιοτικά δρουν ως αυξητικοί παράγοντες δεν είναι απόλυτα γνωστός, ωστόσο πιστεύεται ότι έχουν ανασταλτική ή μεταβολική επίδραση σε ορισμένα Gram θετικά βακτήρια της εντερικής χλωρίδας [Prescott

2006]. Άλλοι ερευνητές υποστηρίζουν ότι οι κυριότεροι μηχανισμοί δράσης, με αποτέλεσμα την αύξηση της παραγωγής, περιλαμβάνουν την:

- Καταστολή των μικροοργανισμών που είναι υπεύθυνοι για τις υποκλινικές λοιμώξεις
- Μείωση της παραγωγής τοξινών που επιβραδύνουν την ανάπτυξη
- Μειωμένη αποδόμηση απαραίτητων θρεπτικών ουσιών στο γαστρεντερικό σωλήνα, με αποτέλεσμα την αύξηση στην σύνθεση βιταμινών και άλλων παραγόντων
- Αυξημένη απορρόφηση και χρήση των θρεπτικών ουσιών λόγω της λέπτυνσης του τοιχώματος του εντερικού σωλήνα [Jukes και Williams 1953, Francois 1962].

Ορισμένα αντιβιοτικά που σε υψηλές δόσεις χορηγούνται για θεραπευτικούς σκοπούς, σε χαμηλότερες δόσεις χρησιμοποιήθηκαν για δεκαετίες ως αυξητικοί παράγοντες. Ο βασικός λόγος που γινόταν αυτό ήταν η πρόληψη της εμφάνισης νοσημάτων, σε ορισμένες "επικίνδυνες" ηλικίες των ζώων. Για παράδειγμα η καταπόνηση (το στρες) του απογαλακτισμού σε συνδυασμό με δυσμενείς καιρικές συνθήκες ή/και ακατάλληλες συνθήκες στέγασης και υγιεινής μέσα στον στάβλο, αποτελούν προδιαθεσικούς παράγοντες εμφάνισης διαφόρων νοσημάτων (π.χ. διαρροϊκό σύνδρομο). Έτσι εξακριβώθηκε ότι η χορήγηση αυξητικών παραγόντων στην τροφή, βοηθά τα ζώα να αντιπαρέλθουν την καταπόνηση του απογαλακτισμού χωρίς δυσμενείς για την υγεία τους επιπτώσεις. Βέβαια, οι αυξητικοί παράγοντες έχουν καταργηθεί και έχει απαγορευθεί η χρήση τους. Τα αποτελέσματα όμως της μακροχρόνιας χρήσης τους (εδώ και δεκαετίες) παραμένουν και αντικατοπρίζονται σε στελέχη βακτηρίων που εμφανίζουν αντοχή σε κατηγορίες αντιβιοτικών που έχουν αποσυρθεί από την αγορά (π.χ. βανκομυκίνη).

Τα αντιβιοτικά χρησιμοποιήθηκαν ως αυξητικοί παράγοντες και στην ιατρική. Μέχρι τα μέσα της δεκαετίας του ’50 γινόταν παρατεταμένη χορήγηση μικρής δόσης τετρακυκλίνης per os σε λιποβαρείς ανθρώπους και βρέφη, προκειμένου να βελτιωθεί η θρεπτική τους κατάσταση. Η πρακτική όμως αυτή εγκαταλείφθηκε, λόγω της πρόκλησης μικροβιακής αντοχής και του εμφανούς αποχρωματισμού των δοντιών [Prescott 2006]. Τέλος, σε πείραμα που πραγματοποιήθηκε στο Πολεμικό Ναυτικό των ΗΠΑ, τρεις ομάδες αντρών των 55 ατόμων έκαστη, λάμβαναν καθημερινά μικρές δόσεις αντιβιοτικών (τετρακυκλίνη ή πενικιλλίνη) για επτά εβδομάδες. Μετά το τέλος του πειράματος παρατηρήθηκε μεγαλύτερη αύξηση βάρους στις δύο ομάδες που λάμβαναν τα αντιβιοτικά, σε σχέση με εκείνη που έπαιρνε φάρμακο placebo [Thomas κ.ά. 1955].

3.2.3 Κατάλοιπα

Ακόμη μια σημαντική παράμετρος που διέπει τη χρήση των κτηνιατρικών φαρμάκων στα παραγωγικά ζώα είναι τα κατάλοιπα που μπορεί να ανιχνευθούν σε εδώδιμα προϊόντα ζωικής προέλευσης (κρέας, αυγά, γάλα και μέλι). Ειδικότερα, η κατανάλωση τροφίμων που περιέχουν κατάλοιπα δραστικών ουσιών, μπορεί να οδηγήσει στην ανάπτυξη ανθεκτικών στελεχών στην εντερική χλωρίδα του ανθρώπου, συμβάλλοντας έτσι στο φαινόμενο της

αντιβιοαντοχής με όλες τις δυσμενείς επιπτώσεις για τη δημόσια υγεία. Κατάλοιπα κτηνιατρικών φαρμάκων, θεωρούνται όλες οι φαρμακολογικά ενεργές ουσίες, τα έκδοχα, τα προϊόντα αποδόμησης τους, καθώς και τα προϊόντα μεταβολισμού τους που παραμένουν στους εδώδιμους ιστούς των ζώων, στα οποία χορηγήθηκε το εν λόγω κτηνιατρικό φάρμακο.

Η Ευρώπη σε μια προσπάθεια της να διασφαλίσει την υγεία των καταναλωτών, έχει επαναπροσδιορισθεί την ευρωπαϊκή νομοθεσία, θεσπίζοντας τον κανονισμό 2377/90, προκειμένου να διατίθενται ασφαλή τρόφιμα ζωικής προέλευσης, στους καταναλωτές. Δεδομένου ότι η επιστημονική και τεχνική πρόοδος επιτρέπουν να ανιχνεύεται η παρουσία καταλοίπων κτηνιατρικών φαρμάκων στα τρόφιμα σε όλο και χαμηλότερες συγκεντρώσεις, για κάθε αντιμικροβιακό φάρμακο που χρησιμοποιείται, πρέπει να καθορίζεται το ανώτατο όριο καταλοίπων (*Maximum Residue Level, MRL*) πριν χορηγηθεί άδεια κυκλοφορίας του φαρμάκου. Ανώτατο Όριο Καταλοίπων (ΑΟΚ) είναι η μέγιστη συγκέντρωση καταλοίπων που προκύπτει από τη χρήση κτηνιατρικού φαρμάκου (εκφραζόμενη σε mg/kg ή μg/kg με βάση το βάρος του νωπού προϊόντος), η οποία μπορεί να θεωρείται ως νομίμως επιτρεπτή από την Κοινότητα, ή να αναγνωρίζεται ως αποδεκτή εντός ή επί του τρόφιμου (κανονισμός ΕΟΚ αριθ.2377/90 του Συμβουλίου, άρθρο 1), ή η μέγιστη αποδεκτή συγκέντρωση καταλοίπων στα τρόφιμα ζωικής προέλευσης χωρίς δυσμενείς επιπτώσεις στη δημόσια υγεία. Με βάση τα ανώτατα όρια καταλοίπων ανάλογα με τη φαρμακοτεχνική μορφή, καθορίζονται και οι κατάλληλοι χρόνοι αναμονής. Ως χρόνος αναμονής, ορίζεται το διάστημα μεταξύ του χρονικού σημείου της τελευταίας χορήγησης κτηνιατρικού φαρμάκου και του χρονικού σημείου που το ζώο μπορεί να οδηγηθεί με ασφάλεια στο σφαγείο, ή να καταναλωθούν με ασφάλεια το γάλα ή τα αυγά [Barragry 1994]. Μια άλλη σπουδαία παράμετρος που διέπει τη χρήση των αντιμικροβιακών φαρμάκων στα παραγωγικά ζώα είναι η ανάπτυξη ανθεκτικότητας από παθογόνα και κοινά βακτήρια, τα οποία μπορεί να αποτελέσουν σοβαρό κίνδυνο για τη δημόσια υγεία. Για το λόγο αυτό, πρέπει η χρήση των αντιμικροβιακών φαρμάκων στα παραγωγικά ζώα να πράττεται πάντα σύμφωνα με τους κανόνες της ορθής κτηνιατρικής πρακτικής.

3.3 ΚΥΡΙΟΤΕΡΕΣ ΚΑΤΗΓΟΡΙΕΣ ΧΟΡΗΓΗΣΗΣ ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΩΝ ΣΕ ΠΑΡΑΓΩΓΙΚΑ ΖΩΑ – ΧΟΙΡΟΥΣ

3.3.1. Γενικά

Από τη 10ετία του ’50 και μετά, οι ανάγκες της αγοράς σε κρέας σε συνδυασμό με την αλματώδη αύξηση του ανθρώπινου πληθυσμού, ξεπέρασαν αισθητά το μέγεθος παραγωγής με αποτέλεσμα το κρέας των μηρυκαστικών να μην μπορεί να τις καλύψει. Έτσι, η χοιροτροφία μεταπήδησε πολύ γρήγορα στη βιομηχανική παραγωγή καλύπτοντας την συνολική παραγωγή κρέατος. Ο χοίρος αναδείχθηκε παγκοσμίως σε ένα πολύτιμο αγροτικό ζώο, εκτρεφόμενος σε πολυπληθείς αγέλες βιομηχανικής μορφής, αποδίδοντας περίπου το 40% της παγκόσμιας συνολικής παραγωγής κρεάτων. Η δυνατότητα όμως αύξησης της παραγωγής χοιρινού κρέατος, δεν θα μπορούσε να γίνει εφικτή χωρίς την συμβολή της γενετικής επιλογής, τη βελτίωση της διατροφής και της διαχείρισης των ζώων, αλλά και την προληπτική ιατρική. Παράλληλα, σημαντικό παράγοντα

στην παραγωγή, αποτέλεσε το γεγονός ότι ο χοίρος είναι ένα πολύτοκο ζώο. Πραγματοποιεί 2 και πλέον τοκετούς/έτος, ενώ από κάθε τοκετό περίπου 9-10 χοίροι οδηγούνται στο σφαγείο. Δεδομένου ότι οι χοίροι μπορεί να σφάζονται σε διάφορα στάδια ανάπτυξης, χωρίς ιδιαίτερο τρόπο εκτροφής ή ειδικούς γενότυπους, ευνοείται η απόδοση σφάγιων που ανταποκρίνονται στις ποικίλες τεχνολογικές και γευστικές επιθυμίες του καταναλωτή. Τέλος, η επιτυχής ανάπτυξη της χοιροτροφικής παραγωγής, οφείλεται σημαντικά στη βελτίωση της κατάστασης υγείας των χοίρων με την παράλληλη πρόοδο της κτηνιατρικής επιστήμης στον τομέα της χοιροπαθολογίας, ευνοώντας τους χοιροτρόφους και τελικά τους καταναλωτές χοιρινού κρέατος. Σήμερα, πρωταρχικός στόχος πρέπει να είναι η διασφάλιση της υγειούς διατροφής του ανθρώπου εν συνάρτηση της ποσότητας και της ποιότητας του αποδιδόμενου κρέατος. Η ποσότητα του κρέατος εκτιμάται με την μέση παραγωγή χοίρων κατ' έτος εκτροφής, ενώ η εμπορική ποιότητά του από την περιεκτικότητά του σε λιπώδη και μυώδη ιστό. Χοιρινό σφάγιο με περισσότερο μυϊκό ιστό και λιγότερο λιπώδη ιστό θεωρείται καλύτερης ποιότητας και προτιμάται από τον καταναλωτή [Κατσαούνης και Σπαής 1998].

3.3.2 Χρήση αντιμικροβιακών φαρμάκων στους χοίρους

Σήμερα, η συστηματική χοιροτροφία, επιβάλλει στις διάφορες χοιροτροφικές μονάδες το διαχωρισμό των ζώων ηλικιακά, κατά ομάδες, έτσι ώστε η χορήγηση αντιβιοτικών φαρμάκων να γίνεται κατά ομάδα. Οι χοίροι που εκτρέφονται εντατικά εκτίθενται σε μολυσματικούς παράγοντες σε όλη τη διάρκεια της ζωής τους, αλλά συνήθως εκδηλώνουν κλινικά νοσήματα όταν υποβληθούν σε καταστάσεις στρες, λόγω καταστολής του ανοσοποιητικού συστήματος. Τέτοιες καταστάσεις σχετίζονται με τον εμβολιασμό, την αυξημένη θερμοκρασία περιβάλλοντος, ανεπαρκή αερισμό, μεταφορά και απότομη αλλαγή σιτηρεσίου. Η ομαδική θεραπεία γίνεται είτε με την προσθήκη του φαρμάκου στην τροφή και είναι περισσότερο αποτελεσματική για την θεραπεία εντερικών παθήσεων, είτε με την προσθήκη του αντιβιοτικού στο νερό [Prescott κ.ά. 2000]. Η θεραπεία κάθε ζώου ξεχωριστά, γίνεται με ενέσιμα και αφορά κυρίως τον αναπαραγωγικό πληθυσμό της εκτροφής, δηλαδή χοιρομητέρες και κάπρους, αλλά και τα γαλουχούμενα χοιρίδια.

Η προληπτική χορήγηση αντιβιοτικών φαρμάκων αποτελεί πλέον συνηθισμένη πρακτική στις εκτροφές χοίρων. Όπως προαναφέρθηκε, οι περίοδοι που τα ζώα υφίστανται έντονο στρες, προδιαθέτει την εμφάνιση λοιμωδών νοσημάτων και χρονογραφείται από τη γέννηση των χοιριδίων ως τη γαλουχία (αποκοπή ομφάλιου λώρου, κοπή της ουράς, κοπή κυνοδόντων), τον απογαλακτισμό (αλλαγή περιβάλλοντος, αλλαγή διατροφής, ευνουχισμός, ανάμιξη με άλλα ζώα, εμβολιασμοί) και την πάχυνση (συνωστισμός, κακός αερισμός, υψηλές ή χαμηλές θερμοκρασίες) [Barragry 1994]. Η μεγαλύτερη χορήγηση φαρμάκων γίνεται κατά το στάδιο του απογαλακτισμού, ενώ αντιθέτως στο τελευταίο στάδιο, της πάχυνσης, η χρήση αντιβιοτικών γίνεται με φειδώ διασφαλίζοντας έτσι την απουσία καταλοίπων στο σφάγιο. Η επιλογή του ενδεδειγμένου αντιβιοτικού και της ορθής μεθόδου χορήγησης, εξαρτάται κυρίως από τις φαρμακοκινητικές/φαρμακοδυναμικές ιδιότητες του κτηνιατρικού φαρμάκου.

Κρίσιμο ρόλο παίζει και η γνώση του τρόπου λειτουργίας κάθε χοιροτροφικής μονάδας. Αυτό αφορά τη διάθεση και ικανότητα των εκτροφέων να εφαρμόσουν την συντεινόμενη θεραπευτική αγωγή και την εφαρμογή σωστών χειρισμών, υπό καθοδήγηση, σε περίπτωση αποτυχίας προηγούμενων θεραπευτικών αγωγών με διάφορα αντιμικροβιακά φάρμακα. Για την πρόληψη και θεραπεία της πνευμονίας (π.χ. ενζωοτική πνευμονία, πλευροπνευμονία), μια πολύ σημαντική νοσολογική οντότητα στους χοίρους, χρησιμοποιούνται διάφορα αντιβιοτικά όπως κεφτιοφούρη, σουλφοναμίδες, τετρακυκλίνες, τιαμουλίνη, λινκομυκίνη, ενροφλοξακίνη [McEwen και Fedorka-Cray 2002]. Η βακτηριακής αιτιολογίας εντερίτιδα με κυρίαρχο σύμπτωμα τη διάρροια αποτελεί και αυτή σοβαρό πρόβλημα της συστηματικής χοιροτροφίας, έτσι στην περίπτωση που αιτιολογικός παράγοντας είναι η *E. coli* ή το *Clostridium perfringens* αντιμετωπίζεται κυρίως με πενικιλλίνες, αμινογλυκοσίδες (απραμυκίνη, γενταμικίνη, νεομυκίνη), τετρακυκλίνες (χλωροτετρακυκλίνη, οξυτετρακυκλίνη), και φθοριοκινολόνες (ενροφλοξακίνη). Στη δυσεντερία του χοίρου (*Brahyspira hyodysenteriae*) και στην ειλεΐτιδα (*Lawsonia intracellularis*) χρησιμοποιούνται για την αντιμετώπιση τους κυρίως λινκομυκίνη, τιαμουλίνη, μακρολίδια, ή τετρακυκλίνες. Τέλος, η χρήση αντιμικροβιακών στην περίπτωση της σαλμονέλωσης, πρέπει να θεωρείται περισσότερο προφυλακτική παρά θεραπευτική [Κρήτας 2004], ενώ αυτά που θεωρούνται *in vitro* αποτελεσματικά είναι η: απραμυκίνη, νεομυκίνη, κεφτιοφούρη, σπεκτινομυκίνη, τριμεθοπρίμη-σουλφοναμίδη και φθοριοκινολόνες.

3.3.3 Ποσότητα των χρησιμοποιούμενων αντιμικροβιακών στα παραγωγικά ζώα

Παγκοσμίως, η χρήση αντιμικροβιακών φαρμάκων, με σκοπό την εξασφάλιση της υγείας των ζώων, το 1996 υπολογίστηκε σε 27.000 τόνους εκ των οποίων περίπου το 25% χρησιμοποιήθηκε στην Ε.Ε. Μια άλλη έρευνα έδειξε ότι, το 50% των φαρμάκων που παράγονται στην Ε.Ε. χορηγείται στα ζώα [Boatman 1998], ενώ σύμφωνα με μια κατ' εκτίμηση κατανομή: το 50% των φαρμάκων χρησιμοποιείται για θεραπευτικούς σκοπούς, το 25% ως προσθετικές ουσίες ζωοτροφών και το υπόλοιπο 25% για την πρόληψη της κοκκιδίωσης στα πουλερικά και αφορά αποκλειστικά τα ιονοφόρα [Boatman 1998]. Το 90% των αντιβιοτικών, που παράγονται στον κόσμο και χορηγούνται σε ζώα, είτε για την αύξηση της ανάπτυξης είτε για θεραπεία, χορηγούνται μέσω της τροφής. Στους χοίρους χορηγείται κυρίως το 60%, ενώ το 20% χορηγείται στα πουλερικά και κουνέλια, το 18% στα μηρυκαστικά, το 1% στους ιχθύς και το 1% στα κατοικίδια ζώα [Bories και Louisot 1998]. Στην Ευρώπη το 1997, οι συνολικές πωλήσεις των φαρμάκων άγγιξαν το αστρονομικό ποσό των 10.493 τόνων, από τους οποίους οι 5.400 τόνοι χρησιμοποιήθηκαν στην ιατρική του ανθρώπου (52%), 3.494 τόνοι χρησιμοποιήθηκαν στη θεραπευτική των ζώων (33%) και 1.599 τόνοι ως αυξητικοί παράγοντες στα ζώα (15%) [Schwarz και Chaslus-Dancla 2001].

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η έρευνα η οποία αναφέρει τη χρήση 7.659 τόνων αντιμικροβιακών φαρμάκων, χορηγούμενα ως σκευάσματα ανθρώπινης χρήσης (Πίνακας 10) [Ungemach κ.ά. 2006]. Στην συγκεκριμένη έρευνα παρουσιάζονται οι εκτιμήσεις, όπως δημοσιεύτηκαν από την FEDESA, των πωλήσεων αντιμικροβιακών φαρμάκων για τα έτη 1997 και 1999 στην Ε.Ε., συμπεριλαμβανομένης της Ελβετίας. Αναλυτικά, το 1997 χορηγήθηκαν 3.494

τόνοι φαρμάκων στα ζώα για θεραπευτικούς σκοπούς, εκ των οποίων το 80% καταναλώθηκε από παραγωγικά ζώα και το 20% από ζώα συντροφιάς (Πίνακας 9). Από την προαναφερόμενη ποσότητα καταδεικνύεται ότι το 66% ήταν τετρακυκλίνες, 12% μακρολίδια, 9% πενικιλλίνες και 12% οι υπόλοιπες ομάδες αντιμικροβιακών φαρμάκων (Πίνακας 10). Το 1999 η χρήση αντιμικροβιακών φαρμάκων για θεραπευτικούς σκοπούς στα ζώα αυξήθηκε κατά 408 τόνους, δηλαδή έφθασε τους 3.902 τόνους (Πίνακας 9). Αντιθέτως, όπως φαίνεται στο ενδιάμεσο χρονικό διάστημα, η ποσότητα των αντιμικροβιακών που χρησιμοποιήθηκαν ως αυξητικοί παράγοντες στα παραγωγικά ζώα μειώθηκε κατά 51%. Αυτό οφείλεται στην απαγόρευση της χρήσης ορισμένων αντιμικροβιακών φαρμάκων, ως προσθετικά τροφής, απαγόρευση που τελικά ολοκληρώθηκε το 2006 μειώνοντας τη χρήση στους 786 τόνους. Τέλος, παρατηρούνται μεγάλες διαφορές στα ποσοστά των φαρμάκων που χρησιμοποιούνται είτε για θεραπεία είτε για αύξηση της ανάπτυξης των ζώων μεταξύ των διαφορετικών χωρών, σε σχέση με τον τύπο ζωικής παραγωγής, είτε αυτή είναι εντατική είτε όχι (Πίνακες 10 και 11).

Πίνακας 9: Ποσότητες (τόνοι) και δοσολογία αντιμικροβιακών που πουλήθηκαν στην Ε.Ε. και Ελβετία σε ανθρώπους και ζώα τα έτη 1997 και 1999 [Ungemach κ.ά. 2006]**.**

	Άνθρωποι		**Παραγωγικά ζώα**	
Αντιμικροβιακά				
1999	8528[a]		3902[a] x 0,8[b]	
1997	7659[a]		3494 x 0,8[b]	
Πληθυσμός (1997)	**Αριθμός[c] ($x10^6$)**	**Σωματικό βάρος ($kgx10^6$)**	**Αριθμός[c] ($x10^6$)**	**Σωματικό βάρος ($kgx10^6$)**
Άνθρωποι (60kg)[d]	373	22380		
Αγελάδες/μοσχάρια			56,7	17130
Πρόβατα/αίγες			71,1	2539
Χοίροι			190,5	20398
Πουλερικά (2kg)[e]			5804	11608
Δοσολογία (mg/kg σ.β.)	342		54	
Μέρες θεραπείας	34-68			2,7-5,4
MDD[f] (mg/kg)	5-10			10-20

[a] Στοιχεία σύμφωνα με τη FEDESA (1998, 2001)
[b] 80% παραγωγικά ζώα / 20% ζώα συντροφιάς
[c] Στοιχεία (αριθμός ζώων και βάρος σφάγιων) σύμφωνα με τη Eurostat (1997)
[d] μέσο βάρος σώματος 60kg
[e] μέσο βάρος σώματος στην σφαγή (1997)
[f] Μέση ημερήσια δόση αντιμικροβιακών σε ανθρώπους και ζώα

Όσον αφορά την κατανάλωση αντιμικροβιακών φαρμάκων στην ιατρική, το 1997 ο πληθυσμός της Ευρώπης ήταν 373 εκατομμύρια κάτοικοι, με ένα μέσο ατομικό βάρος σώματος 60kg (Πίνακας 9). Σύμφωνα τους Swharz και Chaslus-Dancla πωλήθηκαν 5.400 τόνοι αντιμικροβιακών φαρμάκων για θεραπευτική

χρήση, οπότε η αντίστοιχη κατανάλωση για τον άνθρωπο ήταν 241mg ανά kg βάρος σώματος. Ωστόσο, για το ίδιο χρονικό διάστημα ο Ungemach και συνεργάτες εκτιμούν ότι η κατανάλωση αντιμικροβιακών φαρμάκων από τους Ευρωπαίους ήταν 7.659 τόνοι επομένως η αντίστοιχη κατανάλωση για τον άνθρωπο ήταν 342mg ανά kg βάρος σώματος. Έτσι σύμφωνα με τους Swharz και Chaslus-Dancla (2001), η κατανάλωση αντιμικροβιακών φαρμάκων από τους ανθρώπους ήταν 4,5 φορές (241/54) μεγαλύτερη από ό,τι στα ζώα, ενώ σύμφωνα με τους Ungemach και συνεργάτες (2006) η κατανάλωση αντιμικροβιακών από τους ανθρώπους ήταν 6,3 φορές (342/54) μεγαλύτερη. Επίσης, πρέπει να τονισθεί ότι η διάρκεια της θεραπείας με αντιμικροβιακά φάρμακα στον άνθρωπο είναι μεγαλύτερη από εκείνη στα παραγωγικά ζώα (Πίνακας 9), γεγονός που υποδηλώνει αρκετά μεγαλύτερη κατανάλωση αντιμικροβιακών φαρμάκων στους ανθρώπους από ό,τι στα ζώα. Συγκεκριμένα, όπως φαίνεται στον Πίνακα 9, η διάρκεια θεραπείας στον άνθρωπο είναι 34-68 ημέρες, ενώ στα παραγωγικά ζώα είναι 2,7-5,4 ημέρες. Εντούτοις, όλα αυτά αποτελούν μόνο μια αδρή εκτίμηση, καθώς διαφορετικές παράμετροι φαίνεται να υπέρ ή υποεκτιμούνται, όπως για παράδειγμα, στην περίπτωση των ανθρώπων δεν καταναλώνονται όλα τα αντιμικροβιακά φάρμακα που πωλούνται.

Πίνακας 10: Ποσότητες αντιμικροβιακών που πουλήθηκαν στην Ε.Ε συμπεριλαμβανόμενης και της Ελβετίας το 1997 [Schwarz και Chaslus-Dancla 2001]**.**

Ομάδες αντιμικροβιακών	**Πωλήσεις όπως υπολογίστηκαν από τη FEDESA**	
	Τόνοι ενεργών συστατικών	**% των συνολικών πωλήσεων**
Τετρακυκλίνες	2294	66
Μακρολίδια	424	12
Πενικιλλίνες	322	9
Αμινογλυκοσίδες	154	4
Τριμεθοπρίμη/σουλφοναμίδες	75	2
Φθοριοκινολόνες	43	1
Άλλες ομάδες	182	5

Με βάση την ποσότητα του αντιμικροβιακού φαρμάκου ανά κιλό ζώντος βάρους σφαγέντων ζώων, οι χώρες της Ευρωπαϊκής Ένωσης ταξινομούνται σε τρεις ομάδες: στην πρώτη ομάδα (>100mg/kg ζώντος βάρους) περιλαμβάνονται το Ηνωμένο Βασίλειο, η Ελλάδα, η Ισπανία και η Ολλανδία, στη δεύτερη ομάδα (25-100 mg/kg ζώντος βάρους) περιλαμβάνονται το Βέλγιο, η Γαλλία, η Ιταλία, η Γερμανία και η Πορτογαλία, και τέλος στην τρίτη ομάδα (<25mg/kg ζώντος βάρους) περιλαμβάνονται η Δανία, η Φινλανδία , η Σουηδία, η Ιρλανδία και η Αυστρία. Αυτή η ταξινόμηση απεικονίζει κατά ένα μεγάλο μέρος τον τύπο συστήματος εκτροφής των παραγωγικών ζώων καθώς επίσης και την ορθολογική ή μη, χρήση των αντιμικροβιακών φαρμάκων [Teuber 2001].

Πίνακας 11: Ποσότητες αντιμικροβιακών (τόνοι) που πουλήθηκαν (για θεραπεία και αύξηση της ανάπτυξης) σε διαφορετικές χώρες-μέλη της Ε.Ε. το 1997 [Schwarz και Chaslus-Dancla 2001]**.**

	Αυξητικοί παράγοντες		Θεραπευτικοί παράγοντες	
Χώρα	**Ολική ποσότητα**	**% Ευρωπαϊκής αγοράς**	**Ολική ποσότητα**	**% Ευρωπαϊκής αγοράς**
Αυστρία	23	1	8	<1
Βέλγιο-Λουξεμβούργο	110	7	125	4
Δανία	75	5	60	2
Φινλανδία	<1	<1	12	<1
Γαλλία	339	21	492	14
Γερμανία	255	16	488	14
Ελλάδα	15	1	110	3
Ιρλανδία	34	2	22	<1
Ιταλία	100	6	389	11
Ολλανδία	226	14	300	9
Πορτογαλία	24	2	44	1
Ισπανία	198	12	616	18
Σουηδία	<1	<1	20	<1
Ηνωμένο Βασίλειο	191	12	788	23

3.3.4 Μετάδοση ανθεκτικών, στα αντιμικροβιακά φάρμακα, τροφιμογενών βακτηρίων στον άνθρωπο μέσω του κρέατος

Ανησυχία προκαλεί το γεγονός ότι η χρήση αντιβιοτικών στα παραγωγικά ζώα οδηγεί στην επιλογή των εντερικών βακτηρίων που εμφανίζουν αντοχή σε συγκεκριμένους αντιμικροβιακούς παράγοντες. Πολλά πειραματικά δεδομένα έδειξαν ότι υπάρχει δυνατότητα μεταφοράς γονιδίων αντοχής από συμβιωτικά τροφιμογενή βακτήρια σε ευαίσθητα στελέχη της εντερικής χλωρίδας του ανθρώπου, με αποτέλεσμα ο τελευταίος να κινδυνεύει λόγω της ανεπάρκειας της θεραπευτικής αγωγής και της ανάπτυξης μικροβιακής αντοχής [Walters 2003].

Παρά το γεγονός ότι στις αναπτυγμένες χώρες έχουν βελτιωθεί κατά πολύ οι συνθήκες υγιεινής κατά τη διάρκεια της σφαγής, η επιμόλυνση του κρέατος ως τελικού προϊόντος είναι δύσκολο να αποφευχθεί. Η ανάπτυξη αντοχής στα αντιβιοτικά των εντερόκοκκων και των σταφυλόκοκκων είναι σημαντική, ιδιαίτερα δεδομένου ότι τα τρόφιμα, όπως το νωπό κρέας και τα προϊόντα μεταποίησης κρέατος, δυνητικά είναι πηγές των παραπάνω μικροοργανισμών [Franz κ.ά. 1999]. Συγκεκριμένα διαπιστώθηκε ότι, οι εντερόκοκκοι που απομόνωσαν από το σαλάμι και κρεατοσκευάσματα ζύμωσης τύπου

Landjäger, εμφάνισαν σε μεγάλη συχνότητα αντοχή στην στρεπτομυκίνη και την λινκομυκίνη [Franz κ.ά. 1999]. Το κρέας ως μέσο μεταφοράς της *E. coli*, αλλά και των γονιδίων αντοχής που φέρει η τελευταία, έχει επιβεβαιωθεί όσον αφορά την *sat-mediated* αντοχή στην στρεπτοθρισίνη (*streptothricin*). Επίσης, έχει επιβεβαιωθεί η μεταφορά του *vanA* στους εντερόκοκκους [Werner κ.ά. 2000]. Το 1983 πραγματοποιήθηκε σχετική έρευνα στην πρώην Ανατολική Γερμανία, όταν το αντιβιοτικό νουρσεοθρισίνη (ανήκει στις στρεπτοθρισίνες), αντικατέστησε τη χορήγηση οξυτετρακυκλινών στα ζώα, μέσω τροφής, παγκοσμίως. Μέχρι τότε δεν είχε αναφερθεί αντοχή των εντεροβακτηριοειδών που απομονώθηκαν από ανθρώπους και ζώα στο συγκεκριμένο αντιβιοτικό. Εντούτοις, δύο χρόνια αργότερα παρατηρήθηκε ανάπτυξη αντοχής σε στελέχη *E. coli* που απομονώθηκαν από την εντερική χλωρίδα των χοίρων. Μέχρι την εποχή που απαγορεύτηκε η χρήση της στρεπτοθρισίνης, βρέθηκαν ανθεκτικά στελέχη *E. coli* που απομονώθηκαν όχι μόνο από τον εντερικό σωλήνα των χοίρων, αλλά και των κτηνοτρόφων, των οικογενειών τους, καθώς και αρκετών κατοίκων της αγροτικής περιοχής. Μάλιστα, ανθεκτικά στελέχη *E. coli* απομονώθηκαν τόσο από τον εντερικό σωλήνα όσο και από το ουροποιητικό σύστημα [Werner κ.ά. 2000].

Η βιρτζινιαμυκίνη (*virginiamycin*) χρησιμοποιήθηκε ως αυξητικός παράγοντας στην Ευρώπη και τη Β. Αμερική για περισσότερα από 20 χρόνια. Προσφάτως, εγκρίθηκε στις ΗΠΑ ένα δομικά ανάλογο αντιμικροβιακό φάρμακο, το Synercid (*quinupristin/dalfopristin*), για χρήση κατά των εντερόκοκκων αλλά και άλλων βακτηρίων του ανθρώπου. Παρά την πρόσφατη χρήση του όμως, απομονώθηκαν βακτήρια που εμφάνισαν αντοχή στο Synercid, από ανθρώπους οι οποίοι δεν είχαν λάβει ποτέ το συγκεκριμένο αντιβιοτικό. Το γεγονός αυτό αποδεικνύει ότι η μικροβιακή αντοχή οφειλόταν σε μη ανθρώπινη πηγή προέλευσης [Kugler κ.ά. 2000]. Η χρήση βιρτζινιαμυκίνης στα παραγωγικά ζώα οδηγεί στην επιλογή ανθεκτικών εντερόκοκκων, που επιμολύνουν τα τρόφιμα, εισέρχονται στο γαστρεντερικό σωλήνα του ανθρώπου και μεταφέρουν γονίδια αντοχής σε εντερόκοκκους της εντερικής χλωρίδας του ανθρώπου [Werner κ.ά. 2000].

Μελέτες μικροβιακής αντοχής, σχετικά με την μεταφορά ανθεκτικών στα αντιβιοτικά στελεχών του τροφιμογενούς παθογόνου, *S. Typhimurium* παρείχαν στην επιστημονική κοινότητα σημαντικά δεδομένα. Συγκεκριμένα, κατά τα έτη 1940 έως 1948, απομονώθηκαν και μελετήθηκαν εκατό στελέχη *S. typhimurium* από μια κτηνοτροφική μονάδα και αντίστοιχα εκατό στελέχη *S. typhimurium* από ανθρώπους. Όλα τα στελέχη ήταν ευαίσθητα στην τετρακυκλίνη. Ωστόσο, μετά την εισαγωγή της τετρακυκλίνης στην κτηνιατρική και την ιατρική πράξη, το ποσοστό ανάπτυξης μικροβιακής αντοχής έναντι της τετρακυκλίνης έφτασε μέχρι και 90% σε ορισμένες χώρες [Hey και Edwards 1958, Teuber 1999], αποδεικνύοντας έτσι ότι ένα αποτελεσματικό μέχρι πρότινος αντιμικροβιακό έχασε την αντιμικροβιακή του δράση μέσα σε ένα διάστημα 50 περίπου ετών. Πιο σημαντική όμως καταγράφεται η κατάσταση της διασποράς ανθεκτικών στελεχών *S. typhimurium phage type DT104*. Όλα σχεδόν τα στελέχη του τύπου *DT104* χαρακτηρίζονται από ένα συγκεκριμένο τύπο μικροβιακής αντοχής στα αντιβιοτικά αμπικιλλίνη, χλωραμφενικόλη, στρεπτομυκίνη, σουλφοναμίδες και τετρακυκλίνη. Πρόσφατα προστέθηκαν η τριμεθοπρίμη, σπεκτινομυκίνη και η σιπροφλοξασίνη [Threlfall 1997]. Κανείς δεν

μπορεί να ξεχάσει το τραγικό περιστατικό στη Δανία, το Σεπτέμβριο του 1998, όπου μια μέχρι τότε υγιής γυναίκα πεθαίνει μετά από μόλυνση από τον πολυανθεκτικό φαγότυπο *(phage type) DT104* που προήλθε από κατανάλωση μολυσμένου χοιρινού [WHO 1998].

Το 2001, μελετήθηκε η αντοχή 1009 στελεχών *Listeria spp.*, που απομονώθηκαν σε διάφορα τρόφιμα (χάμπουργκερ, μαγειρεμένο κρέας, σαλάτες). Η συχνότερη μικροβιακή αντοχή παρατηρήθηκε στην τετρακυκλίνη σε ποσοστό 6,3%, ακολούθησε η αντοχή στην πενικιλλίνη (3,73%), την αμπικιλλίνη (1,98%), ενώ η αντοχή στη στρεπτομυκίνη, τη βανκομυκίνη, τη χλωραμφενικόλη και τη γενταμικίνη ήταν κάτω από 0,6%. Αργότερα, οι Mayrhofer και συν. (2004) διαπίστωσαν ότι τα 60 στελέχη *Listeria monocytogenes* που απομόνωσαν από δείγματα χοιρινού, ορνίθειου, βοδινού κρέατος και κιμά, ήταν ευαίσθητα στα αντιβιοτικά [Mayrhofer κ.ά. 2004]. Σε παρόμοια έρευνα στην Τουρκία, ανθεκτικό στην αμπικιλλίνη ήταν το 56% των στελεχών *L. monocytogenes* (πέντε από τα εννέα στελέχη) και το 96% των στελεχών *L. innocua* (65 από τα 68 στελέχη), ενώ στην σιπροφλοξασίνη ήταν ευαίσθητα όλα τα στελέχη *L. monocytogenes* και τα 30 από τα 68 στελέχη *L. innocua* [Yucel κ.ά. 2005]. Την ίδια χρονιά, μια άλλη έρευνα των Mayrhofer και συν., σε δείγματα νωπού κρέατος, έδειξε ότι από τα 28 στελέχη *E. coli* που απομονώθηκαν τα 15 ήταν ανθεκτικά σε ένα τουλάχιστον αντιβιοτικό (54%), 5 στελέχη εμφάνισαν αντοχή στην τετρακυκλίνη και 10 στελέχη σε τουλάχιστον δύο αντιβιοτικά. Με βάση το είδος του κρέατος από το οποίο απομονώθηκαν, τα οκτώ από τα 12 στελέχη *E. coli* που απομονώθηκαν από χοιρινό κρέας έδειξαν μονο-αντοχή. Τα τρία στελέχη από κρέας πουλερικών ήταν πολυανθεκτικά και το ένα στέλεχος από γαλοπούλα ήταν ανθεκτικό μόνο στην τετρακυκλίνη [Mayrhofer κ.ά. 2004]. Τέλος, σε μελέτη που πραγματοποιήθηκε στην Ιρλανδία και αφορούσε την απομόνωση ανθεκτικών στελεχών *Salmonella spp*. από νωπά κρέατα, καταγράφηκε αντοχή 100% στην σουλφομεθοξαζόλη, 57,3% στην τετρακυκλίνη, 18,3% στην σιπροφλοξασίνη, 68% στο ναλιδιξικό οξύ και 22,1% στην πενικιλλίνη G [Duffy κ.ά. 1999].

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4. ΕΛΕΓΧΟΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ & ΑΡΜΟΔΙΕΣ ΑΡΧΕΣ

4.1 Η ΑΝΑΓΚΗ ΓΙΑ ΠΡΟΤΥΠΑ ΑΣΦΑΛΕΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

«Η τροφή μας είναι το φάρμακο μας και το φάρμακο μας είναι η τροφή μας» αναφέρει ο Ιπποκράτης.
Μέσα από τα λόγια αυτά, δεν είναι δύσκολο να καταλάβουμε το διαχρονικά σημαντικό ρόλο που διαδραματίζει για τη δημόσια υγεία, ο τομέας των τροφίμων και γενικότερα η διατροφή.

Στην σύγχρονη εποχή η διασφάλιση της υγιεινής και ασφάλειας των τροφίμων, καθ' όλο το μήκος της εφοδιαστικής αλυσίδας, αποτελεί μια συνεχή πρόκληση, τόσο για τις επιχειρήσεις που δραστηριοποιούνται στον κλάδο, όσο και για τις κυβερνήσεις οι οποίες καθορίζουν το νομοθετικό πλαίσιο. Σήμερα, οι καταναλωτές των εκβιομηχανισμένων χωρών, είναι ενημερωμένοι και απαιτούν τρόφιμα, ζωικής προέλευσης, σταθερής και υψηλής ποιότητας απαλλαγμένα από κατάλοιπα φαρμάκων και περιβαλλοντικούς ρύπους. Ο τομέας βιομηχανοποίησης των τροφίμων, πλέον, δίνει μεγάλη έμφαση στον έλεγχο της ασφάλειας και της ποιότητας, την ιχνηλασιμότητα των προϊόντων τροφίμων και σε περιβαλλοντικά θέματα, καθώς επίσης και στην μετάβαση από τη χύδην παραγωγή προς την παραγωγή προϊόντων ειδικών προδιαγραφών υψηλής προστιθέμενης αξίας. Για να διεκπεραιωθούν όλα αυτά, οι επιχειρήσεις τροφίμων παγκοσμίως χρησιμοποιούν όλο και περισσότερο, συστήματα διασφάλισης της ποιότητας και ασφάλειας των τροφίμων, αλλά και των διεργασιών παραγωγής, διευκολύνοντας έτσι την επικύρωση των μέτρων ελέγχου που χρησιμοποιούνται για το σκοπό αυτό. Ιδιωτικά συστήματα ελέγχου ποιότητας, πρότυπα και προγράμματα πιστοποίησης, χρησιμοποιούνται για την ανταπόκριση των υψηλότερων προσδοκιών των καταναλωτών, καθώς η ποιότητα δεν σχετίζεται μόνο με το τελικό προϊόν αλλά και με τα χαρακτηριστικά παραγωγής και τις διαδικασίες διανομής [Holleran 1999].

Ερχόμενοι στη σύγχρονη παραγωγή και εστιάζοντας στην ασφάλεια των παραγόμενων τροφίμων από την άποψη των καταλοίπων των χημικών ουσιών, διαπιστώνουμε ότι ένας μεγάλος αριθμός χημικών εξωγενών παραγόντων ποικίλης δραστικότητας, συχνά αποτελεί την κύρια αιτία της δημιουργίας μιας

πολύπλοκης εικόνας επιβαρυμένων με χημικά κατάλοιπα τροφίμων και την υποβάθμιση τους, η οποία εντέλει οδηγεί στην μείωση της εμπιστοσύνης του καταναλωτή. Επιπλέον, το γεγονός ότι η ανθρωπότητα δοκιμάστηκε από μια σειρά διατροφικών κρίσεων, παλαιότερα με τις ορμόνες και πρόσφατα με το σύνδρομο των τρελών αγελάδων, την ανίχνευση διαφόρων καταλοίπων σε ζωικά και φυτικά προϊόντα, τις διοξίνες στα πουλερικά και την γρίπη των πτηνών, έπληξε κατάφωρα την εμπιστοσύνη του κοινού. Τούτο, ώθησε την Ε.Ε. στην αποπεράτωση διαφόρων διορθωτικών μέτρων, κυρίως με τη θέσπιση ενός επιστημονικού φορέα. Στόχος της ίδρυσης του φορέα αυτού ήταν, η παροχή ανεξάρτητων επιστημονικών συμβουλών και ιδεών σε θέματα ασφάλειας τροφίμων, καθ΄ όλο το φάσμα της τροφικής αλυσίδας και ως εκ τούτου δημιουργήθηκε ο Ευρωπαϊκός Οργανισμός Ασφάλειας Τροφίμων (EFSA). Επιπρόσθετα, για να ολοκληρωθεί η διαδικασία της διασφάλισης ενός υψηλού επιπέδου ποιότητας των τροφίμων, της υγείας και της ορθής μεταχείρισης των ζώων και φυτών, με την λήψη κατάλληλων μέτρων δημιουργίας της εσωτερικής αγοράς, δημιουργήθηκε το Γρήγορο Σύστημα Επαγρύπνησης για τα Τρόφιμα και τις Ζωοτροφές (Rapid Alert System for Food and Feed, RASFF) [Tyrpenou 2008].

4.2 Η ΣΗΜΑΣΙΑ ΤΗΣ ΑΣΦΑΛΕΙΑΣ ΤΩΝ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

Σε παγκόσμιο επίπεδο, οι οργανισμοί που ασχολούνται με θέματα ασφάλειας των τροφίμων είναι η FAO και η WHO, οι δύο οργανισμοί των Ηνωμένων Εθνών και ο Παγκόσμιος Οργανισμός Εμπορίου (World Trade Organization, WTO). Το 1962, ως αποτέλεσμα του Food Standards Programme, ιδρύθηκε από τους FAO και WHO ο *Codex Alimentarius*, με στόχο την δημιουργία ενός οργανισμού που θα λειτουργούσε ως «ομπρέλα» για τη διαμόρφωση μιας ενιαίας πολιτικής σχετικά με τα τρόφιμα σε παγκόσμιο επίπεδο. Σκοπός του *Codex* είναι η προστασία της δημόσιας υγείας και η υποστήριξη ισορροπημένων σχέσεων εμπορίου στην αγορά τροφίμων. Για τον σκοπό αυτό αναπτύχθηκαν πρότυπα, σε σχέση με τα χαρακτηριστικά πρώτων υλών και επεξεργασμένων υλικών, την υγιεινή των τροφίμων, την παρουσία υπολειμμάτων φαρμάκων και πιθανόν προσμίξεων, την επισήμανση και τις μεθόδους ανάλυσης και δειγματοληψίας [Luning κ.ά. 2002]. Τα τρόφιμα που διατίθενται στην αγορά για τοπική κατανάλωση ή εξαγωγή, πρέπει να είναι ασφαλή προς βρώση και να εξασφαλίζουν καλή ποιότητα. Πρέπει επίσης να είναι απαλλαγμένα από νοσογόνους παράγοντες (μικρόβια, ιούς, κατάλοιπα φαρμάκων, κ.α.) και η σύνθεση τους να είναι εγκεκριμένη και βασισμένη στα πρότυπα που θέτει ο «Κώδικας», για την αποφυγή κινδύνων που θα μπορούσαν να βλάψουν τα ζώα, τα φυτά και τους πολίτες στις χώρες εισαγωγής.

Όπως προαναφέρθηκε, την τελευταία δεκαετία, η Ε.Ε. έχει κλονιστεί από διάφορα διατροφικά σκάνδαλα πολλά από τα οποία είχαν ως επίκεντρο την κτηνοτροφία και τα προϊόντα της. Σε συνδυασμό, με την συνεχώς αυξανόμενη βακτηριακή αντίσταση σε ολοένα και περισσότερα αντιβιοτικά, η Ευρωπαϊκή Επιτροπή καθώς και τα επιμέρους κράτη-μέλη, προσπαθώντας να διασφαλίσουν την ασφάλεια και την υγιεινή των τροφίμων, με απώτερο στόχο την προστασία της υγείας του Ευρωπαίου καταναλωτή, προχώρησαν αρχικά στη δημιουργία του EFSA, καθώς και στην αναδιοργάνωση της κοινοτικής

νομοθεσίας και των εθνικών νομοθεσιών. Επί του παρόντος, βρίσκονται σε ισχύ διάφορες κοινοτικές οδηγίες περί ασφάλειας των τροφίμων, μερικές από τις οποίες σχετίζονται με τη χρήση αντιβιοτικών και την ανίχνευση των καταλοίπων τους στα εδώδιμα προϊόντα ζωικής παραγωγής. Ειδικότερα, προχώρησαν στη δημιουργία οργανισμών υπεύθυνων για την ασφάλεια των τροφίμων σε κάθε κράτος-μέλος, οι οποίοι είναι υποχρεωμένοι να συνεργάζονται μεταξύ τους. Οι δύο βασικοί πυλώνες που συνιστούν μια ολοκληρωμένη στρατηγική της Ε.Ε., για την αντιμετώπιση των κινδύνων που ελλοχεύουν στα τρόφιμα, για την δημόσια υγεία, αφορούν:

- την νομοθεσία για την ασφάλεια των τροφίμων και των ζωοτροφών και
- τις έγκυρες επιστημονικές συμβουλές, στις οποίες βασίζονται οι αποφάσεις και τα μέτρα επιβολής και ελέγχου.

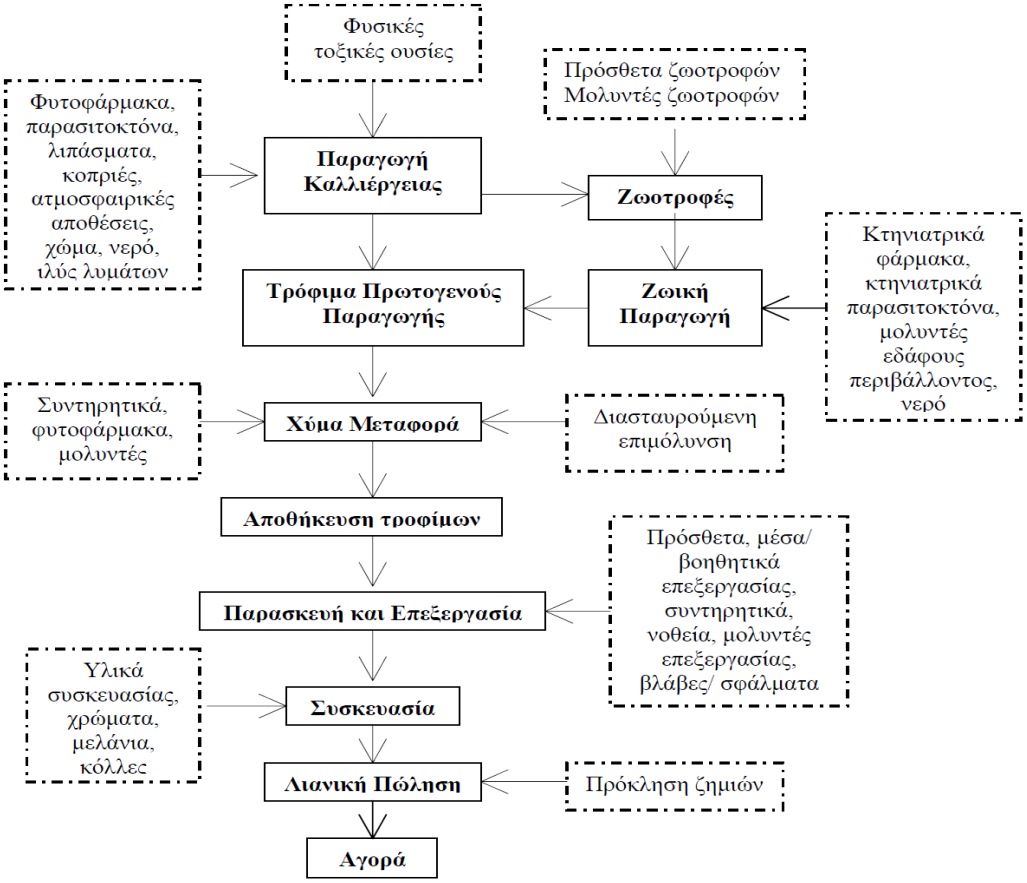
Η εδραίωση της λειτουργίας ειδικευμένων οργανισμών όπως ο EMA και η ίδρυση του ECDC, αποτελούν τεκμήρια της αυξανόμενης δέσμευσης της Ε.Ε. υπέρ μιας ενιαίας πολιτικής για την υγεία. Προς όφελος της δημόσιας υγείας αποβαίνουν επίσης δράσεις σε τομείς πολιτικής όπως είναι το περιβάλλον και τα τρόφιμα. Η έναρξη ισχύος του ρυθμιστικού πλαισίου REACH (Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals), για την αξιολόγηση και την καταχώριση χημικών ουσιών και όπως αναφέρθηκε η ίδρυση του EFSA, αποτελούν επίσης σαφείς ενδείξεις των διεπιστημονικών προσπαθειών που καταβάλλονται, με στόχο τη βελτίωση της υγείας των πολιτών της Ε.Ε. Θεωρείται πλέον επιβεβλημένο να διατίθεται στην Ε.Ε. ικανότητα ταχείας και συντονισμένης αντίδρασης σε σοβαρές απειλές για την υγεία, ιδίως αν ληφθούν υπόψη η απειλή της βιοτρομοκρατίας και οι πιθανότητες εκδήλωσης παγκόσμιων επιδημιών, σε μια εποχή όπου η ταχύτητα με την οποία μπορούν να πραγματοποιηθούν οι μετακινήσεις σε ολόκληρο τον κόσμο καθιστά ευκολότερη την εξάπλωση των ασθενειών. Κοινός στόχος είναι η καταπολέμηση των βασικών αιτιών κακής υγείας που σχετίζονται με τον τρόπο ζωής και με οικονομικούς και περιβαλλοντικούς παράγοντες (ρύπανση από φάρμακα, βαρέα μέταλλα, ενδοκρινικοί διαταράκτες). Αυτό προϋποθέτει στενή συνεργασία με άλλους τομείς πολιτικής της Ε.Ε. και συγκεκριμένα τομείς που αφορούν το περιβάλλον, τις μεταφορές, τη γεωργία και την οικονομική ανάπτυξη. Επιπλέον, προϋποθέτει εγγύτερες διαβουλεύσεις με όλους τους ενδιαφερόμενους και διαδικασίες λήψης αποφάσεων ακόμη πιο ανοικτές και διαφανείς. Μια σημαντική πρωτοβουλία είναι η σύσταση μηχανισμού δημόσιας διαβούλευσης σε θέματα υγείας. Στις ΗΠΑ τα συστήματα διασφάλισης ποιότητας υπάρχουν εδώ και πολλά χρόνια και στοχεύουν κυρίως σε μεθόδους ασφαλούς παραγωγής, αλλά και στη φυσική υγεία των παραγωγικών ζώων. Τέτοια παραδείγματα, αποτελούν προγράμματα διασφάλισης της ποιότητας του βοδινού κρέατος (*Beef Quality Assurance Program of the National Cattlemen's Beef Association*) για την μείωση των καταλοίπων, καθώς και του χοιρινού κρέατος (*National Pork Producers Council Pork Quality Assurance Program*) το οποίο στοχεύει σε ορθές πρακτικές διαχείρισης (*good management practices*). Παρόλο που τα προηγούμενα χρόνια δινόταν περισσότερη προσοχή σε θέματα σχετικά με την ευζωία και το περιβάλλον, το θέμα της ιχνηλασιμότητας έχει πλέον κατακτήσει το υψηλότερο επίπεδο στην ατζέντα των ζητημάτων περί διαχείρισης τροφίμων [Esbjerg και Bruun 2003].

4.3 ΕΥΡΩΠΑΪΚΗ ΕΝΩΣΗ ΚΑΙ ΕΛΕΓΧΟΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

4.3.1 Νομοθετικό Πλαίσιο

Η προστασία της δημόσιας υγείας και, ειδικότερα, τα ίδια τα συστήματα υγειονομικής περίθαλψης, εξακολουθούν να αποτελούν πρωτίστως ευθύνη των κρατών-μελών. Εντούτοις, η Ε.Ε. εξακολουθεί να είναι επιφορτισμένη με τον σημαντικό ρόλο που αφορά την βελτίωση της δημόσιας υγείας, την πρόληψη και την διαχείριση των ασθενειών, την άμβλυνση των απειλών για την ανθρώπινη υγεία και την εναρμόνιση των στρατηγικών των κρατών μελών στον τομέα της υγείας. Η Ε.Ε. έχει θέσει με επιτυχία σε εφαρμογή μια συνολική πολιτική μέσω της στρατηγικής «*One Health*» και του προγράμματος δράσης της, για την περίοδο 2014-2020, καθώς και μιας δέσμης Κανόνων παράγωγου δικαίου. Το ισχύον θεσμικό πλαίσιο για την υποστήριξη της υλοποίησης της πολιτικής περιλαμβάνει τη Γενική Διεύθυνση Υγείας και Ασφάλειας των Τροφίμων της Επιτροπής (ΓΔ SANTE), καθώς και ειδικευμένους οργανισμούς, όπως είναι το ECDC και ο EMA.

Κυρίαρχος στόχος της Ε.Ε. σήμερα, είναι η προαγωγή της 'καλής' υγείας μέσω της διασφάλιση της ποιότητας των τροφίμων και της σωστής διαχείρισης του ζωικού κεφαλαίου. Η στρατηγική αυτή διασφαλίζει τη δυνατότητα ανίχνευσης των τροφίμων καθ' όλη τους την πορεία, από τη μονάδα παραγωγής μέχρι το τραπέζι του καταναλωτή. Πλήθος κινδύνων μπορεί να εισαχθεί στα τρόφιμα σε όλη τη διαδρομή τους στην αλυσίδα παραγωγής, όπως παρουσιάζεται στο Διάγραμμα 1 προκαλώντας την μόλυνση τους. Η ασφάλεια των τροφίμων, επομένως, πρέπει να εξετάζεται σε κάθε στάδιο της τροφικής αλυσίδας. Ο ρεαλιστικός στόχος των παραγωγών τροφίμων και των συστημάτων ασφαλείας των τροφίμων είναι η μείωση, κατά το δυνατόν, της πιθανότητας εμφάνισης κινδύνων στα τρόφιμα. Για το σκοπό αυτό απαιτείται σήμερα η ανάλυση της επικινδυνότητας των τροφίμων και η ποσοτικοποίηση αυτών (Ποσοτικοποιημένη Ανάλυση Επικινδυνότητας – *Quantitative Risk Assessment*, *QRA*). Η ανάλυση κινδύνου εξαρτάται από τη φύση και τον τύπο του τρόφιμου, αλλά και από τον καταναλωτή [Τζιά]. Αυστηρά πρότυπα εφαρμόζονται, τόσο στα προϊόντα που παράγονται στην Ε.Ε., όσο και σε αυτά που εισάγονται από άλλες χώρες. Γι' αυτό, η Ε.Ε. εφαρμόζει ένα σύστημα έγκαιρης προειδοποίησης ώστε να εντοπίζονται έγκαιρα μη ασφαλή τρόφιμα, όπως επίσης και τρόφιμα τα οποία περιέχουν απαγορευμένες ουσίες ή αυτά που ενέχουν κίνδυνο τροφικής δηλητηρίασης του καταναλωτή. Το σύστημα αυτό, επικεντρώνεται ακόμη στον εντοπισμό αυξημένων συγκεντρώσεων ουσιών υψηλού κινδύνου, όπως είναι τα κατάλοιπα κτηνιατρικών φαρμάκων στα κτηνοτροφικά προϊόντα (εδώδιμοι ιστοί, γαλακτοκομικά, αυγά) και στα προϊόντα ιχθυοκαλλιέργειας.



Διάγραμμα 1: Αλυσίδα τροφίμων [Τζιά].

Η νομοθεσία καλύπτει ένα ευρύ πεδίο από τις ζωοτροφές και τα τρόφιμα, έως την υγιεινή των τροφίμων, εφαρμόζοντας τα ίδια αυστηρά πρότυπα σε όλη την Ε.Ε. Οι γενικοί κανόνες για όλα τα τρόφιμα και τις ζωοτροφές συμπληρώνονται από περιοριστικά μέτρα που άπτονται φλεγόντων θεμάτων, όπως είναι η χρήση αντιμικροβιακών ουσιών, στα οποία απαιτείται ιδιαίτερη προστασία του καταναλωτή και ιδιαίτερα των ευαίσθητων πληθυσμιακών ομάδων. Η Ευρωπαϊκή Επιτροπή ελέγχει γενικά την εφαρμογή της κοινοτικής νομοθεσίας για τις ζωοτροφές και τα τρόφιμα, εξετάζοντας την ορθή εναρμόνιση της με την εθνική νομοθεσία κάθε κράτους-μέλους και διενεργώντας επιτόπιες επιθεωρήσεις τόσο στις χώρες της Ε.Ε., όσο και σε άλλες χώρες [http://europa.eu/pol/food/index_el.htm]. Η νομική βάση των απαιτήσεων καθώς και των ελέγχων στα τρόφιμα ζωικής προέλευσης, απορρέει από τους κανονισμούς και τις αποφάσεις της Ε.Ε. που ισχύουν μέχρι και σήμερα για τα τρόφιμα. Σημαντικότερες των οποίων είναι:

- Η Οδηγία 89/397/EC, σχετικά με τον επίσημο έλεγχο των τροφίμων.
- Ο Κανονισμός 90/2377/EC, ο οποίος έχει αντικατασταθεί από τον Κανονισμό 37/2010/EC, σχετικά με τον καθορισμό ανώτατων ορίων καταλοίπων κτηνιατρικών φαρμάκων στα τρόφιμα ζωικής προέλευσης.
- Η Οδηγία 96/23/EC για τη λήψη μέτρων ελέγχου για ορισμένες ενώσεις και τα κατάλοιπά τους σε ζώντα ζώα και στα προϊόντα τους.

- Η απόφαση 657/2002/EC για την επίδοση των αναλυτικών μεθόδων και την ερμηνεία των αποτελεσμάτων.

Οι τελευταίες τρεις οδηγίες εστιάζονται κυρίως στο θέμα των καταλοίπων κτηνιατρικών φαρμάκων σε τρόφιμα ζωικής προέλευσης και στον καθορισμό των κριτηρίων για την επικύρωση των αντίστοιχων αναλυτικών μεθόδων που εφαρμόζονται [Council Directive 89/397/EC & 96/23/EC, Council Regulation 90/2377/EC, Commission Decision 657/2002/EC].

4.3.2 Κατάλοιπα κτηνιατρικών φαρμάκων στα τρόφιμα

Η χορήγηση κτηνιατρικών φαρμάκων σε παραγωγικά ζώα, μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα την παρουσία καταλοίπων στα τρόφιμα που προέρχονται από τα υπό θεραπεία ζώα. Με στόχο την προστασία της δημόσιας υγείας, τα ΑΟΚ καθορίζονται σύμφωνα με γενικώς αναγνωρισμένες αρχές για την αξιολόγηση της ασφάλειας και με βάση οποιαδήποτε άλλη επιστημονική αξιολόγηση της ασφάλειας των σχετικών ουσιών. Η αξιολόγηση ασφάλειας, πραγματοποιείται από διεθνείς οργανισμούς και ιδίως στο πλαίσιο του *Codex Alimentarius*, ή αν οι ουσίες αυτές χρησιμοποιούνται για άλλους σκοπούς από άλλες κοινοτικές επιστημονικές επιτροπές. Με την πρόοδο της επιστημονικής τεχνολογίας, είναι πλέον δυνατή η ανίχνευση της παρουσίας καταλοίπων κτηνιατρικών φαρμάκων στα τρόφιμα σε όλο και χαμηλότερες συγκεντρώσεις. Για τον λόγο αυτό, έχουν θεσπιστεί τα ΑΟΚ, σε κοινοτικό επίπεδο, των φαρμακολογικώς ενεργά ουσιών που χρησιμοποιούνται στα κτηνιατρικά φάρμακα, για όλα τα τρόφιμα ζωικής προέλευσης, συμπεριλαμβανομένων και των ιχθύων.

Με βάση την Οδηγία 90/2377/EC, η Ευρωπαϊκή Επιτροπή εκτιμώντας ότι μετά από την επιστημονική αξιολόγηση της Επιτροπής κτηνιατρικών φαρμάκων, τα ΑΟΚ πρέπει να θεσπίζονται με μια σύντομη διαδικασία που να εγγυείται στενή συνεργασία της Επιτροπής με τα κράτη μέλη. Αυτό διασφαλίστηκε και περιλαμβάνεται στο πλαίσιο της Επιτροπής που συστάθηκε, βάση της Οδηγίας 81/852/EC (όπως τροποποιήθηκε τελευταίος από την οδηγία 87/20/EC), περί προσεγγίσεως των νομοθεσιών των κρατών μελών σχετικά με τα αναλυτικά, φαρμακοτοξικολογικά και κλινικά πρότυπα και πρωτόκολλα, στον τομέα του ελέγχου των κτηνιατρικών φαρμάκων. Η Επιτροπή επίσης εκτιμά ότι, απαιτείται μια επείγουσα διαδικασία προκειμένου να εξασφαλίζεται η ταχεία επανεξέταση κάθε ορίου ανοχής που αποδεικνύεται ανεπαρκές για την προστασία της δημόσιας υγείας. Αλλά, και η διασφάλιση διατάξεων, για το συστηματικό καθορισμό ΑΟΚ για νέες ουσίες με φαρμακολογική δράση, οι οποίες χορηγούνται σε παραγωγικά ζώα. Ειδικότερα, η Επιτροπή εκτιμά ότι επιβάλλεται η θέσπιση διατάξεων για τον καθορισμό ΑΟΚ, για ουσίες που χρησιμοποιούνται ήδη ευρέως στα κτηνιατρικά φάρμακα και οι οποίες χορηγούνται σε παραγωγικά ζώα.

4.3.3 Φαρμακούχες Ζωοτροφές

Σύμφωνα με την Ευρωπαϊκή Οδηγία, ως φαρμακούχος ζωοτροφή, ορίζεται κάθε μείγμα κτηνιατρικού φαρμάκου και ζωοτροφής, που διατίθεται στην αγορά έτοιμο προς χρήση και προορίζεται να χορηγηθεί στα ζώα χωρίς άλλη επεξεργασία, λόγω των θεραπευτικών ή προληπτικών ιδιοτήτων του

φαρμάκου, όπως αυτές αναφέρονται στον ορισμό του κτηνιατρικού φαρμάκου. Η παραγωγή, πώληση, προμήθεια και χρήση των φαρμακούχων ζωοτροφών στην Ε.Ε. ρυθμίζεται από την Οδηγία 90/167/ΕC. Οι φαρμακούχες ζωοτροφές επιτρέπεται να παρασκευάζονται μόνο από φαρμακούχα προμίγματα η παραγωγή και χρήση των οποίων καθορίζεται από την Οδηγία 2001/82/ΕC. Ως φαρμακούχο πρόμιγμα, ορίζεται ένα κτηνιατρικό φάρμακο εκ των προτέρων παρασκευασμένο, με σκοπό την μεταγενέστερη παρασκευή φαρμακούχων ζωοτροφών. Για να χρησιμοποιηθεί μια δραστική ουσία σε φαρμακούχο πρόμιγμα πρέπει να έχει προηγούμενος καταχωρηθεί σε κάποιο από τα τέσσερα παραρτήματα του κοινοτικού Κανονισμού 2377/90, ώστε να έχει καθορισμένα όρια καταλοίπων. Υπολογίζεται ότι το 60% των αντιβιοτικών, χορηγούνται στα ζώα με την μορφή των φαρμακούχων ζωοτροφών [McEvoy 2002].

4.3.4 Σύστημα Έγκαιρης Προειδοποίησης για τα Τρόφιμα και τις Ζωοτροφές (RASFF)

Οι πρώτοι κανόνες για την ασφάλεια των τροφίμων χρονολογούνται από την αρχή της Ε.Ε. Με την πάροδο των χρόνων, οι διάφορες διατροφικές κρίσεις έφεραν στην επιφάνεια την ανάγκη για μια πιο απλή και ολοκληρωμένη προσέγγιση, έναντι των ενδεχομένων κινδύνων στα τρόφιμα που οφείλονται εν μέρη και σε μολυσμένες ζωοτροφές. Σημαντικός επίσης είναι και ο έλεγχος των ζωοτροφών που παρασκευάζονται σε μονάδες εκτροφής για ιδία χρήση και οι οποίες πρέπει να διέπονται από τις ίδιες αρχές ελέγχου. Έτσι, δημιουργήθηκε το RASFF με σκοπό να εφοδιάσει τις Αρμόδιες Αρχές ελέγχου, των κρατών-μελών, με ένα αποτελεσματικό τρόπο ανταλλαγής πληροφοριών για τα μέτρα που πρέπει να εφαρμόζονται για την διασφάλιση της υγιεινής των τροφίμων. Στο δίκτυο του συστήματος αυτού συμμετέχουν τα κράτη-μέλη της Ε.Ε., η Ευρωπαϊκή Επιτροπή και η EFSA.

Το σύστημα RASFF, μας επιτρέπει μια έγκαιρη διάδοση των πληροφοριών, σχετικά με τους νέους κινδύνους για τον καταναλωτή, αλλά και για τα μέτρα που λήφθηκαν ώστε να εμποδιστεί η είσοδος τους στην τροφική αλυσίδα. Οι προειδοποιήσεις γίνονται για διάφορους λόγους, όπως π.χ. η διαπίστωση της ύπαρξης σαλμονέλας στο κρέας, η παρουσία υδραργύρου στα ψάρια, ή η εισαγωγή τροφίμων από μη εγκεκριμένες εγκαταστάσεις μεταποίησης και ταυτόχρονα δημοσιεύονται στο διαδίκτυο. Το RASFF, χωρίζει τις πληροφορίες που πρέπει να σταλούν σε δύο κατηγορίες:

(Α) Ομάδα: Κοινοποιήσεις προειδοποίησης (Alert Notification)
Οι κοινοποιήσεις προειδοποίησης (Εικόνα 20), αποστέλλονται όταν τα τρόφιμα ή οι ζωοτροφές που είναι υπεύθυνες για κάποιο κίνδυνο έχουν διοχετευθεί στην αγορά και απαιτείται άμεση λήψη μέτρων. Οι κοινοποιήσεις αυτές γίνονται από τα κράτη-μέλη αφού έχει διαπιστωθεί το πρόβλημα και έχουν προβεί στην λήψη σχετικών μέτρων, όπως είναι η ανάκληση/απόσυρση. Στόχος των μέτρων αυτών είναι η ενημέρωση και η λήψη ανάλογων μέτρων προστασίας.

Εικόνα 20: Ετικέτα που χρησιμοποιείται για τις κοινοποιήσεις προειδοποίησης.

(Β) Ομάδα: Κοινοποιήσεις πληροφόρησης (Information Notification)

Οι κοινοποιήσεις πληροφόρησης (Εικόνα 21), αναφέρονται σε ένα τρόφιμο ή μια ζωοτροφή για το οποίο κάποιος κίνδυνος έχει διαπιστωθεί, αλλά για το οποίο τα άλλα κράτη-μέλη του δικτύου δεν πρέπει να πάρουν άμεσα μέτρα επειδή το συγκεκριμένο προϊόν δεν έχει φθάσει ακόμα στην αγορά τους. Οι κοινοποιήσεις αυτές, αφορούν κυρίως εμπορεύματα τροφίμων και ζωοτροφών τα οποία έχουν ελεγχθεί και απορριφθεί στα εξωτερικά σύνορα της Ε.Ε. Οι καταναλωτές μπορούν να πληροφορηθούν ότι τα προϊόντα αυτά υπόκεινται στις κοινοποιήσεις πληροφόρησης και ότι δεν έχουν φθάσει στην αγορά ή ότι όλα τα απαραίτητα μέτρα έχουν ήδη ληφθεί [Tyrpenou 2008].

Εικόνα 21: Ετικέτα που χρησιμοποιείται για τις κοινοποιήσεις πληροφόρησης.

Σύμφωνα με την ετήσια αναφορά για την λειτουργία του συστήματος RASFF, από το 1997 έως το 2006, οι κοινοποιήσεις (προειδοποίησης και πληροφόρησης), ανάλογα με την προέλευση του προϊόντος και ταξινομημένες ανάλογα με τις διάφορες γεωγραφικές περιοχές, παρουσίασαν μια τρομακτική αύξηση, δείχνοντας ότι το σύστημα απέδωσε πολύ περισσότερο απ' ότι αρχικά προβλεπόταν. Στην Εικόνα 22, μπορούμε να παρατηρήσουμε την αύξηση για τις κοινοποιήσεις από την Αφρική, Ασία, Ευρώπη, Λατινική Αμερική, Βόρεια Αμερική και Ωκεανία, με μεγαλύτερη αυτή της Ασίας [Tyrpenou 2008].

Εικόνα 22: Κοινοποιήσεις κατά γεωγραφική περιοχή, από το 1997-2006.

4.4 ΕΥΡΩΠΑΪΚΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ ΚΑΤΑΝΑΛΩΤΩΝ ΚΑΙ ΑΣΦΑΛΕΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

Εκτός από τα θεσμικά όργανα της Ε.Ε., ιδιαίτερα ευαισθητοποιημένοι είναι και οι πολίτες της. Ανταποκρινόμενη η Ε.Ε. σ' αυτή την ανάγκη προχώρησε στη σύσταση ενώσεων, τόσο σε εθνικό όσο και σε επίπεδο Ε.Ε., που θα αποτελούν την φωνή των ευρωπαίων καταναλωτών. Οι ενώσεις αυτές, σε ευρωπαϊκό επίπεδο, είναι η European Association for the Coordination of Consumer Representation in Standardisation (**ANEC**) και η Bureau Européen des Unions des Consommateurs (**BEUC**). Οι ενώσεις αυτές απαρτίζονται από εκπροσώπους των εθνικών ενώσεων των καταναλωτών. Η BEUC έχει να επιδείξει σημαντικό παρεμβατικό αλλά και ερευνητικό έργο πάνω σε θέματα σήμανσης τροφίμων, ασφάλειας τροφίμων, ικανοποίησης των διατροφικών αναγκών με την χαμηλότερη περιβαλλοντική επίπτωση (food sustainability), νέων τροφίμων (novel foods) καθώς επίσης και σε θέματα χρήσης γενετικά τροποποιημένων οργανισμών σε τρόφιμα. Χαρακτηριστικό παράδειγμα της αποτελεσματικής της δράσης συνιστά υποχρεωτική σήμανση των τροφίμων που περιέχουν ή παράγονται από γενετικά τροποποιημένους οργανισμούς. Η ANEC αποτελεί την φωνή των ευρωπαίων καταναλωτών σε θέματα τυποποίησης, εκπροσωπώντας και υπερασπίζοντας τα συμφέροντα των καταναλωτών σε θέματα πιστοποιήσεων, πολιτικών και νομοθεσιών σχετικών με την τυποποίηση. Χαρακτηριστικό πρόσφατο παράδειγμα (Ιούνιος 2014) του παρεμβατικού της ρόλου ήταν η σύνταξη μιας έκθεσης η οποία καταδείκνυε την ανάγκη για αυστηρότερο ρυθμιστικό περιβάλλον σχετικά με υλικά που έρχονται σε επαφή με τα τρόφιμα [http://www.beuc.org/ & http://www.anec.org/anec.asp]

4.5 ΤΑ ΣΥΓΧΡΟΝΑ ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ ΑΣΦΑΛΕΙΑΣ ΤΩΝ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

4.5.1 Πρότυπα ασφάλειας τροφίμων

Η ευαισθητοποίηση των καταναλωτών των ανεπτυγμένων χωρών συντέλεσε και στην κινητοποίηση του ιδιωτικού τομέα, που δραστηριοποιείται στον κλάδο των τροφίμων, καθώς επίσης και την μη κυβερνητικών οργανισμών. Η κινητοποίηση αυτή είχε σημαντικά αποτελέσματα, με την εμφάνιση και ανάπτυξη πληθώρας ιδιωτικών προτύπων ασφάλειας τροφίμων. Ιδιαίτερα, στη θέσπιση, ανάπτυξη και καθιέρωση αυτών των προτύπων συνέβαλλαν οι μεγάλες αλυσίδες υπεραγωγών, οι οποίες κατάφεραν να τα επιβάλουν στους προμηθευτές τους προκειμένου να διασφαλίσουν την ασφάλεια των προϊόντων που εμπορεύονται. Τα σημαντικότερα ιδιωτικά πρότυπα είναι τα εξής:

- Global Standard for Food Safety edition 6 εκδιδόμενο από το BRC (British Retail Consortium)
- CanadaGAP
- FSSC 22000 (Food Safety Standard Certification)
- Global G.A.P (Global Good Agriculture Practices)
- GRMS (Global Red Meat Standard)
- IFS (International Food Standard) version 6
- PrimusGFS (a Global Food Safety Initiative)
- SQF (Safe Quality Food) edition 7
- Dutch HACCP (Hazard Analysis and Critical Control Points)

– Synergy Global Standardization Services (Synergy 22000)
– Global Aquaculture Alliance (Seafood Processing Standard)

Τα πρότυπα αυτά είναι γνωστά και ως Συστήματα Διαχείρισης και Ασφάλειας Τροφίμων, περικλείνοντας τις δυο βασικές έννοιες της ασφάλειας των τροφίμων και της διαχείρισης της ποιότητας:

- Η *ασφάλεια των τροφίμων*, ορίζεται ως η διαβεβαίωση ότι το τρόφιμο δεν πρόκειται να προκαλέσει κάποια βλάβη στην υγεία του καταναλωτή εφόσον παρασκευάζεται και καταναλώνεται σύμφωνα με την προβλεπόμενη χρήση του.
- Ο όρος *διαχείριση της ποιότητας* αναφέρεται σ' όλες εκείνες τις δραστηριότητες που προβαίνει ένας οργανισμός προκειμένου να κατευθύνει και να ελέγξει όλα τα θέματα που αφορούν την ποιότητα.

Σ' αυτές τις δραστηριότητες περιλαμβάνονται η διαμόρφωση πολιτικής ποιότητας, ο καθορισμός των στόχων ποιότητας, ο ποιοτικός σχεδιασμός και έλεγχος, η συνεχής βελτίωση καθώς επίσης ο καθορισμός ευθυνών, αρμοδιοτήτων, διεργασιών, διαδικασιών και απαιτούμενων πόρων που διευκολύνουν την επίτευξη του επιθυμητού επιπέδου ποιότητας. Τα ιδιωτικά αυτά πρότυπα θεωρούνται πιο αυστηρά από τα πρότυπα που υπαγορεύουν οι κοινοτικοί και διεθνείς κανονισμοί για τέσσερις βασικούς λόγους. Πρώτον, γιατί θέτουν υψηλότερα το πήχη ως προς συγκεκριμένα χαρακτηριστικά των τροφίμων. Δεύτερον, γιατί ρυθμίζουν περισσότερες δραστηριότητες. Τρίτον, γιατί είναι πολύ πιο συγκεκριμένα στο πως θα επιτευχθούν οι στόχοι που επιβάλλει το ίδιο το πρότυπο. Τέταρτον, γιατί η υιοθέτηση και εφαρμογή ενός συστήματος HACCP ή ακόμη του ISO 22000 προαπαιτείται. Τα κίνητρα που ωθούν τις μεγάλες αλυσίδες υπεραγωγών να επιβάλλουν ιδιωτικά πρότυπα στους προμηθευτές είναι η αύξηση κερδοφορίας διαμέσου της διαφοροποίησης που παρέχουν τα ιδιωτικά πρότυπα στα προϊόντα και η μείωση του κόστους και ρίσκου σ' όλο το μήκος της εφοδιαστικής αλυσίδας.

Το πιο γνωστό διεθνές πρότυπο διαχείρισης ασφάλειας τροφίμων είναι το ISO 22000:2005 το οποίο εκδόθηκε από το Διεθνή Οργανισμό Τυποποίησης (International Organization for Standardization, ISO) ως μια προσπάθεια ένταξης του ελέγχου των κινδύνων που σχετίζονται με την παραγωγή, εμπορία, διάθεση και αποθήκευση τροφίμων. Το πρότυπο αυτό ενσωματώνει το HACCP σ' ένα ολοκληρωμένο σύστημα διοίκησης, την ιχνηλασιμότητα, αλλά και την εφαρμογή της σχετικής με το κάθε είδος τρόφιμου νομοθεσίας. Το ISO 22000 δίνει ιδιαίτερη έμφαση στον συνεχή έλεγχο λειτουργίας και την αποτελεσματική αντιμετώπιση μεμονωμένων δυσλειτουργιών. Αξίζει να σημειωθεί ότι ως βάση ανάπτυξης όλων αυτών των προτύπων, αποτέλεσαν το HACCP, οι Κανόνες Ορθής Γεωργικής Πρακτικής (Good Agriculture Practices, GAP) και το ISO 9000, τα οποία αποτελούν και τα τρία σημαντικότερα συστήματα διασφάλισης ποιότητας στο τομέα των τροφίμων. Λαμβάνοντας υπόψη την αυξημένη ευαισθητοποίηση καταναλωτών αλλά και την ανάπτυξη του όλο και αυστηρότερου κανονιστικού πλαισίου, τεκμαίρεται η ανάγκη, απ' όλα τα ενδιαφερόμενα μέρη (κυβερνήσεις, καταναλωτές, διεθνής οργανισμούς), για ποιοτικό και ασφαλές τρόφιμο με άμεσο αποτέλεσμα την εμφάνιση μεγάλης πληθώρας προτύπων ασφάλειας τροφίμων [Λαγοδήμος].

4.5.2 Ανάλυση κινδύνου (Risk Analysis) της ασφάλειας των τροφίμων

Η επιστημονική προσέγγιση των σύγχρονων συστημάτων ασφάλειας, αποτελεί πρωτίστως ένα σημαντικό και αναπόσπαστο κομμάτι της ανάλυσης κινδύνου, με σκοπό τη βελτίωση των συστημάτων ασφάλειας και την πρόληψη του κίνδυνου. Ως ανάλυση κινδύνου (Risk Analysis) της ασφάλειας των τροφίμων, νοείται μια διαδικασία επιστημονικής εκτίμησης της πιθανότητας και σοβαρότητας να συμβεί μια γνωστή ή πιθανή αρνητική επίδραση στην υγεία, λόγω έκθεσης του ανθρώπου σε κινδύνους τροφιμογενών ασθενειών. Ως εκ τούτου, η υιοθέτηση κατάλληλης στρατηγικής είναι επιβεβλημένη, υπό το φως των αποτελεσμάτων εκτίμησης των κινδύνων και εάν είναι αναγκαίο, η επιλογή και εφαρμογή κατάλληλων μέτρων ελέγχου (*Risk management*) καθώς και ανταλλαγής πληροφοριών και απόψεων μεταξύ των εκτιμητών κινδύνου (*Risk assessors*), διαχειριστών κινδύνου (*Risk managers*) και άλλων ενδιαφερομένων.

Η ανάλυση κινδύνου είναι απαραίτητη και παρέχει την αποτελεσματική διαχείριση, την αξιολόγηση και την κοινοποίηση των κινδύνων, σε συνεργασία με τους εμπλεκόμενους φορείς. Μια τέτοια επιστημονική προσέγγιση της ανάλυσης κινδύνων, δεν αποτελεί νέα τακτική, αλλά εν γένει είναι άρρηκτα συνδεδεμένη με διεθνώς καθιερωμένες διαδικασίες, όπως η ορθή γεωργική πρακτική, οι ορθές πρακτικές υγιεινής, καλής κατασκευαστικής πρακτικής και το HACCP. Δεδομένου ότι η επιστημονική αξιολόγηση των διαφόρων χημικών ουσιών, αποτελεί επίσης ένα έλεγχο με μάλλον μακρά παράδοση, η εφαρμογή της ανάλυσης κινδύνου χρησιμοποιείται πλέον ως ένα πλαίσιο επίλυσης προβλημάτων ασφάλειας. Στόχος της διαδικασίας αυτής είναι η συστηματική και διαρθρωμένη με επιστημονικό τρόπο, αντιμετώπιση των κινδύνων, ώστε να βελτιωθεί η ποιότητα λήψης αποφάσεων σε όλο το εύρος της τροφική αλυσίδα.

Η ανάλυση κινδύνου αποτελεί ένα μόνο μέρος ενός αποτελεσματικού συστήματος ασφάλειας των τροφίμων, γι΄αυτό και είναι απαραίτητο όπως βελτιωθούν όλα τα στοιχεία, που συνιστούν τα διάφορα συστήματα ασφάλειας και εμπλέκονται άμεσα με ανάλογους ελέγχους. Τέτοια στοιχεία, αφορούν μια πολιτική υιοθέτησης για την ασφάλεια των τροφίμων, την νομοθεσία περί τροφίμων, τις επιθεωρήσεις, εργαστηριακές αναλύσεις, την επιδημιολογική επιτήρηση των τροφιμογενών νόσων, τα συστήματα παρακολούθησης πιθανής χημικής και μικροβιολογικής μόλυνσης των τροφίμων και της ενημέρωσης, εκπαίδευσης και επικοινωνίας μεταξύ των εμπλεκόμενων φορέων. Μέσα σε αυτό το πλαίσιο, η κοινοτική οδηγία 657/2002/EC της Ευρωπαϊκής Επιτροπής καθορίζει με μεγάλη ακρίβεια τόσο τις απαιτήσεις που πρέπει να πληροί μια αναλυτική μέθοδος, για να χρησιμοποιηθεί ως μέθοδος επιβεβαίωσης στον έλεγχο καταλοίπων σε τρόφιμα ζωικής προέλευσης, όσο και τα στάδια επικύρωσής της. Εν ολίγοις, η χρήση της επιστημονικής προσέγγισης, σε θέματα ασφάλειας της ποιότητας τροφίμων, μέσω της ανάλυσης κινδύνων, επιτρέπει την εφαρμογή μιας σειράς βελτιωτικών μέτρων, προσαρμοσμένων σε υψηλού κινδύνου περιοχές, με απώτερο στόχο τον περιορισμό των επιπτώσεων των διαφόρων τροφιμογενών λοιμώξεων.

4.5.3 Στοιχεία του συστήματος εκτίμησης κινδύνου (Risk assessment)

Οι τρείς άξονες που καθορίζουν την ανάλυση κινδύνων, ως μια δομημένη διαδικασία λήψης αποφάσεων, συνίστανται από την *εκτίμηση/αξιολόγηση του κινδύνου* (Risk assessment), την διαχείριση και την επικοινωνία. Η ανάλυση κινδύνου κρίνεται αποτελεσματική, όταν και οι τρείς συνιστώσες ενσωματώνονται επιτυχώς. Εκ των τριών αυτών συστατικών στοιχείων, η αξιολόγηση επικινδυνότητας είναι μια διαδικασία επιστημονικής βάσης που έχει ως στόχο την εκτίμηση της πιθανότητας και του μεγέθους των επιβλαβών συνεπειών στην υγεία ενός ανθρώπινου πληθυσμού, εξαιτίας της έκθεσης σε τροφογενείς κίνδυνους.

Σε πρώτο στάδιο, η *αξιολόγηση του κινδύνου* (Risk assessment) περιλαμβάνει την ταυτοποίηση και χαρακτηρισμό του κινδύνου, εκτίμηση της έκθεσης και κατηγοριοποίηση της επικινδυνότητας. Σε δεύτερο στάδιο η διαδικασία *διαχείρισης του κινδύνου* (Risk management) διακρίνεται από την εκτίμηση του κινδύνου, με σκοπό την εξεύρεση εναλλακτικών λύσεων μέσω της επιλογής των κατάλληλων μέσων πρόληψης και ελέγχου, σε συνεργασία με τους εμπλεκόμενους φορείς, λαμβάνοντας υπόψη την αξιολόγηση του κινδύνου. Τέλος, η *γνωστοποίηση* ή *επικοινωνία των κινδύνων* (Risk communication) διεκπεραιώνεται μέσω της αμφίδρομής ανταλλαγής πληροφοριών και απόψεων, με σκοπό την σύνταξη έκθεσης εκτίμησης κινδύνου και την λήψη αποφάσεων διαχείρισης των κινδύνων. Η επικοινωνία, σχετικά με τους ενδεχόμενους παράγοντες κινδύνων αλλά και της αντίληψης των κινδύνων, λαμβάνει χώρα μεταξύ των αξιολογητών, των καταναλωτών, των διαχειριστών κινδύνου, της βιομηχανίας, της ακαδημαϊκής κοινότητας και τυχόν άλλων ενδιαφερομένων.

Για την ιεράρχηση των κινδύνων και τον καθορισμό των προτεραιοτήτων ορίζονται στόχοι και κριτήρια διαχείρισης κινδύνων. Οι στόχοι αυτοί, μπορούν να διατυπωθούν με βάση την αναγνώριση και το προφίλ του κινδύνου, εστιάζονται κυρίως στην δημόσια υγεία, λαμβάνοντας υπόψη κοινωνικούς και οικονομικούς παράγοντες. Τέτοιοι στόχοι περιλαμβάνουν την:

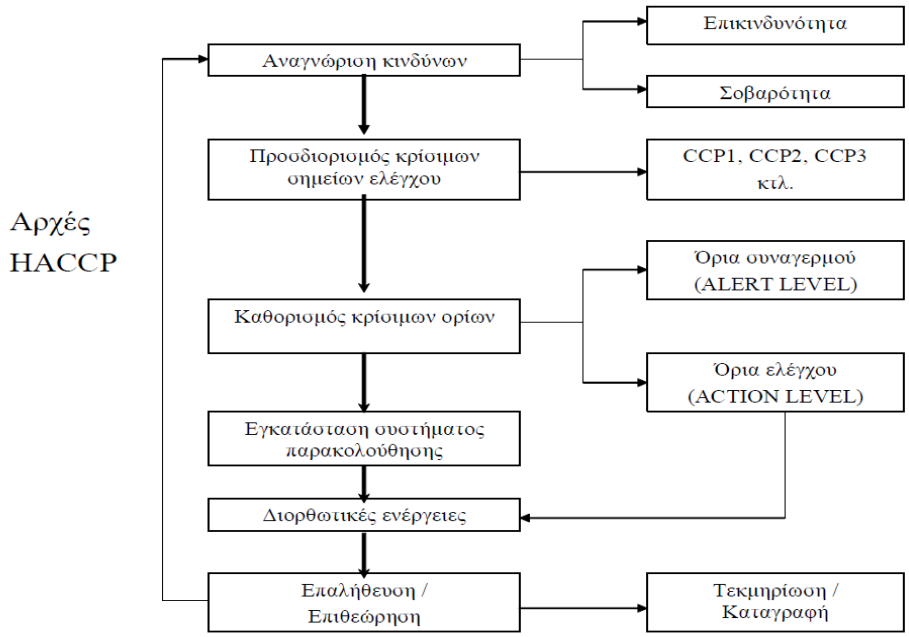
- Μείωση της χρονικής διάρκειας του κινδύνου, μετά από την έκθεση σε ένα συγκεκριμένο χημικό ρύπο.
- Μείωση του παθογόνου φορτίου για ένα βασικό προϊόν στο σημείο πώλησης.
- Ειδική μείωση των ασθενειών που προκαλούνται από ένα συγκεκριμένο παθογόνο.
- Προστασία των θέσεων εργασίας στον κλάδο των τροφίμων που συνδέονται με τον κίνδυνο.
- Διατήρηση του μεριδίου αγοράς μιας χώρας στο διεθνές εμπόριο τροφίμων.

Το επίπεδο κινδύνου, μπορεί να εκφραστεί με διάφορους τρόπους. Το *Κατάλληλο Επίπεδο Προστασίας* (Appropriate level of protection, ALOP), χαρακτηρίζει το επίπεδο κινδύνου που πρέπει να επιτευχθεί μέσω της διαχείρισης αυτού. Σημειώνεται ότι, μέχρι στιγμής η προσέγγιση ALOP, εφαρμόζεται κυρίως σε σχέση με τους μικροβιολογικούς κινδύνους. Το ALOP, καθορίστηκε μέσω της συμφωνίας SPS (The Sanitary and Phytosanitary Measures Agreement), ως το επίπεδο προστασίας που απαιτείται από τα κράτη-μέλη για τη θέσπιση υγειονομικών και φυτοϋγειονομικών μέτρων, για την προστασία της ανθρώπινης, ζωικής, φυτικής και γενικά της δημόσιας υγείας

μιας χώρας. Η έννοια ALOP, μερικές φορές αναφέρεται και ως «*αποδεκτό επίπεδο κινδύνου*». Στην περίπτωση που το πραγματικό επίπεδο κινδύνου είναι υψηλότερο από το ALOP, τότε οι ενέργειες αποβλέπουν στην μείωση του κινδύνου στα επίπεδα του επιλεγμένου ALOP. Τέλος, το ALOP θα μπορούσε να μεταφραστεί ως το κόστος (ανθρώπινο δυναμικό, οικονομικό, ηθικό, νομικό κλπ.) που μια κοινωνία είναι διατεθειμένη να πληρώσει για την επίτευξη ενός συγκεκριμένου ελεγχόμενου επιπέδου ασφάλειας των τροφίμων. Για τα πρόσθετα τροφίμων, υπολείμματα κτηνιατρικών φαρμάκων και φυτοφαρμάκων, οι αξιολογητές του κινδύνου, έχουν καθορίσει μια *αποδεκτή ημερήσια πρόσληψη* (ADI) σε μg/kg βάρους σώματος/ημέρα. Με βάση την ADI και σε συνδυασμό με την ορθή κτηνιατρική πρακτική στην χρήση κτηνιατρικών φαρμάκων, καθορίζονται τα ΑΟΚ για τα κτηνιατρικά φάρμακα [CAC/GL 53-2003].

4.6 ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗ ΤΗΣ ΑΣΦΑΛΕΙΑΣ ΤΩΝ ΤΡΟΦΙΜΩΝ – HACCP

Η διαχείριση της ασφάλειας των τροφίμων (*Risk management*), επιτυγχάνεται μέσω του συστήματος HACCP. Το HACCP αποτελεί μία ευρέως χρησιμοποιούμενη λογική προσέγγιση για ασφαλέστερες διεργασίες των τροφίμων. Σύμφωνα με τις αρχές του HACCP γίνεται ανάλυση των διεργασιών των τροφίμων με βάση τους κινδύνους (μικροβιολογικούς, χημικούς ή φυσικούς κινδύνους). Η ανάλυση αυτή καταλήγει στον προσδιορισμό των κρίσιμων σημείων ελέγχου (*Critical Control Points, CCPs*), ο έλεγχος των οποίων εξασφαλίζεται με διαχείριση των συνθηκών των διεργασιών και με ικανοποίηση των κρίσιμων ορίων (κριτηρίων) (Διάγραμμα 2). Τα συστήματα HACCP, σε συνδυασμό με ακριβείς και αξιόπιστες μετρήσεις και καλή τεκμηρίωση, παρέχουν μεγάλη σιγουριά για την ασφάλεια των παραγόμενων προϊόντων.



Διάγραμμα 2: Εφαρμογή των αρχών HACCP.

Από διεθνείς οργανισμούς, όπως η Διεθνής Επιτροπή για τις Μικροβιολογικές Προδιαγραφές των Τροφίμων (*ICMSF*) και η Επιτροπή CCFH (*Codex Committee on Food Hygiene*) του Codex Alimentarius, διαφαίνεται ότι υπάρχει

τάση για καθορισμό Αντικειμενικών Στόχων για την Ασφάλεια των Τροφίμων (Food Safety Objectives - FSOs). Οι FSOs για τη δημόσια υγεία, παρέχουν αντικειμενικούς στόχους για τον έλεγχο των κινδύνων στα τρόφιμα και καθιερώνουν όρια/συγκεντρώσεις για τους κινδύνους των τροφίμων ως Κατάλληλα/Επιτρεπόμενα Επίπεδα Προστασίας (ALOP). Οι FSOs συνδυάζουν το HACCP με Προγράμματα Μείωσης Παθογόνων (*Pathogen Reduction Programs*) και αυτό έχει ήδη βρει εφαρμογή σε συστήματα επιθεώρησης στις ΗΠΑ για ορισμένα προϊόντα (κρέας και πουλερικά). Οι FSOs ενσωματώνονται στο HACCP και επιτρέπουν την ανάπτυξη σημαντικών προγραμμάτων ασφάλειας των τροφίμων που βασίζονται σε μετρήσιμους/αντικειμενικούς στόχους για τη δημόσια υγεία. Έτσι, μέσω του συστήματος HACCP και των FSOs επιτυγχάνεται συνεχής βελτίωση της ασφάλειας των τροφίμων.

Η ιδέα των Αντικειμενικών Στόχων Ασφάλειας Τροφίμων (FSOs) είναι πολύ ισχυρή καθιστώντας την ασφάλεια των τροφίμων διάφανη και ποσοτικοποιήσιμη. Έχει το πλεονέκτημα ότι, λαμβάνοντας υπόψη το στόχο της υγείας του πληθυσμού και της κατηγορίας των τροφίμων, επιχειρεί να εξασφαλίσει την ασφάλεια στις διεργασίες, όπου εκεί είναι δυνατόν να επιτευχθεί συνολικά και ολοκληρωμένα ο στόχος. Επιπλέον, μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τις επί μέρους υπευθυνότητες στα διάφορα μέρη της αλυσίδας τροφίμων, όπως και εντός ενός μέρους της αλυσίδας ως προς τα διάφορα στάδια της παραγωγικής διαδικασίας, συνδέοντας τελικά τα όρια των κρίσιμων σημείων ελέγχου (Critical Control Points, CCPs) στο HACCP, με τον αντικειμενικό στόχο γενικότερα της προστασίας της δημόσιας υγείας. Η καθιέρωση Προδιαγραφών Ασφάλειας των Τροφίμων (Food Safety Performance Standards - FSPS) και Πρότυπων Διαδικασιών για την Υγιεινή Λειτουργία (Sanitation Standard Operating Procedures - SSOPs) στη βιομηχανία τροφίμων, κρίνεται απαραίτητη και μπορεί να επιτευχθεί με την συνεργασία των αρμόδιων υπηρεσιών επιθεώρησης για την ασφάλεια των τροφίμων (Food Safety & Inspection Service - FSIS με FDA). Επίσης έχουν αναπτυχθεί μοντέλα επιθεώρησης για HACCP (HACCP Inspection Model Project - HIMP) και Υγιεινή (Hygiene Risk Assessment Model - HYGRAM) [Τζιά].

4.6.1 Ασφάλεια των τροφίμων ζωικής προέλευσης

Λόγω του ανοίγματος των συνόρων των διαφόρων χωρών στη διακίνηση ζώων από άλλες χώρες, εντός και εκτός της Ε.Ε., ο υγειονομικός έλεγχος των ζώων που εκτρέφονται στην κάθε χώρα πρέπει να είναι εντατικός. Ο εντατικός έλεγχος διασφαλίζει την έγκαιρη αντιμετώπιση δυσμενών καταστάσεων με επιπτώσεις στην υγεία των ζώων και κατ΄επέκταση τη δημόσια υγεία. Είναι γεγονός ότι ασθένειες όπως η φυματίωση και η βρουκέλωση μπορεί να εμφανίσουν εξάρσεις λοιμώξεων στα ζώα και λόγω της εμπορίας ζώων σε παγκόσμιο επίπεδο. Απαραίτητος κρίνεται ο κτηνιατρικός υγειονομικός έλεγχος των ζώων, ο οποίος συντελεί σημαντικά στην εξάλειψη σοβαρών τροφολοιμώξεων στον άνθρωπο από μολυσμένα τρόφιμα ζωικής προέλευσης. Αυτό επιτυγχάνεται κυρίως, μέσω (i) ελέγχου της υγείας και ευημερίας των ζώων, παράλληλα με καταγραφή των νόσων κάθε κτηνοτροφικής μονάδας (ii) ελέγχου των χορηγούμενων κτηνιατρικών φαρμάκων στα ζώα (αντιμικροβιακά, αντιπαρασιτικά κ.α.) (iii) ελέγχου των ζωοτροφών (τοξίνες, μικρόβια κλπ.) και (iv) ελέγχου του παραγομένου γάλακτος και κρέατος της συγκεκριμένης

μονάδας μέσω καταγραφής στοιχείων. Επιπλέον, τα προβλήματα αυτά αντιμετωπίζονται εθνικά με προγράμματα εμβολιασμού ή θανάτωσης των προσβεβλημένων ζώων.

4.6.2 CCPs ενός βιομηχανικού σφαγείου

Το σύστημα *Ανάλυσης Επικινδυνότητας στα Κρίσιμα Σημεία ελέγχου* (HACCP) αποτελεί μια συστηματική επιστημονική προσέγγιση ελέγχου μιας διαδικασίας. Είναι σχεδιασμένο να προλαμβάνει την εμφάνιση προβλημάτων με το να διασφαλίζει ότι οι έλεγχοι εφαρμόζονται σε κάθε στάδιο του συστήματος παραγωγής όπου επικίνδυνες/κρίσιμες καταστάσεις μπορεί να εμφανιστούν. Στόχος είναι η εξαφάνιση ή μείωση σε αποδεκτά επίπεδα, όλων των δυνητικών κινδύνων που απειλούν τα προϊόντα ζωικής παραγωγής και συνεπώς τη δημόσια υγεία. Είναι γνωστό ότι η ασφάλεια των τροφίμων στην παραγωγική διαδικασία μπορεί να επιτευχθεί μέσω κατάλληλων προγραμμάτων ελέγχου (HACCP, GMPs, GHPs κλπ.). Είναι επίσης γνωστό ότι διάφορες χώρες μπορούν να νομοθετούν διάφορους στόχους ασφάλειας των τροφίμων FSOs για ορθή λειτουργία των προγραμμάτων ελέγχου HACCP. Σε κάθε HACCP μιας παραγωγικής διαδικασίας τροφίμων ζωικής προέλευσης πρέπει να απαιτείται όπως το αρχικό ζωοκομικό προϊόν συνοδεύεται πάντα από ένα έγγραφο, από εγγεγραμμένο κτηνίατρο, που πιστοποιεί ότι η κτηνοτροφική μονάδα είναι απαλλαγμένη από ζωοανθρωπονόσους.

Το έγγραφο αυτό είναι απαραίτητο, διότι διευκολύνει σε σημαντικό βαθμό τον περαιτέρω υγειονομικό έλεγχο και την ασφάλεια των τροφίμων. Για παράδειγμα σ' ένα βιομηχανικό σφαγείο, με σύστημα HACCP σφαγής χοίρων για χοιρινό κρέας, ανάμεσα στον έλεγχο των διάφορων κρίσιμων σημείων γίνεται και ο έλεγχος των εξής κρίσιμων σημείων.

- Παραλαβή ζώντων ζώων: Έλεγχος υγείας και συνοδευτικών εγγράφων από κτηνίατρο.
- Απουσία συμφόρησης των φλεβών (αυτιά).
- Ανάπαυση πριν την σφαγή: Έλεγχος σωστής λειτουργίας ψεκαστήρων νερού και εξαερισμού 1-3 φορές την ημέρα.
- Μετάβαση στο χώρο σφαγής: Οι μώλωπες και τα αιματώματα (στρες), ελέγχονται με τη σωστή εκπαίδευση του προσωπικού.
- Αναισθητοποίηση: Τα κατάγματα και τα αιματώματα ελέγχονται με τη σωστή ρύθμιση της συσκευής αναισθητοποίησης (90-110 V, 12-15A).
- Αφαίμαξη: Σωστή αποστείρωση μαχαιριού αφαίμαξης μετά από κάθε χρήση. Έλεγχος θερμοκρασίας νερού «αποστείρωσης».
- Ζεμάτισμα: Έλεγχος θερμοκρασίας και χλωρίωσης του νερού.
- Εκσπλαχνισμός: Αποφυγή τρώσης του πεπτικού σωλήνα, 100% συμμόρφωση με τις οδηγίες εργασίας, «αποστείρωση» μαχαιριών μετά από κάθε χρήση (80°C).
- Αφαίρεση ερυθρών εντοσθίων:100% συμμόρφωση με τις οδηγίες εργασίας, αποστείρωση μαχαιριών μετά από κάθε χρήση (80°C).

- Τεμαχισμός σε ημιμόρια: 100% συμμόρφωση με τις οδηγίες εργασίας, «αποστείρωση» πριονιού μετά από κάθε χρήση (80°C).
- Κρεοσκοπία: Παθολογοανατομικός έλεγχος και τριχινοσκόπιση.
- Ταξινόμηση: Απολύμανση βελόνης συσκευής μετά από κάθε χρήση.
- Ψύξη των σφάγιων: Θερμοκρασία στις εσωτερικές μυϊκές μάζες, 5°C σε 12-14 ώρες μετά τη σφαγή.
- Αφαίρεση δέρματος και λίπους: 100% συμμόρφωση με τις οδηγίες εργασίας, συχνή «αποστείρωση» μαχαιριών.

Τα CCPs σε ένα βιομηχανικό σφαγείο, καθορίζονται κυρίως από την παρουσία των παθογόνων μικροοργανισμών που απειλούν τα εδώδιμα προϊόντα ζωικής προέλευσης, κρίνοντας κατά πόσο αυτά σχετίζονται με τη δημόσια υγεία και κατά πόσο μπορούν να περιοριστούν σε κάθε στάδιο. Με σκοπό την απαλλαγή παθογόνων μικροοργανισμών από τα τρόφιμα, εδώ και πολλά χρόνια έχουν καθιερωθεί ορισμένα «προστατευτικά μέτρα» κατά την παραγωγική διαδικασία που ισχύουν διεθνώς, π.χ. στο γάλα έχει καθιερωθεί η παστερίωση στους 71,6^{o}C για 16sec, με σκοπό την απαλλαγή από τους διάφορους μικροοργανισμούς (βλαστικές μορφές βακτηρίων, ιοί κλπ.). Ο συνδυασμός αυτός χρόνου και θερμοκρασίας παστερίωσης έχει σαν στόχο την θανάτωση του βακίλου της φυματίωσης, που είναι από τα πλέον θερμοανθεκτικά μικρόβια. Στα προϊόντα ζύμωσης (αλλαντικά αέρος, γιαούρτια κλπ.) έχει καθιερωθεί ένα pH<4,6 για την απαλλαγή από διάφορους παθογόνους μικροοργανισμούς (π.χ. *Shigella spp*, *Pseudomonas spp* κλπ.). Στα εγκυτιωμένα τρόφιμα (κονσέρβες), καθορίζεται ότι η μείωση, των 12 λογαριθμικών μονάδων, του πληθυσμού του κλωστηριδίου της αλλαντίασης (*Clostridium botilinum*) με θερμική επεξεργασία, παρέχει ασφάλεια στους καταναλωτές αφού έχει ως αποτέλεσμα τη θανάτωση όλων των μικροοργανισμών (σπόρια βακτηρίων, μυκήτων κλπ.).

Τα παραπάνω «μέτρα ασφαλείας» προστατεύουν τον καταναλωτή από σοβαρές τροφιμογενείς λοιμώξεις. Τα τελευταία χρόνια όμως ακόμη και τα παραπάνω μέτρα υφίστανται κριτική. Σημαντικά παραδείγματα αμφισβήτησης αποτελούν:

- Η παστερίωση στους 71,6^{o}C για 16sec, διότι υπάρχουν μικροοργανισμοί περισσότερο θερμοανθεκτικοί της θερμικής αυτής επεξεργασίας όπως π.χ. το *Mycobacterium paratuberculosis* ή οι ιοί της κροτωγενούς εγκεφαλοπάθειας.

- Το pH<4,6 στα προϊόντα ζύμωσης, διότι σήμερα υπάρχουν παθογόνοι μικροοργανισμοί που επιβιώνουν για μεγάλο χρονικό διάστημα στο όξινο περιβάλλον των τροφίμων, με pH μικρότερο του ανωτέρω, όπως είναι η *Escherichia coli O157:H7* και η *Listeria monocytogenes*.

- Η θερμική επεξεργασία για 3min στους 121,1^{o}C, διότι δεν είναι ικανή να εξουδετερώσει τον λοιμογόνο παράγοντα πράιον της σπογγώδους εγκεφαλοπάθειας, ο οποίος απαιτεί θερμική επεξεργασία για 20min στους 133°C για την εξουδετέρωσή του.

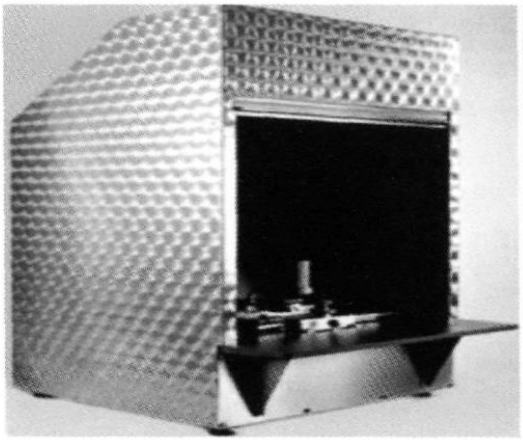
Όπως έχουμε ήδη αναφέρει, η επισκόπηση της διεθνούς βιβλιογραφίας δείχνει ότι τα τελευταία χρόνια έχουν προκύψει πολλές τροφολοιμώξεις με σοβαρές

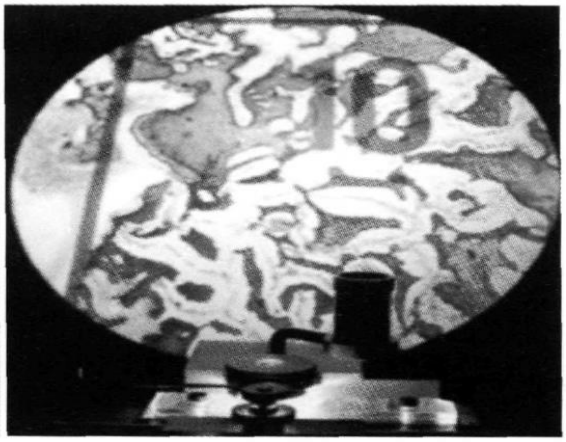
επιπτώσεις στην υγεία του καταναλωτή που προκαλούνται από παθογόνους μικροοργανισμούς, όπως είναι η *Escherichia coli O157:H7*, το *Campylobacter jejuni*, η *Salmonella enteritidis* και η *Listeria monocytogenes*. Οι έλεγχοι είναι καθοριστικής σημασίας, λόγω των ιδιόμορφων χαρακτηριστικών των παραπάνω μικροβίων. Συγκεκριμένα, η *Escherichia coli O157:H7* καταφέρνει να επιβιώσει για μεγάλο χρονικό διάστημα σε pH<4,6, ενώ η *Salmonella enteritidis* δημιουργεί μια λοίμωξη στα πτηνά χωρίς πολλά συμπτώματα. Τα πτηνά είναι φορείς και το μικρόβιο περνά από την ωοθήκη στο αυγό και διάφορα στελέχη του μικροβίου αυτού έχουν κατά καιρούς δημιουργήσει σοβαρά προβλήματα στην υγεία του ανθρώπου. Τέλος, έχει παρατηρηθεί ότι η *Listeria monocytogenes* αναπτύσσεται σε θερμοκρασίες χαμηλότερες των 4°C και μέχρι πριν λίγα χρόνια τα βακτήρια του γένους *Campylobacter jejuni* θεωρούνταν ότι προκαλούσαν λοιμώξεις μόνο στα ζώα [Γκόβαρης 2005].

4.6.3 Παθολογοανατομικός έλεγχος και τριχινοσκόπιση

Τόσο ο προ σφαγής έλεγχος της υγειονομικής κατάστασης των ζώων, όσο και η κρεοσκοπία, είναι κυρίως μακροσκοπικοί έλεγχοι που μόνο μερικές φορές υποστηρίζονται από περαιτέρω εργαστηριακή εξέταση. Γι' αυτό και όλη η διαδικασία ελέγχου δεν είναι συχνά σε θέση να εντοπίσει μικροβιακούς μολυσματικούς παράγοντες ή χημικά κατάλοιπα σε κλινικώς υγιή ζώα και δεν μπορεί να εγγυηθεί την πλήρη απουσία τους ή ακόμη την παρουσία τους σε αποδεκτά όρια συχνότητας ή συγκέντρωσης [Berends κ.ά. 1993].

Ο παθογοανατομικός έλεγχος μπορεί εύκολα να διαπιστώσει στο σφαγείο ένα νόσημα πχ. άνθρακας, σαρκοκυστίαση. Αλλά, οι ζωοανθρωπονόσοι όπως η τριχίνωση των χοίρων και ο πυρετός Q απαιτούν εργαστηριακή εξέταση διότι δεν υπάρχουν παθολογικά ευρήματα σε επίπεδο σφάγιου των ζώων. Η τριχινοσκόπιση, συνίσταται στην εξέταση τεμαχίου κρέατος για την παρουσία εγκυστωμένων προνυμφών, μετά από συμπίεση μεταξύ δύο υάλινων πλακιδίων σε ειδικά διαμορφωμένο μικροσκόπιο (Εικόνα 23), όπου η εικόνα προβάλλεται σε οθόνη, το τριχινοσκόπιο [Θεοδωρόπουλος]. Εδώ θα πρέπει να τονισθεί ότι η τριχινοσκόπιση, με την χρήση ειδικού τριχινοσκοπίου, είναι υποχρεωτική βάση νομοθεσίας. Εντούτοις, η τριχινοσκόπιση, δεν θεωρείται μέθοδος κατάλληλη για την ανίχνευση μη εγκυστωμένων προνυμφών, όπως αυτών του είδους *Trichinella pseudospiralis*, με επιπλέον μειονέκτημα το γεγονός ότι η μέθοδος είναι χρονοβόρα, πολυέξοδη και μη ευαίσθητη.





Εικόνα 23: Τριχινοσκόπιο [Θεοδωρόπουλος].

Έτσι, σε ένα σύγχρονο σφαγείο ο υγειονομικός έλεγχος της τριχίνωσης των χοίρων και του πυρετού Q, θα μπορούσε να γίνεται με σύγχρονες ορολογικές μεθόδους π.χ. ELISA [Γκόβαρης 2005]. Ως εκ τούτου, χρειάζεται μια ολοκληρωμένη προσέγγιση μέσω προγραμμάτων ελέγχου ολόκληρης της τροφικής παραγωγικής αλυσίδας, από την εκτροφή και την ασφαλή χρήση των ζωοτροφών μέχρι τον τελικό δέκτη του προϊόντος. Σε αυτή την ολοκληρωμένη προσέγγιση κάθε κρίκος της αλυσίδας έχει και αναλαμβάνει το μερίδιο ευθύνης που του αναλογεί, στην μείωση της παρουσίας των μικροβιακών μολυσματικών παραγόντων και των καταλοίπων στο τελικό προϊόν.

Τέλος η τοξοπλάσμωση και η νευροκυστικέρκωση θεωρούνται αναδυόμενες ασθένειες στη Δυτική Ευρώπη, η πολυκυστική εχινοκοκκίαση στην Κεντρική Ευρώπη, με σημαντική θνησιμότητα, ενώ η νέα τάση για κατανάλωση ωμών ιχθυηρών αποτελεί σημαντικό παράγοντα κινδύνου για την εξάπλωση της ανισακίασης στη Δυτική Ευρώπη. Η ανεπάρκεια των στοιχείων για την ολιστική προσέγγιση των παραγόντων κινδύνου καθιστά δαιδαλώδη κάθε προσπάθεια για προγραμματισμένη δράση. Η έγκαιρη αναγνώριση των εξάρσεων είναι εξαιρετικά δύσκολη, ενώ η μεγάλη περίοδος επώασης και η υποκλινική φάση αρκετών τροφιμογενών παρασιτικών ασθενειών περιορίζουν σημαντικά την στατιστική εκτίμηση της εξάπλωσης του κινδύνου. Επιπλέον, απαιτείται η περαιτέρω μελέτη της βιωσιμότητας και της συμπεριφοράς των παρασιτικών μορφών στο τρόφιμο. Ο κρεοσκοπικός έλεγχος των σφάγιων προβλέπεται για την κυστικέρκωση και την τριχινέλλωση, όχι όμως για την τοξοπλάσμωση. Επίσης, η χαμηλή ευαισθησία της οπτικής επιθεώρησης έχει ως αποτέλεσμα κάποια μολυσμένα είδη κρέατος να διαφεύγουν των κτηνιατρικών ελέγχων. Κατά συνέπεια, η πρόληψη κατευθύνεται στην αναζήτηση αποτελεσματικών εμβολίων στα ζώα και στον άνθρωπο. Κατά συνέπεια, η εγκατάσταση της ευρωπαϊκής βάσης δεδομένων για την μελέτη των στελεχών *Giardia spp*. και *Cryptosporidium spp.*, οι συλλογικές προσπάθειες για την αποδοτική λειτουργία των συστημάτων παρακολούθησης, της συστηματικής ενημέρωσης και αφύπνισης σε όλες τις χώρες της Ευρώπης, αποτελούν σημαντικές προκλήσεις για το μέλλον [Γκόβαρης 2005].

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5. ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΟΥ ΚΙΝΔΥΝΟΥ ΤΗΣ ΔΙΑΤΡΟΦΙΚΗΣ ΠΡΟΣΛΗΨΗΣ ΥΠΟΛΕΙΜΜΑΤΩΝ ΟΥΣΙΩΝ ΣΤΑ ΤΡΟΦΙΜΑ

5.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

«Ένα από τα δυσκολότερα σημεία στην επιστήμη της διατροφής είναι η μέτρηση της συνήθους ή της πραγματικής πρόσληψης τροφίμων και θρεπτικών συστατικών στο άτομο ή στην ομάδα»

(National Research Council, 1989)

Η ασφάλεια των τροφίμων αποτελεί καίριο ζήτημα για τον σύγχρονο καταναλωτή που συχνά εκτίθεται μέσω της διατροφής σε σειρά επικίνδυνων για

την υγεία του παραγόντων. Οι χημικοί ρυπαντές των τροφίμων αποτελούν μια σημαντική ομάδα επικίνδυνων παραγόντων με σοβαρές επιπτώσεις στην υγεία. Οι καταναλωτές τροφίμων ζωικής προέλευσης, δεν επιθυμούν την παρουσία υπολειμμάτων στα τρόφιμα που καταναλώνουν γιατί δεν έχουν καμία θρεπτική αξία, αντιθέτως δυνητικά αποτελούν κίνδυνο για την υγεία τους. Στην εποχή μας, ιδιαίτερα λόγω της εύκολης πρόσβασης του κοινού μέσω του τύπου ακόμη και σε θέματα όπως είναι η ύπαρξη καταλοίπων κτηνιατρικών φαρμάκων στα τρόφιμα, υπάρχει προβληματισμός και η απαίτηση για περισσότερη ενημέρωση σχετικά με την ασφάλεια των τροφίμων που διατίθενται στην αγορά. Κατά συνέπεια ο προσδιορισμός της έκθεσης των καταναλωτών σε χημικούς ρυπαντές αποτελεί σημαντική παράμετρο στα πλαίσια της ανάλυσης επικινδυνότητας των τροφίμων. Η διατροφική έκθεση προσδιορίζεται συσχετίζοντας τις διατροφικές συνήθειες μιας ομάδας πληθυσμού, με τα επίπεδα των ρυπαντών στα τρόφιμα. Η αξιολόγηση του κινδύνου, η οποία με επιστημονικές διεργασίες ελέγχει την επικινδυνότητα των υπολειμμάτων στα τρόφιμα, έχει αναπτυχθεί ευρέως τα τελευταία χρόνια [Tomerlin και Petersen 2004].

Δύο έννοιες που χρησιμοποιούνται ευρέως στην αξιολόγηση του κινδύνου, λόγω πρόσληψης υπολειμμάτων ρυπαντών μέσω της τροφής, είναι ο κίνδυνος και η επικινδυνότητα. Οι λέξεις αυτές, έχουν διαφορετική εννοιολογική σημασία. Ως *επικινδυνότητα* (Hazard) ορίζεται μια ιδιότητα ή μια κατάσταση που, υπό ορισμένες προϋποθέσεις, μπορεί να προκαλέσει δυσμενείς επιπτώσεις στην υγεία του καταναλωτή, ενώ με τον όρο *κίνδυνος* (Risk) υπό την ευρεία έννοια, εννοούμε μια συνάρτηση της πιθανής αρνητικής επίπτωσης στην υγεία του καταναλωτή και της σοβαρότητας αυτής, ως αποτέλεσμα της παρουσίας μιας επικινδυνότητας στα τρόφιμα. Η *αξιολόγηση του κινδύνου* (Risk Assessment), πιο συγκεκριμένα, εκφράζει «το συνδυασμό της πιθανότητας ή της συχνότητας εμφάνισης μιας καθορισμένης επικίνδυνης κατάστασης και του μεγέθους των συνεπειών αυτού του συμβάντος». Για παράδειγμα, πολλές χημικές ουσίες ή στοιχεία αποτελούν ενδεχόμενη πηγή κινδύνου για την ανθρώπινη υγεία. Θα υπάρξει όμως πραγματικός κίνδυνος μόνο όταν ο ανθρώπινος οργανισμός εκτεθεί σε αυτά.

Όπως έχει προαναφερθεί, η αξιολόγηση του κινδύνου, αποτελεί το επιστημονικό κλειδί της ανάλυσης κινδύνου και αναπτύχθηκε κυρίως λόγω της ανάγκης λήψης αποφάσεων σχετικά με την προστασία της υγείας του καταναλωτή και την αντιμετώπιση της επιστημονικής αβεβαιότητας. Η αρχή της *ανάλυσης του κινδύνου* (Risk Analysis) αποτελείται από τρεις χωριστές αλλά αλληλένδετες συνιστώσες, (**i**) την *αξιολόγηση κινδύνου* (Risk Assessment), (**ii**) την *διαχείριση κινδύνου* (Risk Management) και (**iii**) την δημοσιοποίηση κινδύνου (Risk Communication).

Ιδιαίτερα, η (**i**) *αξιολόγηση του κινδύνου* (Risk Assessment) ορίζεται ως η επιστημονικής βάσης διαδικασία που απαρτίζεται από τέσσερα στάδια:

- Την *εκτίμηση της επικινδυνότητας* (Hazard Assessment), με συλλογή δεδομένων από την υπό μελέτη περιοχή και *αναγνώριση των πηγών κινδύνου* (Data Collection and Hazard Evaluation).
- Την *εκτίμηση της τοξικότητας* (Toxicity Assessment) και την *αναγνώριση της επικινδυνότητας* (Hazard Identification) μιας χημικής ουσίας, με την βοήθεια

τοξικολογικών μελετών, προσδιορίζοντας έτσι τις πιθανές δυσμενείς επιπτώσεις στην υγεία του καταναλωτή. Παράλληλα, συνεκτιμώντας τις τοξικές επιπτώσεις της ένωσης σε σχέση με τη βιολογική απόκριση από πλευράς δόσης π.χ. σχέση δόσης-απόκρισης (Dose-Response Relationship), γίνεται *χαρακτηρισμός της επικινδυνότητας* (Hazard Characterization) και έτσι προκύπτουν τα αποδεκτά όρια της διατροφικής πρόσληψης.

- Την *εκτίμηση της έκθεσης* (Exposure Assessment) ή και *εκτίμηση της διατροφικής πρόσληψης* (Estimate Daily Intake), όπου εκτιμάται η διατροφική έκθεση των υπολειμμάτων χημικών ουσιών, η οποία προκύπτει από την κατανάλωση τροφίμων και νερού, που περιέχουν υπολείμματα.
- Τέλος τον *χαρακτηρισμό του κινδύνου* (Risk Characterization), συγκρίνοντας την εκτιμώμενη διατροφική πρόσληψη με τα αποδεκτά όρια διατροφικής πρόσληψης ή δόσης, τα οποία προέκυψαν από την εκτίμηση της επικινδυνότητας [Tomerlin και Petersen 2004, FAO/WHO Chapter 6].

Η *εκτίμηση της επικινδυνότητας* (Hazard Assessment) σε πρώτο στάδιο, είναι μια διαδικασία που καθιερώθηκε το 1995 από το συμβουλευτικό σώμα της μεικτής επιτροπής εμπειρογνωμόνων της WHO/FAO και ακολουθείται πιστά από την EFSA και το Τμήμα Γεωργίας των Ηνωμένων Πολιτειών (USDA). Σύμφωνα με το συμβουλευτικό σώμα των WHO/FAO, η αξιολόγηση του κινδύνου εκ της παρουσίας χημικών ουσιών στα τρόφιμα, περιγράφεται ως ο χαρακτηρισμός των πιθανών κινδύνων και των επιμέρους ρίσκων για τη ζωή και την υγεία, που προκύπτουν από την έκθεση των ανθρώπων σε τροφογενείς κινδύνους, κατά τη διάρκεια μιας καθορισμένης περιόδου [FAO/WHO Chapter 6].

Η (**ii**) *διαχείριση του κινδύνου* (Risk Management) αποτελεί μια αναπόσπαστη διαδικασία της αξιολόγησης του κινδύνου, βασιζόμενη στην στάθμιση εναλλακτικών πολιτικών. Απαραίτητη είναι, η άποψη των ενδιαφερόμενων μερών και αφού ληφθεί υπόψη η αξιολόγηση του κινδύνου και άλλοι εύλογοι παράγοντες, εάν χρειαστεί, η επιλογή των κατάλληλων μέσων πρόληψης και ελέγχου.

Η (**iii**) *δημοσιοποίηση του κινδύνου* (Risk Communication) ορίζεται ως η αμφίδρομη ανταλλαγή πληροφοριών και απόψεων, σε όλη τη διάρκεια της διαδικασίας ανάλυσης του κινδύνου. Αφορά τις πηγές κινδύνου, τους κινδύνους, τους παράγοντες που συνδέονται με τον κίνδυνο και τους διάφορους τρόπους αντίληψης του κινδύνου μεταξύ των αξιολογητών και διαχειριστών του κινδύνου, των καταναλωτών, των επιχειρήσεων τροφίμων και ζωοτροφών και της ακαδημαϊκής κοινότητας. Κάθε δημοσιοποίηση οφείλει να περικλείει την εξήγηση των πορισμάτων αξιολόγησης του κινδύνου, αλλά και τη βάση των αποφάσεων για τη διαχείριση του κινδύνου.

5.2 ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΕΠΙΚΙΝΔΥΝΟΤΗΤΑΣ (Hazard Assessment)

Η εκτίμηση της επικινδυνότητας μπορεί να είναι ποιοτική (qualitative) αν στηρίζεται σε περιγραφικές/ρητές εκφράσεις του κινδύνου ή ποσοτική (quantitative), αν στηρίζεται σε αριθμητικές εκφράσεις (μεταβλητές) του κινδύνου. Τα βήματα ανάλυσης της επικινδυνότητας ,που προσδίδουν ποιοτικό

ή ποσοτικό χαρακτήρα στην τελική έκφραση της επικινδυνότητας, είναι η εκτίμηση της έκθεσης και ο χαρακτηρισμός του κίνδυνου. Δεδομένα κατανομής του επιπέδου του κινδύνου ανά τρόφιμο, πληθυσμό, συχνότητα/ποσότητα κατανάλωσης και προφίλ συνθηκών επεξεργασίας και θερμοκρασιών συντήρησης, χρησιμοποιούνται για τη δημιουργία διαφόρων σεναρίων μεταχείρισης και κατανάλωσης του τρόφιμου.

5.2.1 Συλλογή δεδομένων και αναγνώριση πηγών κινδύνου

Βασικός στόχος είναι η καταρχήν τοποθέτηση και οριοθέτηση του προβλήματος, καθώς και η συλλογή των απαραίτητων για τα επόμενα στάδια δεδομένων. Στο στάδιο αυτό συγκεντρώνονται και αναλύονται δεδομένα σχετικά με χημικές ουσίες, οι οποίες μπορεί να έχουν επιπτώσεις στην υγεία του καταναλωτή. Η σωστή συλλογή των δεδομένων είναι απαραίτητη για την ελαχιστοποίηση των αποκλίσεων και των σφαλμάτων κατά τον προσδιορισμό του κινδύνου. Τα βασικά βήματα για μια ολοκληρωμένη και αξιόπιστη συλλογή δεδομένων, είναι τα ακόλουθα:

i. Τοποθέτηση του προβλήματος και προσδιορισμός των κατάλληλων πηγών πληροφόρησης για την επίλυση του.

ii. Προσδιορισμός των συμπληρωματικών πληροφοριών που απαιτούνται ώστε να περιγραφεί με επάρκεια το πρόβλημα των δυσμενών επιπτώσεων, καθώς και ο καθορισμός των αναλυτικών μεθόδων που θα ακολουθηθούν.

iii. Καθορισμός των ορίων της έρευνας και των απαιτήσεων, από τα συλλεγόμενα δεδομένα, δηλαδή:
- Προσδιορισμός της υπό έρευνα γεωγραφικής περιοχής.
- Προσδιορισμός του πληθυσμού που ενδιαφέρει.
- Κατηγοριοποίηση του χώρου σε περιοχές δεδομένης, πιθανής και μη πιθανής έκθεσης.
- Διερεύνηση των πιθανών περιορισμών στη δειγματοληψία (σχετικών με θέματα υγείας).

iv. Καθορισμός των βασικών παραγόντων (π.χ. οικονομικών, τεχνολογικών) που θα επιβάλλουν την επιλογή μεταξύ διαφορετικών λύσεων/αποφάσεων.

v. Καθορισμός των αποδεκτών, κατά περίπτωση, σφαλμάτων ώστε να μειωθεί η αναξιοπιστία των αποτελεσμάτων. Συγκεκριμένα απαιτείται:
- Προσδιορισμός της αποδεκτής πιθανότητας να συμβούν λάθη.
- Καθορισμός στόχων σχετικά με πιθανές αποκλίσεις ή σφάλματα.
- Καθορισμός των επιπτώσεων από τυχόν λάθος εκτίμηση της υπάρχουσας κατάστασης.

vi. Καθορισμός της αποδοτικότερης μεθόδου για τη δειγματοληψία, ώστε να προκύψουν αξιόπιστα δεδομένα [Καλιαμπάκος, Μεθοδολογίες Αξιολόγησης Κινδύνου].

5.2.1.1 Δεδομένα κατανάλωσης τροφίμων

Τα δεδομένα κατανάλωσης τροφίμων, αντικατοπτρίζουν την κατανάλωση στερεών τροφών, ποτών (συμπεριλαμβανομένου και του πόσιμου νερού) και

όλων των διατροφικών συμπληρωμάτων. Η κατανάλωση τροφίμων, μπορεί να προσδιορισθεί με την βοήθεια ερευνών σε μεμονωμένα άτομα, σε οικογένειες, ή κατά προσέγγιση με τη χρήση στατιστικών που αναφέρονται στη παραγωγή των τροφίμων, ενώ ο τρόπος με το οποίο συλλέγονται τα δεδομένα πρόσληψης, ή οργανώνονται μετά τη συλλογή, έχει να κάνει με τον τύπο της εκτίμησης της διατροφικής πρόσληψης που πρέπει να υπολογιστεί. Οι έρευνες κατανάλωσης τροφίμων, περιλαμβάνουν:

- Καταγραφές στοιχείων/ημερολόγια.
- Ερωτηματολόγια Συχνότητας Κατανάλωσης Τροφίμων (Food Frequency Questionnaires, FFQs).
- Διατροφική ανάκληση (Dietary recall).
- Μελέτες Συνολικής Δίαιτας (Total Diet Studies, TDS).

Η αξιοπιστία των αποτελεσμάτων των δεδομένων της έρευνας, εξαρτάται από το σχεδιασμό της έρευνας και έγκειται στη μεθοδολογία, το κίνητρο και την μνήμη όλων όσοι συμμετείχαν, την στατιστική επεξεργασία και την εικόνα (πως αγοράζονται αλλά και πως καταναλώνονται τα τρόφιμα) αυτών των δεδομένων.

Ένας από τους πιο ανέξοδους τρόπους διατροφικής έρευνας, είναι η έρευνα συχνότητας κατανάλωσης τροφίμων (FFQs), η οποία μερικές φορές αναφέρεται και ως «ιστορικό διατροφής βάση λίστας». Αποτελείται από ένα δομημένο κατάλογο επιμέρους τροφίμων ή ομάδων τροφίμων. Για κάθε στοιχείο στον κατάλογο των τροφίμων, ο ερωτώμενος καλείται να εκτιμήσει πόσες φορές ένα τρόφιμο καταναλώνεται ανά ημέρα, εβδομάδα, μήνα ή έτος. Τέτοιες έρευνες έχουν αναπτυχθεί για την εκτίμηση της πρόσληψης τροφίμων που συνήθως δεν καταναλώνονται καθημερινά (π.χ. τα ψάρια), ενώ ο αριθμός και το είδος των τροφίμων που εμφανίζονται σε αυτές μπορεί να ποικίλει. Μερικοί τύποι έρευνας, παρέχουν πληροφορίες σχετικά με το συνολικό εφοδιασμό της αγοράς με τρόφιμα (overall food supply) και ο πιο κοινός τύπος έρευνας εφοδιασμού, είναι ο ισολογισμός τροφίμων (food balance sheet). Οι ισολογισμοί τροφίμων, παρέχουν πληροφορίες σχετικά με την ποσότητα των τροφίμων που περνά από την αλυσίδα παροχής, όχι όμως για:

- Την ποσότητα των τροφίμων που καταναλώνεται στη πραγματικότητα.
- Την μορφή κατανάλωσης των προϊόντων.
- Την κατανάλωση των τροφίμων από υποομάδες.
- Τα τρόφιμα που δεν επιλέγονται από νοικοκυριά. Σε μερικές περιπτώσεις όμως, έρευνες που έχουν πραγματοποιηθεί για τον προϋπολογισμό των νοικοκυριών βοηθούν στο να διορθωθούν τα ισοζύγια.

Αξίζει να αναφέρουμε ότι βάση έρευνας του FAO/WHO η κατανάλωση τροφίμων, η οποία υπολογίζεται με τη βοήθεια του ισολογισμού των τροφίμων, είναι κατά 15% υψηλότερη από την κατανάλωση η οποία προκύπτει από έρευνες σε νοικοκυριά ή σε έρευνες διατροφής (και σε εθνικό επίπεδο).

5.2.2 Εκτίμηση της επικινδυνότητας (Hazard Assessment)

Η *εκτίμηση της επικινδυνότητας* (Hazard Assessment), περιλαμβάνει δύο χαρακτηριστικά του δεύτερου σταδίου αξιολόγησης του κινδύνου (Risk

Assessment), την *αναγνώριση της επικινδυνότητας* (Hazard Identification) και τον *χαρακτηρισμό της επικινδυνότητας* (Hazard Characterization).

Η διαδικασία εκτίμησης της επικινδυνότητας των παραγόντων πρόκλησης κινδύνων, βασίζεται στην ποιοτική και ποσοτική αξιολόγηση των διαθέσιμων τοξικολογικών και επιδημιολογικών μελετών που γίνονται σε ζώα και στον άνθρωπο, με σκοπό την ταυτοποίηση της επικινδυνότητας, της σχέσης δόσης/απόκρισης και την εκτίμηση της έκθεσης του ανθρώπου στον κίνδυνο [Baines κ.ά. 2011]. Τα αποτελέσματα των μελετών εκτίμησης της επικινδυνότητας οδηγούν στον καθορισμό ορίων τα οποία πρέπει να λαμβάνονται υπόψη κατά την εφαρμογή του HACCP, τόσο για τον καθορισμό των κρίσιμων σημείων ελέγχου (CCPs), όσο και των προδιαγραφών ασφάλειας των προϊόντων. Καθορίζουν επιπλέον την επικινδυνότητα του επιλεγμένου σχήματος δειγματοληψίας, σε όλα τα σημεία που απαιτείται, με μέτρο την επικινδυνότητα των κινδύνων. Συχνά, οι μέθοδοι δειγματοληψίας δεν είναι ιδιαίτερα ακριβείς ώστε να ανιχνεύουν πραγματικές διαφορές, όταν απαιτείται και πολλές φορές οι κίνδυνοι είναι μικροβιολογικοί (*E. coli*) με αποτέλεσμα ένα μεγάλο μέρος της έρευνας να ασχολείται με την επιτήρηση και την πιθανότητα επιβίωσης των μικροβίων κατά την επεξεργασία τροφίμων. Όπως έχει ήδη αναφερθεί, τρόφιμα υψηλής θρεπτικής αξίας μπορεί να κρύβουν σημαντικούς κινδύνους. Παραδείγματος χάρη το κρέας μολύνεται σημαντικά κατά τη σφαγή, ενώ άλλα βασικά τρόφιμα όπως τα ιχθυρά ενέχονται σε κινδύνους (αμίνες) που προκαλούν ασθένειες. Τέλος, είναι γνωστό ότι τα φρούτα και τα λαχανικά όταν καταναλωθούν ως έχουν μεταφέρουν σοβαρούς κινδύνους (φυτοφάρμακα, παθογόνα) στον άνθρωπο. Σήμερα, οι τάσεις που διαμορφώνονται συνεχώς από κυβερνητικούς φορείς, φιλοδοξούν βάση συγκεκριμένων χρονοδιαγραμμάτων και προγραμμάτων επιτήρησης, να επιτύχουν κατά 30% μείωση της μόλυνσης των τροφίμων [Τζιά, Αποτίμηση Ρίσκου και Ασφάλεια Τροφίμων].

Η διαδικασία της εκτίμησης των κινδύνων είναι παρόμοια για μικροβιολογικούς και χημικούς κινδύνους. Περιλαμβάνει την ταυτοποίηση των κινδύνων και τον καθορισμό της «σχέσης τους σε έκθεση», βάση επιδημιολογικών μελετών και άλλου είδους πειραματικών μελετών σε ανθρώπους και ζώα. Κατά τα στάδια διερεύνησης της επικινδυνότητας, σε σχέση με τη δόση-απόκρισης, γίνεται πρωτίστως προσπάθεια να κατανοηθεί το είδος της τοξικότητας ή η επίπτωση στην υγεία που μπορεί να προκαλέσει η διερευνώμενη ουσία και οι συνθήκες υπό τις οποίες συμβαίνει αυτό. *Ασήμαντος/μηδαμινός κίνδυνος* (Negligible Risk, NRI) καλείται η ημερήσια λήψη του συστατικού που πιστεύεται ότι θέτει σε ασήμαντο κίνδυνο τον άνθρωπο, με βάση επιστημονικά δεδομένα. Για την εκτίμηση της έκθεσης του ανθρώπου εξετάζονται τα επίπεδα του συστατικού στο τρόφιμο και τα πρότυπα κατανάλωσης τροφίμων και προσδιορίζεται η εκτιμώμενη ημερήσια πρόσληψη (Estimated Daily Intake, EDI) του συστατικού. Η ασφάλεια των τροφίμων επιτυγχάνεται και εξασφαλίζεται όταν η EDI μειωθεί κάτω από τον NRI. Ο NRI προσεγγίζεται διαφορετικά για καθεμία από τις κατηγορίες ουσιών-κινδύνων (φυσικά συστατικά, πρόσθετα, μολυντές). Ο συνδυασμός νομοθεσίας, ιστορικών στοιχείων και κανονιστικών δράσεων, οδηγούν στον καθορισμό κριτηρίων για την κρίση/απόφαση σχετικά με την ασφάλεια κάθε τρόφιμου (τα κριτήρια διαφέρουν ανά τρόφιμο). Διάφορα φυσικά συστατικά, λόγου χάρη, μπορεί να είναι τοξικά υπό ορισμένες συνθήκες έκθεσης, είναι όμως ανησυχητικά μόνο αν επιδειχθεί τοξικότητα πλησίον ή στις

πραγματικές συνθήκες. Για τους επιμολυντές των τροφίμων ο NRI συνήθως εκφράζεται ως η ανοχή ημερήσιας πρόσληψης (Tolerance Daily Intake, TDI) η οποία εκτιμάται από πειραματικές μελέτες σε ανθρώπους και ζώα. Η αποδεκτή ημερήσια πρόσληψη (ADI) είναι όρος που χρησιμοποιείται για να ορίσει τον NRI για συστατικά που εισάγονται για συγκεκριμένο σκοπό στα τρόφιμα ή λόγω ανίχνευσης υπολειμμάτων φαρμακολογικώς ενεργών ουσιών. Οι τιμές ADI, είναι διεθνώς αποδεκτές και βασίζονται σε δεδομένα τοξικότητας σε ζώα, λαμβάνοντας υπόψη ειδικούς συντελεστές ασφάλειας για τον άνθρωπο (10x μεταξύ ζώων και ανθρώπων και στη συνέχεια 10x μεταξύ ανθρώπων). Η ADI καθορίζει την κατώτερη αποδεκτή δόση (κατώφλι), διασφαλίζοντας την αποφυγή της παρουσίας δυσμενών επιδράσεων στην υγεία του ανθρώπου [Τζιά, Αποτίμηση Ρίσκου και Ασφάλεια Τροφίμων].

5.2.2.1 Αναγνώριση της επικινδυνότητας (Hazard Identification)

Η αναγνώριση της επικινδυνότητας, ορίζεται ως ο προσδιορισμός του τύπου και της φύσης των δυσμενών επιπτώσεων στις οποίες ένας παράγοντας έχει την εγγενή ικανότητα να προκαλέσει σε ένα οργανισμό, ένα σύστημα ή ακόμα και σε ένα πληθυσμό. Η αναγνώριση της επικινδυνότητας βασίζεται στις αναλύσεις διαφόρων δεδομένων που προκύπτουν από τοξικολογικές και επιδημιολογικές μελέτες, οι οποίες περιλαμβάνουν εργαστηριακές μελέτες, με σκοπό τον προσδιορισμό της φύσης της επικινδυνότητας που μπορεί να προκαλέσει ένας παράγοντας στην υγεία του ανθρώπου και τις συνθήκες κάτω από τις οποίες η αναγνωρισμένη επικινδυνότητα μπορεί να παρουσιαστεί [FAO/WHO Chapter 6, Baines κ.ά. 2011].

Στο στάδιο αυτό, οι χημικοί κίνδυνοι που αφορούν συστατικά των τροφίμων ή επιμολυντές τροφίμων εξετάζονται για την περίπτωση τοξικότητας στον ανθρώπινο οργανισμό. Σκοπός του προσδιορισμού μιας χημικής ουσίας στα τρόφιμα, είναι η αξιολόγηση των δεδομένων εμφάνισης των αρνητικών επιπτώσεων στην υγεία του ανθρώπου, βασιζόμενη στην εκτίμηση όλων των διαθέσιμων εργαστηριακών αποτελεσμάτων τοξικότητας και τρόπου δράσης.

5.2.2.2 Χαρακτηρισμός της επικινδυνότητας (Hazard Characterization)

Περισσότερα από 2.000 χημικά χρησιμοποιούνται σήμερα στην προετοιμασία και παρασκευή τροφίμων και προστίθενται είτε ως συντηρητικά, είτε ως βελτιωτικά γεύσης, είτε ως χρωστικές ουσίες, γλυκαντικά, αρώματα, αντιοξειδωτικά, είτε ως ουσίες που μπορούν να βελτιώσουν την θρεπτική τους αξία ή τέλος, για να εξυπηρετήσουν ιδιαίτερες διαιτητικές απαιτήσεις μεμονωμένων καταναλωτών. Επιπρόσθετα, άλλα συστατικά χρησιμοποιούνται στη πρωτογενή παραγωγή και υπολείμματα τους μπορεί να παραμείνουν στα τρόφιμα, λόγω μη ορθής εφαρμογής των κανόνων καλής κτηνιατρικής και γεωργικής παραγωγής. Στην περίπτωση αυτή, υπολείμματα κτηνιατρικών φαρμάκων και φυτοφαρμάκων ή μολυντές που εισάγονται χωρίς λόγο στα τρόφιμα από μόλυνση του περιβάλλοντος (βαρέα μέταλλα, PCBs, διάφορα χημικά, βιολογικά ή βιομηχανικά προϊόντα και παραπροϊόντα), ανιχνεύονται στα τρόφιμα. Η εκτίμηση των κινδύνων, αφορά την πιθανότητα που υπάρχει όπως συγκεκριμένες ουσίες ή συνδυασμοί τους, να προκαλέσουν δυσμενείς επιδράσεις, υπό πραγματικές ή υπό αναμενόμενες συνθήκες έκθεσης του

ανθρώπου [Τζιά, Αποτίμηση Ρίσκου και Ασφάλεια Τροφίμων]. Ως *χαρακτηρισμός της επικινδυνότητας* (Hazard Characterization) νοείται η ποιοτική και όπου είναι εφικτό, ή ποσοτική περιγραφή των ιδιοτήτων ενός παράγοντα ή μιας κατάστασης, που μπορεί να προκαλέσει μια δυσμενή επίπτωση. Δύναται να περιλάβει την αξιολόγηση της δόσης-απόκρισης και τις αβεβαιότητες που συνεπάγονται αυτής. Ο χαρακτηρισμός της επικινδυνότητας περιγράφει τη σχέση μεταξύ της χορηγούμενης δόσης μιας ουσίας, ή της έκθεσης της σε αυτή και της επίδρασης που έχει στην υγεία. Η αρχική επίδραση προσδιορίζεται με την αύξηση της δόσης, ή την έκθεση της στην ουσία και χαρακτηρίζεται ως *κρίσιμη επίδραση* (Critical Effect). Στις περιπτώσεις όπου η τοξική επίδραση έχει ένα κατώτατο όριο, ο χαρακτηρισμός της επικινδυνότητας καταλήγει στην καθιέρωση τιμών βασιζόμενων στην υγεία, όπως για παράδειγμα είναι η εκτιμώμενη ποσότητα μιας ουσίας σε τρόφιμα ή στο πόσιμο νερό. Οι τιμές αυτές εκφράζονται σε σχέση με το σωματικό βάρος και καθορίζουν την ποσότητα που μπορεί ο άνθρωπος να εκτίθεται καθημερινά χωρίς αξιόλογο κίνδυνο για την υγεία (ADI) [FAO/WHO 2009c].

Η αξιολόγηση της δόσης-απόκρισης, είναι μια πολύ σημαντική παράμετρος του χαρακτηρισμού της επικινδυνότητας στο πλαίσιο *αξιολόγησης του κινδύνου* (Risk Assessment). Ιδιαίτερα, τα δεδομένα δόσης-απόκρισης μπορεί να προέρχονται είτε από *in vivo* μελέτες, στον άνθρωπο και στα ζώα που συνήθως παρέχουν τη βάση για το χαρακτηρισμό της επικινδυνότητας, είτε από *in vitro* μελέτες οι οποίες συχνά συνδέονται με τις έρευνες του τρόπου δράσης. Σε κάθε περίπτωση, η ερμηνεία των δεδομένων σχετικά με την επίδραση της ουσίας στον άνθρωπο, απαιτεί την αναγνώριση των επιπέδων έκθεσης που δεν παράγουν ένα μετρήσιμο αποτέλεσμα και τη σχέση μεταξύ της αύξησης της συχνότητας και της σοβαρότητας ή της φύσης του αποτελέσματος, με την αύξηση της έκθεσης [FAO/WHO Chapter 7]. Έτσι, η αξιολόγηση της δόσης-απόκρισης, είτε παρέχει μια ποσοτική (ή απλά ποιοτική) ανάλυση της εκτίμησης του κινδύνου (risk), είτε διαμορφώνει, με βάση την υγεία του ανθρώπου, τις τιμές αναφοράς των επιπέδων έκθεσης του καταναλωτή σε μια ουσία ούτος ώστε να μην ενέχει κίνδυνο για την υγεία του. Οι τιμές αυτές αναφοράς, είναι η αποδεκτή ημερήσια πρόσληψη (ADI) και η ανεκτή ημερήσια πρόσληψη (TDI). Η τελευταία, συχνά περιγράφεται ως «αξιολόγηση της ασφάλειας» και χρησιμοποιείται ιδιαίτερα σε περιπτώσεις όπου η έκθεση μπορεί να ελεγχθεί, όπως στην περίπτωση καταλοίπων κτηνιατρικών φαρμάκων στα τρόφιμα.

5.3 ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ (Toxicity Assessment)

5.3.1 Τοξικολογικές Μελέτες

Οι τοξικολογικές μελέτες χωρίζονται στις *in vivo* μελέτες, οι οποίες διεξάγονται σε ανθρώπους και ζώα εργαστηρίου και στις τεχνητές *in vitro* μελέτες, στις οποίες χρησιμοποιούνται κύτταρα ή ιστοί από ζώα εργαστηρίου. Διεξάγονται αφενός για τον προσδιορισμό πιθανών δυσμενών επιπτώσεων αλλά και για τον καθορισμό εκείνων των συνθηκών έκθεσης για τις οποίες παρατηρούνται δυσμενείς επιδράσεις. Αφετέρου, διεξάγονται για την αξιολόγηση της σχέσης δόσης-απόκρισης (dose-response) με αρνητικές επιδράσεις, συμπεριλαμβανομένου των επιπέδων δόσεων που δεν προκαλούν κάποια αρνητική δράση. Τέλος η ερμηνεία πειραματικών δεδομένων, στους

ανθρώπους και σε υποομάδες αυτών, όπως ο τρόπος δράσης των ενώσεων, ο μεταβολισμός και η τοξικοκινητική τους, κρίνεται απαραίτητη για την αξιολόγηση του κινδύνου [FAO/WHO Chapter 6].

Έρευνες σχετικά με την συμπεριφορά των διαφόρων ουσιών στα τρόφιμα, παίζουν σημαίνοντα ρόλο στον σχεδιασμό και την ερμηνεία των τοξικολογικών μελετών, καθώς και στην συσχέτιση των αποτελεσμάτων τους με τον άνθρωπο. Στο ίδιο ερευνητικό πλαίσιο, συγκαταλέγονται και οι βασικές μελέτες ADME για χημικές ουσίες [τα τέσσερα κύρια φαρμακοκινητικά χαρακτηριστικά μιας ουσίας: η απορρόφηση (Absorption), η κατανομή (Distribution), ο μεταβολισμός (Metabolism) και η απέκκριση (Excretion), όπου συχνά αναφέρονται ως ADME από τα αρχικά των αντίστοιχων αγγλικών όρων]. Τέτοιες μελέτες, μπορούν να διεξαχθούν με τεχνικές ραδιοσημασμένων ενώσεων (^{3}H – σήμανση ή ^{14}C – σήμανση), με χρήση μη ειδικών τεχνικών για την μέτρηση της συνολικής ραδιενέργειας σε συνδυασμό με μεθόδους διαχωρισμού, όπως η χρωματογραφία, για τον προσδιορισμό των ραδιοσημασμένων στοιχείων ενός βιολογικού δείγματος. Σήμερα, οι τοξικολογικές μελέτες συμπληρώνουν τις βασικές μελέτες ADME, καθιστώντας δυνατή την ανίχνευση της συγκέντρωσης της χημικής ουσίας ή των μεταβολιτών της στο πλάσμα και τους ιστούς του σώματος. Στην συνέχεια, τα αποτελέσματα ανίχνευσης χρησιμοποιούνται σε ένα μαθηματικό μοντέλο περιγραφής της σχέσης συγκέντρωσης-χρόνου της εσωτερικής έκθεσης. Ειδικότερα, η τοξικοκινητική έρευνα παρέχει πληροφορίες για την είσοδο και πορεία μιας ουσίας στο σώμα, συμπεριλαμβανομένης της απορρόφησής, κατανομής, μεταβολισμού [παραγωγή λιγότερο τοξικών μεταβολιτών (αποτοξικοποίηση) ή, σε μερικές περιπτώσεις, περισσότερο τοξικών μεταβολιτών] και απέκκρισής. Μια τοξικολογική μελέτη, πρέπει να καλύπτει και τις δύο βασικές συνιστώσες των μελετών ADME, της ραδιοσημασμένης ένωσης και της καμπύλης συγκέντρωσης-χρόνου [FAO/WHO Chapter 6].

Γενικά, η εκτίμηση της τοξικότητας, με βάση τη σχέση δόσης-απόκρισης, αποσκοπεί στην ποιοτική και ποσοτική αξιολόγηση διαθέσιμων τοξικολογικών και επιδημιολογικών δεδομένων για τις επικίνδυνες ουσίες, που απαντούν στο συγκεκριμένο χώρο, αναφορικά με την πρόκληση δυσμενών επιπτώσεων στην ανθρώπινη υγεία. Με βάση τη μεθοδολογία του Οργανισμού Προστασίας του Περιβάλλοντος των ΗΠΑ (United States Environmental Protection Agency, EPA) [U.S. EPA 1992], διακρίνονται δύο κατηγορίες επιπτώσεων στην ανθρώπινη υγεία: οι μη-καρκινογενείς και οι καρκινογενείς:

i. Οι μη-καρκινογενείς επιπτώσεις, γενικά, παρατηρούνται όταν υπάρξει υπέρβαση μιας *οριακής τιμής* (threshold value) έκθεσης. Για την εφαρμογή της μεθοδολογίας αξιολόγησης κινδύνου, η EPA έχει καθορίσει *τιμές αναφοράς* (Reference Values – RfDs), οι οποίες αριθμούνται από το 10 έως και 1000 φορές χαμηλότερες από τις αντίστοιχες οριακές τιμές, με αποτέλεσμα να προσφέρουν σημαντικό επίπεδο ασφάλειας.

ii. Οι καρκινογενείς επιπτώσεις αφορούν ουσίες που παρουσιάζουν ενδεχόμενους κινδύνους για καρκινογένεση. Προς αντιμετώπιση του προβλήματος αυτού, η U.S. EPA για τις καρκινογόνες ουσίες, έχει υιοθετήσει την πολιτική της *μη-οριακής τιμής* (no-threshold value), με την

παραδοχή ότι η έκθεση σε ουσίες που θεωρούνται καρκινογόνες σχετίζεται με κίνδυνο καρκινογένεσης ανεξάρτητα από το επίπεδο συγκέντρωσης της ουσίας. Παράλληλα, διατυπώνεται ότι ο κίνδυνος αυτός θεωρείται αθροιστικός, δηλαδή αυξάνεται όσο η διάρκεια έκθεσης και η συγκέντρωση της ουσίας αυξάνουν. Η U.S. EPA έχει καθορίσει τιμές γνωστές ως *συντελεστές πιθανότητας καρκινογένεσης* (Cancer Potency Factors, CPF), βασισμένες σε επιστημονικά στοιχεία, που παρέχονται από ειδικές βάσεις δεδομένων (π.χ. U.S. EPA's Integrated Risk Information System - IRIS) [Καλιαμπάκος, Μεθοδολογίες Αξιολόγησης Κινδύνου].

Οι τοξικολογικές μελέτες γενικά διεξάγονται προς δύο κατευθύνσεις. Η πρώτη κατεύθυνση αφορά την οξεία έκθεση και την ταυτοποίηση του τελικού σημείου τοξικότητας με τον καθορισμό της *Θανάσιμης Δόσης* (Dose Lethal, LD_{50}). Το LD_{50} εκφράζεται σε mg/Kg βάρους σώματος του πειραματόζωου και προκύπτει μετά την εφάπαξ χορήγηση ποσότητας ουσίας, ώστε να προκληθεί θάνατος του 50% του πληθυσμού των πειραματόζωων. Τα αποτελέσματα τέτοιων μελετών, είναι βραχυπρόθεσμα καθώς προκύπτουν μέσα σε 1-3 μήνες και καταλήγουν στη συνέχιση ή στη διακοπή της περαιτέρω μελέτης. Όσο μικρότερη είναι η τιμή LD_{50} μιας ουσίας, τόσο περισσότερο τοξική είναι. Η δεύτερη κατεύθυνση τοξικολογικών μελετών, περιλαμβάνει βραχυπρόθεσμες (χορήγηση επαναλαμβανόμενων δόσεων σε πειραματόζωα στο μεγαλύτερο μέρος της διάρκειας ζωής τους), μακροχρόνιες (90 ημέρες) μελέτες ή/και μελέτες καρκινογένεσης (2 έτη) σε συνδυασμό με μελέτες δεύτερης γενεάς αναπαραγωγής (2-4 έτη). Η χρόνια τοξικότητα εκδηλώνεται όταν ένας οργανισμός εκτίθεται συνεχώς σε μικρές, μη θανατηφόρες δόσεις, μιας ικανής να βλάψει ουσίας [Hassal 1990]. Τα αποτελέσματα των μελετών αυτών, εκτός του ότι καθορίζουν την τοξικότητα μιας ουσίας, καθορίζουν ταυτόχρονα, λαμβάνοντας υπόψη πάντα το μεγάλο συντελεστή ασφαλείας και το όριο της διερευνώμενης ουσίας, την υψηλότερη δηλαδή δυνατή δόση η οποία *δεν παρουσιάζει δυσμενή επίδραση στην υγεία* (No Observed Adverse Effect Levels, NOAEL) του ανθρώπου, σε mg/kg σωματικού βάρους/ημέρα [Τζιά, Αποτίμηση Ρίσκου και Ασφάλεια Τροφίμων]. Τόσο η οξεία όσο και η χρόνια τοξικότητα, έχουν δυσάρεστες συνέπειες για τον άνθρωπο όπως καρκίνο, λευχαιμία, νευρολογικές διαταραχές, ορμονικές διαταραχές [Χριστοδουλάκης 1998] κ.α., αν και για τα αποτελέσματα της χρόνιας έκθεσης η επιστημονική κοινότητα είναι διχασμένη.

5.3.2 Επιδημιολογικές Μελέτες

Η Επιδημιολογία είναι η βασική επιστήμη της δημόσιας υγείας. Μελετά την συχνότητα και κατανομή νοσημάτων και νοσηρών καταστάσεων στον ανθρώπινο πληθυσμό, καθώς και των παραγόντων που διαμορφώνουν την κατανομή αυτή. Σκοπός της Επιδημιολογίας είναι ο έλεγχος και η πρόληψη των ασθενειών, μέσω της καταγραφής και αξιολόγησης της κατανομής και της εξέλιξης τους στην κοινότητα, καθώς και των παραγόντων που διαμορφώνουν και επηρεάζουν τις ασθένειες. Οι επιδημιολογικές μελέτες, περιλαμβάνουν έρευνες σε ανθρώπους μιας κοινότητας, σε σχέση με την έκθεση τους στην υπό μελέτη ουσία. Ο βασικός πυρήνας μιας τέτοιας έκθεσης, είναι η καταγραφή πληροφοριών με βάση τις διαφορές, που πιθανόν να υπάρχουν, μεταξύ ομάδων ατόμων που εκτίθενται στην υπό μελέτη ουσία κατά τη διάρκεια

συγκεκριμένης χρονικής περιόδου και η σύγκριση αντίστοιχα με μια ομάδα που δεν εκτίθεται ή εκτέθηκε σε μικρότερο βαθμό, την ίδια περίοδο, στην ίδια ουσία.

Η Επιδημιολογία σε γενικές γραμμές είναι από τη φύση της περισσότερο παρατηρησιακή επιστήμη παρά πειραματική. Σε αντίθεση με τις ελεγχόμενες μελέτες, στις οποίες τα υπό εξέταση άτομα επιλέγονται με τυχαίο τρόπο για να λάβουν, για παράδειγμα, μια θεραπεία ή ένα εικονικό φάρμακο (placebo), οι επιδημιολόγοι δεν μπορούν να καθορίσουν ποιος θα δεχθεί ή όχι την έκθεση σε κάποιο παράγοντα. Συνεπώς, οι επιδημιολογικές μελέτες μπορούν να επηρεαστούν από την *μεροληπτικότητα* (bias) (δηλ. τη συστηματική ροπή προς το λάθος αποτέλεσμα, ως επακόλουθο της σχεδίασης και διεξαγωγής της μελέτης) ή τη *σύγχυση* (confounding) (δηλ. λανθασμένα συμπεράσματα εξαιτίας της επίδρασης μιας μεταβλητής που συσχετίζεται τόσο με την έκθεση όσο και με την υπό μελέτη ασθένεια). Οι επιδημιολόγοι προσπαθούν να επιλύσουν τα παραπάνω προβλήματα, επιλέγοντας καταρχήν μια κατάλληλη μορφή μελέτης και επιπλέον δίνοντας μεγάλη έμφαση στη διεξαγωγή και την ανάλυσή της. Εντούτοις, δεν είναι όλες οι μελέτες εξίσου καλές και είναι σημαντικό να γίνεται πάντα ένας απολογισμός όσον αφορά τα πλεονεκτήματα και τα μειονεκτήματά τους. Είναι σημαντικό να διακριθούν οι επιδημιολογικές μελέτες, οι οποίες σχεδιάστηκαν για να εξετάσουν μια συγκεκριμένη και προηγούμενα (a priori) διατυπωμένη υπόθεση, από τις μελέτες που στοχεύουν να δημιουργήσουν υποθέσεις για πιθανούς παράγοντες κινδύνου, για τις οποίες υπάρχουν ελάχιστα ή και καθόλου προγενέστερα στοιχεία. Θα ήταν ευκολότερο να ερμηνευθεί ένας συσχετισμός μεταξύ της παρουσίας ενός παράγοντα και του κινδύνου ασθένειας, αν υπήρχαν προγενέστεροι λόγοι οι οποίοι θα οδηγούσαν σε αυτό το συμπέρασμα. Διαφορετικά, εάν εξετάζεται μια σειρά πιθανών παραγόντων χωρίς προγενέστερη προτίμηση, τότε ένας από αυτούς μπορεί να επιφέρει κάποια θετική διαπίστωση καθαρά από τύχη [http://emf.physics.auth.gr/gr/guidelines/epidimiology.htm].

Σημαντική πτυχή μιας επιδημιολογικής μελέτης είναι η στατιστική ισχύς της (statistical power). Η πιθανότητα δηλαδή να ανιχνεύσει έναν αυξημένο κίνδυνο καθορισμένης σημαντικότητας, με ένα συγκεκριμένο βαθμό αξιοπιστίας. Η στατιστική ισχύς θα έπρεπε κανονικά να υπολογίζεται πριν από την έναρξη μιας μελέτης, για να αξιολογήσει την πιθανότητα διπλασιασμού του κινδύνου χρησιμοποιώντας, για παράδειγμα, έναν έλεγχο σημαντικότητας στο επίπεδο του 5%. Μόλις πραγματοποιηθεί μια μελέτη, η ακρίβειά της μπορεί να βαθμολογηθεί από το πλάτος του διαστήματος αξιοπιστίας για την εκτιμώμενη επίδραση [http://emf.physics.auth.gr/gr/guidelines/epidimiology.htm].

5.4 ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΗΣ ΕΚΘΕΣΗΣ (Exposure Assessment)

Στόχος στην εκτίμηση της έκθεσης, είναι ο προσδιορισμός της δόσης/συγκέντρωσης μιας ουσίας στην οποία εκτίθεται ή ενδέχεται να εκτεθεί σε αυτήν ο ανθρώπινος οργανισμός. Στο στάδιο αυτό συνεκτιμώνται η συχνότητα, η διάρκεια της έκθεσης και οι «οδοί» μεταφοράς των επικίνδυνων ουσιών προς τον άνθρωπο. Όσον αφορά, την εκτίμηση της έκθεσης σε χημικά που περιλαμβάνονται στα τρόφιμα, αυτή ορίζεται ως η ποιοτική ή/και ποσοτική

εκτίμηση της πιθανής πρόσληψης του χημικού παράγοντα δια μέσω της τροφής, καθώς και της έκθεσης σε παράγοντες που σχετίζονται με τη διατροφή.

Παρακολουθώντας τις πηγές των πιθανών τοξικών, παρέχονται τα δεδομένα που απαιτούνται για την εκτίμηση της έκθεσης. Η έκθεση του ανθρώπου σε χημικά, εκφράζεται ως η συγκέντρωση του χημικού στα τρόφιμα και οι ποσότητες των καταναλισκόμενων τροφίμων, ενώ οι υπολογισμοί μοιραία γίνονται με υποθέσεις με σημαντική αβεβαιότητα. Κρίσιμο σημείο στο στάδιο αυτό είναι να καθοριστεί ο στόχος-πληθυσμός (διαφορετικές καταναλώσεις τροφίμων). Γι΄αυτό και όταν πραγματοποιείται εκτίμηση της έκθεσης, πρέπει να λαμβάνονται υπόψη κάποια ιδιαίτερα χαρακτηριστικά, δεδομένου ότι διαφοροποιούνται και τα χαρακτηριστικά του πληθυσμού που εκτίθεται στις επικίνδυνες ουσίες, τόσο ως προς τον αριθμό, όσο και ως προς το είδος του, π.χ. ενήλικες, έγκυες γυναίκες, παιδιά. Η εκτίμηση της έκθεσης ενός ατόμου σε χημικές ενώσεις που λαμβάνονται μέσω της διατροφής, λαμβάνει χώρα στα ακόλουθα στάδια:

- Καθορισμός της συχνότητας εμφάνισης της ουσίας στη διατροφή.
- Καθορισμός της συγκέντρωσης της ουσίας στη διατροφή.
- Καθορισμός της συχνότητας και της διάρκειας έκθεσης.
- Καθορισμός του εκτιθέμενου πληθυσμού, επισημαίνοντας τις συνήθειες κατανάλωσης του τρόφιμου που περιέχει το συγκεκριμένο χημικό και της πιθανότητας κάποιοι άνθρωποι να κατανάλωσαν μεγάλες ποσότητες του τρόφιμου που περιέχει την ουσία.

Μια τελευταία προσέγγιση για την εκτίμηση της έκθεσης πληθυσμού, που έχει πρόσφατα χρησιμοποιηθεί στην Ε.Ε. είναι η πιθανολογική. Στο *πιθανολογικό μοντέλο* χρησιμοποιούνται πλήρεις κατανομές. Συγκεκριμένα κάθε τιμή συγκέντρωσης της ουσίας συνδυάζεται με την αντίστοιχη τιμή κατανάλωσης για ένα δεδομένο τρόφιμο μέσω πολλών προσομοιώσεων που γίνονται στο δευτερόλεπτο με τη χρήση κατάλληλου μοντέλου. Ένα τέτοιο μοντέλο είναι το «Monte Carlo Risk Assessment» (MCRA), το οποίο στηρίζεται στο πιθανολογικό μοντέλο [De Boer κ.ά. 2007]. Στα πλαίσια του προγράμματος της EFSA “European Tool Usual Intake” (ETUI) μελετήθηκαν τα διαθέσιμα μοντέλα συνήθους πρόσληψης (usual intake models) και επιλέχθηκε το καλύτερο βάση στατιστικής επεξεργασίας και με την προϋπόθεση το μοντέλο αυτό να μπορεί να χρησιμοποιηθεί από την EFSA [Van Klaveren κ.ά. 2012]. Υπάρχουν διάφορα τέτοια μοντέλα για τον υπολογισμό τόσο της χρόνιας (chronic) όσο και της οξείας (acute) έκθεσης σε χημικές ουσίες στα τρόφιμα. Στην περίπτωση που οι κίνδυνοι είναι μικροβιολογικοί (*E. coli*), η εκτίμηση της επικινδυνότητας γίνεται με τη χρήση μαθηματικών μοντέλων πρόρρησης της επιβίωσης ή του ρυθμού ανάπτυξης ή θανάτου των παθογόνων. Έτσι, με τη βοήθεια των τεχνικών προσομοίωσης (Monte Carlo simulation) εκτιμάται η μεταβολή των πληθυσμών του παθογόνου από την αρχική επιμόλυνση έως τη στιγμή της κατανάλωσης ανά σενάριο, υπολογίζοντας κατά αυτόν τον τρόπο τη δόση πρόσληψης του κινδύνου. Στη συνέχεια, κατά τον χαρακτηρισμό του κινδύνου, απομένει η συσχέτιση της δόσης, όπως υπολογίστηκε στο προηγούμενο στάδιο, με την πιθανότητα εκδήλωσης της ασθένειας. Η μολυσματική δόση ενός παθογόνου εξαρτάται από τον ξενιστή, το είδος και την ποσότητα του μολυσμένου τρόφιμου, την ποσότητα και τη μολυσματικότητα του παθογόνου.

Με την πάροδο του χρόνου, η ανάγκη για πιο ακριβείς εκτιμήσεις της έκθεσης του πληθυσμού σε τοξικές ουσίες έγινε πιο επιτακτική. Πολλές φορές ο χειρισμός ταυτόχρονα πολλών βάσεων δεδομένων – π.χ. μιας βάσης για τις συγκεντρώσεις ουσιών και παράλληλα διαφόρων βάσεων δεδομένων για τα στοιχεία κατανάλωσης τροφίμων –, δημιουργούσαν συγχύσεις υπογραμμίζοντας την ανάγκη ενός *προσδιοριστικού μοντέλου*, για ένα πιο λεπτομερή και ακριβή συνδυασμό των βάσεων δεδομένων. Γι' αυτό και η EFSA προχώρησε αρχικά στη δημιουργία του "FoodEx", ενός ιεραρχικού συστήματος κατηγοριοποίησης/κωδικοποίησης των τροφίμων με 4 επίπεδα [EFSA 2011α] και στη συνέχεια του "FoodEx 2", ενός πιο λεπτομερούς συστήματος με 5 επίπεδα ιεράρχησης των τροφίμων [EFSA 2011β]. Τα κράτη μέλη, βάση νομοθεσίας της Ε.Ε., έχουν καθήκον να αποστέλλουν στην EFSA δεδομένα των συγκεντρώσεων των διαφόρων ουσιών (πρόσθετα, ρυπαντές τροφίμων, υπολειμμάτων φυτοφαρμάκων, καταλοίπων κτηνιατρικών φαρμάκων κ.α.) στα τρόφιμα, για να μπορεί να προβαίνει στις αναγκαίες εκτιμήσεις κινδύνου. Επιπλέον, η EFSA προχώρησε στη δημιουργία του Standard Sample Description (SSD) και μετέπειτα του SSD 2, στο οποίο περιέχεται το FoodEx 2, μέσω του οποίου η υποβολή δεδομένων από τα κράτη μέλη γίνεται πλέον ηλεκτρονικά και στο οποίο η κωδικοποίηση των τροφίμων γίνεται με το σύστημα FoodEx [EFSA 2010α]. Όσο αφορά τα στοιχεία κατανάλωσης τροφίμων, η EFSA έχει δημιουργήσει μια πανευρωπαϊκή βάση δεδομένων τη λεγόμενη "Comprehensive European Food Consumption Database" [EFSA 2011γ]. Σε αυτή, χρησιμοποιείται το FoodEx για την κατηγοριοποίηση των τροφίμων, που περιλαμβάνονται σε βάση δεδομένων και τα στοιχεία κατανάλωσης τροφίμων για κάθε χώρα σε χωριστές ηλικιακές κατηγορίες (από νήπια έως ενήλικες 75 ετών και άνω), για 160 περίπου κατηγορίες/είδη τροφίμων. Επιπλέον, στα πλαίσια της εναρμόνισης της μεθοδολογίας συλλογής δεδομένων για κατανάλωση τροφίμων σε ένα πιο λεπτομερές και ακριβές επίπεδο στην Ε.Ε., ξεκίνησε το έργο "EU Menu" [EFSA 2013] διενεργώντας γνωμοδοτήσεις για την εκτίμησης της έκθεσης του πληθυσμού σε διάφορες χημικές ουσίες μέσω του προσδιοριστικού μοντέλου, με ατομικά στοιχεία κατανάλωσης τροφίμων και σωματικού βάρους [EFSA 2012α-γ, EFSA 2014].

5.4.1 Εκτίμηση της διατροφικής έκθεσης σε διάφορες χημικές ουσίες

Η αξιολόγηση της διατροφικής έκθεσης αποτελεί βασικό στοιχείο για την ποσοτικοποίηση του κινδύνου, γι΄αυτό και ο ρόλος της εκτίμησης της έκθεσης σε διάφορες χημικές ουσίες στα τρόφιμα και κατ΄επέκταση της επικινδυνότητας, ήταν καθοριστικής σημασίας για την εργασία της μεικτής επιτροπής εμπειρογνωμόνων των FAO και WHO. Την εκτίμηση της διατροφικής έκθεσης σε διάφορες χημικές ουσίες, ακολουθεί η αξιολόγηση των επιπτώσεων που μπορεί να έχει η έκθεση αυτή στον άνθρωπο. Για να είναι αυτό εφικτό, απαιτούνται οι αντίστοιχες τοξικολογικές τιμές αναφοράς των ουσιών αυτών (πχ. NOEL, ADI, MRLs, TDI, PTWI, ARfD), ώστε να συγκριθούν με τα προσδιορισμένα επίπεδα έκθεσης. Κάποιοι ιδιαίτεροι δείκτες αξιολόγησης της διατροφικής έκθεσης, αναλύονται πιο κάτω.

5.4.1.1 Επίπεδα Μη Παρατηρούμενων Επιδράσεων (No Observed Effect Levels, NOELs)

Τα *Επίπεδα Μη Παρατηρούμενων Επιδράσεων* (No Observed Effect Levels, NOELs), προσδιορίζονται από μελέτες δόσης-απόκρισης που διεξάγονται για μια ουσία. Το τελικό NOEL που χρησιμοποιείται στον προσδιορισμό της αποδεκτής ημερήσιας πρόσληψης είναι το NOEL που έδειξε τοξική επίδραση σε πειραματόζωα στη χαμηλότερη δόση. Εκφράζεται σε χιλιόγραμμα της χημικής ουσίας ανά κιλό σωματικού βάρους ανά μέρα (mg/Kg b.w./d). Γενικά, όπως έχει ήδη αναφερθεί, η εκτίμηση της αξιολόγησης κινδύνου (Risk Assessment) σχετικά με την πρόσληψη υπολειμμάτων χημικών ουσιών μέσω των τροφίμων, σχετίζεται με δυσμενείς επιδράσεις της έκθεσης στην ανθρώπινη υγεία. Ως εκ τούτου, η αξιολόγηση πιθανών επιπτώσεων έκθεσης προϋποθέτει τον υπολογισμό του επιτρεπτού επιπέδου πρόσληψης μιας χημικής ουσίας, η οποία θα είναι ασφαλής όταν καταναλώνεται επ΄αόριστο ή τουλάχιστο για ένα μεγάλο χρονικό διάστημα. Μια ολοκληρωμένη μεθοδολογία διαχείρισης των αποτελεσμάτων τοξικολογικών μελετών, δύναται να καθορίσει την ημερήσια δόση μιας χημικής ουσίας, η οποία σε συγκεκριμένη δόση και χρονική περίοδο μπορεί να καταναλωθεί χωρίς να προκαλέσει επίπτωση στον οργανισμό.

Επιπλέον, το επίπεδο όπου η υψηλότερη δόση μιας ουσίας, η τιμή της οποίας έχει προσδιορισθεί πειραματικά, δεν προκαλεί καμία τοξική επίδραση, εκφράζει το *Επίπεδο Μη Παρατηρούμενης Ανεπιθύμητης Ενέργειας* (No Observed Adverse Effect Levels, NOAEL). Ο καθορισμός του NOEL ή NOAEL σε μια μελέτη εξαρτάται από την πολιτική που αποφασίζεται να ακολουθηθεί. Μελετώντας την τοξικότητα μιας ουσίας, υπολογίζεται το NOEL/NOAEL για κάθε μελέτη γενικής συστηματικής τοξικολογίας, που πραγματοποιείται για συγκεκριμένη ένωση και στη συνέχεια επιλέγεται ένα NOEL/NOAEL το οποίο προκύπτει είτε από την πιο κατάλληλη μελέτη είτε από τη μελέτη που έχει δώσει τη χαμηλότερη τιμή. Σε κάθε τοξικολογική μελέτη, το NOEL/NOAEL καθορίζεται από τις δόσεις που επιλέγονται να μελετηθούν στην συγκεκριμένη έρευνα. Μερικές φορές όμως δεν είναι ξεκάθαρα τα NOELs/NOAELs καθώς ακόμη και στη χαμηλότερη δόση παρατηρούνται κάποιες επιδράσεις της υπό μελέτης ουσίας. Στις περιπτώσεις αυτές οι τοξικολόγοι θεωρούν πως η δόση αυτή είναι η *Χαμηλότερη Παρατηρούμενης Επίδρασης Δόση* (Lowest Observed Effect Level, LOEL). Αυτό σημαίνει ότι είναι η χαμηλότερη δόση της υπό μελέτη ουσίας, η οποία προκαλεί διακριτές μεταβολές από αυτές που παρατηρούνται σε πειραματόζωα στα οποία δεν έχει γίνει εφαρμογή της ουσίας [Davies κ.ά. 2004].

5.4.1.2 Η Αποδεκτή Ημερήσια Πρόσληψη (Acceptable Daily Intake, ADI)

Η *Αποδεκτή Ημερήσια Πρόσληψη* (ADI), χρησιμοποιείται ευρέως για να περιγράψει την κατ' εκτίμηση ποσότητα της ουσίας στην τροφή, εκφραζόμενη βάσει του σωματικού βάρους, η οποία μπορεί να προσλαμβάνεται ημερησίως σε όλη τη διάρκεια της ζωής, χωρίς αξιόλογο κίνδυνο για οποιονδήποτε καταναλωτή, βάση όλων των γνωστών κατά τη στιγμή της αξιολόγησης στοιχείων, λαμβανομένων υπόψη των ομάδων του πληθυσμού που είναι ευάλωτες (π.χ. παιδιά και έμβρυα) [Καν. 396/2005].

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, άλλοι δείκτες που χρησιμοποιούνται είναι η TDI, η οποία αποτελεί εκτίμηση της ποσότητας μιας χημικής ουσίας η οποία βρέθηκε

στο τρόφιμο και μπορεί να προσλαμβάνεται ημερησίως καθ' όλη τη διάρκεια της ζωής, χωρίς να παρουσιάζει σημαντικό κίνδυνο για την υγεία [Καν. 2019/6].

Η *Προσωρινή Ανεκτή Εβδομαδιαία Πρόσληψη* (Provisional Tolerable Weekly Intake, PTWI), χρησιμοποιείται σε προσμίξεις που συσσωρεύονται στο ανθρώπινο σώμα (π.χ. βαρέα μέταλλα) και η εβδομαδιαία συγκέντρωση τονίζει την σημασία του περιορισμού της διατροφικής έκθεσης σε αυτές τις ουσίες κάτω από ένα συγκεκριμένο χρονικό διάστημα [Herrman και Younes 1999]. Ενώ τέλος, η *Οξεία Δόση Αναφοράς* (Acute Reference Dose, ARfD) ορίζεται ως μια ποσότητα μιας ουσίας σε τρόφιμα ή νερό, η οποία μπορεί να προσλαμβάνεται μέσα σε 24 ώρες ή λιγότερο, χωρίς αξιόλογους κινδύνους για την υγεία του καταναλωτή, βάση όλων των γνωστών κατά τη στιγμή της αξιολόγησης στοιχείων.

Ο Πίνακας 12 περιέχει τις τοξικολογικές τιμές αναφοράς, της αποδεκτής ημερήσιας διατροφικής πρόσληψης φαρμακολογικώς ενεργών ουσιών, οι οποίες ανιχνεύθηκαν σε χοίρειο μυϊκό ιστό και αποτέλεσαν αντικείμενο μελέτης της παρούσας εργασίας. Η αναζήτηση των στοιχείων πραγματοποιήθηκε σε βάσεις δεδομένων του WHO, εκθέσεις της EFSA, του EMA και σε δημοσιευμένες μελέτες.

Πίνακας 12: Τιμές αναφοράς διατροφικής έκθεσης σε κατάλοιπα φαρμακολογικώς ενεργών ουσιών, για κτηνιατρική χρήση.

ΚΑΤΑΛΟΙΠΟ	ΤΥΠΟΣ ΠΡΟΣΛΗΨΗΣ	ΤΙΜΗ ΑΝΑΦΟΡΑΣ	ΑΝΑΦΟΡΑ
ΣΟΥΛΦΟΝΑΜΙΔΕΣ			
Σουλφαδιαζίνη	ADI	0-20μg·kg^{-1} σ.β.	[Thomas Ternes και Adriano Joss 2006]
Σουλφαδιμιδίνη		0-50μg·kg^{-1} σ.β.	[MRLs & RMRs CX/MRL 2-2018]
Σουλφαμεθοξαζόλη		Δεν καθορίζεται	–
Τριμεθοπρίμη		12,5μg·kg^{-1} σ.β.	[CVMP 1997]
ΑΜΙΝΟΓΛΥΚΟΣΙΔΕΣ			
Λινκομυκίνη	ADI	0-30μg·kg^{-1} σ.β.	[MRLs & RMRs CX/MRL 2-2018]
ΤΕΤΡΑΚΥΚΛΙΝΕΣ			
Χλωροτετρακυκλίνη	ADI	0-30μg·kg^{-1} σ.β.	[MRLs & RMRs CX/MRL 2-2018]
Δοξυκυκλίνη		0-3μg·kg^{-1} σ.β.	[CVMP 1996]
Οξυτετρακυκλίνη		0-30μg·kg^{-1} σ.β.	[MRLs & RMRs CX/MRL 2-2018]
Τετρακυκλίνη		0-30μg·kg^{-1} σ.β.	[MRLs & RMRs CX/MRL 2-2018]

ΠΕΝΙΚΙΛΛΙΝΕΣ			
Αμοξικιλλίνη	ADI	0-0,07μg·kg^{-1} σ.β.	[MRLs & RMRs 2015]
ΜΑΚΡΟΛΙΔΙΑ			
Τιλμικοσίνη	ADI	0-40μg·kg^{-1} σ.β.	[MRLs & RMRs CX/MRL 2-2018]

Για να εφαρμοστούν οι πληροφορίες, ταυτοποίησης του κινδύνου και εκτίμησης της δόσης/απόκρισης, στην εκτίμηση των κινδύνων είναι απαραίτητη η ποσοτικοποίηση της έκθεσης του ανθρώπου σε επιβλαβείς ουσίες. Ως εκ τούτου, διεξάγονται μακροχρόνιες μελέτες σε πειραματόζωα νοουμένου ότι η υπό μελέτη χημική ουσία ενσωματώνεται στη διατροφή, με σκοπό τον προσδιορισμό της ADI. Οι μελέτες αυτές, περιλαμβάνουν την ίδια ημερήσια πρόσληψη της υπό μελέτη χημικής ουσίας σε πειραματόζωα, αναλογικά με τη χρόνια έκθεση του ανθρώπου ως αποτέλεσμα της παρουσίας μικρής ποσότητας υπολειμμάτων της συγκεκριμένης ουσίας στα τρόφιμα. Αφού λοιπόν ορισθεί η χαμηλότερη δόση NOEL ή NOAEL (εξαρτάται από το πιο είναι πιο κατάλληλο), αυτό χρησιμοποιείται για να καθοριστεί η ADI για τον άνθρωπο. Η ADI υπολογίζεται με τη διαίρεση του NOEL ή NOAEL, με ένα *Παράγοντα Ασφαλείας* (Safety Factor, SF) ο οποίος έχει επιλεχθεί προσεκτικά ώστε να είναι όσον το δυνατόν καλύτερος και να παρέχει ένα επαρκές επίπεδο ασφάλειας. Περιγράφεται με την ακόλουθη εξίσωση (1):

$$ADI = \frac{NOEL(NOAEL)}{SF} \qquad (1)$$

Γενικά, οι παράγοντες ασφαλείας που χρησιμοποιούνται κυμαίνονται από 100 έως 2000 και εξαρτώνται από τις υποστηριζόμενες τοξικολογικές βάσεις δεδομένων. Όταν τα NOELs έχουν προκύψει από μελέτες σε ζώα, τότε ο παράγοντας ασφαλείας που χρησιμοποιείται για να υπολογισθεί η ADI είναι 100 [Davies κ.ά. 2004].

5.4.1.3 Παράγοντες ασφάλειας/αβεβαιότητας (Safety/Uncertainty Factor)

Η χρήση των όρων *Παράγοντας Ασφάλειας* (Safety Factor, SF) και *Παράγοντας Αβεβαιότητας* (Uncertainty Factor, UF), στον υπολογισμό της έκθεσης σε μια ουσία, στοχεύει στο να παρέχει ένα επαρκές περιθώριο ασφάλειας για τον καταναλωτή, λαμβάνοντας πάντα υπόψη τις ευαίσθητες πληθυσμιακές ομάδες. Ανέκαθεν, οι παράγοντες αβεβαιότητας χρησιμοποιούνταν τόσο για τον υπολογισμό της αβεβαιότητας όσο για τον υπολογισμό της ποικιλομορφίας. Στον υπολογισμό, περιλαμβάνεται ένας συντελεστής ασφάλειας – συνήθως ίσος με 100 – στη διαμόρφωση του οποίου λαμβάνονται υπόψη οι πιο κάτω παράγοντες αβεβαιότητας:

– Διακύμανση ευαισθησίας μεταξύ ανθρώπων (intraspecies).

– Διακύμανση ευαισθησίας από είδος σε είδος (interspecies, πειραματόζωο-άνθρωπος).
– Συντελεστής για ευαίσθητους ανθρώπινους πληθυσμούς λόγω προγενέστερης ή τρέχουσας ασθένειας έναντι των υγιών πειραματόζωων.
– Πιθανή συνεργιστική δράση με άλλα πρόσθετα ή τοξικά συστατικά των τροφίμων.
– Διαφορές στο μέγεθος σώματος των πειραματόζωων έναντι των ανθρώπων.
– Διαφορές στη διατροφή ανάλογα με την ηλικία, φύλο, επίπεδο δραστηριότητας και περιβαλλοντικούς παράγοντες.
– Διαφορές πειραματόζωων-ανθρώπων στο ισοζύγιο ύδατος μεταξύ σώματος και περιβάλλοντος.
– Διαφορές λόγω μικρού αριθμού πειραματόζωων έναντι του μεγάλου αριθμού ανθρώπων που μπορούν να εκτεθούν.
– Δυσκολία στην εκτίμηση της πρόσληψης από τον άνθρωπο μέσω της διατροφής και της μεταβλητότητας της [Καλογερόπουλος].

Ένας παράγοντας αβεβαιότητας 100 χρησιμοποιείται συνήθως για να μετατρέψει το NOAEL, από μια μελέτη σε πειραματόζωα, σε μια τιμή ανθρώπινης έκθεσης. Επιπρόσθετα, παράγοντες αβεβαιότητας μπορεί να χρησιμοποιηθούν όταν υπάρχουν σημαντικές ελλείψεις στις βάσεις δεδομένων τοξικολογικών μελετών, είτε λόγω απουσίας χρόνιας μελέτης, είτε όταν εντοπίζονται επιπτώσεις σε διάφορα πειραματικά επίπεδα δόσεων με αποτέλεσμα να μην μπορεί να καθοριστεί το NOAEL. Στις περιπτώσεις που το NOAEL δεν μπορεί να καθοριστεί, το LOAEL μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον υπολογισμό μιας τιμής έκθεσης απαραίτητη για την προστασία της υγείας του καταναλωτή. Είναι ξεκάθαρο ότι η εκτίμηση του επιπέδου της ασφαλούς έκθεσης του ανθρώπου σε δραστικές ουσίες και κατ΄επέκταση η εκτίμηση της επικινδυνότητας, απαιτούν χρήση της τιμής NOAEL για τον ποσοτικό προσδιορισμό της σχέσης δόσης-απόκρισης, με χρήση δεδομένων υποπειραματικής έκθεσης σε χαμηλές δόσεις.

5.4.1.4 Κτηνιατρικά φάρμακα και Ανώτατα Όρια Καταλοίπων (Maximum Residue Limits, MRLs)

Οι τροφές περιέχουν, ένα ευρύ φάσμα ουσιών οι οποίες είναι είτε επιθυμητές (θρεπτικά συστατικά, πρόσθετα, διαιτητικές ίνες), είτε αδιάφορες (για τις οποίες ίσως να μη γνωρίζουμε τις συνέπειες που προκαλούν ή τις ιδιότητές τους), είτε ανεπιθύμητες (φυσικές τοξίνες, κατάλοιπα γεωργικών και κτηνιατρικών φαρμάκων, μυκοτοξίνες ή υπερβολικά αυξημένες συγκεντρώσεις θρεπτικών ουσιών) [Τζιά, Αποτίμηση Ρίσκου και Ασφάλεια Τροφίμων]. Όλες οι προαναφερόμενες ουσίες σε χαμηλές ή υψηλές συγκεντρώσεις είναι δυνατό να αποτελέσουν κίνδυνο για τη δημόσια υγεία. Η παρουσία ή απουσία των ουσιών αυτών από τις τροφές, εξαρτάται κυρίως από την ορθή τους χρήση, σύμφωνα με τους κανόνες της ορθής κτηνιατρικής πρακτικής. Μερικά κτηνιατρικά φάρμακα, χρησιμοποιούνται ευρέως για την πρόληψη ασθενειών (π.χ. βενζιμιδαζόλες), αλλά αρκετά άλλα χρησιμοποιούνται μόνο σε περίπτωση ανάγκης (π.χ. αντιφλεγμονώδη). Για κάθε φάρμακο έχει ορισθεί συγκεκριμένος χρόνος

αναμονής, ανάμεσα στη χορήγηση, την σφαγή ή το άρμεγμα, έτσι ώστε να μην ανιχνεύονται στην τροφή κατάλοιπα σε επίπεδα συγκέντρωσης επικίνδυνα για τον άνθρωπο. Με τον όρο χρόνος αναμονής, ορίζεται η αναγκαία χρονική περίοδος που πρέπει να μεσολαβεί μεταξύ της τελευταίας χορήγησης ενός κτηνιατρικού φαρμάκου σε ζώα, υπό κανονικές συνθήκες χρήσης και της παραγωγής τροφίμων από τα εν λόγω ζώα, διασφαλίζοντας έτσι ότι τα τρόφιμα που προέρχονται από το υπό θεραπεία ζώα, δεν περιέχουν κατάλοιπα σε ποσότητες που υπερβαίνουν τα ανώτατα όρια καταλοίπων δραστικών ουσιών [Καλογερόπουλος]. Ο κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 470/2009 προβλέπει ότι, εκτός των περιπτώσεων στις οποίες εφαρμόζεται η διαδικασία του *Codex Alimentarius*, για κάθε φαρμακολογικώς δραστική ουσία, προοριζόμενη για χρήση στην Ε.Ε. σε κτηνιατρικά φάρμακα τα οποία χορηγούνται σε ζώα παραγωγής τροφίμων, απαιτείται γνωμοδότηση του ΕΜΑ σχετικά με τα ανώτατα όρια καταλοίπων των φαρμακολογικώς δραστικών ουσιών που χρησιμοποιούνται ή προορίζονται να χρησιμοποιηθούν σε κτηνιατρικά φάρμακα. Η γνωμοδότηση του ΕΜΑ συνίσταται από μια επιστημονική εκτίμηση του κινδύνου, περιλαμβάνοντας συστάσεις για τη διαχείριση του κινδύνου. Οι μεθοδολογικές αρχές της εκτίμησης του κινδύνου και των συστάσεων για τη διαχείριση του κινδύνου, θα πρέπει να αποσκοπούν στην εξασφάλιση υψηλού επιπέδου προστασίας της υγείας του ανθρώπου και, παράλληλα, να διασφαλίζουν ότι η υγεία του ανθρώπου, η υγεία των ζώων και η καλή διαβίωση των ζώων δεν επηρεάζονται αρνητικά από την έλλειψη διαθεσιμότητας κατάλληλων κτηνιατρικών φαρμάκων [Καν. 2018/782].

Οι δοκιμές που διεξάγονται για την έγκριση ενός φαρμάκου – τοξικολογικές, καρκινογένεσης, μεταλλαξιογένεσης, τερατογένεσης – έχουν ως κύριο στόχο την εκτίμηση του επιπέδου μη παρατηρούμενου (ανεπιθύμητου) αποτελέσματος, NO(A)EL ή του κατώτατου επιπέδου παρατήρησης (ανεπιθύμητου) αποτελέσματος, LO(A)EL ή του κατώτερου ορίου της δόσης αναφοράς, BMDL, για δοκιμές ασφαλείας στο οποίο δεν παρατηρούνται δυσμενείς επιπτώσεις για την υγεία [Καν. 2018/782]. Από τη στιγμή που ορίζεται μία τιμή NOAEL, χρησιμοποιώντας ένα συντελεστή ασφαλείας, μπορεί να υπολογισθεί και η τιμή ADI, η οποία αντιστοιχεί στην ποσότητα που μπορεί να προσλαμβάνει ο καταναλωτής ημερησίως και για όλη τη διάρκεια της ζωής του, χωρίς την πιθανότητα εκδήλωσης δυσμενών επιπτώσεων [Καν. 396/2005]. Μετά τον καθορισμό της ADI, καθορίζεται και το ανώτατο όριο καταλοίπων, για κάθε προϊόν ζωικής προέλευσης, έτσι ώστε η ανθρώπινη κατανάλωση να μην οδηγεί σε ποσότητες καταλοίπου οι οποίες να υπερβαίνουν την ADI. Ο καθορισμός των ΑΟΚ, εξαρτάται από έναν αριθμό παραγόντων, όπως είναι η πιθανότητα κατανάλωσης ενός προϊόντος και τις διατροφικές συνήθειες ενός πληθυσμού. Το κατά πόσο οι παράγοντες αυτοί απεικονίζουν την πραγματικότητα, είναι αντικείμενο συζήτησης. Επίπεδα συγκέντρωσης καταλοίπων σε ένα τρόφιμο κοντά στο ΑΟΚ, συνήθως οδηγούν σε καταναλώσεις, αρκετά χαμηλότερες της ADI [Davies κ.ά. 2004]. Η συγκέντρωση του καταλοίπου, θα πρέπει να είναι πολλές φορές μεγαλύτερη του ΑΟΚ σε ένα τρόφιμο για να προσεγγισθεί η τιμή της ADI από τον καταναλωτή.

5.4.2 Αξιολόγηση της διατροφικής πρόσληψης

Οι αξιολογήσεις της διατροφικής πρόσληψης, χωρίζονται γενικά σε οξεία έκθεση (βραχυπρόθεσμη), καλύπτοντας μια περίοδο 24 ωρών και σε χρόνια έκθεση (μακροπρόθεσμη), η οποία καλύπτει καθημερινή έκθεση στην συγκεκριμένη ουσία καθόλη τη διάρκεια ζωής του καταναλωτή. Διάφορες μέθοδοι έχουν αναπτυχθεί για την αξιολόγηση της διατροφικής πρόσληψης ενός οργανισμού, αλλά και υποομάδες αυτού όπως παιδιά και νήπια, με διαφορετικές προσεγγίσεις να προτείνονται στη διεθνή. Συγκεκριμένα οι Voutsa και Samara το 1998 [Voutsa και Samara 1998], Dougherty κ.ά. το 2000 [Dougherty κ.ά. 2000], Urieta κ.ά. το 1996 [Urieta κ.ά. 1996] και Domingo κ.ά. το 2008 [Jose κ.ά. 2008], χρησιμοποίησαν το μοντέλο της εξίσωσης (2):

$$\textit{Μέση Ημερήσια Έκθεση (μg/kg σωματικού βάρους ανά ημέρα)} = \textit{Ημερήσια Κατανάλωση (g/kg σωματικού βάρους ανά ημέρα)} \times \textit{συγκέντρωση του ρυπαντή (μg/g)} \qquad (2)$$

ενώ οι Arnich κ.ά. το 2012 [Arnich κ.ά. 2012] και Chan-Hon-Tong κ.ά. το 2013 [Chan-Hon-Tong κ.ά. 2013] εφάρμοσαν την εξίσωση (3):

$$E_{ij} = \frac{\Sigma_{k=1 \text{ to } n} C_{ij} \times L_{kj}}{BW_i} \qquad (3)$$

όπου E_{ij} = έκθεση στην πρόσμιξη
C_{ij} = κατανάλωση τρόφιμου
L_{kj} = συγκέντρωση πρόσμιξης
BW_i = βάρος σώματος

Η περισσότερο αποδεκτή προσέγγιση, η οποία και εφαρμόστηκε για την εκτίμηση της διατροφικής πρόσληψης στην παρούσα εργασία, αφορά την εξίσωση (2) για την αποτύπωση τόσο της οξείας όσο και της χρόνιας διατροφικής έκθεσης:

$$\textit{Διαιτητική έκθεση} = \frac{\textit{Συγκέντρωση των χημικών στο τρόφιμο} \times \textit{Κατανάλωση του τρόφιμου}}{\textit{Σωματικό Βάρος}} \qquad (4)$$

Οι μονάδες μέτρησης της διατροφικής έκθεσης είναι mg/kg σωματικού βάρους για τη διατροφική έκθεση, mg/kg για την συγκέντρωση των χημικών και kg για την καταναλισκόμενη τροφή. Για τη διασφάλιση της σωστής εφαρμογής της εξίσωσης, πρέπει να διευκρινιστεί ότι η διατροφική έκθεση αφορά την συγκέντρωση των χημικών που προσλαμβάνονται μέσω της τροφής. Επίσης, ως «κατανάλωση» νοείται η ποσότητα της τροφής που καταναλώθηκε, ενώ ο όρος «τρόφιμο» περιλαμβάνει τα ποτά, το πόσιμο νερό και τα συμπληρώματα διατροφής [FAO/WHO 2008b].

Για την ανάλυση της διατροφικής πρόσληψης, μπορεί να χρησιμοποιηθούν και άλλα προσδιοριστικά μοντέλα (Deterministic Models) ή μοντέλα κατανομής

(Distributional Models). Μια ανάλυση διατροφικής πρόσληψης στην οποία εφαρμόζονται προσδιοριστικά μοντέλα, απαιτεί αρκετές πηγές, διεξάγεται χρησιμοποιώντας συνοπτικά στοιχεία και προσδιορίζεται σχετικά γρήγορα. Αντιθέτως, οι αναλύσεις οι οποίες χρησιμοποιούν μοντέλα κατανομής, είναι αρκετά πολύπλοκες και απαιτούν σημαντικές τεχνικές πηγές για να διεξαχθούν και να αξιολογηθούν.

5.4.2.1 Εκτίμηση της χρόνιας διατροφικής πρόσληψης

Η αξιολόγηση της χρόνιας διατροφικής πρόσληψης παρέχει την εκτιμώμενη ποσότητα υπολείμματος που καταναλώνεται καθημερινά, μέσω της διατροφής ή του πόσιμου νερού, για μακρά χρονική περίοδο. Στο προσδιορισμό της επικινδυνότητας της χρόνιας πρόσληψης, είναι απαραίτητο να προσδιορισθεί η συγκέντρωση του υπολείμματος της υπό μελέτη χημικής ουσίας, η οποία καταλώνεται μακροπρόθεσμα. Η πληροφορία αυτή είναι απαραίτητη, έτσι ώστε να μπορεί να γίνει σύγκριση με την ADI, η οποία έχει υπολογισθεί με τοξικολογικές μελέτες, όπου η διατροφική πρόσληψη ενός υπολείμματος είναι ασφαλής όταν είναι μικρότερη αυτήν [Davies κ.ά. 2004].

5.5 ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΚΙΝΔΥΝΟΥ (Risk Characterization)

Ο χαρακτηρισμός ενός κινδύνου πρέπει να είναι πολύπλευρος και να περιλαμβάνει την *αναγνώριση* του επικίνδυνου παράγοντα (Hazard Identification), τον *χαρακτηρισμό* του (Hazard Characterization) αλλά και την *εκτίμηση* της διατροφικής έκθεσης στο κίνδυνο (Exposure Assessment). Αποτελεί το τέταρτο και τελευταίο βήμα στην αξιολόγηση ενός κινδύνου, συμπεριλαμβανομένου των συνεπαγόμενων αβεβαιοτήτων, της πιθανότητας εμφάνισης των γνωστών και δυνητικών αρνητικών επιπτώσεων ενός παράγοντα σε ένα οργανισμό, σε ένα σύστημα ή σε μια (υπό)ομάδα πληθυσμού, κάτω από ορισμένες συνθήκες έκθεσης. Ο χαρακτηρισμός κινδύνου, είναι ο συνδετικός κρίκος μεταξύ *εκτίμησης* (Risk Assessment) και *διαχείρισης* κινδύνου (Risk Management), ενώ παράλληλα παρατηρείται συνεχώς αυξανόμενη χρήση μαθηματικών μοντέλων για να υπολογισθεί και ο μικροβιολογικός κίνδυνος.

Για τον χαρακτηρισμό ενός *κινδύνου* (risk), απαιτείται η σύγκριση της εκτιμώμενης ή μετρήσιμης διατροφικής έκθεσης του ανθρώπου σε μια χημική ουσία (health-based guidance values), με τις διεθνώς αποδεκτές τιμές αναφοράς, οι οποίες κατοχυρώνονται βάση τοξικολογικών μελετών. Εντούτοις, για ουσίες που η τιμή της αποδεκτής ημερήσιας πρόσληψης δεν μπορεί να καθοριστεί μέσω τοξικολογικών μελετών, οι JECFA και JMPR προτείνουν τη χρήση δεδομένων σχετικά με το «*περιθώριο της έκθεσης*» (Margin Of Exposure, MOE) μεταξύ των δόσεων για τις οποίες έχουν παρατηρηθεί επιπτώσεις στην εκτιμώμενη έκθεση του ανθρώπου και το «*εύρος ασφαλείας*» (Margin Of Safety, MOS) [FAO/WHO 2009]. Το MOE, είναι ο λόγος μεταξύ του NOAEL, το οποίο έχει προκύψει από μελέτες σε ζώα ή σε ανθρώπους και, της εκτιμώμενης έκθεσης του ανθρώπου. Ενώ το MOS, είναι ο λόγος μεταξύ του NOAEL και, της πραγματικής έκθεσης. Όσο υψηλότερη είναι η τιμή του MOE/MOS, τόσο αυξάνεται ο βαθμός ασφαλείας του ανθρώπου, ενώ η τιμή του θα πρέπει να είναι τουλάχιστόν 100 εάν το NOAEL προέρχεται από μελέτες σε

πειραματόζωα και τουλάχιστον 10 εάν προέρχεται από μελέτες σε ζώα. Όταν η τιμή του MOE είναι 100, σημαίνει ότι το εκτιμώμενο επίπεδο έκθεσης του ανθρώπου είναι 100 φορές πιο κάτω από τη χαμηλότερη συγκέντρωση η οποία προκαλεί αρνητικές επιπτώσεις στον άνθρωπο βάση τοξικολογικών μελετών. Σε ορισμένες περιπτώσεις, υπάρχει η πιθανότητα να μην είναι εφικτός ο προσδιορισμός του NOAEL, βάση τοξικολογικών μελετών, οπότε προσδιορίζεται το LOAEL (χαμηλότερο σημείο συγκέντρωσης στο οποίο παρατηρείται κάποια επίπτωση). Τότε ο υπολογισμός του εύρους της πραγματικής ή εκτιμώμενης έκθεσης του ανθρώπου, μπορεί να πραγματοποιηθεί ομοίως με τα MOS/MOE, χρησιμοποιώντας όμως το LOAEL [Whitford κ.ά. 2012, Renwick 2002, FAO/WHO2009].

II. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6. ΧΗΜΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΣ ΕΚΤΙΜΗΣΗΣ ΤΗΣ ΕΠΙΚΙΝΔΥΝΟΤΗΤΑΣ ΤΗΣ ΔΙΑΤΡΟΦΙΚΗΣ ΠΡΟΣΛΗΨΗΣ ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΩΝ ΟΥΣΙΩΝ, ΜΕΣΩ ΤΟΥ ΧΟΙΡΙΝΟΥ ΚΡΕΑΤΟΣ, ΤΟΥ ΚΥΠΡΙΑΚΟΥ ΠΛΗΘΥΣΜΟΥ

"Dans les champs de l'observation le hasard
ne favorise que les esprits préparés".

Louis Pasteur, 1854

"Στο πεδίο των επιστημονικών παρατηρήσεων
η τύχη δεν ευνοεί παρά μόνον τον προετοιμασμένο νου".

6.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Τις τελευταίες δύο δεκαετίες παρατηρείται συνεχώς αύξηση στη χρήση αντιμικροβιακών φαρμάκων, για τη θεραπεία βακτηριακών κυρίως λοιμώξεων, όχι μόνο στην ιατρική πρακτική, αλλά και στη γεωργία, στην κτηνοτροφία και στις ιχθυοκαλλιέργειες. Η ευρεία χρήση των φαρμάκων αυτών οδηγεί στη συνεχή απελευθέρωση τους στο οικοσύστημα, η οποία αναπόφευκτα οδηγεί στην ανάπτυξη μικροβιακής αντοχής των μικροβίων του περιβάλλοντος, λόγω

της εξελικτικής πίεσης που ασκείται στο βακτηριακό πληθυσμό. Μικρόβια ανθεκτικά στα αντιμικροβιακά φάρμακα μπορούν να μεταδοθούν στον άνθρωπο είτε άμεσα είτε έμμεσα, γεγονός που καταδεικνύει ότι η κλινική αντοχή των μικροβίων σχετίζεται άμεσα και με την αντοχή των μικροβίων που βρίσκονται στο φυσικό περιβάλλον.

Στις σύγχρονες πρακτικές εκτροφής οι φαρμακευτικές ουσίες χρησιμοποιούνται ευρέως, γεγονός που συνδέεται με την εντατικοποίηση των κτηνοτροφικών μονάδων. Σήμερα, σε αντίθεση με το παρελθόν όπου οι εκτροφές ήταν εκτατικές και το ζωικό κεφάλαιο περιπλανιόταν ελεύθερο σε μεγάλες εκτάσεις της υπαίθρου για την ανεύρεση χορτονομής, η εκτροφή λαμβάνει χώρα σε περιορισμένες εκτάσεις ευνοώντας το συνωστισμό, γεγονός που έχει αυξήσει ραγδαία την εμφάνιση και την εξάπλωση ασθενειών. Αυτός είναι κυρίως ο λόγος για τον οποίο η ανάγκη χρήσης αντιμικροβιακών φαρμάκων στα ζώα αυξήθηκε τόσο πολύ, ενώ παράλληλα φάρμακα χρησιμοποιούνται και για προληπτικούς ή μη θεραπευτικούς σκοπούς (ως αυξητικοί παράγοντες). Αναπόφευκτα, όσο αυξάνεται η χορήγηση αντιμικροβιακών ουσιών στα ζώα τόσο πιο επιτακτική γίνεται η ανάγκη του ελέγχου και προσδιορισμού των ουσιών αυτών, αφού λόγω της εκτεταμένης χρήσης τους στη ζωική παραγωγή, είναι δυνατό, το ίδιο το φάρμακο ή οι μεταβολίτες του να εμφανισθούν υπολειμματικά σε εδώδιμα ζωικά προϊόντα. Μια πολύ σημαντική παράμετρος που αφορά τη χρήση κτηνιατρικών φαρμάκων σε παραγωγικά ζώα και την κατανάλωση προϊόντων ζωικής παραγωγής, είναι τα κατάλοιπα. Όπως έχει ήδη αναφερθεί, κατάλοιπα θεωρούνται όλες οι φαρμακολογικά ενεργές ουσίες, τα έκδοχα, τα προϊόντα αποδόμησης και μεταβολισμού τους, που παραμένουν στους εδώδιμους ιστούς των υπό θεραπεία ζώων και κατ΄επέκταση στα τρόφιμα ζωικής προέλευσης (κρέας, αυγά, γάλα, μέλι). Η εμφάνιση καταλοίπων δραστικών ουσιών στα τρόφιμα, οφείλεται κυρίως στην υπέρμετρη χρήση αντιβιοτικών στα ζώα, εντείνοντας έτσι το πρόβλημα της ανθεκτικότητας με όλες τις δυσμενείς επιπτώσεις για τη δημόσια υγεία.

Τα επίπεδα της αντοχής στα αντιμικροβιακά φάρμακα παρακολουθούνται και καταγράφονται παγκοσμίως εδώ και πολλά χρόνια. Για το σκοπό αυτό, έχουν θεσμοθετηθεί ειδικοί φορείς τόσο στην Ευρώπη όσο και στον Καναδά, Αυστραλία και στις Ηνωμένες Πολιτείες Αμερικής, οι οποίοι συστηματικά ασχολούνται με το φαινόμενο αυτό και ιδιαίτερα με τον κίνδυνο μεταβίβασης, μέσω της τροφικής αλυσίδας στον άνθρωπο, της ενδεχόμενης ανθεκτικότητας των βακτηριακών στελεχών. Δυστυχώς, το πρόβλημα της εμφάνισης και μετάδοσης μικροβίων που είναι ανθεκτικά σε οικονομικά προσιτά φάρμακα πρώτης επιλογής, γίνεται συνεχώς εντονότερο καθιστώντας τα κοινά αντιμικροβιακά αναποτελεσματικά για τη θεραπεία λοιμώξεων. Οι ετήσιες εκθέσεις των οργάνων αυτών αποκαλύπτουν ότι το φαινόμενο της μικροβιακής αντοχής έχει λάβει ανησυχητικές διαστάσεις και εφιστούν την προσοχή της επιστημονικής κοινότητας στο ζήτημα αυτό. Η μικροβιακή αντοχή αποτελεί φυσικό βιολογικό φαινόμενο αλλά δυστυχώς διογκώνεται από ποικιλία παραγόντων. Όπως έχει ήδη αναφερθεί στο γενικό μέρος, η μη ενδεδειγμένη χρήση θεραπευτικών αντιμικροβιακών ουσιών στην ιατρική και κτηνιατρική, η χρήση των αντιμικροβιακών ουσιών για μη θεραπευτικούς σκοπούς, καθώς και η ρύπανση του περιβάλλοντος από αντιμικροβιακές ουσίες, επιταχύνει την εμφάνιση και τη διάδοση ανθεκτικών παθογόνων μικροοργανισμών τα οποία

εντέλει μολύνουν την τροφική αλυσίδα. Άλλοι σημαντικοί παράμετροι διατροφικής επιβάρυνσης, που σχετίζονται με τα κατάλοιπα αντιβιοτικών στα τρόφιμα, περιλαμβάνουν αυτοανοσία, καρκινογένεση (σουλφαμεθαζίνη, οξυτετρακυκλίνη, φουραζολιδόνη), μεταλλαξιογένεση, νεφροπάθεια (γενταμικίνη), ηπατοτοξικότητα, αναπαραγωγικές διαταραχές, τοξικότητα του μυελού των οστών (χλωραμφενικόλη) και αλλεργίες (πενικιλλίνη) [Heshmati 2015].

Στις μέρες μας, λόγω της εκτενούς ενημέρωσης του καταναλωτικού κοινού, σχετικά με θέματα που άπτονται της δημόσιας υγείας, είτε μέσω του τύπου είτε μέσων άλλων πηγών ενημέρωσης, ακόμη και για θέματα όπως είναι η ύπαρξη καταλοίπων αντιμικροβιακών ουσιών στα τρόφιμα, η ζητούμενη διαφάνεια και περισσότερη πληροφόρηση είναι αναπόφευκτη. Η απαίτηση της λεπτομερούς ενημέρωσης για τα θέματα αυτά είναι καθολική και εστιάζεται ιδιαίτερα στους διάφορους μηχανισμούς που εφαρμόζονται με σκοπό τον έλεγχο της ποιότητας των τροφίμων που διατίθενται στην αγορά και τα μέτρα που επιβάλλονται τόσο σε εγχώρια όσο και σε παγκόσμια κλίμακα για τη διασφάλιση της δημόσιας υγείας. Η διεξαγωγή λοιπόν ποιοτικού ελέγχου με χημική ανάλυση, στα διάφορα είδη τροφίμων, για τον προσδιορισμό καταλοίπων κτηνιατρικών φαρμάκων αλλά και άλλων σημαντικών ουσιών, σε συνδυασμό με την εκτίμηση του ποσοστού πρόσληψης των ουσιών αυτών από τον άνθρωπο, αποτελεί το κύριο σημείο ελέγχου για τον εντοπισμό καταλοίπων και αποσκοπεί στην προστασία της δημόσιας υγείας.

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΠΑΡΟΥΣΑΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

6.2 ΣΚΟΠΟΣ ΚΑΙ ΑΝΤΙΚΕΙΜΕΝΟ ΤΗΣ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

Η παρούσα μελέτη, πραγματεύεται την εκτίμηση της επικινδυνότητας της διατροφικής πρόσληψης καταλοίπων αντιμικροβιακών ουσιών, μέσω του χοιρινού κρέατος στην Κύπρο. Για τον σκοπό αυτό, διερευνήθηκε η παρουσία καταλοίπων σε χοίρειο μυϊκό ιστό 45 αντιμικροβιακών ουσιών, που χρησιμοποιούνται στην κοινή κτηνιατρική πρακτική, από εννέα κατηγορίες φαρμάκων: τετρακυκλίνες, κινολόνες, μακρολίδια, αντιβιοτικά β-λακτάμες, σουλφοναμίδια, αμινογλυκοσίδες, τριμεθοπρίμη και τιαμουλίνη. Η εκτίμηση της επικινδυνότητας πραγματοποιήθηκε συνδυάζοντας δεδομένα διατροφικής κατανάλωσης και των υπολειμματικών συγκεντρώσεων που ανιχνεύθηκαν με χημική ανάλυση, σε ωμό χοιρινό κρέας. Η διατροφική έκθεση προσδιορίζεται συσχετίζοντας διατροφικές συνήθειες μιας ομάδας πληθυσμού με τα επίπεδα των καταλοίπων στο χοιρινό κρέας. Με τον τρόπο αυτό, μπορέσαμε να υπολογίσουμε την Εκτιμώμενη Ημερήσια Πρόσληψη (Estimated Daily Intake, EDI) ως ποσοστό της Αποδεκτής Ημερήσιας Πρόσληψης (Acceptable Daily Intake, ADI) [IUPAC] των ανιχνευόμενων ουσιών. Η μελέτη αυτή επικεντρώθηκε σε ενήλικες άντρες και γυναίκες άνω των 20 χρόνων, παιδιά 6-9 χρονών και έφηβους 10-17 χρονών. Αυτή είναι η πρώτη μελέτη αξιολόγησης της πληθυσμιακής έκθεσης σε αντιμικροβιακά κατάλοιπα κτηνιατρικής χρήσης που γίνεται στην Κύπρο, μέσω της κατανάλωσης χοιρινού κρέατος. Στην αξιολόγηση της επικινδυνότητας, χρησιμοποιήθηκαν μόνο τα αποτελέσματα

ανάλυσης ουσιών που ανιχνεύθηκαν κάτω από το καθορισμένο ανώτατο όριο καταλοίπων (ΑΟΚ), καθώς οποιοδήποτε δείγμα και αντίστοιχη παρτίδα κρέατος περιείχε κατάλοιπα πάνω από το ΑΟΚ θεωρείται πάντα ακατάλληλο προς κατανάλωση και καταστρέφεται από τις Κτηνιατρικές Υπηρεσίες του Κράτους πριν φθάσει στην αγορά.

Τα ΑΟΚ στους ιστούς-στόχους για τις φαρμακολογικώς δραστικές ουσίες, με βάση την επιστημονική αξιολόγηση της ασφάλειας των εν λόγω ουσιών, περιλαμβάνονται στο Παράρτημα Ι του κανονισμού 37/2010/ΕΚ [Κανονισμός αριθ. 37/2010]. Το Παράρτημα Ι αφορά τις ουσίες για τις οποίες μπορεί να καθορισθεί ΑΟΚ, μετά από αξιολόγηση του τοξικολογικού κινδύνου των ουσιών αυτών προς τον άνθρωπο. Στον Πίνακα 13 παρουσιάζονται οι ουσίες, του Παραρτήματος αυτού, κατάλοιπα των οποίων ανιχνεύθηκαν στο κρέας μετά από χημική ανάλυση. Κατάλοιπα φαρμακολογικώς δραστικών ουσιών, νοούνται όλες οι φαρμακολογικά ενεργές ουσίες (εκφρασμένες σε ppm ή ppb νωπού βάρους) ανεξάρτητα αν πρόκειται για δραστικές ουσίες, έκδοχα ή προϊόντα αποδόμησης και οι μεταβολίτες τους που παραμένουν σε τρόφιμα ζωικής παραγωγής.

Πίνακας 13: Ταξινόμηση αντιμικροβιακών ουσιών, που ανιχνεύθηκαν σε χοίρειο μυϊκό ιστό, σε σχέση με τον Κανονισμό 37/2010/ΕΚ Παράρτημα Ι, όσον αφορά τα ΑΟΚ στα τρόφιμα ζωικής προέλευσης.

Δραστική ουσία	Κατάλοιπο δείκτης	Ζωικά είδη	ΑΟΚ ($\mu g \cdot Kg^{-1}$)	Ιστοί-στόχοι	Άλλες διατάξεις [σύμφωνα με το άρθρο 14 παράγραφος 7 του κανονισμού (ΕΚ) αριθ. 470/2009]
ΑΜΙΝΟΓΛΥΚΟΣΙΔΕΣ					
Διυδροστρε-πτομυκίνη	Διυδροστρε-πτομυκίνη	Όλα τα μηρυκαστικά χοίροι, κουνέλια	500 μg/kg 500 μg/kg 500 μg/kg 1000 μg/kg	Μύες Λιπώδης ιστός Ήπαρ Νεφροί	Για τους χοίρους, το ΑΟΚ για το λιπώδη ιστό αφορά το «δέρμα και το λιπώδη ιστό σε φυσική αναλογία».
		Όλα τα μηρυκαστικά	200 μg/kg	Γάλα	
Λινκομυκίνη	Λινκομυκίνη	Όλα τα είδη παραγωγής τροφίμων	100 μg/kg 50 μg/kg 500 μg/kg 1500 μg/kg 150 μg/kg 50 μg/kg	Μύες Λιπώδης ιστός Ήπαρ Νεφροί Γάλα Αβγά	Για τα ψάρια τα ΑΟΚ για τους μύες αφορούν τους «μύες και το δέρμα σε φυσική αναλογία». Τα ΑΟΚ για το λιπώδη ιστό, το ήπαρ και τους νεφρούς δεν ισχύουν για τα ψάρια. Για τους χοίρους και τα πουλερικά το ΑΟΚ για το λιπώδη ιστό αφορά το «δέρμα και

					το λιπώδη ιστό σε φυσική αναλογία».
ΚΙΝΟΛΟΝΕΣ					
Φλουμεκίνη	Φλουμεκίνη	Βοοειδή, πρόβατα, αίγες, χοίροι	200 μg/kg 300 μg/kg 500 μg/kg 1500 μg/kg	Μύες Λιπώδης ιστός Ήπαρ Νεφροί	Για τους χοίρους, το ΑΟΚ για το λιπώδη ιστό αφορά το «δέρμα και το λιπώδη ιστό σε φυσική αναλογία». Να μην χρησιμοποιείται σε ζώα που παράγουν αβγά για κατανάλωση από τον άνθρωπο.
		Βοοειδή, πρόβατα, αίγες	50 μg/kg	Γάλα	
		Πουλερικά	400 μg/kg 250 μg/kg 800 μg/kg 1000 μg/kg	Μύες Δέρμα και λιπώδης ιστός Ήπαρ Νεφροί	
		Ψάρια	600 μg/kg	Μύες και δέρμα σε φυσική αναλογία	
		Όλα τα άλλα είδη παραγωγής τροφίμων	200 μg/kg 250 μg/kg 500 μg/kg 1000 μg/kg	Μύες Λιπώδης ιστός Ήπαρ Νεφροί	
ΜΑΚΡΟΛΙΔΙΑ					
Τιλμικοσίνη	Τιλμικοσίνη	Πουλερικά	75 μg/kg 75 μg/kg 1000 μg/kg 250 μg/kg	Μύες Δέρμα και λιπώδης ιστός Ήπαρ Νεφροί	Για τα ψάρια τα ΑΟΚ για τους μύες αφορούν τους «μύες και το δέρμα σε φυσική αναλογία». Τα ΑΟΚ για το λιπώδη ιστό, το ήπαρ και τους νεφρούς δεν ισχύουν για τα ψάρια. Για τους χοίρους, το ΑΟΚ για το λιπώδη ιστό αφορά «το δέρμα και το λιπώδη ιστό σε φυσική αναλογία». Να μην χρησιμοποιείται σε ζώα που παράγουν αβγά για κατανάλωση από τον άνθρωπο.
		Όλα τα άλλα είδη παραγωγής τροφίμων	50 μg/kg 50 μg/kg 1000 μg/kg 1000 μg/kg 50 μg/kg	Μύες Λιπώδης ιστός Ήπαρ Νεφροί Γάλα	
ΠΕΝΙΚΙΛΛΙΝΕΣ					
Αμοξυκιλλίνη	Αμοξυκιλλίνη	Όλα τα είδη παραγωγής τροφίμων	50 μg/kg 50 μg/kg 50 μg/kg 50 μg/kg	Μύες Λιπώδης ιστός Ήπαρ	Για τα ψάρια τα ΑΟΚ για τους μύες αφορούν τους «μύες και το δέρμα σε φυσική αναλογία». Τα

			4 μg/kg	Νεφροί Γάλα	ΑΟΚ για το λιπώδη ιστό, το ήπαρ και τους νεφρούς δεν ισχύουν για τα ψάρια. Για τους χοίρους και τα πουλερικά το ΑΟΚ για το λιπώδη ιστό αφορά το «δέρμα και το λιπώδη ιστό σε φυσική αναλογία». Να μην χρησιμοποιείται σε ζώα που παράγουν αβγά για κατανάλωση από τον άνθρωπο.
ΣΟΥΛΦΟΝΑΜΙΔΕΣ					
Σουλφονα-μίδες (όλες οι ουσίες που ανήκουν στην ομάδα των σουλφονα-μιδών)	Μητρικό φάρμακο	Όλα τα είδη παραγωγής τροφίμων	100 μg/kg 100 μg/kg 100 μg/kg 100 μg/kg	Μύες Λιπώδης ιστός Ήπαρ Νεφροί	Το σύνολο των καταλοίπων από όλες μαζί τις ουσίες της ομάδας των σουλφοναμιδών δεν πρέπει να υπερβαίνει τα 100 μg/kg. Για τα ψάρια τα ΑΟΚ για τους μύες αφορούν τους «μύες και το δέρμα σε φυσική αναλογία». Τα ΑΟΚ για το λιπώδη ιστό, το ήπαρ και τους νεφρούς δεν ισχύουν για τα ψάρια. Να μην χρησιμοποιείται σε ζώα που παράγουν αβγά για κατανάλωση από τον άνθρωπο.
		Βοοειδή, πρόβατα, αίγες	100 μg/kg	Γάλα	
Τριμεθοπρίμη	Τριμεθοπρίμη	Ιπποειδή	100 μg/kg 100 μg/kg 100 μg/kg 100 μg/kg	Λιπώδης ιστός Μύες Ήπαρ Νεφροί	Για τα ψάρια τα ΑΟΚ για τους μύες αφορούν τους «μύες και το δέρμα σε φυσική αναλογία». Τα ΑΟΚ για το λιπώδη ιστό, το ήπαρ και τους νεφρούς δεν ισχύουν για τα ψάρια. Για τους χοίρους και τα πουλερικά το ΑΟΚ για το λιπώδη ιστό αφορά το «δέρμα και το λιπώδη ιστό σε φυσική αναλογία». Να μην χρησιμοποιείται σε ζώα που παράγουν αβγά για κατανάλωση από τον άνθρωπο.
		Όλα τα άλλα είδη παραγωγής τροφίμων	50 μg/kg 50 μg/kg 50 μg/kg 50 μg/kg 50 μg/kg	Μύες Λιπώδης ιστός Ήπαρ Νεφροί Γάλα	
ΤΕΤΡΑΚΥΚΛΙΝΕΣ					

Χλωροτετρα-κυκλίνη	Άθροισμα του μητρικού φαρμάκου και του 4-επιμερούς του	Όλα τα είδη παραγωγής τροφίμων	100 μg/kg 300 μg/kg 600 μg/kg 100 μg/kg 200 μg/kg	Μύες Ήπαρ Νεφροί Γάλα Αβγά	Για τα ψάρια τα ΑΟΚ για τους μύες αφορούν τους «μύες και το δέρμα σε φυσική αναλογία». Τα ΑΟΚ για το ήπαρ και τους νεφρούς δεν ισχύουν για τα ψάρια.
Δοξυκυκλίνη	Δοξυκυκλίνη	Όλα τα ζωικά είδη παραγωγής τροφίμων	100 μg/kg 300 μg/kg 300 μg/kg 600 μg/kg	Μύες Λιπώδης ιστός Ήπαρ Νεφροί	Για τα ψάρια με πτερύγια το ΑΟΚ για τους μύες αφορά τους «μύες και το δέρμα σε φυσική αναλογία». Τα ΑΟΚ για τον λιπώδη ιστό, το ήπαρ και τους νεφρούς δεν ισχύουν για τα ψάρια με πτερύγια. Για τους χοίρους και τα πουλερικά το ΑΟΚ για τον λιπώδη ιστό αφορά τους «μύες και το δέρμα σε φυσική αναλογία». Να μην χρησιμοποιείται σε ζώα που παράγουν γάλα ή αβγά για κατανάλωση από τον άνθρωπο.
Οξυτετρα-κυκλίνη	Άθροισμα του μητρικού φαρμάκου και του 4-επιμερούς του	Όλα τα είδη παραγωγής τροφίμων	100 μg/kg 300 μg/kg 600 μg/kg 100 μg/kg 200 μg/kg	Μύες Ήπαρ Νεφροί Γάλα Αβγά	Για τα ψάρια τα ΑΟΚ για τους μύες αφορούν τους «μύες και το δέρμα σε φυσική αναλογία». Τα ΑΟΚ για το ήπαρ και τους νεφρούς δεν ισχύουν για τα ψάρια.
Τετρακυκλίνη	Άθροισμα του μητρικού φαρμάκου και του 4-επιμερούς του	Όλα τα είδη παραγωγής τροφίμων	100 μg/kg 300 μg/kg 600 μg/kg 100 μg/kg 200 μg/kg	Μύες Ήπαρ Νεφροί Γάλα Αβγά	Για τα ψάρια τα ΑΟΚ για τους μύες αφορούν τους «μύες και το δέρμα σε φυσική αναλογία». Τα ΑΟΚ για το ήπαρ και τους νεφρούς δεν ισχύουν για τα ψάρια.

Οι μέθοδοι ελέγχου καταλοίπων αντιμικροβιακών φαρμάκων διακρίνονται σε μικροβιολογικές, χρωματογραφικές και άλλες. Οι μικροβιολογικές μέθοδοι έχουν εδώ και πολλά χρόνια χρησιμοποιηθεί με επιτυχία αποτελώντας μέθοδο επιλογής για τη διερεύνηση της παρουσίας καταλοίπων φαρμακολογικώς δραστικών ουσιών σε δείγματα ζωικής προελεύσεως. Η φιλοσοφία τους στηρίζεται στην ανάσχεση της ανάπτυξης ενός ευαίσθητου στις δραστικές ουσίες στελέχους μικροοργανισμού, υπό την παρουσία τέτοιων καταλοίπων. Οι μικροβιολογικές μέθοδοι παρουσιάζουν ιδιαίτερα πλεονέκτημα στη διερεύνηση αντιμικροβιακών ουσιών, όπως το γεγονός ότι είναι απλές στην εφαρμογή, σχετικά ανέξοδες και προσφέρουν μια γενική εκτίμηση της συνολικής αντιμικροβιακής δραστικότητας. Αντιθέτως, το γεγονός ότι υπολείπονται σε εκλεκτικότητα, αφού δεν μπορούν να διαφοροποιήσουν τις φυσικές αντιμικροβιακές ουσίες από τα κατάλοιπα αντιμικροβιακών φαρμάκων και τα

απορρυπαντικά/απολυμαντικά, που μπορεί να βρεθούν στα τρόφιμα, αποτελεί το κύριο μειονέκτημα τους σε σχέση με τις χρωματογραφικές μεθόδους. Επιπρόσθετα είναι χρονοβόρες, δεν έχουν επαναληψιμότητα και προσφέρουν μόνο ημιποσοτικές εκτιμήσεις αφού δεν επιτρέπουν την αναγνώριση του είδους του φαρμάκου ή του/των μεταβολιτών του στο εξεταζόμενο δείγμα [McGill και Hardy 1991]. Τα μειονεκτήματα αυτά, ώθησαν τους επιστήμονες στην ανάπτυξη ειδικών μεθόδων με βάση τη χρωματογραφική ανάλυση, η οποία αποτελεί την κύρια μέθοδο επιλογής σε ότι αφορά την ανίχνευση καταλοίπων αντιμικροβιακών φαρμάκων σε βιολογικά υλικά [McErlane και Kitts 1994]. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι οι χρωματογραφικές μέθοδοι έχουν σαφώς μεγαλύτερη ακρίβεια και επαναληψιμότητα στην ανίχνευση αντιμικροβιακών φαρμάκων σε δείγματα υλικών ζωικής παραγωγής και είναι ικανές να ταυτοποιούν ποσοτικά και ποιοτικά τις διάφορες δραστικές ουσίες. Για το λόγο αυτό, οι αναλυτικές αυτές μέθοδοι χρησιμοποιούνται πολλές φορές και ως επιβεβαιωτικές (confirmatory) των ύποπτων δειγμάτων για παρουσία καταλοίπων κτηνιατρικών φαρμάκων και όχι μόνο ως διερευνητικές (screening), όπως είναι οι μικροβιολογικές μέθοδοι.

Όσον αφορά την έρευνα μας, οι αναλύσεις των δειγμάτων σχετικά με τον προσδιορισμό καταλοίπων σε νωπό χοίρειο κρέας έγιναν στο διαπιστευμένο, σύμφωνα με το Ευρωπαϊκό/Διεθνές Πρότυπο CYS EN ISO/IEC 17025:2005 [ISO/IEC 17025:2005], εργαστήριο του Γενικού Χημείου της Κυπριακής Δημοκρατίας (ΓΧΚ). Το εν λόγω εργαστήριο, είναι το Εθνικό Εργαστήριο Αναφοράς και ταυτόχρονα το Επίσημο Εργαστήριο Ελέγχου Υπολειμμάτων Κτηνιατρικών Φαρμάκων και Αναβολικών Ουσιών σε ζώα και προϊόντα ζωικής προέλευσης. Ο έλεγχος διεξάγεται σύμφωνα με το Εθνικό Πρόγραμμα Ελέγχου Καταλοίπων, το οποίο καταρτίζεται ετησίως σε συνεργασία με τις Κτηνιατρικές Υπηρεσίες (ΚΥ) του κράτους. Αποσκοπεί στην κατάστρωση προγράμματος δειγματοληψίας και χημικής ανάλυσης ζωικών κυρίως προϊόντων, για τον έλεγχο της παρουσίας δραστικών, μεταξύ άλλων και αντιμικροβιακών, ουσιών. Μέσω του εθνικού αυτού προγράμματος ελέγχου καταλοίπων, ελέγχονται εάν τηρούνται οι χρόνοι αναμονής πριν την σφαγή ζώων που έτυχαν αντιμικροβιακής θεραπείας, προϋπόθεση που αποκλείει την ανίχνευση καταλοίπων στα προϊόντα ζωικής προέλευσης. Ως χρόνος αναμονής, νοείται η αναγκαία περίοδος μεταξύ της τελευταίας χορήγησης του κτηνιατρικού φαρμάκου σε ζώα υπό συνήθεις συνθήκες χρήσης και της παραγωγής τροφίμων από τα ζώα αυτά, ώστε να προστατεύεται η δημόσια υγεία δια της διασφαλίσεως ότι τα εν λόγω τρόφιμα δεν περιέχουν κατάλοιπα σε ποσότητες που υπερβαίνουν τα ΑΟΚ δραστικών ουσιών, που καθορίζονται κατ' εφαρμογή του κανονισμού (ΕΟΚ) αριθ. 2377/90. Το εργαστήριο αναφοράς του ΓΧΚ, σύμφωνα με την απόφαση 98/536/ΕΚ [Εκτελεστική Απόφαση της Επιτροπής 98/536/ΕΚ] όσον αφορά τα ενδεδειγμένα ευρωπαϊκά εθνικά εργαστήρια αναφοράς, είναι υπεύθυνο και συμμετέχει ενεργά στο σχεδιασμό και την εφαρμογή του Εθνικού Προγράμματος Ελέγχου και παρακολούθησης καταλοίπων κτηνιατρικών φαρμάκων σε προϊόντα ζωικής παραγωγής στην Κύπρο. Υπογραμμίζεται ότι το εργαστήριο αναφοράς είναι διαπιστευμένο για την εφαρμογή της σχετικής μεθόδου ανάλυσης για τον προσδιορισμό καταλοίπων και υπόκειται σε συστηματικούς επίσημους ευρωπαϊκούς ελέγχους με στόχο την καταλυτική συμβολή στην ολοκληρωμένη προσέγγιση της αξιολόγησης της ασφάλειας των τροφίμων ζωικής προέλευσης στην Κύπρο.

Το προς διερεύνηση τρόφιμο, επιλέχθηκε να είναι το νωπό χοιρινό κρέας, διότι πρόκειται για τρόφιμο ευρείας κατανάλωσης. Σύμφωνα με την τελευταία έρευνα της Στατιστικής Υπηρεσία της Κυπριακής Δημοκρατίας, για τα έτη 1993 έως 2015, έχει υπολογιστεί ότι η μέση ετήσια κατά κεφαλή κατανάλωση χοιρινού κρέατος στην Κύπρο είναι 52kg [Γεωργικές Στατιστικές 2015]. Αντίστοιχα, παρόμοια στατιστική μελέτη της Eurostat το 2011, καταδεικνύει ότι η μέση ετήσια κατά κεφαλή κατανάλωση χοιρινού κρέατος στην Κύπρο είναι 72kg, την στιγμή που ο μέσος ευρωπαίος πολίτης καταναλώνει 37kg [Eurostat 2011]. Επιπλέον, η παραγωγή χοιρινού κρέατος το 2017 αποτελούσε το 32,57% της ολικής αξίας της κτηνοτροφικής παραγωγής, σύμφωνα με εκτίμηση της Στατιστικής Υπηρεσίας και το 54% της συνολικής ποσότητας των κρεάτων στην Κύπρο. Ο αριθμός των χοιρομητέρων κατά τον Δεκέμβρη του 2017 ήταν 29.474, έναντι 28.799 το 2016 και 28.339 το 2015, δηλαδή ο αριθμός των χοιρομητέρων έχει αυξηθεί κατά 675 σε σύγκριση με το 2016 [Υπουργείο Γεωργίας Επισκόπηση Χοιροτροφίας 2014 και 2017]. Το μεγάλο συνεπώς ποσοστό παραγωγής και κατανάλωσης χοιρινού κρέατος στη Κύπρο, επιβάλει την ανάγκη διασφάλισης της ποιότητας, μέσω του ελέγχου της παρουσίας καταλοίπων κτηνιατρικών φαρμάκων στο κρέας, με τη βοήθεια ταχέων, εύχρηστων και αξιόπιστων τεχνικών.

Συνοψίζοντας, ο σκοπός της παρούσας διατριβής ήταν η αποτύπωση του ποσοστού επιμόλυνσης του εγχώριου χοιρινού κρέατος της Κυπριακής αγοράς, καθώς και εν συνεχεία η εκτίμηση της διατροφικής έκθεσης διάφορων πληθυσμιακών ομάδων σε κατάλοιπα αντιμικροβιακών φαρμάκων. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν τα διαχρονικά αποτελέσματα των αναλύσεων δειγμάτων νωπού χοίρειου μυϊκού ιστού, για την ανίχνευση αντιμικροβιακών ουσιών, που παρήχθησαν στο Εθνικό Εργαστήριο Αναφοράς Υπολειμμάτων του Γενικού Χημείου του Κράτους (ΓΧΚ), από το 2012 έως το 2017. Δειγματοληπτικά, η έρευνα κάλυψε όλες τις ελεύθερες περιοχές που ελέγχει το Κράτος, στις πέντε επαρχίες (Λευκωσία, Λάρνακα, Αμμόχωστο, Λεμεσό και Πάφο) της Κυπριακής Δημοκρατίας. Η αξιολόγηση του κινδύνου της διατροφικής πρόσληψης καταλοίπων, αντιμικροβιακών ουσιών που ανιχνεύθηκαν στο κρέας, έγινε για ενήλικες άντρες και γυναίκες άνω των 20 ετών (μέσου σωματικού βάρους 80,91Kg και 64,57Kg αντίστοιχα), με αποτελέσματα της Ευρωπαϊκής Έρευνας Υγείας [Στατιστική Υπηρεσία Ευρωπαϊκή Έρευνα 2014] που διεξήγαγε η Στατιστική Υπηρεσία Κύπρου και για έφηβους και παιδιά ηλικίας 10-17 και 6-9 ετών αντίστοιχα. Τα δεδομένα του μέσου σωματικού βάρους εφήβων και παιδιών, συνδέονται με τα αποτελέσματα της έρευνας που διεξήγαγε το Ερευνητικό και Εκπαιδευτικό Ινστιτούτο Υγείας του Παιδιού (ΕΕΙΥΠ) στην Κύπρο [Savva κ.ά. 2014].

6.3 ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Η παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκε στα ακόλουθα στάδια:

α) Λήψη δειγμάτων νωπού χοιρινού μυϊκού ιστού, με τυχαία σωματοποιημένη δειγματοληψία, από εκτροφές χοίρων σε όλες τις επαρχίες, μέσω των τριών εγκεκριμένων σφαγείων ερυθρού κρέατος της Κύπρου.

β) Περιγραφή της μεθόδου "*Multi Residue Method for screening of antibiotics residues in meat using LC-MS/MS*" Laratoire d'etudes et de recherches sur les

medicament veterinaries et les disinfectants, Laboratoire National de Reference, Fougeres-France, για την ταυτοποίηση και ποσοτικό προσδιορισμό υπολειμμάτων αντιμικροβιακών ουσιών στο νωπό χοιρινό κρέας.

γ) Εκτίμηση της διαιτολογικής πρόσληψης των ανιχνευόμενων ουσιών για διαφορετικές πληθυσμιακές ομάδες διαφορετικού φύλου, για έξη συναπτά έτη από το 2012 έως το 2017, σε όλη την επικράτεια της Κυπριακής Δημοκρατίας (Εικ. 24), με σκοπό την αξιολόγηση του κινδύνου της διατροφικής πρόσληψης αντιμικροβιακών καταλοίπων.

Εικόνα 24: Η Κυπριακή Δημοκρατία, για διοικητικούς λόγους, είναι διαιρεμένη σε έξι επαρχίες. Μετά την τουρκική εισβολή το 1974 και την κατάληψη του μεγάλου μέρους των εδαφών της από τα τουρκικά στρατεύματα, ολόκληρη η επαρχία Κερύνειας, το μεγαλύτερο μέρος της επαρχίας Αμμοχώστου, μεγάλο μέρος της επαρχίας Λευκωσίας και μικρό μέρος της επαρχίας Λάρνακας τελούν υπό κατοχή.

6.4 ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑ

Η λήψη δειγμάτων νωπού χοιρινού κρέατος, έγινε με τυχαία στρωματοποιημένη δειγματοληψία, από τις ΚΥ του Υπουργείου Γεωργίας Αγροτικής Ανάπτυξης και Περιβάλλοντος της Κυπριακής Δημοκρατίας, στα τρία εγκεκριμένα σφαγεία (Cypra Ltd, Αγ. Τριμιθιάς, Α. & Α. Σφαγεία) ερυθρού κρέατος της Κύπρου (Εικ. 25). Τα επιλεγμένα σφαγεία για δειγματοληψία, αποτελούν κύρια σημεία διακίνησης ερυθρού κρέατος των πέντε επαρχιών της Κύπρου, αφού η πλειοψηφία των χοιροτροφικών εκτροφών πωλούν κρέας μέσω των σφαγείων αυτών, σε όλη την επικράτεια της Κυπριακής Δημοκρατίας. Συνεπώς, το κρέας που παράγεται από τις διάφορες εκτροφές, μπορεί να βρεθεί σε αστικές και αγροτικές περιοχές σε οποιαδήποτε μορφή. Η δειγματοληψία έγινε μετά την ολοκλήρωση της σφαγής, πριν τα κρέατα μεταφερθούν στις εγκαταστάσεις λιανικής και χονδρικής πώλησης ή σε εγκαταστάσεις μεταποίησης χοιρινού κρέατος. Επιπρόσθετα, κάθε δείγμα αποτελούσε ένα μέσο δείγμα διότι αντιπροσωπευτικό δείγμα λαμβανόταν από το σφάγιο της συγκεκριμένης παρτίδας εκτροφής, που παραδόθηκε στο σφαγείο και όχι από το κρέας μεμονωμένων ζώων. Παράλληλα, η δειγματοληψία σχεδιάσθηκε ώστε τα ποσοστά των δειγμάτων που λαμβάνονταν από κάθε επαρχία, να είναι σε αναλογία με το ποσοστό των χοιροτροφικών εκτροφών (της εγχώριας παραγωγής) ανά γεωγραφική περιοχή και κατ΄επέκταση επαρχία, της Κύπρου. Τέλος όλες οι χοιροτροφικές εκτροφές παρακολουθούνται από τις ΚΥ της Κύπρου και είναι εγκεκριμένες για την παραγωγή και διανομή χοιρινού κρέατος.

Εικόνα 25: Σφαγείο ερυθρού κρέατος.

Για την συλλογή των δειγμάτων, χρησιμοποιήθηκαν δοχεία πολυπροπυλενίου, χωρητικότητας 250ml, μιας χρήσης, τα οποία σφραγίζουν με καπάκι. Αμέσως μετά τη δειγματοληψία, τα δείγματα μεταφέρονταν με ισοθερμικό περιέκτη, στο Εργαστήριο Ελέγχου Τροφίμων Ζωικής Προέλευσης (ΕΕΤΖΠ) των ΚΥ όπου αποθηκεύονταν στους 4°C. Στο ΕΕΤΖΠ εφαρμόζεται μια βιολογική μέθοδος διαλογής (screening), με την ονομασία Premi-Test, για την ανίχνευση αντιμικροβιακών ουσιών σε νωπό κρέας. Στη συνέχεια τα δείγματα που βρέθηκαν ύποπτα με τη βιολογική μέθοδο, μεταφέρονται εκ νέου με ισοθερμικό περιέκτη στο εθνικό εργαστήριο αναφοράς του ΓΧΚ. Εκεί γίνεται επιβεβαίωση των υπόπτων δειγμάτων με ταυτοποίηση και ποσοτικό προσδιορισμό. Το σύνολο των βιολογικών δοκιμών που διενεργούνται στο εργαστήριο ΕΕΤΖΠ και τα μέτρα που λαμβάνονται μετά την ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση των ύποπτων δειγμάτων, σχετίζονται αποκλειστικά με την προστασία της Δημόσιας Υγείας. Το εργαστήριο ΕΕΤΖΠ αποτελεί βασικό κέντρο δοκιμασιών διαλογής (screening test), στο οποίο αποστέλλονται όλα τα δείγματα τροφίμων ζωικής προέλευσης για τα οποία έχουν αρμοδιότητα ελέγχου οι ΚΥ της Κύπρου. Το ΕΕΤΖΠ είναι διαπιστευμένο για τον έλεγχο παρουσίας αντιμικροβιακών παραγόντων σε νωπό κρέας, καθώς και άλλων εργαστηριακών δοκιμών σε τρόφιμα ζωικής προέλευσης και ζωικής παραγωγής, από τον Κυπριακό Οργανισμό Προώθησης Ποιότητας, σύμφωνα με τα κριτήρια διαπίστευσης για εργαστήρια δοκιμών όπως αυτά καθορίζονται από το πρότυπο *CYS EN ISO/IEC 17025:2005*.

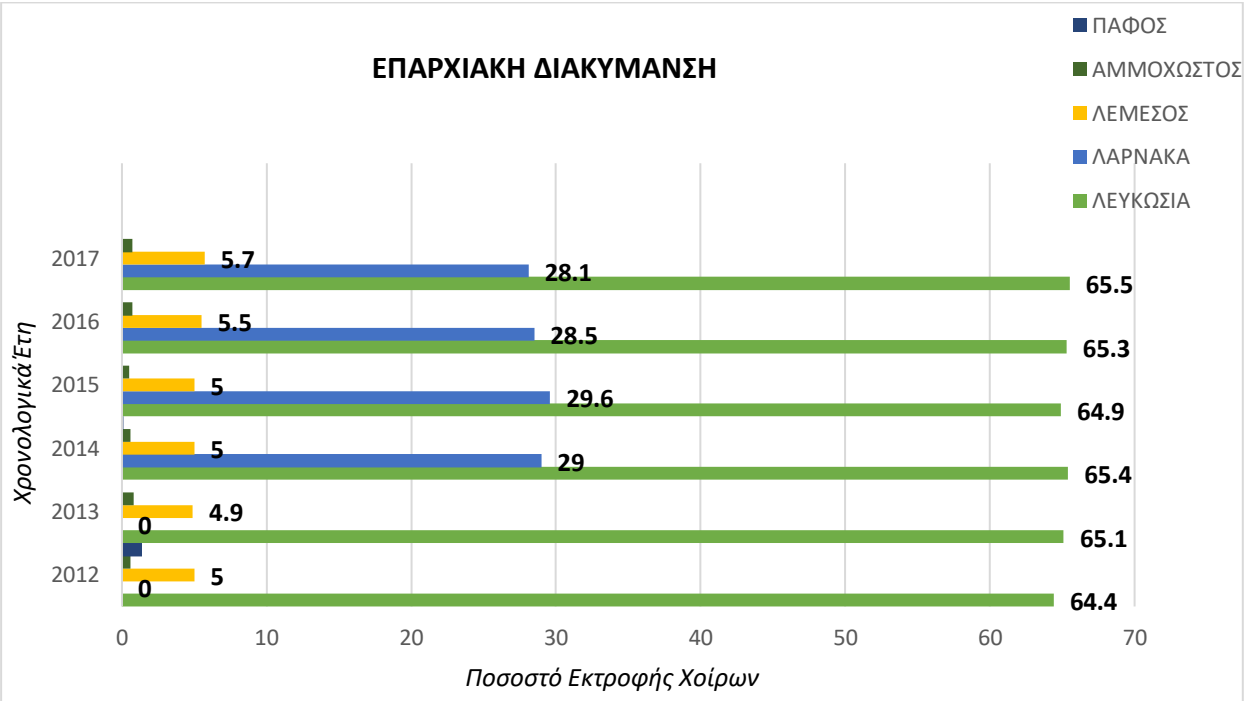
Είναι σημαντικό να αναφέρουμε ότι η δειγματοληψία βασίστηκε στο ποσοστό του ζωικού κεφαλαίου ανά επαρχία, γι΄αυτό και ο κύριος όγκος δειγμάτων προέρχεται κυρίως από την επαρχία Λευκωσίας και δευτερεύοντος από την επαρχία Λάρνακας, με μικρά δειγματοληπτικά ποσοστά στην επαρχία Λεμεσού και ακόμη μικρότερα στις επαρχίες Αμμοχώστου και Πάφου. Η επισκόπηση της κυπριακής χοιροτροφίας, ανά επαρχία, την ίδια περίοδο που έγινε η έρευνα μας (2012 έως 2017) αποδεικνύει του λόγου το αληθές. Συγκεκριμένα, ο συνολικός αριθμός χοίρων όλων των ηλικιών εκφραζόμενος ως ποσοστό (Πίνακας 14, Διάγραμμα 3), δείχνει ότι η κυρίως δομή της οργανωμένης χοιροτροφίας κατανέμεται μεταξύ Λευκωσίας και Λάρνακας, με τα ποσοστά παραγωγής να

κυμαίνονται σε παρόμοια επίπεδα κάθε χρόνο. Συγκεκριμένα, στην επαρχία Λευκωσίας και Λεμεσού τα ποσοστά αυξήθηκαν τα δύο τελευταία χρόνια ελαφρώς μέχρι το 65,5% και 5,7% αντίστοιχα, ενώ στην επαρχία Λάρνακας παρουσιάζεται μια ανεπαίσθητη μείωση της παραγωγής της τάξεως του 0,4%. Η επαρχία Αμμοχώστου παραμένει σταθερή τα δύο τελευταία χρόνια σε πολύ μικρό ποσοστό παραγωγής 0,7% και τέλος η επαρχία Πάφου παρουσιάζει ελάχιστο ποσοστό παραγωγής το οποίο τα τελευταία χρόνια δεν καταγράφεται [Υπουργείο Γεωργίας Επισκόπηση Χοιροτροφίας 2014 και 2017].

Επιπλέον, το προς κατανάλωση κρέας δεν περιορίζεται στη γεωγραφική περιοχή όπου βρίσκεται η κάθε χοιροτροφική εκτροφή, αλλά μέσω των σφαγείων μπορεί να βρεθεί σε οποιαδήποτε επαρχία της Κύπρου για κατανάλωση.

Πίνακας 14: Ποσοστά του Συνολικού Αριθμού Χοίρων κατά Επαρχία επί του Συνόλου των Χοίρων της Κύπρου.

ΕΤΟΣ	ΛΕΥΚΩΣΙΑ	ΛΑΡΝΑΚΑ	ΛΕΜΕΣΟΣ	ΑΜΜΟΧΩΣΤΟΣ	ΠΑΦΟΣ
2012	64.4	28.5	5,0	0,6	1,4
2013	65.1	29.3	4,9	0,8	0,0
2014	65,4	29,0	5,0	0,6	0,1
2015	64,9	29,6	5,0	0,5	0,0
2016	65,3	28,5	5,5	0,7	0,0
2017	65,5	28,1	5,7	0,7	0,0



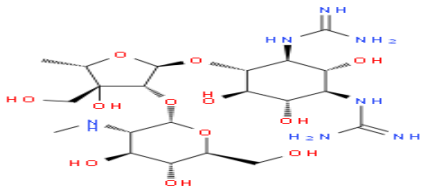
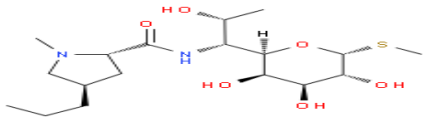
Διάγραμμα 3: Ποσοστό εκτροφής Χοίρων ανά Επαρχία, επί του Συνόλου των Χοίρων εκτροφής στην Κύπρο, για την χρονική περίοδο 2012-2017.

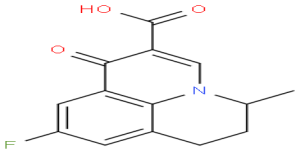
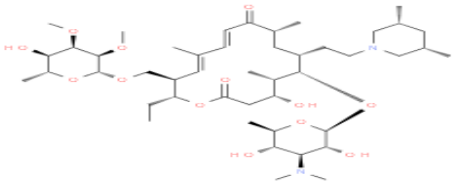
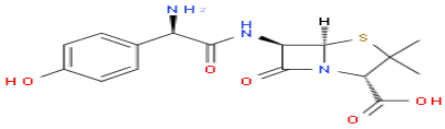
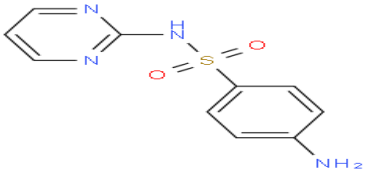
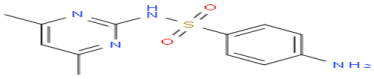
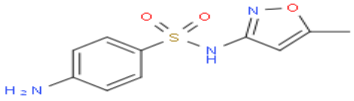
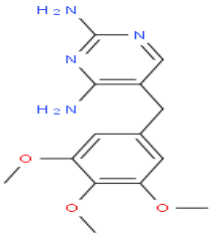
6.5 ΧΗΜΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

6.5.1 Γενικά

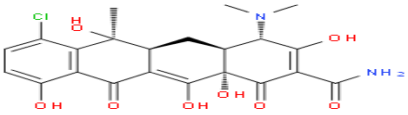
Το εργαστήριο αναφοράς του ΓΧΚ εφαρμόζει, με κάποιες τροποποιήσεις, μια επικυρωμένη μέθοδο για την επιβεβαίωση των ύποπτων δειγμάτων. Η εν λόγω μέθοδος αναφοράς: «*Multi Residue Method for screening of antibiotics residues in meat using LC-MS/MS*», βασίζεται στη χρωματογραφική ανάλυση με την εφαρμογή της τεχνικής της Υγρής Χρωματογραφίας Απόδοσης συνδεδεμένης με Διπλό Φασματογράφο Μάζας (LC-MS/MS). Η μέθοδος αυτή εφαρμόζεται στο εργαστήριο αναφοράς, για τον ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό υπολειμμάτων αντιμικροβιακών ουσιών σε νωπό χοίρειο μυϊκό ιστό και άλλα τρόφιμα ζωικής παραγωγής. Συγκεκριμένα, ελέγχονται οι ομάδες των αμινογλυκοσιδών, κεφαλοσπορινών, κινολονών, μακρολιδίων, πενικιλλινών, σουλφοναμιδών, τετρακυκλινών, καθώς και οι ουσίες τριμεθοπρίμη και τιαμουλίνη, οι οποίες δεν συμπεριλαμβάνονται στις πιο πάνω ομάδες. Στον Πίνακα 15 αναγράφεται ο μοριακός τύπος και η χημική δομή αντιμικροβιακών ουσιών, κατάλοιπα των οποίων ανιχνεύθηκαν σε δείγματα χοίρειου μυϊκού ιστού κατά τα έτη 2012-2017. Η τριμεθοπρίμη στη κοινή κτηνιατρική πρακτική συνήθως χορηγείται συνδυαστικά με σουλφοναμίδες, γι΄αυτό και στον πιο κάτω πίνακα συμπεριλήφθηκε στη κατηγορία των σουλφοναμίδων. Στη συνέχεια, παρατίθενται σημαντικά στοιχεία αναλυτικής απόδοσης της μεθόδου ανίχνευσης και ποσοτικού προσδιορισμού των διερευνώμενων ουσιών, όπως τα όρια ανίχνευσης (LOD) και ποσοτικής αποτίμησης (LOQ). Τέλος, η μέθοδος έχει ειδική εφαρμογή στον εντοπισμό υπερβάσεων του Ορίου Απόφασης (CC*α*).

Πίνακας 15: Ο μοριακός τύπος και η χημική δομή των διερευνώμενων αντιμικροβιακών ουσιών, κατάλοιπα των οποίων ανιχνεύθηκαν σε δείγματα χοίρειου μυϊκού ιστού.

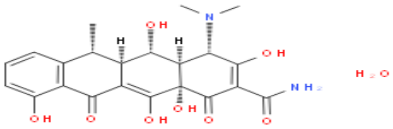
Κατάλοιπο	Μοριακός τύπος	Χημική Δομή
ΑΜΙΝΟΓΛΥΚΟΣΙΔΕΣ		
Διυδροστρεπτομυκίνη	$C_{21}H_{41}N_7O_{12}$	
Λινκομυκίνη	$C_{18}H_{34}N_2O_6S$	
ΚΙΝΟΛΟΝΕΣ		

Φλουμεκίνη	$C_{14}H_{12}FNO_3$	
ΜΑΚΡΟΛΙΔΙΑ		
Τιλμικοσίνη	$C_{46}H_{80}N_2O_{13}$	
ΠΕΝΙΚΙΛΛΙΝΕΣ		
Αμοξικιλλίνη	$C_{16}H_{19}N_3O_5S$	
ΣΟΥΛΦΟΝΑΜΙΔΕΣ		
Σουλφαδιαζίνη	$C_{10}H_{10}N_4O_2S$	
Σουλφαδιμιδίνη	$C_{12}H_{14}N_4O_2S$	
Σουλφαμεθοξαζόλη	$C_{10}H_{11}N_3O_3S$	
Τριμεθοπρίμη	$C_{14}H_{18}N_4O_3$	
ΤΕΤΡΑΚΥΚΛΙΝΕΣ		

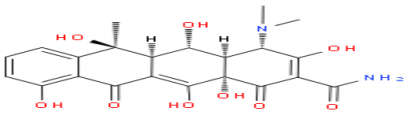
Χλωροτετρακυκλίνη $C_{22}H_{23}ClN_2O_8$



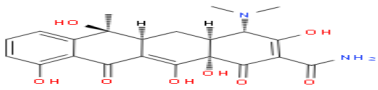
Δοξυκυκλίνη $C_{22}H_{26}N_2O_9$



Οξυτετρακυκλίνη $C_{22}H_{24}N_2O_9$



Τετρακυκλίνη $C_{22}H_{24}N_2O_8$



6.5.2. Αρχή της Μεθόδου

Η μέθοδος αποτελείται συνοπτικά, από τις πιο κάτω διαδικασίες ανάλυσης:

Για τις ομάδες των ουσιών – Τετρακυκλινών, Κινολονών και Αμινογλυκοσιδών (**E_1**) η μέθοδος αναπτύχθηκε ως εξής:

- Ομογενοποίηση και δειγματοληψία.
- Εμβολιασμός των δειγμάτων με εσωτερικά πρότυπα.
- Εκχύλιση με υδατικό διάλυμα τριχλωρικού οξέως (TCA).
- Μέτρηση στον υγρό χρωματογράφο συνδεδεμένο με διπλό φασματογράφο μάζας LC-MS/MS.

Για τις ομάδες των ουσιών – Σουλφοναμίδων, Πενικιλλινών, Κεφαλοσπορινών, Μακρολιδίων, Τιαμουλίνης και Τριμεθοπρίμης (**E_2**) η μέθοδος αναπτύχθηκε ως εξής:

- Ομογενοποίηση και δειγματοληψία.
- Εμβολιασμός των δειγμάτων με εσωτερικά πρότυπα.
- Εκχύλιση με οργανικό διαλύτη.
- Εξάτμιση και αναδιάλυση.
- Μέτρηση στον υγρό χρωματογράφο συνδεδεμένο με διπλό φασματογράφο μάζας LC-MS/MS.

6.5.2.1. Συσκευές – Όργανα

Οι παράμετροι του συστήματος LC-MS/MS δίνονται παρακάτω:

Χρωματογραφική Στήλη:
Symmetry C_{18}, Waters
Μήκος: 150mm
Εσωτερική διάμετρος: 2,1mm
Μέγεθος σωματιδίων (μ): 3,5μm

Προστήλη:
Phenomenex C_{18}
Μήκος: 150mm
Εσωτερική διάμετρος: 2,1mm

Αυτόματος Δειγματολήπτης:
Waters Aliance 2695 Autosampler

- Όγκος έγχυσης 20μL
- Draw Speed slow
- Needle Depth (mm) 0,00
- Sample Temperature 20°C
- Sample Temperature Limit 20°C
- Purge Loop Volumes 0,00

Ανιχνευτής: Waters Quattro Premier XE

6.5.2.2. Αντιδραστήρια

- Μεθανόλη (MeOH,CH_3OH) χρωματογραφικής ή LC-MS/MS καθαρότητας.

- Ακετονιτρίλιο (ACN,CH_3CN) χρωματογραφικής ή LC-MS/MS καθαρότητας.

- Αιθανόλη (EtOH,CH_3CH_2OH) απόλυτης καθαρότητας.

- Τριχλωρικό Οξύ.

- Τριχλωρικό Οξύ (5%).
  Σε ογκομετρική φιάλη των 500mL προστίθενται 25g TCA και συμπληρώνεται η φιάλη με νερό Milli-Q, μέχρι την χαραγή.

- Απιονισμένο νερό (H_2O), καθαρότητας Milli-Q.

- Οξικό Αμμώνιο (CH_3COONH_4), αναλυτικής καθαρότητας.

- Οξικό Αμμώνιο (CH_3COONH_4) 1M.
  Ζυγίζονται 15,4g Οξικού Αμμωνίου σε φιάλη των 200ml. Διαλύεται το οξικό αμμώνιο με νερό Milli-Q και μετά συμπληρώνεται η φιάλη μέχρι την χαραγή. Παραγόμενη συγκέντρωση 1M.

- Οξικό Αμμώνιο 2M.
  Αραιώνονται με νερό Milli-Q 4mL οξικού αμμωνίου 1M σε φιάλη των 20ml. Προκύπτουσα συγκέντρωση Οξικού Αμμωνίου 0,2M.

- Οξικό Οξύ, glacial 100%.

- **Κινητή Φάση Α** για τη διαδικασία ανάλυσης Ε1 και Ε2 και μέτρηση Αμοξυκιλλίνης: Οξικό Οξύ σε νερό (0,05%).
  Σε ογκομετρική φιάλη των 1000ml προστίθενται 500μL Οξικού Οξέος και συμπληρώνεται η φιάλη με νερό μέχρι τη χαραγή.

- **Κινητή Φάση Β** για τη διαδικασία ανάλυσης Ε1 και Ε2: Οξικό Οξύ σε Ακετονιτρίλιο (0,05%).
  Σε ογκομετρική φιάλη των 1000ml προστίθενται 500μL Οξικού Οξέος και συμπληρώνεται η φιάλη με Ακετονιτρίλιο μέχρι τη χαραγή.

- **Κινητή Φάση Β** για τη Αμοξικιλλίνη: Οξικό Οξύ σε Μεθανόλη (0,05%).
  Σε ογκομετρική φιάλη των 1000ml προστίθενται 500μL Οξικού Οξέος και συμπληρώνεται η φιάλη με Μεθανόλη μέχρι τη χαραγή.

6.5.2.3. Πρότυπες Ουσίες

Χρησιμοποιήθηκαν, κυρίως, πρότυπες αναλυτέες ουσίες αναφοράς γνωστής περιεκτικότητας και καθαρότητας τουλάχιστο μεγαλύτερης του 95%. Διατηρούνται στο ψυγείο.

6.5.2.4. Χρωματογραφική Ανάλυση των Διερευνώμενων Ουσιών

Για τη χρωματογραφική ανάλυση των δειγμάτων επιλέχθηκε σύστημα υγρής χρωματογραφίας – δίδυμης φασματομετρίας μάζας LC-MS/MS, το οποίο περιλαμβάνει αυτόματο δειγματολήπτη. Ο υγρός χρωματογράφος, είναι εφοδιασμένος με στήλη Symmetry C_{18}, Waters, με διαστάσεις:

- Μήκος: 150mm
- Εσωτερική διάμετρος: 2,1mm
- Μέγεθος σωματιδίων (μ): 3,5μm

Χρησιμοποιήθηκε ανιχνευτής της Waters Quattro Premier XE, ο οποίος συλλαμβάνει τα διαχωριζόμενα ιόντα και τα μετατρέπει σε ηλεκτρικό σήμα. Στη συνέχεια, γίνεται επεξεργασία του σήματος με ειδικό λογισμικό σε ηλεκτρονικό υπολογιστή. Για την επεξεργασία των αποτελεσμάτων ανάλυσης, επιλέγηκε το λογισμικό ‘MassLynx’, ως εξής:

Για τη διαδικασία ανάλυσης E_1:

- MS File: ‘MET050733_E1.exp’
- Inlet File: ‘MET050733_E1.wat’
- MS TUNE FILE: ‘ms ms_tuning.ipr’

Για τη διαδικασία ανάλυσης E_2:

- MS File: ‘MET050733_E2.exp’
- Inlet File: ‘MET050733_E2.wat’
- MS TUNE FILE: ‘ms ms_tuning.ipr’

Τα υπό ανάλυση δείγματα ωμού χοιρινού κρέατος αποψύχθηκαν πριν από την ανάλυση. Η προετοιμασία δείγματος για την ανάλυση των αμινογλυκοσίδων, των κινολονών και τετρακυκλίνες (εκχύλιση Ε1), διεξήχθη με βάση τον Πίνακα 16:

Πίνακας 16: Βέλτιστες φασματομετρικές παράμετροι μάζας λειτουργίας σε λειτουργία θετικού ιόντος (ESI) για την ανάλυση 19 κτηνιατρικών αντιμικροβιακών (εκχύλιση Ε1) σε δείγματα χοίριου μυϊκού ιστού.

Χρόνος (min)	Κατάλοιπο	Μετάβαση ιόντων	Τάση (V)	Ενέργεια σύγκρουσης (eV)
Function 11.00-6.00	Σπεκτινομυκίνη	351,31 > 333,28	32	19
		351,31 > 207,27		21
	Λινκομυκίνη	407,29 > 126,26	34	24
		407,29 > 359,23		20
	Γενταμυκίνη	478,42 > 157,27	28	23
		478,42 > 322,34		16
	Καναμυκίνη	485,20 > 163,20	24	30
		485,20 > 205,25		28
	Στρεπτομυκίνη	582,54 > 263,28	65	32
		582,54 > 246,30		40
	Διυδροστρεπτομυκίνη	584,50 > 263,42	60	31
		584,50 > 246,37		41
	Παραμυκίνη	616,37 > 163,15	40	35
		616,36 > 293,28		22
	Σουλφαμεθοξυπιριδαζίνη-d3 (ISTD)	284,38 > 108,26	26	26
Function 2 6.00-11.00	Νορφλοξασίνη	320,40 > 276,30	35	17
		320,40 > 233,30		23
	Νορφλοξασίνη-d5 (ISTD)	325,33 > 281,35	35	18
	Σιπροφλοξασίνη	332,19 > 288,26	36	18
		332,19 > 231,22		28
	Δανοφλοξασίνη	358,40 > 96,39	28	23
		358,40 > 314,32		19
	Ενροφλοξασίνη	360,32 > 316,18	32	20
		360,32 > 342,14		21
	Μαρβοφλοξασίνη	363,21 > 320,09	32	16
		363,21 > 345,16		22

Function 3 **11.00-20.00**	Ενροφλοξασίνη-d5 (ISTD)	365,36 > 321,32	35	21
	Σαραφλοξασίνη	386,22 > 299,21	35	18
		386,22 > 342,21		27
	Τετρακυκλίνη	445,20 > 410,20	22	18
		445,20 > 154,01		25
	Οξυτετρακυκλίνη	461,30 > 426,30	28	18
		461,30 > 443,20		12
	Χλωροτετρακυκλίνη	479,20 > 444,20	24	23
		479,20 > 462,15		18
	Δοξυκυκλίνη	445,20 > 428,20	26	21
		445,20 > 154,00		36
	Ναλιδιξικό οξύ	233,27 > 215,21	24	15
		233,27 > 187,15		26
	Φλουμεκίνη	262,30 > 244,30	23	21
		262,30 > 202,30		31

Οι βέλτιστες φασματομετρικές παράμετροι μάζας σε λειτουργία θετικού ιόντος ESI για την ανάλυση 26 κτηνιατρικών αντιμικροβιακών (εκχύλιση Ε2) διεξήχθη με βάση τον Πίνακα 17:

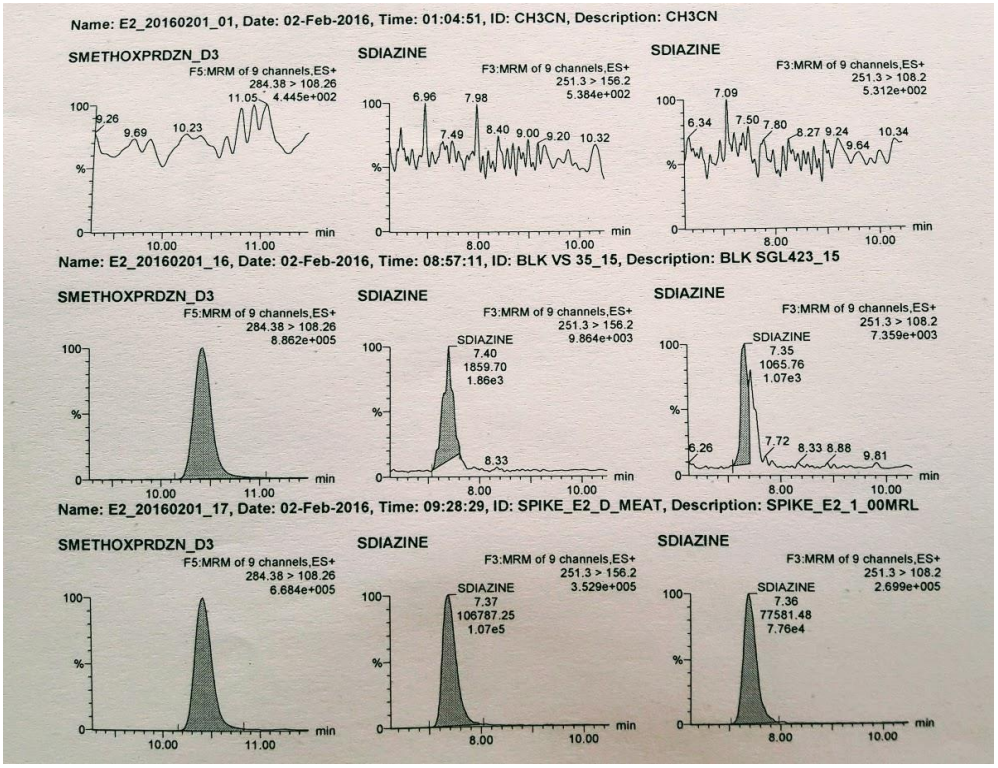
Πίνακας 17. Βέλτιστες φασματομετρικές παράμετροι μάζας σε λειτουργία θετικού ιόντος (ESI) για την ανάλυση 26 αντιμικροβιακών ουσιών (Extraction 2) σε δείγματα χοίρειου μυικού ιστού.

Χρόνος (min)	Κατάλοιπο	Μετάβαση ιόντων	Τάση (V)	Ενέργεια σύγκρουσης (eV)
Function 1 **2.00-6.25**	Σουλφανιλαμίδιο	173,20 > 93,20	33	22
		173,20 > 156,20		8
	Σουλφαγουανι-δίνη	215,26 > 92,25	22	25
		215,26 > 156,10		15
	Τριμεθοπρίμη	291,31 > 123,15	37	24
		291,31 > 230,22		43
	Αμπικιλλίνη	350,36 > 106,28	22	18
		350,36 > 160,25		16
Function 2 **4.00-8.00**	Κεφαπιρίνη	424,20 > 152,10	25	22
		424,20 > 292,20		15
Function 3 **6.25-9.25**	Σουλφαδιαζίνη	251,30 > 156,20	23	16
		251,30 > 108,20		20
	Σουλφαθειαζόλη	256,20 > 156,20	23	16
		256,20 > 108,20		23
	Σπιραμυκίνη	843,60 > 174,14	45	35
		843,60 > 540,11		30
Function 6 **10.00-12.00**	Σουλφαδοξίνη	311,20 > 156,20	27	19
		311,20 > 108,20		28
	Σουλφαδοξίνη-d3 (ISTD)	314,02 > 156,20	28	19
	Τιαμουλίνη	494,37 > 119,01	32	43
		494,37 > 191,12		23
Function 7 **11.00-12.80**	Σουλφαμεθο-ξαζόλη	254,30 > 156,20	23	16
		254,30 > 108,20		23
	Σουλφακινοξαλίνη	301,20 > 156,20	27	19
		301,20 > 108,20		30
	Σουλφαδιμεθοξίνη	311,20 >156,20	27	19
		311,20 >108,20		28
	Σουλφαδιμεθοξίνη-d6 (ISTD)	317,32 > 156,5	41	20

Function 4 **8.00-10.00**	Σουλφαμεραζίνη	265,20 > 108,20	26	26
		265,20 > 156,20		20
	Κεφαλόνιο	459,20 > 152,17	16	21
		459,20 > 337,10		11
	Τιλμικοσίνη	869,85 > 174,30	72	46
		869,85 > 696,68		40
Function 5 **9.25-11.00**	Σουλφαδιμιδίνη	279,20 > 108,10	30	31
		279,20 > 156,20		25
	Σουλφαμεθοξυπιριδαζίνη	281,20 > 108,20	28	26
		281,20 > 156,20		22
	Σουλφαμεθοξυ-πιριδαζίνη-d3 (ISTD)	284,38 > 108,26	26	26
	Ερυθρομυκίνη	734,50 > 158,30	27	33
		734,50 > 576,40		20

Function 8 **12.80-19.00**	Πενικιλίνη_G	335,38 > 160,25	15	12
		335,38 > 176,22		12
	Κεφαπεραζόνη	646,54 > 143,35	18	36
		646,54 > 530,35		12
Function 9 **15.20-25.00**	Πενικιλίνη_V	351,36 > 114,19	15	36
		351,36 > 160,25		15
	Οξακιλλίνη	402,32 > 160,21	18	16
		402,32 > 243,28		14
	Ναφιλλίνη	415,28 > 171,28	18	35
		415,28 > 199,22		18
	Κλοξακιλλίνη	436,26 > 160,21	18	14
		436,26 > 277,18		14
	Δικλοξακιλλίνη	470,16 > 160,23	18	22
		470,16 > 311,10		17

Στα πιο κάτω σχήματα 1-10, παρουσιάζονται υγροχρωματογραφήματα των διερευνώμενων ουσιών οι οποίες ανιχνεύθηκαν, σε θετικά δείγματα νωπού χοίρειου μυϊκού ιστού.



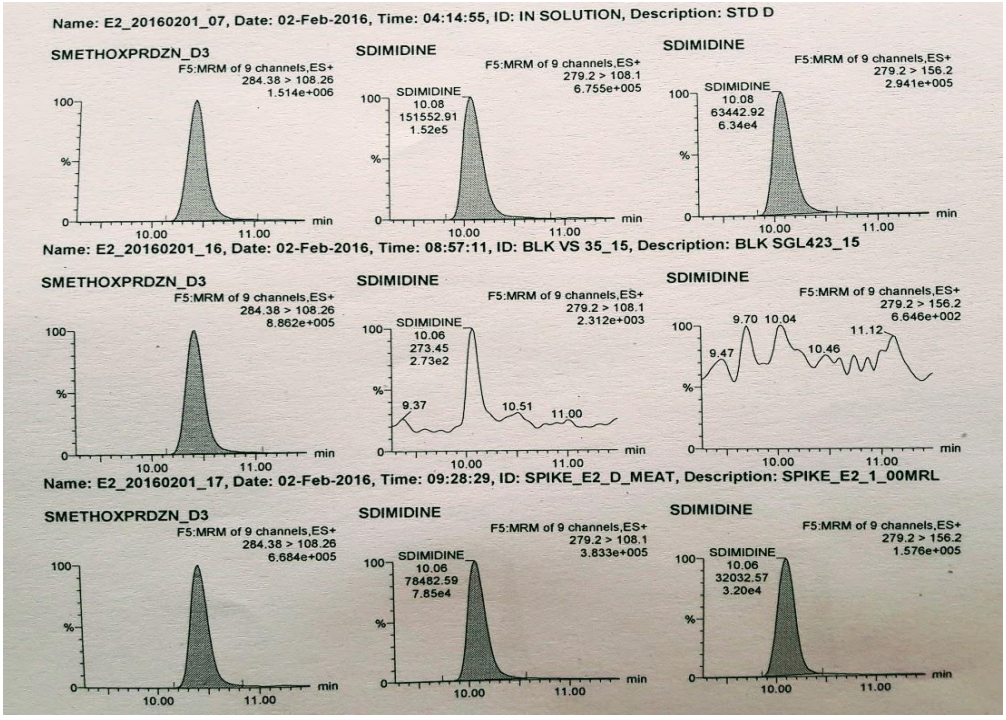
(A)

(B)

(Γ)

Εικόνα 26: Χρωματογραφήματα σουλφαδιαζίνης σε – (Α) πρότυπο δείγμα, (Β) λευκό δείγμα και (Γ) θετικό δείγμα νωπού χοίρειου μυϊκού ιστού σε σουλφαδιαζίνη.

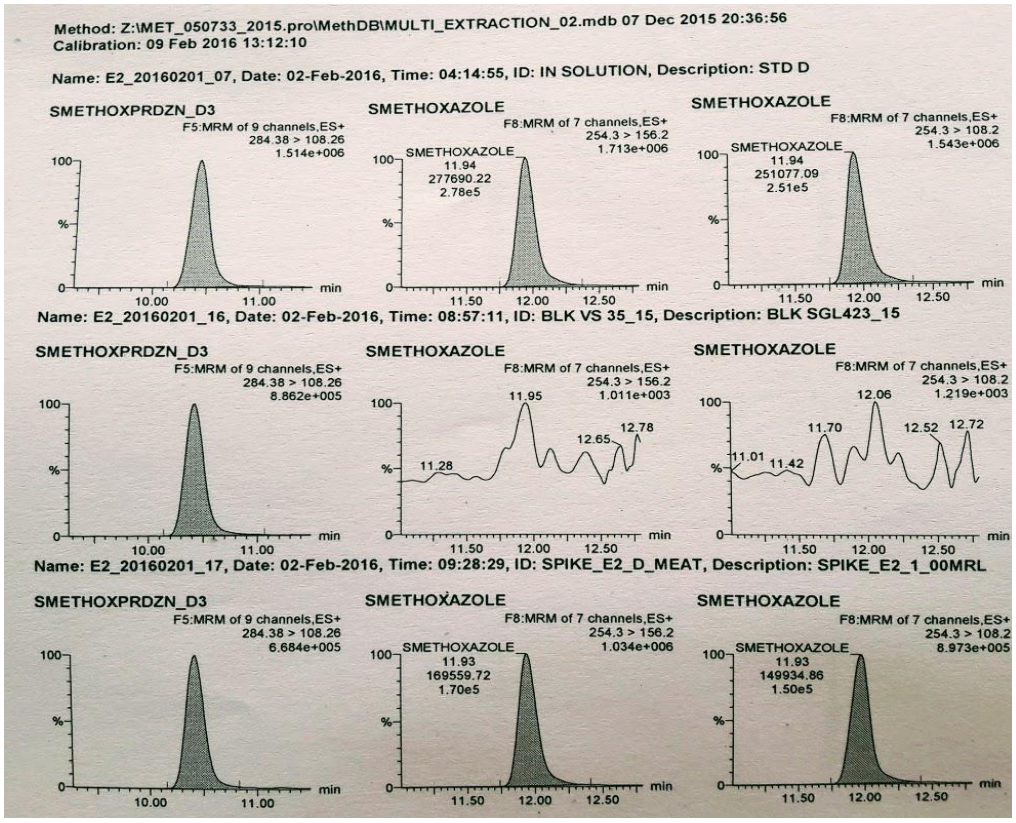
(Α)



(B)

(Γ)

Εικόνα 27: Χρωματογραφήματα σουλφαδιμιδίνης σε – (Α) πρότυπο δείγμα, (Β) λευκό δείγμα και (Γ) θετικό δείγμα νωπού χοίρειου μυϊκού ιστού σε σουλφαδιμιδίνη.

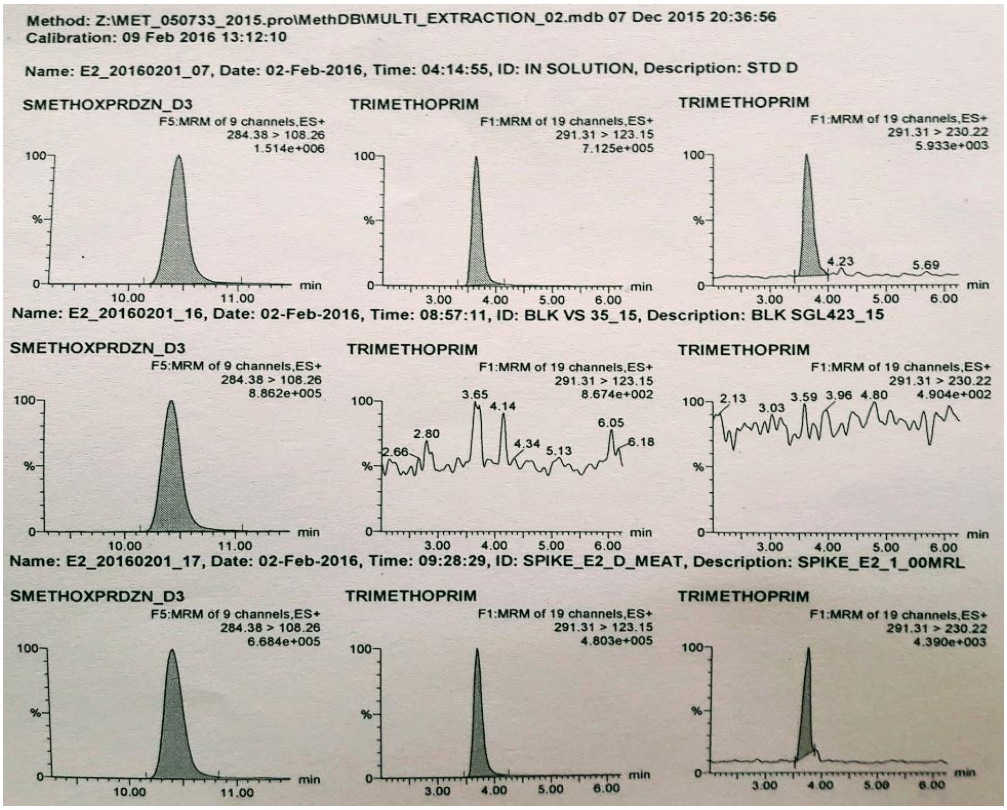


(A)

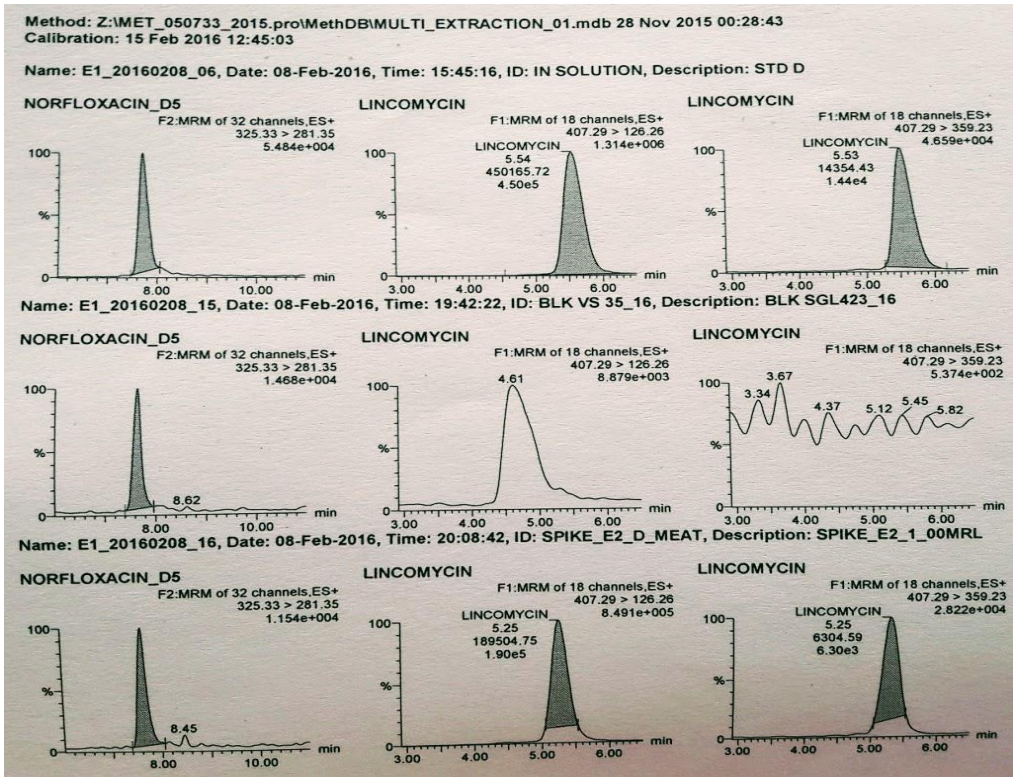
(B)

(Γ)

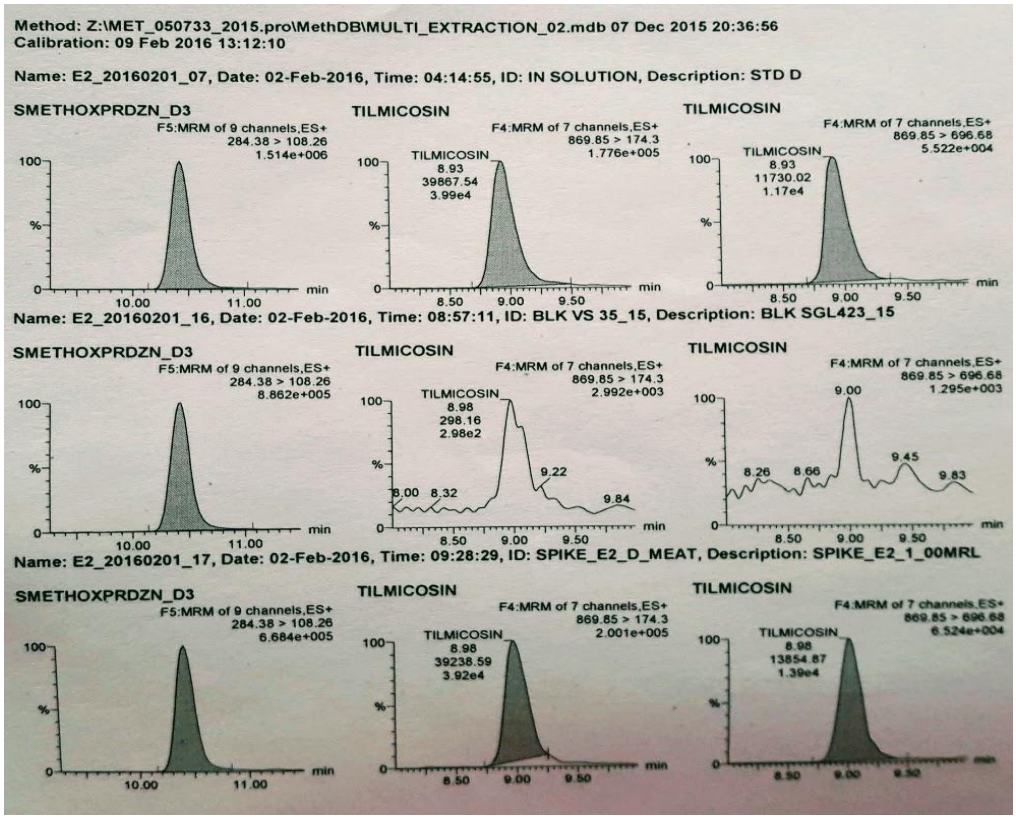
Εικόνα 28: Χρωματογραφήματα σουλφαμεθοξαζόλης σε – (Α) πρότυπο δείγμα, (Β) λευκό δείγμα και (Γ) θετικό δείγμα νωπού χοίρειου μυϊκού ιστού σε σουλφαμεθοξαζόλη.



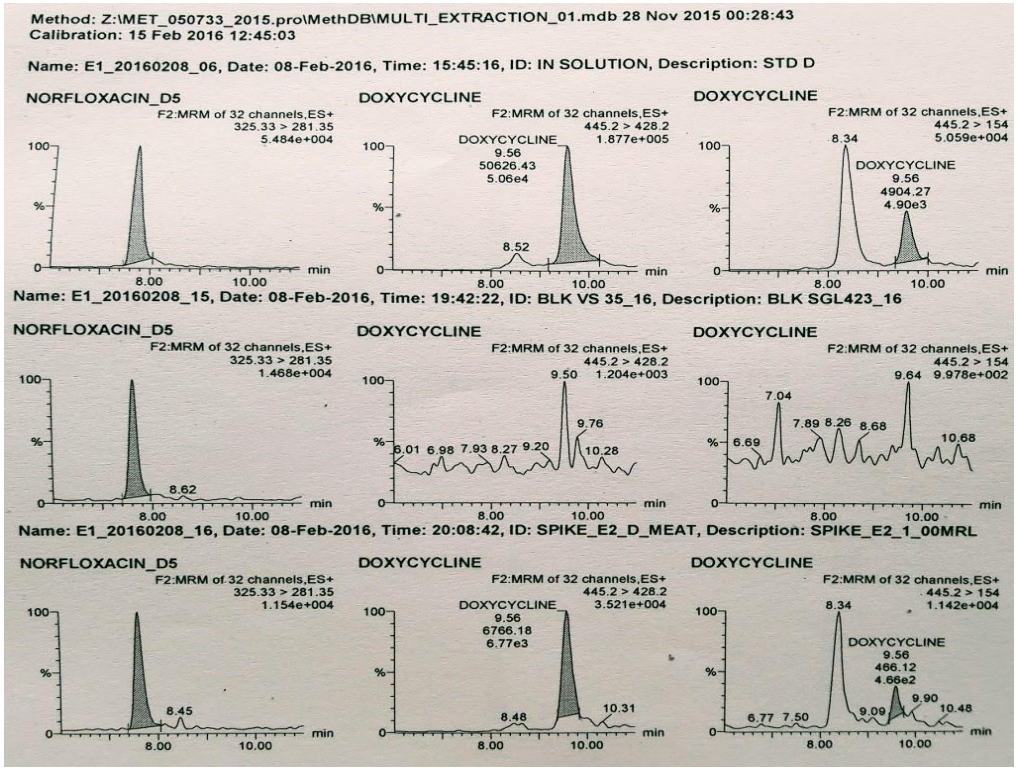
Εικόνα 29: Χρωματογραφήματα τριμεθοπρίμης σε – (Α) πρότυπο δείγμα, (Β) λευκό δείγμα και (Γ) θετικό δείγμα νωπού χοίρειου μυϊκού ιστού σε τριμεθοπρίμη.



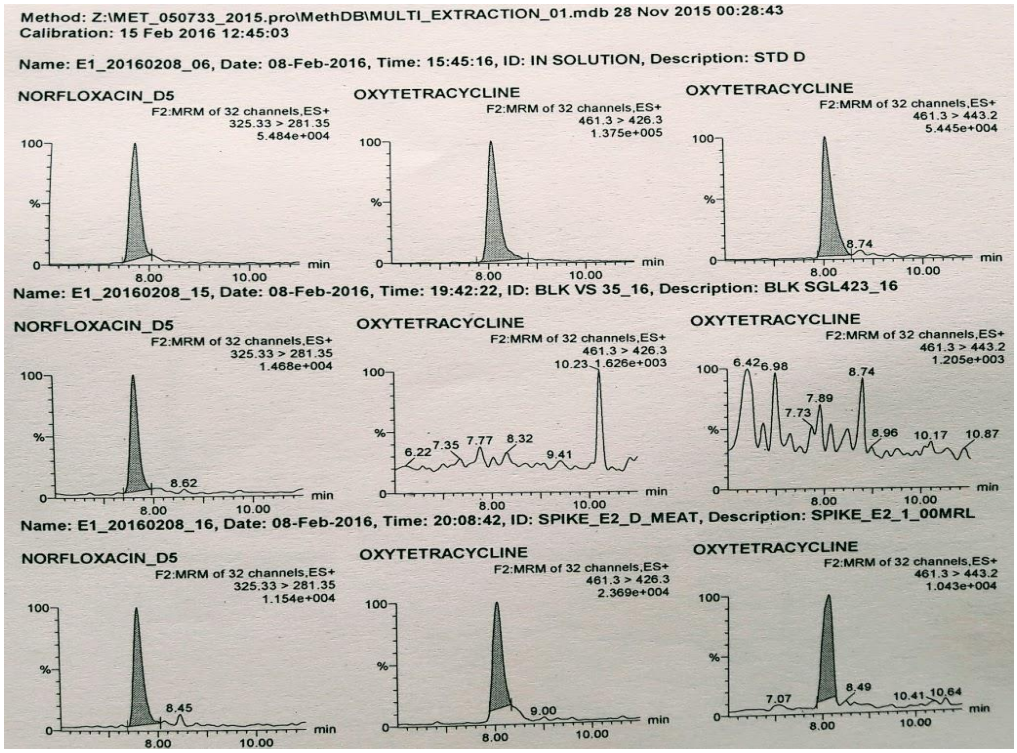
Εικόνα 30: Χρωματογραφήματα λινκομυκίνης σε – (Α) πρότυπο δείγμα, (Β) λευκό δείγμα και (Γ) θετικό δείγμα νωπού χοίρειου μυϊκού ιστού σε λινκομυκίνη.



Εικόνα 31: Χρωματογραφήματα τιλμικοσίνης σε – (Α) πρότυπο δείγμα, (Β) λευκό δείγμα και (Γ) θετικό δείγμα νωπού χοίρειου μυϊκού ιστού σε τιλμικοσίνη.



Εικόνα 32: Χρωματογραφήματα δοξυκυκλίνης σε – (Α) πρότυπο δείγμα, (Β) λευκό δείγμα και (Γ) θετικό δείγμα νωπού χοίρειου μυϊκού ιστού σε δοξυκυκλίνη.

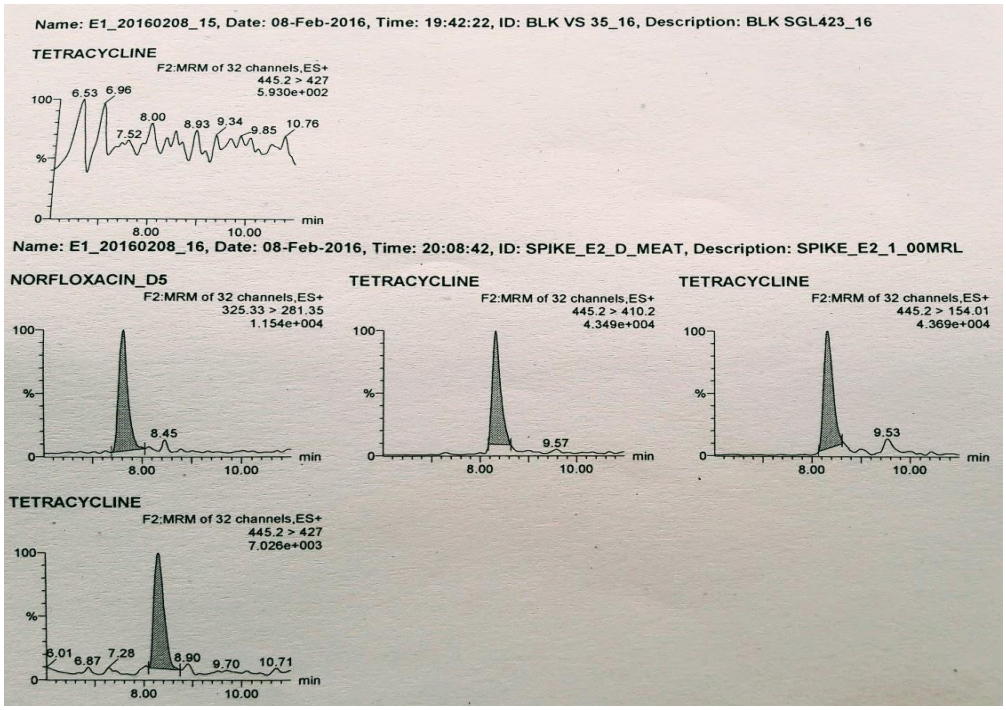


(A)

(B)

(Γ)

Εικόνα 33: Χρωματογραφήματα οξυτετρακυκλίνης σε – (Α) πρότυπο δείγμα, (Β) λευκό δείγμα και (Γ) θετικό δείγμα νωπού χοίρειου μυϊκού ιστού σε οξυτετρακυκλίνη.

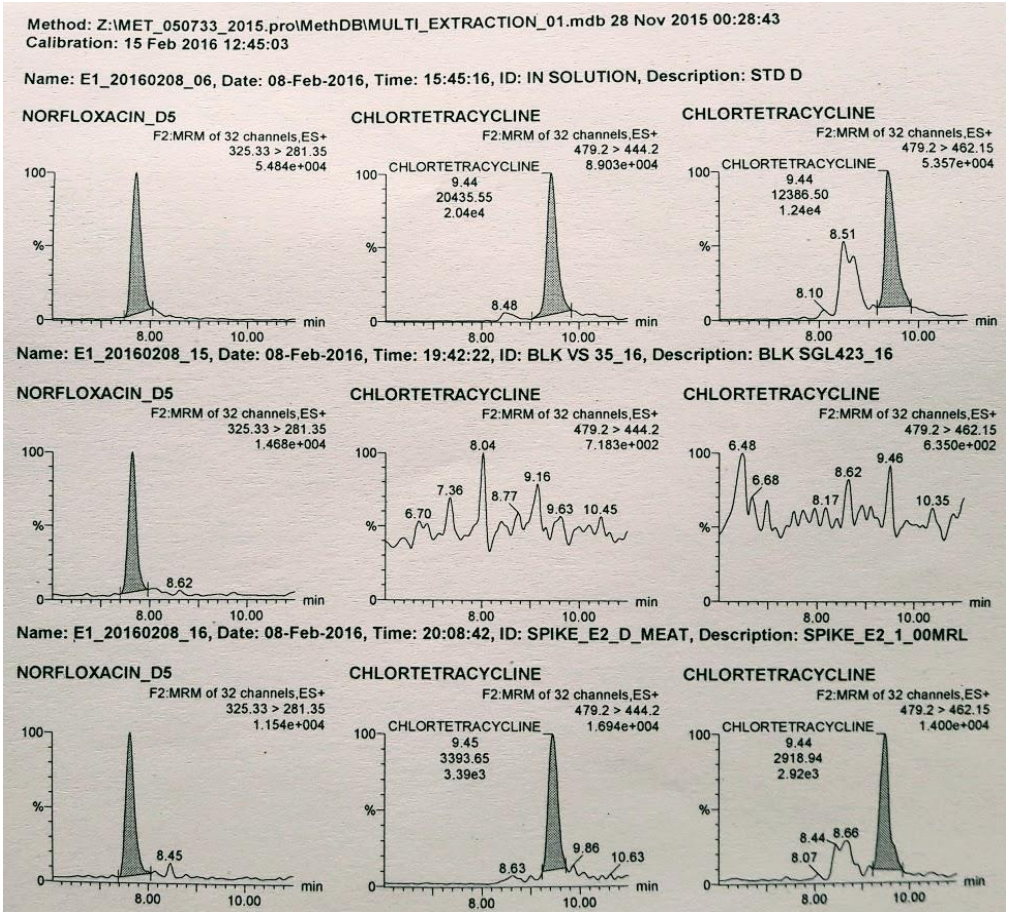


(A)

(B)

(Γ)

Εικόνα 34: Χρωματογραφήματα τετρακυκλίνης σε – (Α) πρότυπο δείγμα, (Β) λευκό δείγμα και (Γ) θετικό δείγμα νωπού χοίρειου μυϊκού ιστού σε τετρακυκλίνη.



Εικόνα 35: Χρωματογραφήματα χλωροτετρακυκλίνης σε – (Α) πρότυπο δείγμα, (Β) λευκό δείγμα και (Γ) θετικό δείγμα νωπού χοίρειου μυϊκού ιστού σε χλωροτετρακυκλίνη.

6.5.2.5. Όρια Ανίχνευσης και Όρια Ποσοτικής Αποτίμησης

Ένα από τα σημαντικότερα προβλήματα στις αναλύσεις υπολειμμάτων φαρμακολογικώς δραστικών ουσιών, σε τρόφιμα ζωικής προέλευσης, είναι οι πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις που μπορεί να κυμαίνονται από ng – pg/Kg ή ακόμη και πιο χαμηλά. Επομένως, η ανάγκη καθορισμού ορίων ανίχνευσης (Limit of Detection, **LOD**) και ποσοτικής αποτίμησης (Limit of Quantitation, **LOQ**), επιβάλλεται. Το LOD και το LOQ, ορίζονται ως η μικρότερη συγκέντρωση μιας ένωσης που μπορεί να ανιχνευθεί και να προσδιορισθεί ποσοτικά αντίστοιχα με βεβαιότητα 95%. Οι τιμές των LOD και LOQ, όλων των διερευνώμενων αντιμικροβιακών ουσιών, που ελήφθησαν στο εργαστήριο αναφοράς του ΓΧΚ και φαίνονται στον Πίνακα 18.

Πίνακας 18: Όρια ανίχνευσης (LOD) και όρια ποσοτικής αποτίμησης (LOQ) των διερευνώμενων ουσιών, σε δείγματα χοίρειου μυϊκού ιστού.

Κατάλοιπο	CC*α** / LOD ($\mu g \cdot kg^{-1}$)	CC*β*** / LOQ ($\mu g \cdot kg^{-1}$)
Σπεκτινομυκίνη	39,3	44,2
Στρεπτομυκίνη	92,0	109
Διυδροστρεπτομυκίνη	23,2	76,7

Απραμυκίνη	58,4	193**
Καναμυκίνη	12,6	14,4
Παραμυκίνη	78,0	93,8
Λινκομυκίνη	5,81	19,2
Γενταμικίνη	12,6	17,6
Μαρβοφλοξασίνη	15,1	49,9
Σπιραμυκίνη	48,5	55,6
Δανοφλοξασίνη	27,2	89,8
Ενροφλοξασίνη	22,6	27,2
Σιπροφλοξασίνη	22,3	28,8
Οξολινικό οξύ	2,84	3,39
Ερυθρομυκίνη	11,8	38,8
Φλουμεκίνη	14,2	16,8
Σαραφλοξασίνη	4,40	17,5
Διφλοξασίνη	30,2	99,8
Οξυτετρακυκλίνη	16,6	18,2
Τετρακυκλίνη	14,2*	16,2
Χλωροτετρακυκλίνη	23,1	29,3
Δοξυκυκλίνη	24,7	31,2
Κεφαπιρίνη	1,63	5,36
Κεφαπεραζόνη	11,0*	15,5**
Κεφαλονιά	3,71*	4,70**
Νορφλοξασίνη	18,0*	20,6**
Τιλμικοσίνη	3,14	74,7**
Ναλιδιξικό οξύ	1,33*	1,50**
Ιοσαμυκίνη	7,38*	24,4**
Ναφκιλλίνη	2,63*	8,69**
Τιαμουλίνη	17,6	173
Πενικιλλίνη-V	0,364	37,1
Πενικιλλίνη-G	0,808	2,67
Αμπικιλλίνη	2,08	6,85
Οξακιλλίνη	3,47	11,5
Κλοξακιλλίνη	0,819	2,70
Δικλοξακιλλίνη	8,01	26,4
Τριμεθοπρίμη	16,9	22,8
Σουλφαμεραζίνη	1,72	5,67

Σουλφαθειαζόλη	1,94	6,41
Σουλφαμεθοξαζόλη	0,878	2,90
Σουλφαδιαζίνη	2,87	9,46
Σουλφανιλαμίδιο	18,0	21,8
Σουλφαμεθοξυπυριδαζίνη	2,61	8,61
Σουλφαδιμιδίνη	4,98	16,4
Σουλφαδοξίνη	2,44	8,07
Σουλφαδιμεθοξίνη	1,15	3,78
Σουλφαμονομεθοξίνη	1,23	4,05
Σουλφαγουανιδίνη	18,1	22,0
Σουλφακινοξαλίνη	2,81	9,29

***CC*α** όριο απόφασης

****CC*β*** ικανότητα ανίχνευσης

6.5.2.6. Όριο Απόφασης (CC*α*) και Ικανότητα Ανίχνευσης (CC*β*)

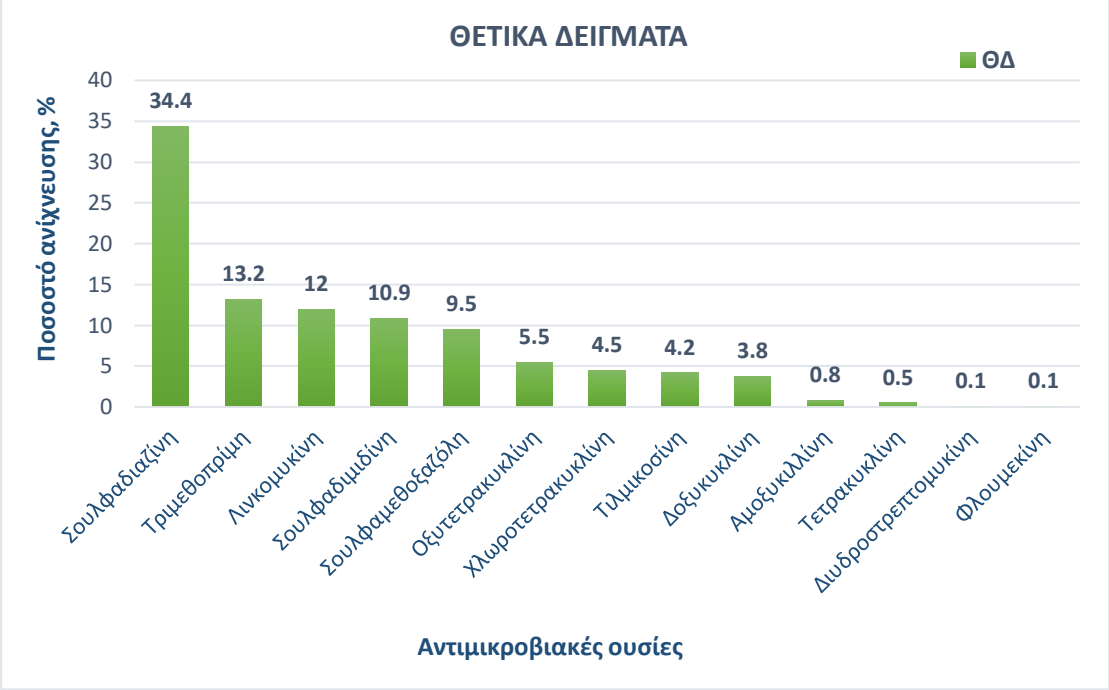
Για την επικύρωση μιας αναλυτικής μεθόδου και την αξιοπιστία των αποτελεσμάτων της, εισάγονται δύο χαρακτηριστικά επίδοσης που πρέπει να προσδιορίζονται, το όριο απόφασης (CC*α*) και η ικανότητα ανίχνευσης (CC*β*). Σύμφωνα με την οδηγία 2002/657/ΕΚ της Ευρωπαϊκής Ένωσης, ως CC*α* θεωρείται το όριο, στο οποίο και πάνω από το οποίο, μπορεί να αποφασιστεί ότι ένα δείγμα είναι μη συμμορφούμενο με πιθανότητα σφάλματος *α*. Σφάλμα *α* θεωρείται η πιθανότητα να είναι συμμορφούμενο το δοκιμασθέν δείγμα ακόμα και αν η μέτρηση κατέληξε σε μη συμμορφούμενα αποτελέσματα («ψευδής απόφαση περί μη συμμόρφωσης»). Αντίστοιχα ως CC*β*, θεωρείται η μικρότερη περιεκτικότητα σε ουσία που μπορεί να ανιχνευτεί, να ταυτοποιηθεί ή και να προσδιοριστεί ποσοτικός σε ένα δείγμα με πιθανότητα σφάλματος *β*. Σφάλμα *β* θεωρείται η πιθανότητα να είναι αληθώς μη συμμορφούμενο το δοκιμασθέν δείγμα, ακόμα και αν η μέτρηση κατέληξε σε συμμορφούμενα αποτελέσματα («ψευδής απόφαση περί συμμόρφωσης») για τις ενώσεις για τις οποίες έχει καθοριστεί επιτρεπόμενο όριο. Τα αποτελέσματα που ελήφθησαν από τη στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων, δίδονται στον Πίνακα 19, για δείγματα χοίρειου μυϊκού ιστού.

Πίνακας 19: Όριο απόφασης (CC*α*) της μεθόδου, ως σημείο αναφοράς της ανίχνευσης των διερευνώμενων ουσιών σε σχέση με το ΑΟΚ, σε δείγματα χοίρειου μυϊκού ιστού.

Κατάλοιπο	CC*α* ($\mu g \cdot kg^{-1}$)	Κατάλοιπο	CC*α* ($\mu g \cdot kg^{-1}$)
Σπεκτινομυκίνη	325	Νορφλοξασίνη	18,0
Στρεπτομυκίνη	573	Τιλμικοσίνη	62,5
Διυδροστρεπτομυκίνη	566	Ναλιδιξικό οξύ	1,33
Απραμυκίνη	1105	Ιοσαμυκίνη	7,38

Καναμυκίνη	113	Ναφκιλλίνη	2,63
Παραμυκίνη	549	τιαμουλίνη	138
Λινκομυκίνη	112	Πενικιλλίνη-V	31,1
Γενταμικίνη	72,2	Πενικιλλίνη-G	64,0
Μαρβοφλοξασίνη	178	Αμπικιλλίνη	59,8
Σπιραμυκίνη	239	Οξακιλλίνη	371
Δανοφλοξασίνη	248	Κλοξακιλλίνη	386
Ενροφλοξασίνη	132	Δικλοξακιλλίνη	332
Σιπροφλοξασίνη	122	Τριμεθοπρίμη	63,9
Οξολινικό οξύ	115	Σουλφαμεραζίνη	114
Ερυθρομυκίνη	249	Σουλφαθειαζόλη	130
Φλουμεκίνη	233	Σουλφαμεθοξαζόλη	123
Σαραφλοξασίνη	13,8	Σουλφαδιαζίνη	112
Διφλοξασίνη	486	Σουλφανιλαμίδιο	112
Οξυτετρακυκλίνη	109	Σουλφαμεθοξυπυριδαζίνη	128
Τετρακυκλίνη	115	Σουλφαδιμιδίνη	138
Χλωροτετρακυκλίνη	118	Σουλφαδοξίνη	118
Δοξυκυκλίνη	113	Σουλφαδιμεθοξίνη	121
Κεφαπιρίνη	64,2	Σουλφαμονομεθοξίνη	130
Κεφαπεραζόνη	11,0	Σουλφαγουανιδίνη	121
Κεφαλόνιο	3,71	Σουλφακινοξαλίνη	117

Στο εργαστήριο αναφοράς του ΓΧΚ εξετάσθηκαν με LC-MS/MS 1,766 δείγματα χοίρειου μυϊκού ιστού, τα οποία βρέθηκαν ύποπτα για υπολείμματα αντιμικροβιακών παραγόντων, εκ του συνόλου των 15,484 συλλεγόμενων δειγμάτων. Ύποπτα, χαρακτηρίζονται τα δείγματα που παρουσιάζουν άλω αναστολής ανάπτυξης διαμέτρου, μεγαλύτερης από 2mm (*Bacillus stearothermophilus* σε άγαρ). Αυτό είναι ενδεικτικό της παρουσίας κάποιου αντιμικροβιακού παράγοντα στο δείγμα και η δοκιμασία του Premi-Test βασίζεται ακριβώς στην αναστολή της ανάπτυξης του μικροοργανισμού *Bacillus stearothermophilus var.calidolactis*, ένα υψηλά θερμόφιλο βακτήριο ευαίσθητο σε πολλά αντιβιοτικά [L'Uboslava κ.ά. 2006]. Από τα 1,766 ύποπτα δείγματα χοίρειου μυϊκού ιστού (Πίνακας 20, Διάγραμμα 4) 596 δείγματα βρέθηκαν θετικά, στις διερευνώμενες αντιμικροβιακές ουσίες.



Διάγραμμα 4. Συχνότητα ανίχνευσης καταλοίπων αντιμικροβιακών ουσιών, σε νωπό χοίρειο μυϊκό ιστό, στο σύνολο των θετικών δειγμάτων (ΘΔ), αριθμός θετικών δειγμάτων $N_{ΘΔ}$=596.

Στους εργαστηριακούς ελέγχους όπως έχει ήδη αναφερθεί, είναι δυνατόν να ανιχνεύονται ίχνη των διερευνώμενων ουσιών με τα αποτελέσματα των αναλύσεων να εκφράζονται σε μg/Kg. Ειδικότερα, όταν η υπολογιζόμενη περιεκτικότητα του δείγματος σε δραστική ουσία είναι κάτω από το όριο απόφασης (CC*α*), για ουσίες που δεν έχουν καθορισμένο ΑΟΚ ή κάτω από το όριο ανίχνευσης (LOD) για ουσίες που έχουν καθορισμένο ΑΟΚ, το αποτέλεσμα αυτό αποδίδεται υπό μορφή ανισότητας (<CC*α* ή <LOD). Στην περίπτωση αυτή, δηλώνεται η συμμόρφωση ως προς τον Κανονισμό 37/2010/ΕΚ, σχετικά με φαρμακολογικώς δραστικές ουσίες και την ταξινόμησή τους, όσον αφορά τα ΑΟΚ σε τρόφιμα ζωικής προέλευσης. Έτσι, για ουσίες που έχουν καθορισμένο ΑΟΚ ισχύει ότι:

- όταν το αποτέλεσμα είναι μεγαλύτερο από το όριο ανίχνευσης (LOD) αλλά μικρότερο από το όριο ποσοτικής αποτίμησης (LOQ), δηλαδή LOD<*αντιβιοτικό*<LOQ, τότε το δείγμα κρίνεται θετικό αλλά συμμορφούμενο ως προς τον κανονισμό 37/2010/ΕΚ.

- όταν το αποτέλεσμα είναι ίσο ή μεγαλύτερο από το LOQ και μικρότερο από το CC*α*, δηλαδή LOQ≤*αντιβιοτικό*<CC*α*, τότε δηλώνεται η προσδιορισθείσα συγκέντρωση α μg/L και στην περίπτωση αυτή το δείγμα κρίνεται θετικό αλλά συμμορφούμενο ως προς τον κανονισμό 37/2010/ΕΚ.

- όταν το αποτέλεσμα είναι ίσο ή μεγαλύτερο από το CC*α*, δηλαδή CC*α*≤*αντιβιοτικό*, τότε δηλώνεται η προσδιορισθείσα συγκέντρωση α μg/L και στην περίπτωση αυτή το δείγμα κρίνεται θετικό και μη συμμορφούμενο ως προς τον κανονισμό 37/2010/ΕΚ.

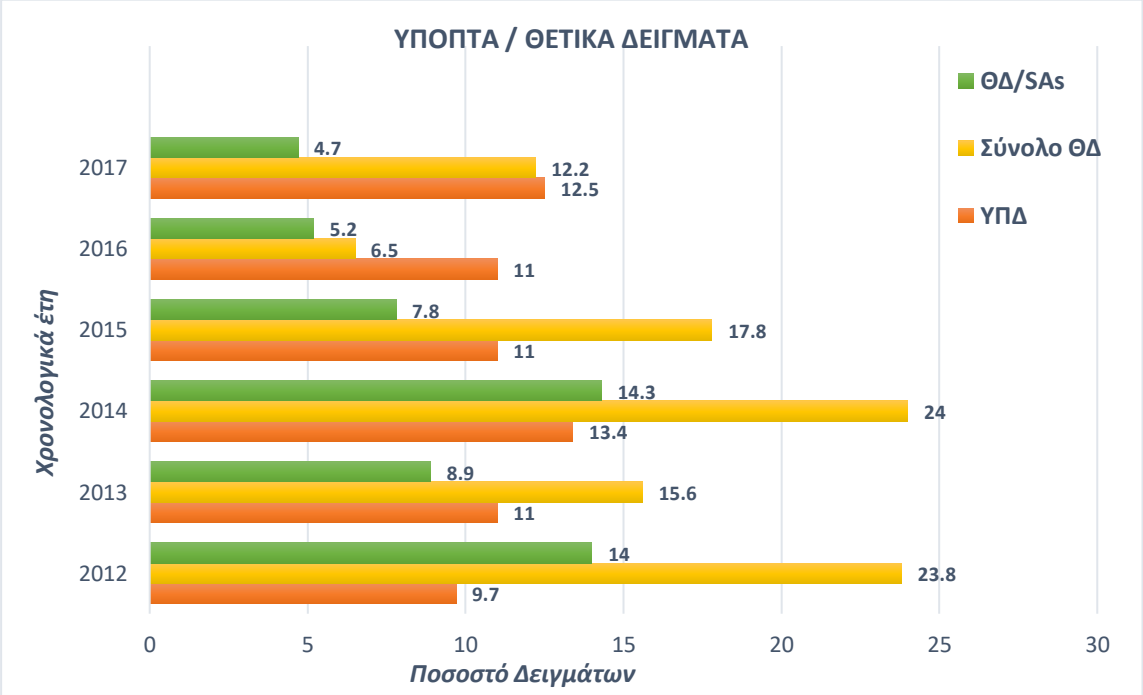
Με βάση τα πιο πάνω, παρατηρείται ότι το ποσοστό του συνόλου των ύποπτων δειγμάτων σε σχέση με το σύνολο των δειγμάτων των τελευταίων έξι χρόνων, δεν είναι ιδιαίτερα ψηλό (11,4%). Ιδιαίτερα, όσον αφορά τα ύποπτα δείγματα, χρονικά η διακύμανση του ποσοστού ανίχνευσης με το βιολογικό τεστ, παρατηρείται σταθερή (Πίνακας 20) και κυμαίνεται μεταξύ 11% με 13%, με εξαίρεση το 2012 όπου το ποσοστό των ύποπτων δειγμάτων ήταν χαμηλότερο (9,7%). Αυτό δεν ισχύει για το ποσοστό των ύποπτων δειγμάτων τα οποία βρέθηκαν θετικά σε υπολείμματα συγκεκριμένων αντιμικροβιακών ουσιών, με χημική ανάλυση στο εργαστήριο αναφοράς. Συγκεκριμένα, παρατηρείται σημαντική χρονική διακύμανση αφού το 2012 και 2014 τα θετικά δείγματα αποτελούσαν περίπου το 25% του συνόλου των 596 θετικών δειγμάτων, με ποσοστά 23,8% και 24% αντίστοιχα, ενώ τα υπόλοιπα έτη σημειώθηκαν πιο χαμηλά ποσοστά ιδιαίτερα το 2016 με ποσοστό 6,5% του συνόλου των θετικών δειγμάτων. Η διαπίστωση αυτή γεννά απορίες, σχετικά με το γεγονός ότι μόλις το 33,7% των δειγμάτων τα οποία κρίθηκαν ύποπτα με το Premi-test, βρέθηκαν θετικά σε αντιμικροβιακές ουσίες με χημική ανάλυση στο εργαστήριο αναφοράς του ΓΧΚ. Με βάση τα δεδομένα αυτά, προκύπτουν προβληματισμοί κατά πόσον τα ύποπτα δείγματα περιέχουν ουσίες μη εγκεκριμένων κτηνιατρικών φαρμάκων, ή κατά πόσον περιέχουν απολυμαντικά, απορρυπαντικά ή μεταβολίτες κάποιων δραστικών ουσιών που δεν περιλαμβάνονται στη μέθοδο ταυτοποίησης του εργαστηρίου αναφοράς.

Στην εν λόγω έρευνα, από την πρώτη στιγμή γίνεται σαφές ότι το πρόβλημα της αυξημένης χορήγησης αντιμικροβιακών ουσιών στην Κύπρο, εστιάζεται κυρίως στη χρήση σουλφοναμιδών (SAs). Αυτό αποδεικνύεται εύκολα, αφού εκ των 596 θετικών δειγμάτων το 54,8% (327) των δειγμάτων βρέθηκαν θετικά σε SAs στο εργαστήριο αναφοράς (Πίνακας 20, Διάγραμμα 5). Άρα, περίπου το 50% των θετικών δειγμάτων για έξι συναπτά έτη περιείχαν κατάλοιπα σε SAs, με υψηλότερο ποσοστό 14,3% το 2017. Συνεπώς, η αποτελεσματικότητα του εφαρμοζόμενου ελέγχου στη διαχρονική παρακολούθηση υπολειμμάτων αντιμικροβιακών ουσιών σε δείγματα χοιρινού κρέατος, καταδεικνύει την αυξημένη χρήση SAs στη θεραπεία και πρόληψη λοιμώξεων επί του συνόλου των χοιροτροφικών μονάδων της Κύπρου, σε σχέση με άλλες διερευνώμενες αντιμικροβιακές ουσίες.

Πίνακας 20: Ποσοστό – Συνολικού Αριθμού Δειγμάτων (N), ΄Υποπτων (με Premi-Test), Συνολικών Θετικών (με LC-MS/MS) και Θετικών Ειδικά Σε SAs (με LC-MS/MS) – από το 2012 έως το 2017, για τον έλεγχο αντιμικροβιακών ουσιών σε δείγματα χοίρειου μυϊκού ιστού στην Κύπρο.

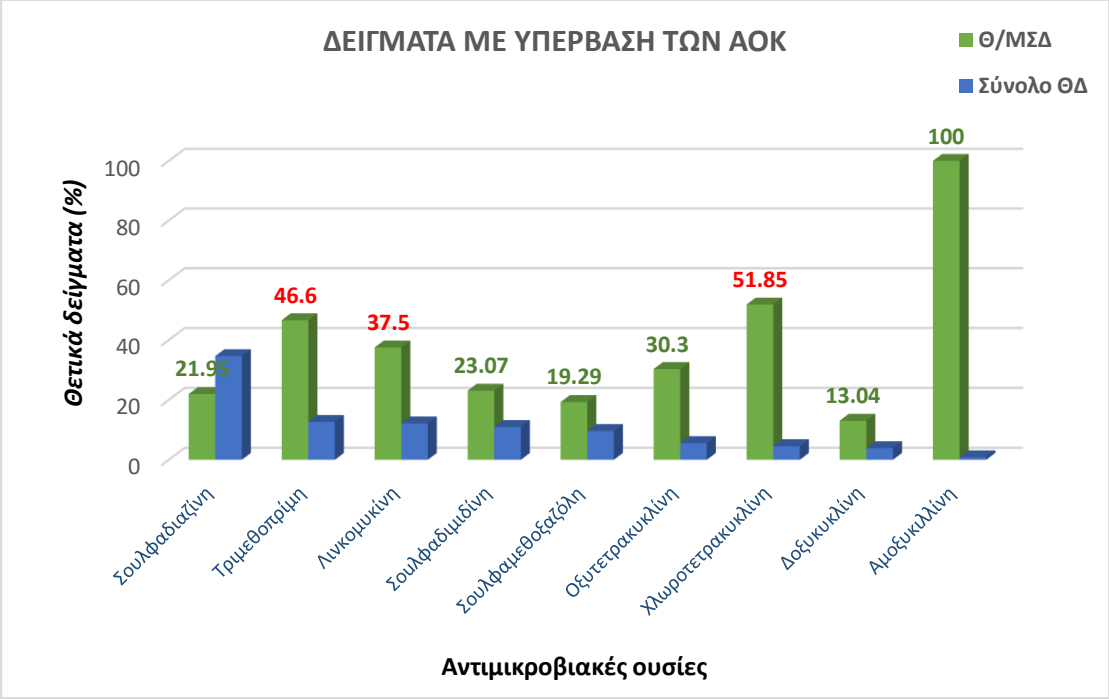
ΕΤΟΣ	N	ΥΠΟΠΤΑ	ΣΥΝΟΛΟ ΘΕΤΙΚΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΣΕ ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΕΣ ΟΥΣΙΕΣ	ΣΥΝΟΛΟ ΘΕΤΙΚΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΕΙΔΙΚΑ ΣΕ SAs
2012	2,675	260	142	83
%		9,7	23,8	14
2013	2,266	252	93	53

%		11	15,6	8,9
2014	2,491	334	143	85
%		13,4	24	14,3
2015	3,412	376	106	47
%		11	17,8	7,8
2016	2,484	274	39	31
%		11	6,5	5,2
2017	2,156	270	73	28
%		12,5	12,2	4,7
Σύνολο	15,484	1,766	596	327
%		11,4	3,8	54,8



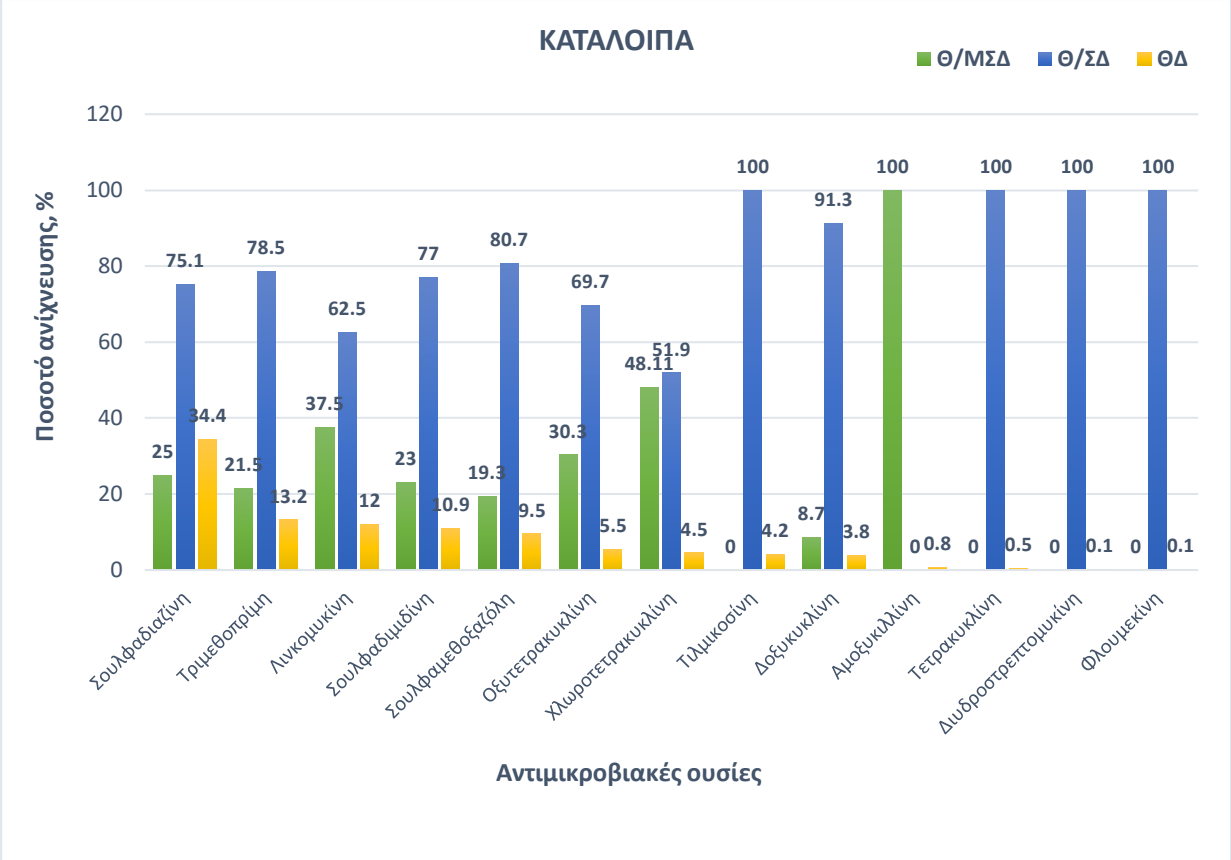
Διάγραμμα 5: Ποσοστό ύποπτων δειγμάτων (ΥΠΔ) με Premi-test, ποσοστό του συνόλου των θετικών δειγμάτων (ΘΔ) σε αντιμικροβιακές ουσίες, ποσοστό των ΘΔ ιδιαίτερα σε SAs (ΘΔ/SAs) με χημική ανάλυση σε χοίρειο μυϊκό ιστό, από το 2012 έως το 2017.

Όσον αφορά την συμμόρφωση με τον Κανονισμό 37/2010/ΕΚ για το ΑΟΚ, ενθαρρυντικό είναι το γεγονός ότι εκ των 596 θετικών δειγμάτων, βρέθηκαν μόνο 151 δείγματα μη συμμορφούμενων δειγμάτων (Θ/ΜΣΔ), πάνω από το ΑΟΚ, με ποσοστό 25,3% (Διάγραμμα 6).



Διάγραμμα 6. Ποσοστό κατανομής θετικών/μη-συμμορφούμενων δειγμάτων (Θ/ΜΣΔ), που υπερβαίνουν το ΑΟΚ, επί του συνόλου καταλοίπων των θετικών δειγμάτων (ΘΔ). Αριθμός θετικών δειγμάτων $N_{ΘΔ}$=596.

Αντιθέτως, το ποσοστό των θετικά συμμορφούμενων δειγμάτων (Θ/ΣΔ) στα οποία ανιχνεύθηκαν αντιμικροβιακές ουσίες κάτω από το ΑΟΚ ήταν ιδιαίτερα ψηλό, αφού εκ των 596 εντοπίστηκαν 445 δείγματα με ποσοστό 74,6%. Στο Διάγραμμα 7 φαίνεται η ποσοστιαία διακύμανση για το σύνολο των θετικών δειγμάτων (ΘΔ) ανά ουσία, που ανιχνεύθηκαν από το 2012 έως το 2017 σε χοίρειο μυϊκό ιστό, με ταυτόχρονη παρουσίαση της ποσοστιαίας διακύμανσης των θετικών συμμορφούμενων (κάτω από το ΑΟΚ) και των θετικών μη συμμορφούμενων δειγμάτων (πάνω από το ΑΟΚ).



Διάγραμμα 7: Ποσοστιαία χρονική διακύμανση για το σύνολο των θετικών δειγμάτων (ΘΔ) ανά ουσία, με ταυτόχρονη παρουσίαση της ποσοστιαίας διακύμανσης των θετικών συμμορφούμενων (κάτω από το ΑΟΚ) και των θετικών μη συμμορφούμενων δειγμάτων (πάνω από το ΑΟΚ).

Κατά συνέπεια, το γεγονός ότι το ποσοστό των θετικών συμμορφούμενων δειγμάτων είναι μεγαλύτερο από το ποσοστό των μη συμμορφούμενων, είναι σημαντικό από πλευράς προστασίας της Δημόσιας Υγείας, καταδεικνύει όμως παράλληλα το μέγεθος του προβλήματος της μικροβιακής αντοχής στην Κύπρο.

6.6 ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΚΙΝΔΥΝΟΥ ΤΗΣ ΔΙΑΤΡΟΦΙΚΗΣ ΠΡΟΣΛΗΨΗΣ ΥΠΟΛΕΙΜΜΑΤΩΝ ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΩΝ ΟΥΣΙΩΝ ΣΤΗΝ ΚΥΠΡΟ, ΜΕΣΩ ΤΗΣ ΚΑΤΑΝΑΛΩΣΗΣ ΧΟΙΡΙΝΟΥ ΚΡΕΑΤΟΣ

6.6.1 Αποτελέσματα δειγματοληπτικού ελέγχου

Τη χρονική περίοδο κατά την οποία διεξήχθη η έρευνα (2012-2017), περισυλλέχθηκαν από όλες τις ελεύθερες περιοχές της Κυπριακής Δημοκρατίας συνολικά 15,484 δείγματα νωπού χοιρινού κρέατος, για τον έλεγχο καταλοίπων αποκλειστικά σε αντιμικροβιακές ουσίες. Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε, ήταν αυτή της τυχαίας στρωματοποιημένης δειγματοληψίας (stratified sampling). Από τα 15,484 δείγματα που συλλέχθηκαν τα 1,766

δείγματα βρέθηκαν ύποπτα για κατάλοιπα αντιμικροβιακών ουσιών με τη βιολογική μέθοδο διαλογής Premi-test και μεταφέρθηκαν στο ΓΧΚ για περαιτέρω ταυτοποίηση και ποσοτικό προσδιορισμό με χημική ανάλυση LC-MS/MS. Από τα 1,766 ύποπτα δείγματα, 596 δείγματα βρέθηκαν θετικά σε αντιμικροβιακές ουσίες και τα συγκεντρωτικά αποτελέσματα των καταλοίπων αντιμικροβιακών φαρμάκων παρουσιάζονται στον Πίνακα 21.

Πίνακας 21: Συγκεντρωτικά αποτελέσματα ($N_{ΘΔ}$=596) καταλοίπων κτηνιατρικών φαρμάκων σε χοίρειο μυϊκό ιστό, για τα έτη 2012 έως 2017, με χρωματογραφική ανάλυση.

Κατάλοιπο	2012	2013	2014	2015	2016	2017
Σουλφαδιαζίνη	**C**[i]	**C**	**C**	**C**	**C**	**C**
	19	22,8	76,1	12,9	κ.ο.π.[ii] (4,73)	21,7
	40,8	21,3	155	κ.ο.π. (4,73)	κ.ο.π. (4,73)	10,7
	947	43,2	80	9,94	κ.ο.π. (4,73)	344
	93,7	21,6	88,6	κ.ο.π. (4,73)	κ.ο.π. (4,73)	763
	18,1	4,01	16	45,4	κ.ο.π. (4,73)	814
	181	4,01	14,8	κ.ο.π. (4,73)	κ.ο.π. (4,73)	677
	193	21,6	14,1	κ.ο.π. (4,73)	12.1	399
	49,4	21,6	14,8	κ.ο.π. (4,73)	κ.ο.π. (4,73)	371
	29,1	43,2	23,6	κ.ο.π. (4,73)	κ.ο.π. (4,73)	563
	172	21,3	17,4	κ.ο.π. (4,73)	κ.ο.π. (4,73)	301
	93,7	22,8	κ.ο.π. (4,73)	κ.ο.π. (4,73)	κ.ο.π. (4,73)	375
	93,7	43,7	κ.ο.π. (4,73)	-	κ.ο.π. (4,73)	344
	18,1	34,9	κ.ο.π. (4,73)	-	-	427
	18,1	44,6	κ.ο.π. (4,73)	-	-	87,8
	181	27,3	κ.ο.π. (4,73)	-	-	34,3

181	42,5	κ.ο.π. (4,73)	-	-	399
193	45,2	11,8	-	-	371
193	κ.ο.π. (4,73)	43,3	-	-	563
49,4	25,4	25,1	-	-	301
49,4	11,3	24,4	-	-	375
29,1	19,9	118	-	-	611
29,1	10,4	11,1	-	-	22,1
172	11,5	14,8	-	-	20
172	5,86	19,1	-	-	30,5
193	3,27	28,2	-	-	95
49,4	κ.ο.π. (4,73)	52,1	-	-	58,5
18,1	κ.ο.π. (4,73)	80,6	-	-	22,7
93,7	κ.ο.π. (4,73)	43,4	-	-	25,6
181	κ.ο.π. (4,73)	39,1	-	-	-
29,1	κ.ο.π. (4,73)	36,5	-	-	-
172	κ.ο.π. (4,73)	44,4	-	-	-
96,8	κ.ο.π. (4,73)	40,5	-	-	-
234	κ.ο.π. (4,73)	34,6	-	-	-
178	κ.ο.π. (4,73)	κ.ο.π. (4,73)	-	-	-
201	κ.ο.π. (4,73)	102	-	-	-
96,8	κ.ο.π. (4,73)	85,7	-	-	-
89	κ.ο.π. (4,73)	17,1	-	-	-
99,3	940	21	-	-	-
234	κ.ο.π. (4,73)	50,9	-	-	-

	178	978	19,5	-	-	-
	201	568	11,6	-	-	-
	96,8	-	42,1	-	-	-
	89	-	34,7	-	-	-
	99,3	-	65,3	-	-	-
	95,9	-	30,5	-	-	-
	23,2	-	28,1	-	-	-
	24,5	-	10,8	-	-	-
	26,2	-	59,3	-	-	-
	31	-	87,8	-	-	-
	17,1	-	568	-	-	-
	37,1	-	940	-	-	-
	31,2	-	978	-	-	-
	10,7	-	κ.ο.π. (4,73)	-	-	-
		-	278	-	-	-
		-	145	-	-	-
		-	74,9	-	-	-
		-	127	-	-	-
		-	102	-	-	-
		-	141	-	-	-
		-	126	-	-	-
Αρ. Θ.Δ. n=205	53	41	60	11	12	28
Θ.Δ. 34,62%	25,85%	20%	29,26%	5,36%	5,85%	13,65%
Ε.Σ.[iii]	10,7 - 947	4,73 - 978	4,73 - 978	4,73 - 45,4	4,73 - 12,1	10,7 - 814
Κατάλοιπο	**2012**	**2013**	**2014**	**2015**	**2016**	**2017**
Σουλφαδιμιδίνη	**c**	**c**	**c**	**c**	**c**	**c**
	7,23	8,01	κ.ο.π. (8,2)	6085	82.6	-
	31,9	8,01	κ.ο.π. (8,2)	5127	20,7	-
	9,33	8,01	-	6924	κ.ο.π. (8,2)	-
	7,23	40,1	-	383	178	-

	31,9	30,2	-	223	142	-
	9,33	κ.ο.π. (8,2)	-	205	26,7	-
	35	κ.ο.π. (8,2)	-	189	κ.ο.π. (8,2)	-
	51,8	17,8	-	295	60,1	-
	14,3	κ.ο.π. (8,2)	-	223	κ.ο.π. (8,2)	-
	22,2	45,3	-	149	186	-
	10,1	3,19	-	223	κ.ο.π. (8,2)	-
	9,14	5,55	-	κ.ο.π. (8,2)	κ.ο.π. (8,2)	-
	38,6	-	-	κ.ο.π. (8,2)	κ.ο.π. (8,2)	-
	30,6	-	-	κ.ο.π. (8,2)	κ.ο.π. (8,2)	-
	11,9	-	-	κ.ο.π. (8,2)	κ.ο.π. (8,2)	-
	-	-	-	κ.ο.π. (8,2)	23,9	-
	-	-	-	18,8	45,6	-
	-	-	-	-	κ.ο.π. (8,2)	-
	-	-	-	-	1725	-
Αρ. Θ.Δ. n=65	15	12	2	17	19	-
Θ.Δ. 11%	23,07%	18,46%	3,07%	26,15%	29,23%	-
Ε.Σ.	7,23 – 51,8	3,19 - 45,3	-	8,2 - 6924	8,2 - 1725	-
Κατάλοιπο	**2012**	**2013**	**2014**	**2015**	**2016**	**2017**
Σουλφαμεθοξαζόλη	**c**	**c**	**c**	**c**	**c**	**c**
	33,2	-	κ.ο.π. (1,45)	5,52	-	-
	76,1	-	κ.ο.π. (1,45)	34,4	-	-
	33,2	-	5,44	5,38	-	-

	76,1	-	46,1	49,1	-	-
	293	-	69,8	51,8	-	-
	359	-	53,9	5,34	-	-
	206	-	41,3	κ.ο.π. (1,45)	-	-
	200	-	60,3	κ.ο.π. (1,45)	-	-
	193	-	39,7	κ.ο.π. (1,45)	-	-
	536	-	60,9	5,1	-	-
	370	-	57,4	κ.ο.π. (1,45)	-	-
	459	-	31,5	κ.ο.π. (1,45)	-	-
	340	-	κ.ο.π. (1,45)	κ.ο.π. (1,45)	-	-
	342	-	κ.ο.π. (1,45)	κ.ο.π. (1,45)	-	-
	340	-	κ.ο.π. (1,45)	κ.ο.π. (1,45)	-	-
	-	-	κ.ο.π. (1,45)	3,29	-	-
	-	-	κ.ο.π. (1,45)	κ.ο.π. (1,45)	-	-
	-	-	κ.ο.π. (1,45)	κ.ο.π. (1,45)	-	-
	-	-	κ.ο.π. (1,45)	κ.ο.π. (1,45)	-	-
	-	-	κ.ο.π. (1,45)	-	-	-
	-	-	κ.ο.π. (1,45)	-	-	-
	-	-	κ.ο.π. (1,45)	-	-	-
	-	-	κ.ο.π. (1,45)	-	-	-
Αρ. Θ.Δ. n=57	15	-	23	19	-	-

Θ.Δ. 9,62%	26,31%	-	40,35%	33,30%	-	-
Ε.Σ.	33,2 - 536	-	1,45 - 69,8	1,45 - 51,8	-	-
Κατάλοιπο	**2012**	**2013**	**2014**	**2015**	**2016**	**2017**
Τριμεθοπρίμη	**c**	**c**	**c**	**c**	**c**	**c**
	202	23	26,2	227	-	κ.ο.π. (11,4)
	19,8	197	30,7	239	-	33,7
	65,5	159	30,7	217	-	κ.ο.π. (11,4)
	64,7	148	-	24,2	-	110
	35,2	-	-	κ.ο.π. (11,4)	-	67,3
	19,8	-	-	48,1	-	71,9
	19,8	-	-	-	-	37,8
	65,5	-	-	-	-	κ.ο.π. (11,4)
	65,5	-	-	-	-	65,6
	64,7	-	-	-	-	κ.ο.π. (11,4)
	64,7	-	-	-	-	41,6
	35,2	-	-	-	-	611
	35,2	-	-	-	-	37,8
	64,7	-	-	-	-	κ.ο.π. (11,4)
	19,8	-	-	-	-	65,6
	65,5	-	-	-	-	κ.ο.π. (11,4)
	35,2	-	-	-	-	41,6
	19,1	-	-	-	-	30,5
	83,8	-	-	-	-	65,3
	40,8	-	-	-	-	-
	43,2	-	-	-	-	-
	19,1	-	-	-	-	-
	17,2	-	-	-	-	-
	16,8	-	-	-	-	-
	28,3	-	-	-	-	-

	83,8	-	-	-	-	-
	40,8	-	-	-	-	-
	43,2	-	-	-	-	-
	19,1	-	-	-	-	-
	17,2	-	-	-	-	-
	16,8	-	-	-	-	-
	28,3	-	-	-	-	-
	187	-	-	-	-	-
	152	-	-	-	-	-
	74	-	-	-	-	-
	73,4	-	-	-	-	-
	75,2	-	-	-	-	-
	124	-	-	-	-	-
	142	-	-	-	-	-
	248	-	-	-	-	-
	66,6	-	-	-	-	-
	93	-	-	-	-	-
	66,6	-	-	-	-	-
Αρ. ΘΔ n= 79	43	4	7	6	-	19
Θ.Δ. 12,6%	57,30%	5,30%	4%	8%	-	25,30%
Ε.Σ.	16,8 - 248	23 - 197	26,2 - 30,7	11,4 - 239	-	11,4 - 611
Κατάλοιπο	**2012**	**2013**	**2014**	**2015**	**2016**	**2017**
Λινκομυκίνη	**c**	**c**	**c**	**c**	**c**	**c**
	-	κ.ο.π. (9,6)	κ.ο.π. (9,6)	42	48.6	209
	-	268	κ.ο.π. (9,6)	κ.ο.π. (9,6)	-	217
	-	268	64,5	κ.ο.π. (9,6)	-	134
	-	642	300	κ.ο.π. (9,6)	-	86,1
	-	280	75,3	45	-	54,8
	-	254	78,6	κ.ο.π. (9,6)	-	-

-	227	κ.ο.π. (9,6)	50,5	-	-
-	280	136	33,1	-	-
-	222	125	32,7	-	-
-	202	19,6	26,4	-	-
-	114	κ.ο.π. (9,6)	38,6	-	-
-	-	κ.ο.π. (9,6)	28,3	-	-
-	-	κ.ο.π. (9,6)	30,5	-	-
-	-	κ.ο.π. (9,6)	45,3	-	-
-	-	κ.ο.π. (9,6)	29,8	-	-
-	-	κ.ο.π. (9,6)	57,1	-	-
-	-	κ.ο.π. (9,6)	23,7	-	-
-	-	κ.ο.π. (9,6)	κ.ο.π. (9,6)	-	-
-	-	227	κ.ο.π. (9,6)	-	-
-	-	31,9	κ.ο.π. (9,6)	-	-
-	-	221	κ.ο.π. (9,6)	-	-
-	-	256	κ.ο.π. (9,6)	-	-
-	-	226	κ.ο.π. (9,6)	-	-
-	-	κ.ο.π. (9,6)	κ.ο.π. (9,6)	-	-
-	-	278	-	-	-
-	-	181	-	-	-
-	-	270	-	-	-
-	-	161	-	-	-
-	-	114	-	-	-
-	-	222	-	-	-

	-	-	202	-	-	-
Αρ. Θ.Δ. n= 72	-	11	31	24	1	5
Θ.Δ. 12,16 %	-	15,27%	43,05%	33,30%	1,38%	7%
Ε.Σ.	-	9,6 - 642	9,6 - 300	9,6 - 57,1	-	54,8 - 217
Κατάλοιπο	**2012**	**2013**	**2014**	**2015**	**2016**	**2017**
Χλωροτετρακυκλίνη	**c**	**c**	**c**	**c**	**c**	**c**
	84.6	84,6	κ.ο.π. (14,65)	274	-	-
	105	κ.ο.π. (14,65)	47,7	373	-	-
	-	139	94,7	211	-	-
	-	94,7	122	323	-	-
	-	137	202	108	-	-
	-	122	137	172	-	-
	-	-	139	237	-	-
	-	-	-	40,7	-	-
	-	-	-	41,1	-	-
	-	-	-	κ.ο.π. (14,65)	-	-
	-	-	-	62,7	-	-
	-	-	-	33	-	-
Αρ. Θ.Δ. n= 27	2	6	7	12	-	-
Θ.Δ. 4,56%	7,40%	22,20%	26%	44,40%	-	-
Ε.Σ.	84,6 - 105	14,65 - 139	14,65 - 202	14,65 - 373	-	-
Κατάλοιπο	**2012**	**2013**	**2014**	**2015**	**2016**	**2017**
Δοξυκυκλίνη	**c**	**c**	**c**	**c**	**c**	**c**
	39,1	κ.ο.π. (15,6)	-	-	284	77,4
	39,1	46,2	-	-	-	66,6

	-	κ.ο.π. (15,6)	-	-	-	76,3
	-	36,2	-	-	-	40,6
	-	36,2	-	-	-	374
	-	77,7	-	-	-	352
	-	49,6	-	-	-	92,3
	-	46	-	-	-	92,3
	-	80,6	-	-	-	-
	-	66,2	-	-	-	-
	-	61,2	-	-	-	-
	-	39,4	-	-	-	-
Αρ. Θ.Δ. n= 23	2	12	-	-	1	8
Θ.Δ. 3,71 %	8,69%	52,17%	-	-	4,34%	34,78%
Ε.Σ.		15,6 - 80,6	-	-	-	66,6 - 374
Κατάλοιπο	**2012**	**2013**	**2014**	**2015**	**2016**	**2017**
Οξυτετρακυκλίνη	**c**	**c**	**c**	**c**	**c**	**c**
	42,5	43,7	κ.ο.π. (9,1)	24,7	22	202
	54,2	19,8	117	35,5	-	κ.ο.π. (9,1)
	60,5	42,8	193	58,4	-	38
	42,5	19,4	207	21,9	-	27,9
	54,2	18,9	187	-	-	28,2
	60,5	18,9	κ.ο.π. (9,1)	-	-	-
	-	-	117	-	-	-
	-	-	193	-	-	-
	-	-	187	-	-	-
	-	-	207	-	-	-
	-	-	200	-	-	-
Αρ. ΘΔ n= 33	6	6	11	4	1	5

Θ.Δ. 5,57 %	18,18%	18,18%	33,30%	12,12%	3,03%	15,15%
Ε.Σ.	42,5 - 60,5	18,9 - 43,7	9,1 - 207	21,9 - 58,4	-	9,1-202
Κατάλοιπο	**2012**	**2013**	**2014**	**2015**	**2016**	**2017**
Τετρακυκλίνη	**c**	**c**	**c**	**c**	**c**	**c**
	8,1	-	20.2	-	-	-
	-	-	40	-	-	-
Αρ. ΘΔ n= 3	1	-	2	-	-	-
Θ.Δ. 0,5 %	33,30%	-	66,60%	-	-	-
Ε.Σ.	-	-	20.2 - 40	-	-	-
Κατάλοιπο	**2012**	**2013**	**2014**	**2015**	**2016**	**2017**
Τιλμικοσίνη	**c**	**c**	**c**	**c**	**c**	**c**
	9,03	-	-	18,4	κ.ο.π. (5,2)	31,2
	8,21	-	-	18,4	κ.ο.π. (5,2)	13,9
	9,03	-	-	16,6	κ.ο.π. (5,2)	κ.ο.π. (5,2)
	8,21	-	-	13,2	κ.ο.π. (5,2)	11,6
	-	-	-	11,6	-	11,6
	-	-	-	15	-	15,2
	-	-	-	33,9	-	κ.ο.π. (5,2)
	-	-	-	κ.ο.π. (5,2)	-	κ.ο.π. (5,2)
	-	-	-	κ.ο.π. (5,2)	-	-
Αρ. Θ.Δ. n= 25	4	-	-	9	4	8
Θ.Δ. 4,2%	16%	-	-	36%	16%	32%

Ε.Σ.	8,21 - 9,03	-	-	5,2 - 33,9	-	5,2-31,2
Κατάλοιπο	**2012**	**2013**	**2014**	**2015**	**2016**	**2017**
Αμοξικιλλίνη	**c**	**c**	**c**	**c**	**c**	**c**
	-	-	-	547	121	-
	-	-	-	184	-	-
	-	-	-	73,7	-	-
	-	-	-	84,2	-	-
Αρ. Θ.Δ. n= 5	-	-	-	4	1	-
Θ.Δ. 0,84%	-	-	-	80%	20%	-
Ε.Σ.	-	-	-	73,7-547	-	-
Κατάλοιπο	**2012**	**2013**	**2014**	**2015**	**2016**	**2017**
Φλουμεκίνη	**c**	**c**	**c**	**c**	**c**	**c**
	-	-	-	-	-	51,3
Αρ. Θ.Δ. n=1	-	-	-	-	-	1
Θ.Δ. 0,16%	-	-	-	-	-	100%
Ε.Σ.	-	-	-	-	-	-
Κατάλοιπο	**2012**	**2013**	**2014**	**2015**	**2016**	**2017**
Διυδροστρεπτομυκίνη	**c**	**c**	**c**	**c**	**c**	**c**
	-	68,8	-	-	-	-
Αρ. Θ.Δ. n=1	-	1	-	-	-	-
Θ.Δ. 0,16%	-	100%	-	-	-	-
Ε.Σ.	-	-	-	-	-	-

[ii] **c:** συγκέντρωση δείγματος (μg·kg^{-1})

[ii] **κ.ο.π.:** κάτω από το όριο ποσοτικοποίησης (LOD<α<LOQ)

[iii] **Ε.Σ.:** Εύρος Συγκέντρωσης (μg·kg^{-1})

6.6.2 Συγκριτικά αποτελέσματα δειγματοληψίας

Από τις 45 διερευνώμενες αντιμικροβιακές ουσίες σε 1,766 ύποπτα δείγματα νωπού χοιρινού κρέατος για την περίοδο 2012 έως 2017, συλλογικά ανιχνεύθηκαν μόνο 13 ουσίες στα 596 (3,8%) θετικά δείγματα σε κατάλοιπα αντιμικροβιακών ουσιών και συνοψίζονται στον Πίνακα 22 (Διάγραμμα 4). Λαμβάνοντας πλέον υπόψη ότι συνολικά το ποσοστό των δειγμάτων που βρέθηκαν θετικά σε κατάλοιπα των διερευνώμενων αντιμικροβιακών ουσιών τα τελευταία έξι χρόνια είναι πολύ μικρό (3,8%), μπορούμε να συμπεράνουμε ότι γενικά τηρούνται οι ενδεδειγμένοι χρόνοι αναμονής, γίνεται ορθή κτηνιατρική χρήση από τους ιδιώτες κτηνίατρους και οι ΚΥ επιτελούν το έργο τους στον βέλτιστο δυνατό βαθμό.

Πίνακας 22: Ποσοστό δειγμάτων, που βρέθηκαν θετικά (ΘΔ) σε 13 αντιμικροβιακές ουσίες, από το 2012 έως το 2017, στην Κύπρο.

Κατάλοιπο	N	%
Σουλφαδιαζίνη	205	34.4
Σουλφαδιμιδίνη	65	10.9
Σουλφαμεθοξαζόλη	57	9.5
Τριμεθοπρίμη	79	13.2
Λινκομυκίνη	72	12
Χλωροτετρακυκλίνη	27	4.5
Δοξυκυκλίνη	23	3.8
Οξυτετρακυκλίνη	33	5.5
Αμοξικιλλίνη	5	0.8
Τετρακυκλίνη	3	0.5
Τιλμικοσίνη	25	4.2
Φλουμεκίνη	1	0.1
Διυδροστρεπτομυκίνη	1	0.1

Πάλι, όπως και στο Διάγραμμα 4, διαγράφεται ξεκάθαρα το πρόβλημα στα κατάλοιπα σουλφοναμιδών και συγκεκριμένα της σουλφαδιαζίνης, η οποία παρουσιάζει με διαφορά το υψηλότερο ποσοστό ανίχνευσης (34,4%), σε σχέση με τις άλλες ανιχνεύσιμες αντιμικροβιακές ουσίες. Αυξημένο ποσοστό ανίχνευσης επίσης παρατηρείται και στην τριμεθοπρίμη (13,2%) η οποία συνήθως χορηγείται συνδυαστικά με σουλφαδιαζίνη, στη λινκομυκίνη (12%), αλλά και στις υπόλοιπες σουλφοναμίδες – σουλφαδιμιδίνη 10,9% και σουλφαμεθοξαζόλη 9,5%.

Ο συνολικός αριθμός των μη συμμορφούμενων δειγμάτων, δηλαδή αυτών που τα επίπεδα συγκέντρωσης των διερευνώμενων ουσιών βρέθηκαν να είναι πάνω από τις θεσπισμένες τιμές ΑΟΚ της Ευρωπαϊκής Ένωσης ήταν 151 (25,3%) και δεν περιείχαν τις ουσίες διυδροστρεπτομυκίνη, φλουμεκίνη, τιλμικοσίνη και τετρακυκλίνη. Αντιθέτως, 445 (74,6%) δείγματα βρέθηκαν θετικά-συμμορφούμενα, αφού δεν υπερβαίνουν τις καθορισμένες τιμές ΑΟΚ, προσδιορίζοντας έτσι τη διατροφική επιβάρυνση ως παράμετρο ανάπτυξης της μικροβιακής αντοχής.

Στον Πίνακα 23 φαίνεται η διακύμανση των ποσοστών των θετικών δειγμάτων, μεταξύ των δεδομένων που υπερβαίνουν το ΑΟΚ και των δεδομένων που δεν υπερβαίνουν το ΑΟΚ. Απ' ότι φαίνεται, η πλειοψηφία των θετικών μη-συμμορφούμενων δειγμάτων (πάνω από το ΑΟΚ) εντοπίζεται κυρίως σε δείγματα που ανιχνεύθηκαν κατάλοιπα χλωροτετρακυκλίνης (48,1%), οξυτετρακυκλίνης (30,3%) και λινκομυκίνης (37,5%) (Διάγραμμα 7). Επιπλέον, δείγματα στα οποία ανιχνεύθηκαν κατάλοιπα των τριών σουλφοναμιδών (σουλφαδιαζίνη, σουλφαδιμιδίνη, σουλφαμεθοξαζόλη) και της δοξυκυκλίνης (DXC) παρουσίασαν μεγάλη διαφορά στο ποσοστό θετικών συμμορφούμενων δειγμάτων (κάτω από το ΑΟΚ), σε σχέση με το ποσοστό των θετικών μη-συμμορφούμενων δειγμάτων. Όσον αφορά την αμοξυκιλλίνη, φαίνεται ότι και τα 5 δείγματα που βρέθηκαν θετικά σε κατάλοιπα ξεπερνούσαν το ΑΟΚ (Διάγραμμα 7).

Πίνακας 23: Ποσοστό θετικών συμμορφούμενων (κάτω από ΑΟΚ) και θετικών μη-συμμορφούμενων δειγμάτων (πάνω από ΑΟΚ), από το 2012 έως το 2017.

Κατάλοιπο	N	ΑΟΚ ($\mu g \cdot Kg^{-1}$)	Πάνω από ΑΟΚ %	Κάτω από ΑΟΚ %
Σουλφαδιαζίνη	205	100	25	75.1
Σουλφαδιμιδίνη	65	100	23	77
Σουλφαμεθοξαζόλη	57	100	19.3	80.7
Τριμεθοπρίμη	79	50	21.5	78.5
Λινκομυκίνη	72	100	37.5	62.5
Χλωροτετρακυκλίνη	27	100	48.1	51.9
Δοξυκυκλίνη	23	100	8.7	91.3
Οξυτετρακυκλίνη	33	100	30.3	69.7
Αμοξικιλλίνη	5	50	100	0
Τετρακυκλίνη	3	100	0	100
Τιλμικοσίνη	25	200	0	100
Φλουμεκίνη	1	500	0	100
Διυδροστρεπτομυκίνη	1	200	0	100

Με εξαίρεση την περίπτωση της αμοξυκιλλίνης, φαίνεται ξεκάθαρα η πλειοψηφία των δειγμάτων με συγκέντρωση ουσίας κάτω από το ΑΟΚ. Το

γεγονός αυτό, της αυξημένης παρουσίας δειγμάτων με κατάλοιπα αντιμικροβιακών ουσιών κάτω από τα καθορισμένα ΑΟΚ, εγείρει ανησυχίες για το πρόβλημα της μικροβιακής αντοχής στην Κύπρο. Η κείμενη νομοθεσία δεν προνοεί τη δέσμευση και καταστροφή προϊόντων ζωικής παραγωγής με παρουσία καταλοίπων κάτω από τα καθορισμένα ΑΟΚ, με αποτέλεσμα αυτό να διοχετεύεται στην αγορά προς κατανάλωση.

6.6.3 Ο Γεωμετρικός Μέσος ένα σημαντικό εργαλείο χρήσης στον υπολογισμό της Εκτιμώμενης Ημερήσιας Πρόσληψης

Ο γεωμετρικός μέσος των συγκεντρώσεων των διερευνώμενων αντιμικροβιακών ουσιών στα δείγματα χοιρινού κρέατος, κατά χρονολογική σειρά, παρατίθεται στον Πίνακα 24. Στην μελέτη αυτή χρησιμοποιήθηκε ο γεωμετρικός μέσος γιατί είναι πιο σταθερός από τον αριθμητικό μέσο, αφού επηρεάζεται λιγότερο από παρατηρήσεις με πολύ μεγάλες τιμές (σε κάποια έτη παρατηρήθηκε μεγάλη διακύμανση στις τιμές συγκέντρωσης καταλοίπων). Διευκρινίζεται ότι, για τις ουσίες οι οποίες ανιχνεύθηκαν μόνο σε ένα δείγμα (διυδροστρεπτομυκίνη και φλουμεκίνη), δεν ήταν δυνατό να υπολογισθεί ο γεωμετρικός μέσος συγκέντρωσης γι΄αυτό και δεν συμπεριελήφθησαν στα περαιτέρω αποτελέσματα της διατροφικής εκτίμησης. Στην συνέχεια, χρησιμοποιήθηκε ο γεωμετρικός μέσος των συγκεντρώσεων των διερευνώμενων ουσιών και η ημερήσια κατανάλωση σε χοιρινό κρέας, για να υπολογισθεί η εκτιμώμενη ημερήσια πρόσληψη (EDI) ώστε να συγκριθεί με την αποδεκτή ημερήσια πρόσληψη (ADI).

Πίνακας 24: Θετικά δείγματα χοιρινού κρέατος, γεωμετρικός μέσος και εύρος συγκεντρώσεων των διερευνώμενων αντιμικροβιακών ουσιών, ανά ουσία και έτος.

	2012			2013			2014		
Κατάλοιπο	**Σ.Α.**[i]	**Γ.Μ.**[ii]	**Ε.Σ.**[iii]	**Σ.Α.**	**Γ.Μ.**	**Ε.Σ.**	**Σ.Α.**	**Γ.Μ.**	**Ε.Σ.**
Σουλφαδιαζίνη	25,85	42,2	10,7 – 947	20	11,3	3,27 – 978	29,3	32,7	4,73 – 978
Σουλφαδιμιδίνη	23	17,2	7,23 – 51,8	18,5	11,4	3,19 – 45,3	3	8,2	8,2
Σουλφαμεθοξαζόλη	26,3	50,3	33,2 – 536	-	-	-	40,3	6,1	1,45 – 69,8
Τριμεθοπρίμη	54,4	25,5	16,8 – 248	5	23	23 – 197	8,8	50,9	11,4 – 197
Λινκομυκίνη	-	-	-	15,3	149,4	9,6 – 642	43	46,2	9,6 – 300
Χλωροτετρακυκλίνη	7,4	84,6	84,6	22,2	49	14,65 – 139	26	83,7	14,65 – 202
Δοξυκυκλίνη	8,7	39,1	39,1	52	42,4	15,6 – 80,6	-	-	-
Οξυτετρακυκλίνη	18,2	51,8	42,5 – 60,5	18,2	25,2	18,9 – 43,7	33,3	64,5	9,1 – 207
Τετρακυκλίνη	33,3	-	8,1	-	-	-	66,6	28,4	20,2 - 40
Αμοξικιλλίνη	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Τιλμικοσίνη	16	8,6	8,21 – 9,03	-	-	-	-	-	-
	2015			**2016**			**2017**		
Κατάλοιπο	**Σ.Α.**	**Γ.Μ.**	**Ε.Σ.**	**Σ.Α.**	**Γ.Μ.**	**Ε.Σ.**	**Σ.Α.**	**Γ.Μ.**	**Ε.Σ.**
Σουλφαδιαζίνη	5,4	6,8	4,73 – 45,4	5,9	5,1	4,73 – 12,1	16,7	31,5	10,7 – 814
Σουλφαδιμιδίνη	26,2	16	8,2 – **6924**	29,2	28,4	8,2 – **1725**	-	-	-
Σουλφαμεθοξαζόλη	33,3	3,8	1,45 – 51,8	-	-	-	-	-	-

Τριμεθοπρίμη	7,6	23,7	11,4 – 239	-	-	-	24	20,5	11,4 – 611
Λινκομυκίνη	33,3	19,6	9,6 – 57,1	1,4	-	48,6	7	123,5	54,8 – 217
Χλωροτετρακυκλίνη	44,4	42	14,65 – 373	-	-	-	-	-	-
Δοξυκυκλίνη	-	-	-	4,3	-	284	34,8	80,5	40,6 – 374
Οξυτετρακυκλίνη	12	32,5	21,9 – 58,4	3	-	22	15,2	22,8	9,1 – 202
Τετρακυκλίνη	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Αμοξικιλλίνη	80	-	73,7 – 547	20	-	121	-	-	-
Τιλμικοσίνη	36	13,2	5,2 – 33,9	16	5,2	5,2	32	10,3	5,2 – 31,2

[i] **Σ.Α.** – Συχνότητα ανίχνευσης (%)

[ii] **Γ.Μ.** – Γεωμετρικός Μέσος ($\mu g \cdot kg^{-1}$)

[iii] **Ε.Σ.** – Εύρος συγκέντρωσης ($\mu g \cdot kg^{-1}$)

Στην αξιολόγηση του κινδύνου (risk) το σημαντικότερο πρόβλημα είναι ο προσδιορισμός της επικινδυνότητας (hazard), ο οποίος προκύπτει από την κατανάλωση τροφίμων τα οποία μπορεί μεν να περιέχουν κατάλοιπα κτηνιατρικών φαρμάκων, εντούτοις οι αναλύσεις αυτών έδειξαν ότι δεν περιέχουν τέτοιες ουσίες. Αυτό αποτελεί μια σημαντική παράμετρο που πρέπει να λαμβάνεται υπόψιν στην εκτίμηση της διατροφικής πρόσληψης δραστικών ουσιών, καθώς υπάρχει η πιθανότητα οι υπό μελέτη ουσίες να υφίστανται στο τρόφιμο σε συγκεντρώσεις χαμηλότερες του ορίου ανίχνευσης, με αποτέλεσμα αυτές να μην ανιχνεύονται. Για το λόγο αυτό, στις περιπτώσεις που έχουν καθοριστεί LOD και LOQ ισχύουν [Corley 2003] τα εξής:

- Όταν ένα κατάλοιπο ανιχνεύεται σε συγκέντρωση μικρότερη του LOQ, για την αξιολόγηση του (risk), τότε η τιμή που χρησιμοποιείται είναι το μισό του LOQ (1⁄2LOQ).

- Όταν ένα κατάλοιπο ανιχνεύεται σε συγκέντρωση μικρότερη του LOD, για την αξιολόγηση του (risk), τότε η τιμή που χρησιμοποιείται είναι το μισό του LOD (1⁄2LOD).

6.6.4 Υπολογισμός της Ημερήσιας Κατανάλωσης χοιρινού κρέατος για άντρες και γυναίκες >20 ετών, για παιδιά ηλικίας 6-9 ετών και εφήβους ηλικίας 10-17 ετών, στην Κύπρο.

Τα στοιχεία κατανάλωσης χοιρινού κρέατος στην Κύπρο για άνδρες και γυναίκες >20 ετών και συγκεκριμένα η Ημερήσια Κατανάλωση (ΗΚ) σε g/άτομο/ημέρα, υπολογίστηκε με βάση την εξίσωση (5):

$$HK = \frac{\{[(\text{ετήσια έξοδα της οικογένειας για το χοιρινό}) / (\text{λιανική τιμή πώλησης είδους})] \times 1000\} / 365 \text{ ημέρες}}{\text{μέσο αριθμό ατόμων ανά οικογένεια}} \times \frac{\text{μέσος αριθμός ενηλίκων} > 20 \text{ ετών ανά οικογένεια}}{\text{μέσο αριθμό ατόμων ανά οικογένεια}} \quad (5)$$

Για τον σκοπό αυτό, χρησιμοποιήθηκαν δεδομένα των αποτελεσμάτων έρευνας για τα έτη 2015-2016 που διεξήγαγε η Στατιστική Υπηρεσία Κύπρου (ανά πενταετία), για τα έξοδα του οικογενειακού προϋπολογισμού (Household Budget Spreadsheet, HBS) μιας οικογένειας μέσης εισοδηματικής τάξης, καλύπτοντας ένα αντιπροσωπευτικό δείγμα 2,600 νοικοκυριών σε όλες τις ελεύθερες περιοχές της Κύπρου [CYSTAT, 2017]. Συγκεκριμένα, υπολογίσθηκε ότι η μέση ετήσια καταναλωτική δαπάνη για ένα νοικοκυριό είναι 31.206 ευρώ, εκ των οποίων 275 ευρώ διατίθενται για νωπό χοιρινό κρέας εγχώριου παραγωγής. Σε σχέση με την έρευνα αυτή, η μέση τιμή λιανικής πώλησης χοιρινού κρέατος ήταν 4,8 ευρώ / kg. Επιπλέον, ο μέσος αριθμός ατόμων ανά οικογένεια ήταν 2,73 ± 0,04 και ο μέσος αριθμός ενηλίκων >20 ετών ανά οικογένεια ήταν 2,11 ± 0,02 [Στατιστική Υπηρεσία 2016]. Με βάση τα παραπάνω, η ΗΚ χοιρινού κρέατος βρέθηκε ίση με **44,4 g** ανά ενήλικα >20 ετών την ημέρα.

Όσον αφορά τους έφηβους και τα παιδιά, χρειάστηκε να υπολογίσουμε αρχικά την Συνολική Ημερήσια Κατανάλωση (ΣΗΚ) του γενικού πληθυσμού (Εξίσωση 6), δεδομένου πάλι ότι η μέση τιμή λιανικής πώλησης χοιρινού κρέατος ήταν 4,8 ευρώ / kg και ο μέσος αριθμός ατόμων ανά οικογένεια ήταν 2,73 ± 0,04 [Στατιστική Υπηρεσία 2016]:

$$\Sigma HK = \frac{\{[(\text{ετήσια έξοδα της οικογένειας για το χοιρινό}) / (\text{λιανική τιμή πώλησης είδους})] \times 1000\} / 365 \text{ ημέρες}}{\text{μέσο αριθμό ατόμων ανά οικογένεια}} \quad (6)$$

Με βάση τα παραπάνω, η συνολική ημερήσια κατανάλωση χοιρινού κρέατος ανά έφηβο και παιδί ανά οικογένεια, υπολογίστηκε σε **58,13 g** χοιρινού κρέατος ανά άτομο την ημέρα.

Είναι εμφανές ότι στις πιο πάνω εξισώσεις εισάγονται αβεβαιότητες για κάθε συνιστώσα. Παρ΄ όλα αυτά, οι προσεγγίσεις αυτές είναι ακριβέστερες από άλλες προσεγγίσεις {χρήση στοιχείων κατανάλωσης τροφίμων άλλων χωρών ή περιοχών, ή χρήση των Food Balance Sheets, FBS [Ruprich J. 2000]}.

6.6.5 Υπολογισμός της EDI, αντιμικροβιακών καταλοίπων για άντρες και γυναίκες >20 ετών στην Κύπρο, ως ποσοστό (%) της ADI.

Στα πλαίσια της έρευνας αυτής, εξετάσθηκε ο κίνδυνος πρόσληψης αντιμικροβιακών ουσιών, μέσω του χοιρινού κρέατος στην Κύπρο. Για την πραγματοποίηση της αξιολόγησης αυτής, χρησιμοποιήθηκαν τα συγκεντρωτικά αποτελέσματα των καταλοίπων που ανιχνευθήκαν μετά από δειγματοληψία και χρωματογραφική ανάλυση. Τα αποτελέσματα της έρευνας αυτής είναι σημαντικά, πρώτιστος για την αντιμετώπιση και πρόληψη του φαινομένου της μικροβιακής αντοχής και παράλληλα για την προστασία της Δημόσιας Υγείας στο σύνολο της. Λόγω της μακροχρόνιας έκθεσης του ανθρώπου σε κατάλοιπα αντιμικροβιακών ουσιών μέσω των τροφίμων ζωικής προέλευσης, έχουν θεσπιστεί από την ΕΕ τα ΑΟΚ. Τα όρια αυτά σύμφωνα με τον κανονισμό (ΕΚ) αριθ. 470/2009 του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου, της 6^{ης} Μαΐου 2009, για τον καθορισμό ΑΟΚ των φαρμακολογικά δραστικών ουσιών

στα τρόφιμα ζωικής προέλευσης, αντικατοπτρίζουν την συγκέντρωση μιας ουσίας που επιτρέπεται να ανιχνευθεί στα τρόφιμα ζωικής παραγωγής.

Μέσα στο πλαίσιο αυτό, σε σχέση με τον καθορισμό των μεθοδολογικών αρχών της εκτίμησης του κινδύνου και των συστάσεων για τη διαχείριση του κινδύνου όσον αφορά τον καθορισμό και εφαρμογή των ΑΟΚ των φαρμακολογικά δραστικών ουσιών στα κράτη-μέλη, η υιοθέτηση της καθιερωμένης αποδεκτής ημερήσιας πρόσληψης (ADI) είναι απαραίτητη. Η ADI αφορά την μέγιστη συγκέντρωση της δραστικής ουσίας που μπορεί να ανιχνευθεί σε εδώδιμα προϊόντα, η οποία εάν προσλαμβάνεται καθημερινά από τον άνθρωπο δεν προκαλεί βλάβη στον οργανισμό. Ως εκ τούτου στην εργασία αυτή, για την αξιολόγησης του κινδύνου (risk), χρησιμοποιήθηκε το νωπό χοιρινό κρέας και τα αποτελέσματα της ανάλυσης αυτού με σκοπό την μελέτη της EDI και σύγκριση της με την ADI. Αρχικά η EDI υπολογίσθηκε με βάση την συγκέντρωση κάθε ουσίας στο νωπό χοιρινό κρέας (Εξίσωση 7), για άνδρες και γυναίκες >20 ετών:

$$EDI = \frac{\textit{συγκέντρωση (μg/kg)} \times \textit{ΗΚ (g/άτομο/ημέρα)}}{\textit{β.σ. (kg)}} \qquad (7)$$

Σχετικά με την μέση τιμή βάρους σώματος, στον παρονομαστή της εξίσωσης (7), χρησιμοποιήθηκαν τα αποτελέσματα της Ευρωπαϊκής Έρευνας Υγείας που διεξήγαγε η Στατιστική Υπηρεσία Κύπρου το 2014, για άντρες και γυναίκες >20 ετών (τα αποτελέσματα επαληθεύτηκαν το 2017 χωρίς να σημειωθεί απόκλιση των τιμών), υπολογίζοντας ότι το μέσο βάρος σώματος ενός άντρα και μιας γυναίκας >20 ετών στην Κύπρο είναι αντίστοιχα **80,9Kg** και **64,5Kg**, ενώ η μέση τιμή βάρους πληθυσμού στην Κύπρο είναι 72,3Kg [Στατιστική Υπηρεσία Ευρωπαϊκή Έρευνα 2014].

Η τρέχουσα εκτίμηση της διατροφικής έκθεσης βασίστηκε στα αποτελέσματα ανίχνευσης με χημική ανάλυση, από τις 45 διερευνώμενες ουσίες, 13 καταλοίπων αντιμικροβιακών ουσιών σε δείγματα χοιρινού κρέατος στην Κύπρο, μεταξύ 2012 και 2017. Όλα τα δείγματα χοιρινού κρέατος, στα οποία ανιχνεύθηκαν κατάλοιπα αντιμικροβιακών ουσιών, σε συγκεντρώσεις πάνω από τα καθορισμένα ΑΟΚ εξαιρέθηκαν από την εκτίμηση της διατροφικής έκθεσης, δεδομένου ότι οι ΚΥ καταστρέφουν το κρέας αυτό. Συγκεκριμένα, οι ΚΥ της Κύπρου έχουν την νομική εξουσία να λαμβάνουν κατάλληλα μέτρα, περιορισμού ή απαγόρευσης της διάθεσης προϊόντων ζωικής προέλευσης στην αγορά, της παρακολούθησης, ανάκλησης, απόσυρσης και/ή καταστροφής, σε περιπτώσεις εντοπισμένων παραβιάσεων των καθορισμένων καταλοίπων για εδώδιμα προϊόντα ζωικής παραγωγής. Ιδιαίτερα, μέσω του εθνικού προγράμματος ελέγχου καταλοίπων στο χοιρινό κρέας, κάθε ζώο (δείγμα μυϊκού ιστού) εγχώριου παραγωγής υποβάλλεται σε δοκιμή για την παρουσία αντιμικροβιακών καταλοίπων. Τα ζώα κατακρατούνται εν αναμονή του αποτελέσματος της ανάλυσης δείγματος και στην περίπτωση που η συγκέντρωση των φαρμάκων υπερβαίνει τα ΑΟΚ, τότε το κρέας των ζώων αυτών καταστρέφεται και σε καμία περίπτωση δεν διατίθεται στην Κυπριακή αγορά προς κατανάλωση. Επιπλέον, η αμοξυκιλλίνη εξαιρέθηκε από την μελέτη της διατροφικής έκθεσης, καθώς ανιχνεύθηκε μόνο τα έτη 2015 και 2016, σε

συγκεντρώσεις που υπερέβαιναν το ΑΟΚ (50 μg.kg^{-1}), με εύρος συγκέντρωσης 73,7 έως 547 μg·kg^{-1}. Η διυδροστρεπτομυκίνη και η φλουμεκίνη επίσης εξαιρέθηκαν από την εκτίμηση της διατροφικής έκθεσης, αφού ανιχνεύθηκαν μόνο μία φορά κατά τη διάρκεια του 2012 και του 2013 σε δείγματα ωμού χοιρινού κρέατος. Τέλος, παρόλο που η σουλφομεθοξαζόλη ανιχνεύθηκε το 2012 με εύρος συγκέντρωσης 33,2 έως 536 μg·kg^{-1}, το 2014 με εύρος συγκέντρωσης 1,45 έως 69,8 μg·kg^{-1} και το 2015 με εύρος συγκέντρωσης 1,45 έως 51,8 μg.kg^{-1}, δεν συμπεριλήφθηκε στην εκτίμηση της διατροφικής έκθεσης μιας και η αποδεκτή ημερήσια πρόσληψη (ADI) για την σουλφαμεθοξαζόλη δεν καθορίζεται.

Στην συνέχεια, ο υπολογισμός της EDI ως % της ADI έγινε σύμφωνα με την εξίσωση 8. Μια αναλογία EDI προς ADI μικρότερη από την μονάδα σημαίνει ότι η εκτιμώμενη ημερήσια πρόσληψη καταλοίπων αντιμικροβιακών ουσιών είναι χαμηλότερη από την αποδεκτή ημερήσια πρόσληψη, άρα δεν υπάρχει κίνδυνος.

$$EDI\ \text{ως}\ \%\ \text{της}\ ADI = \frac{EDI}{ADI} \times 100 \qquad (8)$$

Πίνακας 25: Εκτιμώμενη ημερήσια πρόσληψη (EDI) καταλοίπων αντιμικροβιακών φαρμάκων, μέσω της κατανάλωσης χοιρινού κρέατος στην Κύπρο, ως ποσοστό της αποδεκτής ημερήσιας πρόσληψης (ADI) για <u>άντρες</u> >20 ετών (μέσο σωματικό βάρος 80,9 kg).

Κατάλοιπο/ ADI (μg / kg σ.β.)	**EDI ως % της ADI**					
	2012	**2013**	**2014**	**2015**	**2016**	**2017**
Σουλφαδιαζίνη/ 0 – 20	0,11	0,03	0,09	0,01	0,01	0,08
Σουλφαδιμιδίνη/ 0 – 50	0,01	0,01	0,01	0,01	0,03	< LOD
Σουλφαμεθοξαζόλη/ [i]	Ανιχνεύθηκε	< LOD	Ανιχνεύθηκε	Ανιχνεύθηκε	< LOD	< LOD
Τριμεθοπρίμη/ 12.5	0,11	0,1	0,22	0,1	< LOD	0,09
Λινκομυκίνη/ 0 – 30	< LOD	0,27	0,08	0,03	< LOD	0,22
Χλωροτετρακυκλίνη/ 0 – 30	0,15	0,09	0,15	0,07	< LOD	< LOD
Δοξυκυκλίνη/ 0 – 3	0,71	0,77	< LOD	< LOD	< LOD	1,47
Οξυτετρακυκλίνη/ 0 – 30	0,09	0,04	0,11	0,06	< LOD	0,04
Τετρακυκλίνη/0 – 30	< LOD	< LOD	0,05	< LOD	< LOD	< LOD
Αμοξικιλλίνη/ 0 – 0.07	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
Τιλμικοσίνη/ 0 – 40	0,01	< LOD	< LOD	0,02	0,01	0,01

[i] Η ADI δεν καθορίζεται για την σουλφαμεθοξαζόλη.

Πίνακας 26: Εκτιμώμενη ημερήσια πρόσληψη (EDI) καταλοίπων αντιμικροβιακών φαρμάκων, μέσω της κατανάλωσης χοιρινού κρέατος στην Κύπρο, ως ποσοστό της αποδεκτής ημερήσιας πρόσληψης (ADI) για <u>γυναίκες</u> >20 ετών (μέσο σωματικό βάρος 64,57 kg).

Κατάλοιπο/ ADI	**EDI ως % της ADI**

(μg / kg σ.β.)	2012	2013	2014	2015	2016	2017
Σουλφαδιαζίνη/ 0 – 20	0,4	0,03	0,11	0,02	0,01	0,1
Σουλφαδιμιδίνη/ 0 – 50	0,02	0,01	0,01	0,02	0,04	< LOD
Σουλφαμεθοξαζόλη/ [i]	Ανιχνεύθηκε	< LOD	Ανιχνεύθηκε	Ανιχνεύθηκε	< LOD	< LOD
Τριμεθοπρίμη/ 12.5	0,14	0,12	0,13	0,13	< LOD	0,11
Λινκομυκίνη/ 0 – 30	< LOD	0,34	0,05	0,04	< LOD	0,28
Χλωροτετρακυκλίνη/ 0 – 30	0,19	0,11	0,19	0,09	< LOD	< LOD
Δοξυκυκλίνη/ 0 – 3	0,89	0,97	< LOD	< LOD	< LOD	1,84
Οξυτετρακυκλίνη/ 0 – 30	0,11	0,05	0,15	0,07	< LOD	0,05
Τετρακυκλίνη/0 – 30	< LOD	< LOD	0.06	< LOD	< LOD	< LOD
Αμοξικιλλίνη/ 0 – 0.07	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
Τιλμικοσίνη/ 0 – 40	0,01	< LOD	< LOD	0,02	0,01	0,01

[i] Η ADI δεν καθορίζεται για την σουλφαμεθοξαζόλη.

Τα αποτελέσματα των Πινάκων 25 & 26, όσον αφορά τον κίνδυνο πρόσληψης αντιμικροβιακών ουσιών, μας δίνουν μια θετική εικόνα της διατροφικής έκθεσης των ενήλικων >20 ετών, τη διερευνώμενη χρονική περίοδο στην Κύπρο. Συγκεκριμένα, τα αποτελέσματα δείχνουν ότι η EDI (ως % της ADI) δεν ξεπερνά την μέγιστη ADI για καμία από τις διερευνώμενες ουσίες.

6.6.6 Υπολογισμός της EDI, αντιμικροβιακών καταλοίπων για παιδιά και εφήβους, στην Κύπρο.

Σχετικά με την μέση τιμή βάρους σώματος, στον παρονομαστή της εξίσωσης (8) και σε σχέση με την ετερογενή φύση του πληθυσμού σε φύλο και ηλικία, χρησιμοποιήθηκαν τα αποτελέσματα της έρευνας (2000-2010) που διεξήγαγε το Ερευνητικό και Εκπαιδευτικό Ινστιτούτο Υγεία του Παιδιού (ΕΕΙΥΠ) [Savvas C. Savva κ.ά. 2014], έτσι ώστε να εκτιμηθεί ο επιπολασμός του υπέρβαρου και της παχυσαρκίας σε παιδιά και έφηβους 6-17 ετών στην Κύπρο.

$$EDI = \frac{\textit{συγκέντρωση (μg/kg)} \times \textit{ΣΗΚ (g/άτομο/ημέρα)}}{\textit{β.σ.}_{\textit{ανά φύλο και ηλικία}}\ \textit{(kg)}} \qquad (8)$$

Στην δική μας έρευνα, υπολογίστηκε ο γεωμετρικός μέσος προς υπολογισμό του μέσου βάρους παιδιών, αγοριών και κοριτσιών σχολικής ηλικίας, διαχωρίζοντας τα σε τρείς ηλικιακές ομάδες 6-9 χρονών, 10-13 χρονών και 14-17 χρονών όπως φαίνεται στον Πίνακα 27.

Πίνακας 27: Γεωμετρικός Μέσος, σε κιλά (kg), του βάρους παιδιών ηλικίας 6-9 ετών και έφηβων ηλικίας 6-17 ετών, στην Κύπρο {αποτελέσματα μελέτης: *Savva SC et al, Obesity Research & Clinical Practice (2014) 8, e426—e434* [Savva κ.ά. 2014]}.

Αγόρια **Κορίτσια**

Ηλικία (έτη)	Βάρος (kg) 50th percentile (median)	Γ.Μ.*	Ηλικία (έτη)	Βάρος (kg) 50th percentile (median)	Γ.Μ.
6	24		6	23	
7	26	**28,24**	7	25	**27,29**
8	30		8	29	
9	34		9	33,3	
10	38		10	37	
11	44	**45,17**	11	43	**44,20**
12	47		12	48	
13	53		13	50	
14	57		14	52	
15	66,5	**65,39**	15	53	**54,46**
16	67		16	57	
17	72		17	56	

*Γ.Μ. – Γεωμετρικός Μέσος σε kg.

Τα αποτελέσματα της EDI αντιμικροβιακών ουσιών στην Κύπρο μεταξύ 2012 και 2017, παιδιών και εφήβων γένους αρσενικού ανά μg/ kg σ.β./ ημέρα, αναγράφονται στον Πίνακα 28 και αντίστοιχα παιδιών και εφήβων γένους θηλυκού, αναγράφονται στον Πίνακα 29.

Πίνακας 28: Τιμές εκτιμώμενης ημερήσιας πρόσληψης (EDI) αντιμικροβιακών ουσιών σε παιδιά και έφηβους γένους αρσενικού, ανά μg / kg σ.β. / ημέρα, στην Κύπρο μεταξύ 2012 και 2017.

Κατάλοιπο	2012			2013			2014		
	6-9 ετών	10-13 ετών	14-17 ετών	6-9 ετών	10-13 ετών	14-17 ετών	6-9 ετών	10-13 ετών	14-17 ετών
Σουλφαδιαζίνη	0,0861	0,0539	0,0374	0,0230	0,0144	0,0100	0,0667	0,0418	0,0290
Σουλφαδιμιδίνη	0,0351	0,0220	0,0152	0,0233	0,0146	0,0101	0,0167	0,0105	0,0073
Σουλφαμεθοξαζόλη	0,1026	0,0643	0,0446	< LOD	< LOD	< LOD	0,0124	0,0078	0,0054
Τριμεθοπρίμη	0,0520	0,0326	0,0226	0,0469	0,0294	0,0204	0,1038	0,0650	0,0451
Λινκομυκίνη	< LOD	< LOD	< LOD	0,3047	0,1909	0,1323	0,0942	0,0590	0,0409
Χλωροτετρακυκλίνη	0,1726	0,1081	0,0749	0,0999	0,0626	0,0434	0,1707	0,1069	0,0741
Δοξυκυκλίνη	0,0798	0,0500	0,0346	0,0865	0,0542	0,0376	< LOD	< LOD	< LOD
Οξυτετρακυκλίνη	0,1057	0,0662	0,0459	0,0514	0,0322	0,0223	0,1316	0,0824	0,0571
Τετρακυκλίνη	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	0,0579	0,0363	0,0252

Τιλμικοσίνη	0,0175	0,0110	0,0076	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
Κατάλοιπο	**2015**			**2016**			**2017**		
	6-9 ετών	**10-13 ετών**	**14-17 ετών**	**6-9 ετών**	**10-13 ετών**	**14-17 ετών**	**6-9 ετών**	**10-13 ετών**	**14-17 ετών**
Σουλφαδιαζίνη	0,0139	0,0087	0,0060	0,0104	0,0065	0,0045	0,0642	0,0402	0,0279
Σουλφαδιμιδίνη	0,0326	0,0204	0,0142	0,0579	0,0363	0,0252	< LOD	< LOD	< LOD
Σουλφαμεθοξαζόλη	0,0078	0,0049	0,0034	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
Τριμεθοπρίμη	0,0483	0,0303	0,0210	< LOD	< LOD	< LOD	0,0418	0,0262	0,0182
Λινκομυκίνη	0,0400	0,0250	0,0174	< LOD	< LOD	< LOD	0,2519	0,1578	0,1094
Χλωροτετρακυκλίνη	0,0857	0,0537	0,0372	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
Δοξυκυκλίνη	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	0,1642	0,1028	0,0713
Οξυτετρακυκλίνη	0,0663	0,0415	0,0288	< LOD	< LOD	< LOD	0,0465	0,0291	0,0202
Τετρακυκλίνη	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
Τιλμικοσίνη	0,0269	0,0169	0,0117	0,0106	0,0066	0,0046	0,0210	0,0132	0,0091

[i] LOD: όριο ανίχνευσης

Πίνακας 29: Τιμές εκτιμώμενης ημερήσιας πρόσληψης (EDI) αντιμικροβιακών ουσιών σε παιδιά και έφηβους γένους θηλυκού, ανά μg / kg σ.β. / ημέρα, στην Κύπρο μεταξύ 2012 και 2017.

Κατάλοιπο	**2012**			**2013**			**2014**		
	6-9 ετών	**10-13 ετών**	**14-17 ετών**	**6-9 ετών**	**10-13 ετών**	**14-17 ετών**	**6-9 ετών**	**10-13 ετών**	**14-17 ετών**
Σουλφαδιαζίνη	0,0889	0,0551	0,0450	0,0238	0,0148	0,0121	0,0689	0,0427	0,0349
Σουλφαδιμιδίνη	0,0362	0,0225	0,0183	0,0240	0,0149	0,0122	0,0173	0,0107	0,0087
Σουλφαμεθοξαζόλη	0,1059	0,0657	0,0537	< LOD	< LOD	< LOD	0,0128	0,0080	0,0065
Τριμεθοπρίμη	0,0537	0,0333	0,0272	0,0484	0,0300	0,0245	0,1072	0,0665	0,0543
Λινκομυκίνη	< LOD	< LOD	< LOD	0,3147	0,1952	0,1594	0,0973	0,0604	0,0493
Χλωροτετρακυκλίνη	0,1782	0,1105	0,0902	0,1032	0,0640	0,0523	0,1763	0,1093	0,0893
Δοξυκυκλίνη	0,0824	0,0511	0,0417	0,0893	0,0554	0,0452	< LOD	< LOD	< LOD
Οξυτετρακυκλίνη	0,1091	0,0677	0,0553	0,0531	0,0329	0,0269	0,1358	0,0843	0,0688
Τετρακυκλίνη	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	0,0598	0,0371	0,0303
Τιλμικοσίνη	0,0181	0,0112	0,0092	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
Κατάλοιπο	**2015**			**2016**			**2017**		
	6-9 ετών	**10-13 ετών**	**14-17 ετών**	**6-9 ετών**	**10-13 ετών**	**14-17 ετών**	**6-9 ετών**	**10-13 ετών**	**14-17 ετών**
Σουλφαδιαζίνη	0,0143	0,0089	0,0073	0,0107	0,0067	0,0054	0,0663	0,0411	0,0336
Σουλφαδιμιδίνη	0,0337	0,0209	0,0171	0,0598	0,0371	0,0303	< LOD	< LOD	< LOD
Σουλφαμεθοξαζόλη	0,0080	0,0050	0,0041	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD

Τριμεθοπρίμη	0,0499	0,0310	0,0253	< LOD	< LOD	< LOD	0,0432	0,0268	0,0219
Λινκομυκίνη	0,0413	0,0256	0,0209	< LOD	< LOD	< LOD	0,2601	0,1613	0,1317
Χλωροτετρακυκλίνη	0,0885	0,0549	0,0448	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
Δοξυκυκλίνη	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	0,1695	0,1052	0,0859
Οξυτετρακυκλίνη	0,0685	0,0425	0,0347	< LOD	< LOD	< LOD	0,0480	0,0298	0,0243
Τετρακυκλίνη	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
Τιλμικοσίνη	0,0278	0,0172	0,0141	0,0110	0,0068	0,0055	0,0217	0,0135	0,0110

[i]LOD: όριο ανίχνευσης

6.6.7 Υπολογισμός της EDI, αντιμικροβιακών καταλοίπων για παιδιά και εφήβους, ως ποσοστό (%) της ADI και σύγκριση με ενήλικες >18 ετών στην Κύπρο.

Στην μελέτη μας, για την εκτίμηση της διατροφικής έκθεσης παιδιών και εφήβων των δύο φύλων (Πίνακας 30 & 31), χρησιμοποιήθηκε ο μέγιστος γεωμετρικός μέσος συγκέντρωσης των ανιχνευόμενων καταλοίπων αντιμικροβιακών φαρμάκων, στο σχετικό έτος, ως ένα πιο αντιπροσωπευτικό *'worse case scenario'*. Παράλληλα, γίνεται σύγκριση των αποτελεσμάτων με ενήλικες >18 ετών. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον Πίνακα 30 για παιδιά ηλικίας 6-9 ετών, έφηβους ηλικίας 10-17 ετών και ενήλικες >18 ετών, για τα δύο φύλα και παρουσιάζονται στον Πίνακα 30 & 31.

Πίνακας 30: Τιμές της εκτιμώμενης ημερήσιας πρόσληψης (EDI) και επί της % ποσοστιαία αναλογία της EDI ως προς την ADI για ενήλικες >18 ετών, παιδιά και εφήβους γένους <u>αρσενικού</u>, χρησιμοποιώντας τον μέγιστο γεωμετρικό μέσο συγκέντρωσης στο σχετικό έτος.

			EDI (μg/ kg σ.β./ ημέρα)			EDI ως ποσοστό (%) της ADI[iii]			
Κατάλοιπο / ADI (μg/kg σ.β.)	**Έτος[i]**	**Γ.Μ.[ii] (μg/kg)**	**6-9 ετών**	**10-13 ετών**	**14-17 ετών**	**6-9 ετών**	**10-13 ετών**	**14-17 ετών**	**Ενήλικες >18 ετών**
Σουλφαδιαζίνη / 0 - 20	2012	42.2	0.086	0.054	0.037	0.43	0.27	0.19	0.15
Σουλφαδιμιδίνη / 0-50	2016	28.4	0.058	0.036	0.025	0.12	0.07	0.05	0.04
Σουλφαμεθοξαζόλη [iv]	2012	50.3	0.103	0.064	0.045	-	-	-	-
Τριμεθοπρίμη / 0 - 12.5	2014	50.9	0.104	0.065	0.045	0.83	0.52	0.36	0.29
Λινκομυκίνη / 0 - 30	2013	149.4	0.305	0.191	0.132	1.02	0.64	0.44	0.36
Χλωροτετρακυκλίνη / 0-30	2012	84.6	0.173	0.108	0.075	0.58	0.36	0.25	0.20
Δοξυκυκλίνη /0 – 3	2017	80.5	0.164	0.103	0.071	**5.47**	**3.43**	2.38	1.93
Οξυτετρακυκλίνη / 0 – 30	2014	64.5	0.132	0.082	0.057	0.44	0.27	0.19	0.15
Τετρακυκλίνη /0 – 30	2014	28.4	0.058	0.036	0.025	0.19	0.12	0.08	0.07
Τιλμικοσίνη / 0 – 40	2015	13.2	0.027	0.017	0.012	0.07	0.04	0.03	0.02

[i] Έτος μέγιστης συγκέντρωσης ανίχνευσης αντιμικροβιακών ουσιών

[ii] Γεωμετρικός Μέσος της συγκέντρωσης των ανιχνευόμενων ουσιών
[iii] Η αναλογία της EDI ως % της ADI, μικρότερη από 100% σημαίνει ότι η εκτιμώμενη πρόσληψη είναι χαμηλότερη από την αποδεκτή πρόσληψη
[iv] Η ADI δεν καθορίζεται για την σουλφαμεθοξαζόλη

Πίνακας 31: Τιμές της εκτιμώμενης ημερήσιας πρόσληψης (EDI) και επί της % ποσοστιαία αναλογία της EDI ως προς την ADI για ενήλικες >18 ετών, παιδιά και εφήβους γένους θηλυκού, χρησιμοποιώντας τον μέγιστο γεωμετρικό μέσο συγκέντρωσης στο σχετικό έτος.

			EDI (μg/ kg σ.β./ ημέρα)			EDI ως ποσοστό (%) της ADI[iii]			
Κατάλοιπο / ADI (μg/kg σ.β.)	**Έτος[i]**	**Γ.Μ.[ii] (μg/kg)**	**6-9 ετών**	**10-13 ετών**	**14-17 ετών**	**6-9 ετών**	**10-13 ετών**	**14-17 ετών**	**Ενήλικες >18 ετών**
Σουλφαδιαζίνη / 0 - 20	2012	42.2	0.089	0.055	0.045	0.44	0.28	0.23	0.19
Σουλφαδιμιδίνη / 0-50	2016	28.4	0.060	0.037	0.030	0.12	0.07	0.06	0.05
Σουλφαμεθοξαζόλη[iv]	2012	50.3	0.106	0.066	0.054	-	-	-	-
Τριμεθοπρίμη / 0 - 12.5	2014	50.9	0.107	0.066	0.054	0.86	0.53	0.43	0.37
Λινκομυκίνη / 0 - 30	2013	149.4	0.315	0.195	0.159	1.05	0.65	0.53	0.45
Χλωροτετρακυκλίνη / 0-30	2012	84.6	0.178	0.111	0.090	0.59	0.37	0.30	0.25
Δοξυκυκλίνη /0 – 3	2017	80.5	0.170	0.105	0.086	**5.65**	**3.51**	2.86	2.41
Οξυτετρακυκλίνη / 0 – 30	2014	64.5	0.136	0.084	0.069	0.45	0.28	0.23	0.19
Τετρακυκλίνη /0 – 30	2014	28.4	0.060	0.037	0.030	0.20	0.12	0.10	0.09
Τιλμικοσίνη / 0 – 40	2015	13.2	0.028	0.017	0.014	0.07	0.04	0.04	0.03

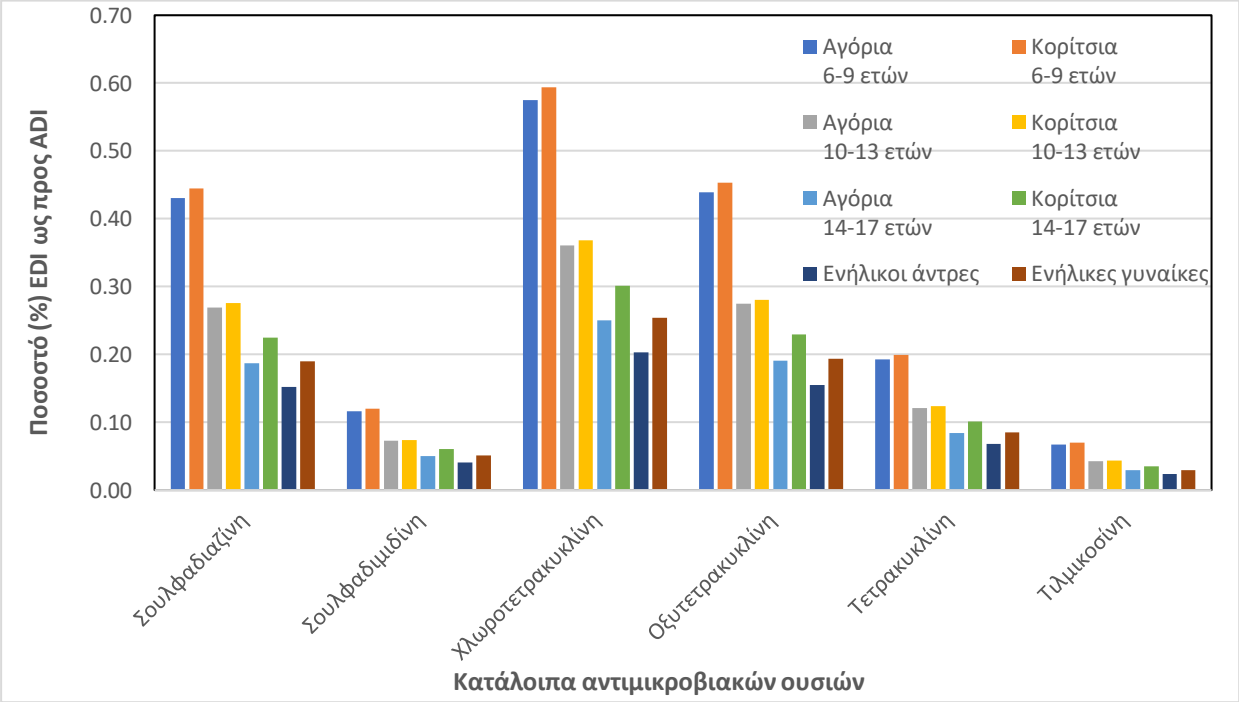
[i] Έτος μέγιστης συγκέντρωσης ανίχνευσης αντιμικροβιακών ουσιών
[ii] Γεωμετρικός Μέσος της συγκέντρωσης των ανιχνευόμενων ουσιών
[iii] Η αναλογία της EDI ως ποσοστό (%) της ADI, μικρότερη από 100% σημαίνει ότι η εκτιμώμενη πρόσληψη είναι χαμηλότερη από την αποδεκτή πρόσληψη.
[iv] Η ADI δεν καθορίζεται για την σουλφαμεθοξαζόλη

Σε σχέση με τους δύο πιο πάνω Πίνακες (Πίνακας 30 & 31), οι μέγιστες τιμές της EDI, για τις τρείς ηλικιακές ομάδες παιδιών και εφήβων (6-9, 10-13 και 14-17 ετών), παρατηρήθηκαν το 2013 για τη λινκομυκίνη με εύρος τιμών 0,132 έως 0,305 μg/ kg σ.β./ ημέρα για τα αγόρια και 0,159 έως 0,315 μg/ kg σ.β./ ημέρα για τα κορίτσια. Επιπλέον, η χλωροτετρακυκλίνη και η δοξυκυκλίνη παρουσίασαν τη δεύτερη και τρίτη υψηλότερη τιμή EDI, αντίστοιχα. Συγκεκριμένα, οι μέγιστες τιμές της EDI για τη χλωροτετρακυκλίνη παρατηρήθηκαν το 2012 και κυμάνθηκαν από 0,075 έως 0,173 μg/ kg σ.β./ ημέρα για τα αγόρια και 0,09 έως 0,178 μg/ kg σ.β./ ημέρα για τα κορίτσια. Όσον αφορά τη δοξυκυκλίνη, οι μέγιστες τιμές της EDI παρατηρήθηκαν το 2017 και κυμάνθηκαν από 0,071 έως 0,164 μg/ kg σ.β./ ημέρα για τα αγόρια και 0,086 έως 0,170 μg/ kg σ.β./ ημέρα για τα κορίτσια.

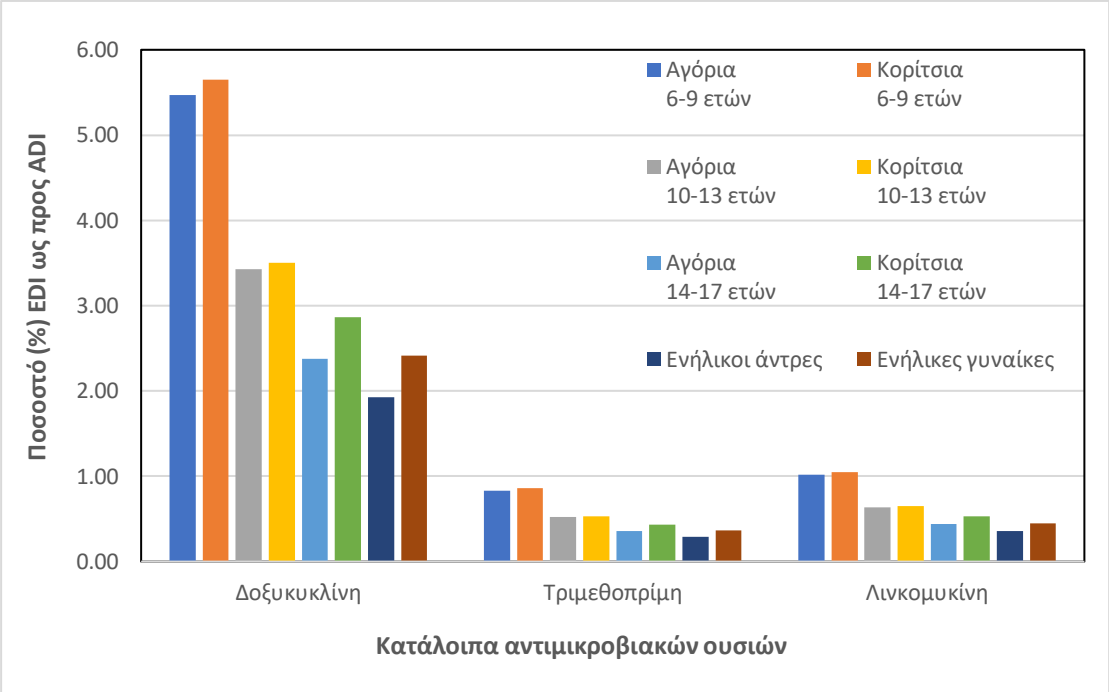
Όσον αφορά τις τιμές της EDI ως % της ADI, τα αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι με εξαίρεση τη δοξυκυκλίνη, καμία άλλη ουσία δεν ξεπερνά την μέγιστη ADI. Συγκεκριμένα, στην περίπτωση της δοξυκυκλίνης, φαίνεται καθαρά ότι η EDI ως % της ADI υπερβαίνει στα αγόρια 6-9 και 10-13 ετών, την μέγιστη αποδεκτή ημερήσια πρόσληψη {0-3 $\mu g \cdot kg^{-1}$ σ.β. [CVMP 1996]}, με ποσοστό 5,47 έως 3,43 μg/ kg σ.β./ ημέρα αντίστοιχα (Πίνακας 30). Το ίδιο συμβαίνει και στα κορίτσια

6-9 και 10-13 ετών, όπου η EDI ως % της ADI, πάλι για τη δοξυκυκλίνη {0-3 μg·kg^{-1} σ.β. [CVMP 1996]}, υπερβαίνει την μέγιστη αποδεκτή ημερήσια πρόσληψη με ποσοστό 5,65 και 3,51 μg/ kg σ.β./ ημέρα αντίστοιχα (Πίνακας 31). Συνεπώς ο τοξικολογικός κίνδυνος της πρόσληψης καταλοίπων αντιμικροβιακών ουσιών, μέσω του χοιρινού κρέατος στην Κύπρο δεν είναι σημαντικός. Εντούτοις, παρατηρούμε ότι το χοιρινό κρέας που καταλήγει στο πιάτο μας, δεν είναι απαλλαγμένο από αντιμικροβιακές ουσίες ενισχύοντας με την πάροδο του χρόνου το φαινόμενο της μικροβιακής αντοχής.

Υπολογίζοντας την EDI αλλά και την EDI ως % της ADI συγκριτικά με ενήλικες >18 ετών (Διάγραμμα 8 & 9), μια άλλη σημαντική παρατήρηση προκύπτει που τεκμηριώνεται από τα αποτελέσματα των Πινάκων 30 & 31. Συγκεκριμένα, φαίνεται ότι οι τιμές αυτές ήταν γενικά υψηλότερες στα παιδιά (αγόρια και κορίτσια) ηλικίας 6-9 ετών, σε σύγκριση με τους έφηβους (10-17 ετών) και ενήλικες >18 ετών και στα δύο φύλα. Στη διεθνή βιβλιογραφία, πολλές μελέτες καταδεικνύουν ότι τα παιδιά εκτίθενται διαρκώς, μέσω της διατροφικής πρόσληψης, σε χαμηλά επίπεδα συγκέντρωσης αντιμικροβιακών καταλοίπων [Ji κ.ά. 2010a, Ji κ.ά. 2010b]. Επιστημονικά πειράματα σε ποντίκια αποκαλύπτουν ότι η συνεχής έκθεση σε χαμηλές συγκεντρώσεις υπολειμματικών αντιμικροβιακών καταλοίπων, ιδιαίτερα κατά την ηλικία ανάπτυξης, έχει δυσμενή επίδραση στον μεταβολισμό, την εντερική μικροχλωρίδα, τη διαδικασία διαφοροποίησης των λιποκυττάρων και την ανάπτυξη του λιπώδους ιστού που οδηγεί στο φαινότυπο του ώριμου λιποκυττάρου (adipogenesis), προκαλώντας παχυσαρκία και διαβήτη [Cox and Blaser 2014, Cox κ.ά. 2014]. Τα αποτελέσματα όπως αναγράφονται στους Πίνακες 30 & 31 της EDI ως % της ADI, για όλες τις πληθυσμιακές ομάδες, παρουσιάζονται στο Διάγραμμα 8 για την σουλφαδιαζίνη, σουλφαδιμιδίνη, χλωροτετρακυκλίνη, οξυτετρακυκλίνη, τετρακυκλίνη, τιλμικοσίνη και στο Διάγραμμα 9 για τη δοξυκυκλίνη, τριμεθοπρίμη και λινκομυκίνη.



Διάγραμμα 8. EDI ως % της ADI, 6 αντιμικροβιακών καταλοίπων κτηνιατρικής χρήσης που ανιχνεύθηκαν σε νωπό χοιρινό κρέας, για παιδιά, εφήβους και ενήλικες του Κυπριακού πληθυσμού.



Διάγραμμα 9. EDI ως % της ADI, των αντιμικροβιακών καταλοίπων δοξυκυκλίνης, τριμεθοπρίμης και λινκομυκίνης, όπως ανιχνεύθηκαν σε νωπό χοιρινό κρέας, για παιδιά, εφήβους και ενήλικες του Κυπριακού πληθυσμού.

6.7 ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η έρευνα αυτή πραγματεύεται την εκτίμηση των επιπέδων καταλοίπων αντιμικροβιακών φαρμάκων κτηνιατρικής χρήσης, στο νωπό χοιρινό κρέας σε όλες της επαρχίες της Κυπριακής Δημοκρατίας, για έξι συναπτά έτη από το 2012 έως το 2017. Στο χρονικό αυτό διάστημα 15,484 δείγματα νωπού χοίρειου μυϊκού ιστού περισυλλέχθηκαν δειγματοληπτικά, εκ των οποίων 1,766 (11,4%) δείγματα βρέθηκαν ύποπτα, στο ΕΕΤΖΠ των ΚΥ, για υπολείμματα αντιμικροβιακών ουσιών με τη βιολογική μέθοδο διαλογής Premi-Test. Στην συνέχεια τα 1,766 ύποπτα δείγματα ελέγχθηκαν με χημική ανάλυση LC-MS/MS στο εργαστήριο αναφοράς του ΓΧΚ, για κατάλοιπα 45 διερευνώμενων αντιμικροβιακών ουσιών. Εκ το σύνολο των ύποπτων δειγμάτων, που ελέγχθηκαν με χρωματογραφική ανάλυση, θετικά βρέθηκαν μόνο 596 δείγματα με ποσοστό ανίχνευσης 3,8%. Στα 596 θετικά δείγματα, ανιχνεύθηκαν μόνο 13 ουσίες: η σουλφαδιαζίνη, σουλφαδιμιδίνη, σουλφαμεθοξαζόλη, τριμεθοπρίμη, λινκομυκίνη, οξυτετρακυκλίνη, χλωροτετρακυκλίνη, δοξυκυκλίνη, τετρακυκλίνη, αμοξικιλλίνη, τιλμικοσίνη, διυδροστρεπτομυκίνη και η φλουμεκίνη. Οι συνέπειες οι οποίες προκύπτουν από την παρουσία καταλοίπων αντιμικροβιακών ουσιών στο χοιρινό κρέας, κρίνονται σημαντικές με κυριότερη τη δημιουργία και επιλογή ανθεκτικών στελεχών βακτηρίων, που μπορούν να περάσουν στον άνθρωπο μέσω της τροφικής αλυσίδας. Επιπλέον, η κατανάλωση αντιμικροβιακών ουσιών, ακόμα και σε ίχνη, μέσω των τροφίμων ζωικής προέλευσης μπορεί να έχει δυσμενείς συνέπειες στην εντερική μικροχλωρίδα του ανθρώπου, ένα

σημαντικό συστατικό της ανθρώπινης φυσιολογίας. Ειδικότερα, η μικροχλωρίδα λειτουργεί αφενός μεν ως εμπόδιο ενάντια στην αποίκιση του γαστρεντερικού συστήματος από παθογόνα βακτήρια [Vollard και Clasener 1994], αφετέρου διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην πέψη των τροφίμων [Cemiglia και Kotarski 1999]. Τέλος μελέτες έδειξαν ότι, κατάλοιπα αντιμικροβιακών ουσιών που καταναλώνονται από βρώσιμους ζωικούς ιστούς, ευαισθητοποιούν και/ή προκαλούν αλλεργικές αντιδράσεις στους ανθρώπους [Adkinson 1980], συνδέονται με την παιδική παχυσαρκία [Ajslev, Bailey] και διαβήτη τύπου 2 με γενικότερη απορρύθμιση της ομοιόσταση γλυκόζης [Chou].

Όσον αφορά την συχνότητα εμφάνισης αυτών των καταλοίπων, ο μεγαλύτερος αριθμός θετικών δειγμάτων αφορά την ανίχνευση σουλφοναμιδών. Από τις σουλφοναμίδες, μεγαλύτερο ποσοστό ανίχνευσης (34,4%) εκ των θετικών δειγμάτων παρουσίασε η σουλφαδιαζίνη η οποία ανιχνεύθηκε σε 205 δείγματα, με εύρος συγκέντρωσης 4,73 έως 978μg·kg^{-1} και ποσοστό 75,1% των αποτελεσμάτων κάτω από το ΑΟΚ. Τα αποτελέσματα της εν λόγω έρευνας, καθιστούν σαφές ότι το πρόβλημα της αυξημένης χρήσης αντιμικροβιακών ουσιών και κατ΄επέκταση της επικείμενης μικροβιακής αντοχής, εστιάζεται κυρίως στη χρήση σουλφοναμιδών, αφού εκ των 596 θετικών δειγμάτων 327 (54,8%) δείγματα βρέθηκαν θετικά ειδικά σε σουλφοναμίδες. Ωστόσο, παρόλο που το ποσοστό των δειγμάτων με συγκέντρωση καταλοίπων σε σουλφοναμίδες πάνω από το ΑΟΚ ήταν μικρό (25% - σουλφαδιαζίνη, 23% - σουλφαδιμιδίνη και 19,3% - σουλφαμεθοξαζόλη), εντούτοις κάποιες χρονιές οι συγκεντρώσεις που ανιχνεύθηκαν ήταν κατά πολύ μεγαλύτερες από το καθιερωμένο για τις σουλφοναμίδες ΑΟΚ (100 μg·kg^{-1}), γεγονός που μας επιτρέπει να συμπεράνουμε είτε την υπέρμετρη χρήση των φαρμάκων αυτών, είτε την μη τήρηση των ενδεδειγμένων χρόνων αναμονής για το κρέας. Συγκεκριμένα, η περίπτωση αυτή αφορά το 2015 και 2016 με μέγιστη συγκέντρωση καταλοίπων για την σουλφαδιμιδίνη στο κρέας 6924 μg·kg^{-1} και 1725 μg·kg^{-1} αντίστοιχα. Η υπέρμετρη χρήση των σουλφοναμιδών στην κτηνιατρική θεραπευτική, κυρίως μέσω της ενσωμάτωσης τους στις ζωοτροφές, οφείλεται ιδιαίτερα στη διαπίστωση της μεγαλύτερης δραστικότητα τους όταν χορηγούνται συνδυαστικά με τριμεθοπρίμη, είτε όσον αφορά την πρόληψη διάφορων ασθενειών, είτε όσον αφορά τη βελτίωση και αύξηση της απόδοσης των παραγωγικών ζώων.

Σε παγκόσμιο επίπεδο, η εντατική χρήση αντιμικροβιακών ουσιών και η εμφάνιση αυξημένων συγκεντρώσεων καταλοίπων στους ιστούς των παραγωγικών ζώων και κατ΄επέκταση στα τρόφιμα ζωικής προέλευσης, ήταν μοιραίο επακόλουθο και ο προάγγελος των δυσμενών επιπτώσεων για τη δημόσια υγεία. Έτσι η ανεξέλεγκτη αύξηση των τροφολοιμώξεων από *Salmonella DT104* τα τελευταία 10 χρόνια, αποτελεί ένα γεγονός που σχετίστηκε άμεσα με την αύξηση της ανθεκτικότητας των μικροοργανισμών εν τη παρουσία σουλφοναμιδών [Τυρπένου κ.ά. 1998, 49(2): 115-127]. Η διεθνής βιβλιογραφία αποκαλύπτει παρόμοια αποτελέσματα, σε σχετική έρευνα στο Ηνωμένο Βασίλειο, όπου το 91% των θετικών σε αντιμικροβιακούς παράγοντες δειγμάτων αφορούσαν το χοιρινό κρέας, ενώ από όλα τα ζώα που βρέθηκαν θετικά σε σουλφοναμίδες στο 97% των δειγμάτων ανιχνεύθηκαν κατάλοιπα σουλφαδιμιδίνης. Οι αυξημένες αυτές συγκεντρώσεις της σουλφαδιμιδίνης στους ζωικούς ιστούς, αποδόθηκαν στην μη τήρηση του μεγάλου χρόνου

αναμονής για το κρέας, που είναι τουλάχιστον 10 ημέρες. Επιπλέον, η ιδιότητα της σουλφαδιμιδίνης να προσκολλάται στα τοιχώματα των μεταλλικών τμημάτων των μηχανημάτων ανάμιξης της ζωοτροφής, με αποτέλεσμα να ενσωματώνεται στη κανονική ζωοτροφή μέσω των υπολειμμάτων του φαρμακευτικού προμίγματος που προηγήθηκε για την παρασκευή φαρμακούχου ζωοτροφής, θεωρείται ακόμη ένας λόγος της υψηλής ανίχνευσης της ουσίας αυτής. Τέλος, ένας ακόμη παράγοντας που συντελεί στην ανίχνευση υψηλών συγκεντρώσεων καταλοίπων σουλφαδιμιδίνης, αποτελεί το γεγονός ότι φαρμακοκινητικά η σουλφαδιμιδίνη έχει καλύτερη απορρόφηση από τις υπόλοιπες σουλφοναμίδες με μεγαλύτερο χρόνο ημιζωής, γεγονός που εξηγεί και την επίμονη παραμονή της στους ιστούς για μακρό χρονικό διάστημα [Τυρπένου κ.ά. 1998, 49(2): 115-127]. Πρέπει ακόμη να προσθέσουμε, ότι η σουλφαδιμιδίνη δεν επηρεάζεται από την αύξηση της θερμοκρασίας κατά το μαγείρεμα. Αντίθετος, κατά τη συντήρηση (κατάψυξη) του τρόφιμου η παρατηρούμενη πτώση της συγκέντρωσης της ουσίας (σχηματισμός μεταβολίτη) διαρκεί μέχρι την κατανάλωση του, αφού η ουσία υπό την επίδραση του όξινου pH στο στομάχι επανέρχεται στα αρχικά της επίπεδα (επανασχηματισμός της μητρικής ουσίας). Επειδή δε η σουλφαδιμιδίνη έχει ενοχοποιηθεί ως καρκινογόνος ουσία (καρκίνος του θυρεοειδούς) και έχει προταθεί η πλήρης απαγόρευση της, θα πρέπει η χρήση της να υπόκειται σε σχολαστικό έλεγχο από τους κτηνίατρους, ενώ ο προτεινόμενος χρόνος αναμονής, ο οποίος δεν αναφέρεται στο κτηνιατρικό συνταγολόγιο του Εθνικού Οργανισμού Φαρμάκων, να τηρείται με ευλάβεια [Τυρπένου κ.ά. 1998, 49(2): 115-127]. Γενικά, οι σουλφοναμίδες ανήκουν στην κατηγορία των μικροβιοστατικών φαρμάκων. Δρουν έναντι σε ένα ευρύ φάσμα παθογόνων μικροοργανισμών γι΄αυτό και είναι αποτελεσματικότερες όταν χορηγούνται στην οξεία φάση μιας λοίμωξης, όταν δηλαδή τα παθογόνα μικρόβια βρίσκονται σε φάση έντονου πολλαπλασιασμού. Ο μηχανισμός δράσης των σουλφοναμιδών βασίζεται στην ανταγωνιστική τους δράση έναντι του παρα-αμινοβενζοϊκού οξέος (PABA). Τα μικροβιακά κύτταρα χρησιμοποιούν το PABA για να συνθέτουν το φολικό οξύ, το οποίο είναι ενδιάμεσος μεταβολίτης στην σύνθεση πουρινικών βάσεων και κατ' επέκταση των πρωτεϊνών. Η ανάσχεση της βιοσύνθεσης του φολικού οξέος οδηγεί στην ανάσχεση πολλαπλασιασμού των μικροβίων. Σημαντικό είναι ότι για την εκδήλωση πλήρους βακτηριοστατικής δράσης, οι σουλφοναμίδες πρέπει να βρίσκονται σε υψηλές συγκεντρώσεις στα υγρά του σώματος. Για το λόγο αυτό συστήνεται η έναρξη της σουλφοναμιδικής θεραπείας όπως γίνεται σε υψηλές δόσεις που εξασφαλίζουν υψηλές συγκεντρώσεις στο αίμα και στους ιστούς, ενισχύοντας παράλληλα όμως τον κίνδυνο ανίχνευσης υψηλών συγκεντρώσεων καταλοίπων στο κρέας. Επιπρόσθετα, ο μηχανισμός εμφάνισης ανθεκτικών μικροβίων έναντι σουλφοναμιδών βασίζεται στην εμφάνιση στελεχών ικανών να παράγουν μεγαλύτερες ποσότητες π-αμινοβενζοϊκού οξέος. Το γεγονός αυτό οδήγησε στην ανάγκη χρήσης υψηλότερων δόσεων σουλφοναμιδών, αφού πειραματικά έχει αποδειχθεί ότι η εμφάνιση ανθεκτικών στελεχών διευκολύνεται από τη χρήση χαμηλών δόσεων σουλφοναμιδών που δεν εξασφαλίζουν θεραπευτικές συγκεντρώσεις στο αίμα. Γι' αυτό και όπως προαναφέρθηκε, συστήνεται όπως η μικροβιακή θεραπεία με σουλφοναμίδες αρχίζει όσο το δυνατό νωρίτερα και με σχετικά υψηλή αρχική δόση (δόση εφόδου), έτσι ώστε να εμφανίζεται σε υψηλές συγκεντρώσεις στους ιστούς [Μουζούρας 1996]. Το ενδιαφέρον για τις σουλφοναμίδες έχει επιταθεί με το συνδυασμό τριμεθοπρίμης-σουλφαδιαζίνης και τριμεθοπρίμης-

σουλφαμεθοξαζόλης, που αποτελούν τυπικό παράδειγμα δυναμικής συνέργειας αντιμικροβιακών φαρμάκων. Ιδιαίτερα, η συνεργική δράση των σουλφοναμιδών με την τριμεθοπρίμη η οποία δρα έναντι της διϋδροφολικής ρεδουκτάσης, συντελεί στην μεγάλη χρήση σουλφοναμιδών την τελευταία δεκαετία [Connor 1998].

Σημαντικό σημείο προβληματισμού αποτελεί ακόμη το γεγονός ότι από τα 1,766 δείγματα, τα οποία βρέθηκαν ύποπτα για αντιμικροβιακές ουσίες στο ΕΕΤΖΠ με τη βιολογική μέθοδο διαλογής (*Premi-test*), μόλις το 33,7% των δειγμάτων (596 δείγματα) βρέθηκαν θετικά σε αντιμικροβιακές ουσίες, με χημική ανάλυση στο εργαστήριο αναφοράς του ΓΧΚ. Το μεγάλο ποσοστό ύποπτων δειγμάτων στα οποία δεν ανιχνεύθηκαν αντιμικροβιακές ουσίες, με εξειδικευμένες μεθόδους όπως η χρωματογραφική ανάλυση, θέτει ερωτήματα ιδιαίτερα κατά πόσον τα δείγματα αυτά περιέχουν ουσίες μη εγκεκριμένων κτηνιατρικών φαρμάκων ή κατά πόσον περιέχουν απολυμαντικά, απορρυπαντικά ή μεταβολίτες κάποιων δραστικών ουσιών που δεν περιλαμβάνονται στην μέθοδο ταυτοποίησης του εργαστηρίου αναφοράς. Οι βιολογικές μέθοδοι διαλογής, από την μια είναι οικονομικές, εύχρηστες, δεν απαιτούν ειδικό εξοπλισμό και έχουν υψηλή απόδοση δείγματος, από την άλλη όμως δεν εξειδικεύονται σε φυσικούς και μη ανασταλτικούς παράγοντες, προκαλώντας διφορούμενα αποτελέσματα.

Στην συνέχεια της έρευνας παρατηρούμε ότι, με εξαίρεση την τριμεθοπρίμη όπου παρατηρείται μικρή διαφορά στο ποσοστό μεταξύ δειγμάτων με συγκέντρωση καταλοίπων πάνω και κάτω από το ΑΟΚ, η πλειοψηφία των υπόλοιπων ανιχνευόμενων ουσιών παρουσιάζουν πολύ μεγαλύτερο ποσοστό καταλοίπων κάτω από το ΑΟΚ. Το γεγονός αυτό εν μέρη εφησυχάζει, την ίδια στιγμή όμως τονίζει το πρόβλημα της εκθετικής αύξησης της αντοχής των βακτηριών στους αντιμικροβιακούς παράγοντες. Παράλληλα, η διυδροστρεπτομυκίνη και φλουμεκίνη ανιχνεύθηκαν η κάθε μια σε ένα μόνο δείγμα, η τετρακυκλίνη σε 3 δείγματα και η αμοξικιλλίνη σε 5, εκ των οποίων τα 4 δείγματα αμοξυκιλλίνης ανιχνεύθηκαν την ίδια χρονιά (το 2015) με μέγιστη συγκέντρωσης 547μg·kg^{-1}. Όσον αφορά τα δείγματα που ανιχνεύθηκαν με συγκεντρώσεις ουσιών ανώτερες του ΑΟΚ (25,3%) και αφορά την πλειοψηφία των δειγμάτων σε σουλφαδιαζίνη, μπορεί να αποδοθεί σε αποτυχία τήρησης των χρόνων αναμονής για το κρέας, που πρέπει να μεσολαβεί προτού τα ζώα οδηγηθούν για σφαγή. Νοείται ότι, η τήρηση του προβλεπόμενου χρόνου αναμονής είναι καθοριστικής σημασίας, καθώς συνδέεται με σημαντικό ποσοστό συγκέντρωσης των χημικών ουσιών που αποβάλλεται από το ζώο. Σε διαφορετική περίπτωση, οι ουσίες αυτές παραμένουν στους ιστούς, δημιουργώντας κατάλοιπα τα οποία αποτελούν παράγοντα επιβάρυνσης της δημόσιας υγείας. Η μη τήρηση των χρόνων αναμονής, μπορεί επίσης να οφείλεται και σε ατελή αρχεία καταγραφής της χορήγησης κτηνιατρικών φαρμάκων, είτε σε αδυναμία σήμανσης και αναγνώρισης των ζώων που έχουν λάβει θεραπεία [Botsoglou και Fletouris 2000:491–500]. Γνωρίζουμε άλλωστε ότι, συνηθίζεται στην καθημερινή πρακτική να χρησιμοποιούνται φαρμακούχα προμίγματα σουλφοναμιδών ή τετρακυκλινών, για ενσωμάτωση στις φαρμακούχες ζωοτροφές, μόνα τους ή σε συνδυασμό με άλλες ουσίες, για την αντιμετώπιση αναπνευστικών και πεπτικών νοσημάτων προληπτικά ή θεραπευτικά. Σε περίπτωση που η χρήση τους γίνεται αλόγιστα και δεν

τηρούνται οι ενδεδειγμένοι χρόνοι αναμονής, είναι λογικό να έχουμε αυξημένα ποσοστά θετικών δειγμάτων σε ιστούς όπως το κρέας. Επίσης, είναι δυνατόν οι οδηγίες χρήσης που παρέχονται από κτηνίατρο ή οποιονδήποτε διακινεί κτηνιατρικά φάρμακα και φαρμακούχα προμίγματα, να είναι λανθασμένες ή ασαφείς. Τέτοια περίπτωση παρατηρείται στην ταυτόχρονη χορήγηση διαφόρων σκευασμάτων για πολλές θεραπείες, όπου ο κτηνοτρόφος, λανθασμένα, θεωρεί ότι ο χρόνος αναμονής του ενός φαρμάκου καλύπτει και τα υπόλοιπα, αμελώντας να τηρήσει τον μεγαλύτερο χρόνο αναμονής. Για το λόγο αυτό, είναι σημαντικό να τηρούνται από τους κτηνοτρόφους και αρμόδιους κτηνιάτρους, παράγοντες ασφαλείας όπως είναι η συνταγογράφηση των φαρμακούχων προμιγμάτων, των κτηνιατρικών φαρμάκων και η σωστή δοσολογία αυτών, η τήρηση των οδηγιών δειγματοληψίας όπως αυτές ορίζονται στην περί καταλοίπων νομοθεσία, η σωστή σφράγιση-συντήρηση των δειγμάτων και η έγκαιρη αποστολή τους στα εργαστήρια. Τα παραπάνω συμβάλλουν αφενός μεν στην παραγωγή ασφαλών τροφίμων, αφετέρου στην έκδοση ορθών εργαστηριακών αποτελεσμάτων. Αυξημένος κίνδυνος εμφάνισης καταλοίπων υπάρχει και όταν γίνεται μη προβλεπόμενη χρήση φαρμάκου (off-label use). Στην περίπτωση αυτή και με ευθύνη κτηνίατρου, η χορήγηση κτηνιατρικών φαρμάκων γίνεται είτε από μη ενδεδειγμένη οδό, ή για άλλο ζωικό είδος από αυτό που το φάρμακο είναι εγκεκριμένο, είτε όταν η φαρμακευτική ουσία χορηγείται για διαφορετική παθολογική κατάσταση από εκείνη για την οποία προορίζεται, ή γενικά για τη χορήγηση απαγορευμένων ουσιών [Girardi και Odore 2008]. Συν τοις άλλοις, πρόβλημα αποτελεί και η ατελής εκπαίδευση του προσωπικού των εκτροφών, ή ακόμα και του ίδιου του ιδιοκτήτη φάρμας, στη χορήγηση φαρμάκων [Botsoglou και Fletouris 2000:491–500].

Όσον αφορά τις ουσίες οι οποίες ανιχνεύθηκαν σε ένα δείγμα, τη διυδροστρεπτομυκίνη (0,1%), τη φλουμεκίνη (0,1%) και τα ελάχιστα δείγματα τετρακυκλίνης (0,5%) και αμοξυκιλλίνης (0,8%), αυτό είναι δυνατό να οφείλεται σε ρύπανση κατά την παραγωγή ζωοτροφών. Η ρύπανση των ζωοτροφών με ανεπιθύμητες φαρμακευτικές ουσίες, συμβαίνει στις μονάδες παραγωγής ζωοτροφών που δεν υπάρχει επαρκής καθαρισμός των σκευών της γραμμής παραγωγής, με αποτέλεσμα όταν παράγονται διαφορετικού είδους φαρμακούχες ζωοτροφές, για διαφορετικά είδη ζώων, να υπάρχει κίνδυνος λήψης μη ενδεδειγμένων φαρμάκων για κάποια είδη. Υπολειπόμενες ποσότητες των φαρμακούχων ζωοτροφών, μπορούν να διατηρούνται σε διάφορα σημεία κατά μήκος της γραμμής παραγωγής, μολύνοντας επόμενες παρτίδες ζωοτροφών που υποβάλλονται σε επεξεργασία. Οι ηλεκτροστατικές ιδιότητες ορισμένων φαρμάκων, ιδίως εκείνων σε μορφή σκόνης, επιδεινώνουν το πρόβλημα, καθιστώντας πιο δύσκολο τον καθαρισμό του εξοπλισμού παρασκευής ζωοτροφών [De Ruyck 2003].

Σε σχέση με τη γεωγραφική διακύμανση, πρώτα η επαρχία Λευκωσίας (5%) και ακολούθως η επαρχία Λάρνακας (2,42%) ήταν οι επαρχίες με τα υψηλότερα ποσοστά ανίχνευσης καταλοίπων, των διερευνώμενων ουσιών στο κρέας. Μόνο το 2,7% των δειγμάτων βρέθηκαν θετικά σε κατάλοιπα στην επαρχία Λεμεσού, ενώ στις χοιροτροφικές εκτροφές της επαρχίας Αμμοχώστου και Πάφου όπου το δειγματοληπτικό ποσοστό ήταν ιδιαίτερα χαμηλό, δεν ανιχνεύθηκαν ουσίες στα δείγματα χοιρινού κρέατος. Αυτό έγκειται στο γεγονός ότι ο κύριος όγκος της οργανωμένης χοιροτροφίας κατανέμεται μεταξύ

Λευκωσίας και Λάρνακας, γι΄αυτό και το μεγαλύτερο ποσοστό των δειγμάτων συλλέχθηκε από τις επαρχίες αυτές. Εντούτοις, όπως έχει ήδη αναφερθεί, δεν σημαίνει ότι το κρέας που παράγεται διακινείται μόνο στις επαρχίες αυτές, αντιθέτως μέσω των τριών κύριων σφαγείων ερυθρού κρέατος διακινείται σε όλες τις αστικές και αγροτικές περιοχές της Κυπριακής Δημοκρατίας.

Μια σημαντική παρατήρηση που έγινε κατά τη διάρκεια διεξαγωγής της μελέτης, είναι ότι υψηλό ποσοστό θετικών δειγμάτων παρατηρήθηκε κατά τον μήνα Δεκέμβριο. Αυτό δεν είναι τυχαίο καθώς συνδέεται με την εντατικοποίηση των δειγματοληπτικών ελέγχων λόγω της αύξησης που παρατηρείται στην κατανάλωση χοιρινού, ιδιαίτερα ενόψει των επερχόμενων εορτών των Χριστουγέννων. Δεδομένου όμως της αυξητικής καταναλωτικής τάσης κατά την περίοδο των εορτών, αναπόφευκτη φαίνεται να είναι και η παράλληλη αύξηση της χορήγησης κτηνιατρικών φαρμάκων προκειμένου να μπορέσουν οι χοιροτρόφοι να ανταποκριθούν στις απαιτήσεις του καταναλωτικού κοινού. Γενικά, τα κρούσματα ασθενειών στους χοίρους εμφανίζονται όλο το χρόνο με αυξανόμενη επίπτωση το χειμώνα, δικαιολογώντας την αυξημένη ανίχνευση θετικών δειγμάτων κατά τους χειμερινούς μήνες. Στην σύγχρονη χοιροτροφία, τα πιο σοβαρά προβλήματα στην υγεία των χοίρων έχουν να κάνουν με νοσήματα που προσβάλλουν το αναπνευστικό σύστημα και προκαλούν εντοπισμένες ή γενικευμένες αναπνευστικές διαταραχές [Sorensen κ.ά. 2006]. Από τους συνηθέστερους παθογόνους μικροοργανισμούς που προσβάλλουν το αναπνευστικό σύστημα είναι διάφορα είδη μυκοπλασμάτων (*Mycoplasma hyorhinis, M. hyopneumoniae, M. hyosynoviae, M. suis*), με πιο σημαντικό τον *M. hyopneumoniae* που εμπλέκεται στην αιτιολογία της ενζωοτικής πνευμονίας του χοίρου και προκαλεί σημαντικές οικονομικές απώλειες στη χοιροτροφία παγκοσμίως [Sibila κ.ά. 2007], το *Haemophilus parasuis* (νόσος του Glasser), τον *Actinobacillus pleuropneumoniae* (πλευροπνευμονία), τον ιό της γρίπης του χοίρου, τον ιό του αναπνευστικού και αναπαραγωγικού συνδρόμου και τον κυκλοϊό τύπου 2 του χοίρου [Sorensen κ.ά. 2006]. Επιπρόσθετα, για χοίρους όλων των ηλικιακών ομάδων, πολύ σημαντικές και από οικονομικής άποψης αφού επηρεάζουν την παραγωγή των χοίρων μιας μονάδας, είναι και οι λοιμώξεις του πεπτικού συστήματος [Thomson 2006 και Wilson 2000]. Στα κλινικά συμπτώματα των εντερικών λοιμώξεων περιλαμβάνονται η διάρροια, η απώλεια βάρους, η καθυστέρηση στην ανάπτυξη και τελικά ο θάνατος. Στους συνηθέστερους αιτιολογικούς παράγοντες περιλαμβάνονται η *Escherichia coli*, το *Clostridium perfringens*, η *Lawsonia intracellularis*, η *Salmonella enterica* και η *Brachyspira (Serpulina) spp*. Όσον αφορά τα υψηλά ποσοστά ανίχνευσης θετικών δειγμάτων κατά την καλοκαιρινή περίοδο (στην μελέτη μας τον μήνα Ιούλιο) εκτός των διαφόρων νοσημάτων, με βάση τη διεθνή βιβλιογραφία, ίσως συνδέονται γενικά με τα μεγαλύτερα ποσοστά θνησιμότητας των χοιρομητέρων κατά τη διάρκεια των καλοκαιρινών μηνών [Koketsu 2000, D'Allaire κ.ά. 1996], τόσο κατά τις ημέρες πριν τον αναμενόμενο τοκετό όσο και αμέσως μετά. Στις σημαντικότερες αιτίες απωλειών στις εντατικές εκτροφές περιλαμβάνονται τα νοσήματα της περιγεννητικής περιόδου (όπως μαστίτιδα-μητρίτιδα-αγαλαξία) και η συστροφή ή διάταση κοιλιακών οργάνων. Στις εκτατικές εκτροφές τα προβλήματα του ουρογεννητικού, του καρδιαγγειακού και του μυοσκελετικού προκαλούν τις περισσότερες απώλειες [Karg και Bilkei 2002]. Δεδομένου όμως ότι, ο αριθμός των χοιρομητέρων πρέπει να διατηρείται σε επίπεδο που να επιτρέπει την εκπλήρωση των στόχων της παραγωγής και στις περισσότερες

περιπτώσεις ο αριθμός των ενεργών θηλυκών πρέπει να αυξάνεται κατά τους καλοκαιρινούς μήνες [DiPietre κ.ά. 2001], αυτό, φαίνεται ότι συντελεί στην αυξημένη χρήση αντιμικροβιακών φαρμάκων κτηνιατρικής χρήσης.

Όσον αφορά την εκτίμηση της διατροφικής πρόσληψης των διερευνώμενων καταλοίπων μέσω της κατανάλωσης χοιρινού κρέατος, από παιδιά και έφηβους, προκύπτουν σημαντικές πληροφορίες. Συγκεκριμένα, οι μέγιστες τιμές της EDI και για τις τρείς ηλικιακές ομάδες παιδιών και εφήβων (6-9, 10-13 και 14-17 ετών), παρατηρήθηκαν πρώτιστος το 2013 για τη λινκομυκίνη (0,132 έως 0,305 μg/ kg σ.β./ ημέρα για αγόρια και 0,159 έως 0,315μg/ kg σ.β./ ημέρα για κορίτσια), κατά δεύτερον το 2012 για την χλωροτετρακυκλίνη (0,075 έως 0,173 μg/ kg σ.β./ ημέρα για αγόρια και 0,09 έως 0,178 μg/ kg σ.β./ ημέρα για κορίτσια) και κατά τρίτον το 2017 για τη δοξυκυκλίνη (0,071 έως 0,164 μg/ kg σ.β./ ημέρα για αγόρια και 0,086 έως 0,170 μg/ kg σ.β./ ημέρα για κορίτσια). Με μία πρώτη ανάγνωση, είναι δυνατό να θεωρηθεί ότι το χοιρινό κρέας ως τρόφιμο αυτό κάθε αυτό, δεν ενέχει ιδιαίτερους κινδύνους για τη δημόσια υγεία. Αυτό γιατί η EDI, στην πλειοψηφία των περιπτώσεων δεν ξεπερνά την ADI. Οι τρέχουσες τιμές των AOK και ADIs, για τις διερευνώμενες ουσίες, είναι θεσπισμένες βάση παρατηρήσεων που έγιναν σε εργαστηριακές συνθήκες και συγκεκριμένα σε ζώα εργαστηρίου (λαμβάνοντας υπόψη έναν παράγοντα ασφαλείας που κυμαίνεται από το 10 έως το 1000) γι΄αυτό και οποιαδήποτε τιμή πάνω από τα όρια αυτά ενέχει κίνδυνο για τη δημόσια υγεία. Αυτό δυστυχώς, δεν ισχύει στην περίπτωση της δοξυκυκλίνης όπου το 2017, η εκτιμώμενη δόση ημερήσιας πρόσληψης ξεπερνάει την μέγιστη αποδεκτή ημερήσια δόση. Συγκεκριμένα, η EDI ως % της ADI, υπερβαίνει στα αγόρια ηλικίας 6-9 και 10-13 ετών την μέγιστη αποδεκτή ημερήσια πρόσληψη για τη δοξυκυκλίνη {0-3 $\mu g \cdot kg^{-1}$ σ.β. [CVMP 1996]}, με ποσοστό 5,47 έως 3,43 μg/ kg σ.β./ ημέρα, αντίστοιχα. Το ίδιο συμβαίνει και στα κορίτσια 6-9 και 10-13 ετών, όπου η EDI ως % της ADI, πάλι για τη δοξυκυκλίνη {0-3 $\mu g \cdot kg^{-1}$ σ.β. [CVMP 1996]} υπερβαίνει την μέγιστη αποδεκτή ημερήσια πρόσληψη με ποσοστό 5,65 και 3,51 μg/ kg σ.β./ ημέρα, αντίστοιχα. Η δοξυκυκλίνη, αποτελεί ημισυνθετικό παράγωγο της οξυτετρακυκλίνης και λόγω των ιδιαίτερων φαρμακοκινητικών της ιδιοτήτων, χαρακτηρίζεται ως τετρακυκλίνη παρατεταμένης δράσης. Αυτό δεν είναι τυχαίο, αφού παρουσιάζει υψηλό βαθμό απορρόφησης (90%) και μεγάλο χρόνο ημιζωής. Ειδικότερα, η βιοδιαθεσιμότητα της δοξυκυκλίνης κυμαίνεται από 41.3 έως 87%, σε αντίθεση με της οξυτετρακυκλίνης και τετρακυκλίνης που ανέρχεται σε ποσοστό 30 και 60% αντίστοιχα, ενώ παράλληλα το ποσοστό δέσμευσης με τις πρωτεΐνες είναι πολύ ψηλό με ποσοστά που αγγίζουν το 84 έως 98%. Η ταχύτερη απορρόφηση και η βραδύτερη αποβολή της δοξυκυκλίνης, σχετίζονται με τη χημική της μορφή, καθώς είναι η πιο λιπόφιλη από όλες τις τετρακυκλίνες και μία από τις πιο σταθερές. Επιπλέον, ενώ η απορροφητικότητα των προαναφερθεισών τετρακυκλινών επηρεάζεται άμεσα από την παρουσία τροφής, λόγω σχηματισμού συμπλόκων με ιοντικά μέταλλα, αντιθέτως η δοξυκυκλίνη έχει μικρή τάση να σχηματίζει σύμπλοκα και έτσι η απορροφητικότητα της δεν μειώνεται [Botsoglou και Fletouris 2001]. Σύμφωνα με τα κριτήρια της ΠΟΥ το 2007, η δοξυκυκλίνη έχει ταξινομηθεί ως «ύψιστης σημασίας αντιμικροβιακό» για ανθρώπινη χρήση και ως «κρίσιμης σημασίας αντιμικροβιακό» για κτηνιατρική χρήση. Η δοξυκυκλίνη, υπό μορφή άλατος υκλάτης, ενδείκνυται στους χοίρους για ατροφική ρινίτιδα που προκαλείται από *Pasteurella multocida* και *Bordetella*

bronchiseptica, βρογχοπνευμονία που προκαλείται από *Pasteurella multocida, Streptococcus suis* και *Mycoplasma hyorhinis* και πλευροπνευμονία που προκαλείται από *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Η άμεση τροφιμογενής και η έμμεση περιβαλλοντική μετάδοση ανθεκτικών μικροοργανισμών συνδέονται με τη χρήση φαρμακευτικών ουσιών, παρόλο που η ποσοτικοποίηση της μετάδοσης ζωονοσογόνων παραγόντων αλλά και της οριζόντιας μετάδοσης γονιδίων ανθεκτικότητας μεταξύ ζωικών και ανθρώπινων βακτηρίων είναι εξαιρετικά δύσκολη *in vivo*. Σημαντικό εύρημα αποτελεί το γεγονός ότι έχουν καταγραφεί υψηλά επίπεδα ανθεκτικότητας των παθογόνων του αναπνευστικού των χοίρων (*A. pleuropneumoniae* και *S. suis*) σε τετρακυκλίνες. Έχει επίσης αναφερθεί διασταυρούμενη αντοχή μεταξύ τετρακυκλινών. Τέλος, η δοξυκυκλίνη λόγω της μεγαλύτερης λιποδιαλυτότητας της και της μεγαλύτερης ευκολίας να διαπερνά κυτταρικές μεμβράνες (σε σύγκριση με την τετρακυκλίνη), διατηρεί συγκεκριμένο βαθμό αποτελεσματικότητας ενάντια σε μικροοργανισμούς οι οποίοι έχουν αναπτύξει ανθεκτικότητα στις τετρακυκλίνες [*https://www.ema.europa.eu/documents/referral/doxycycline-50-wsp-article-34-referral-annex-i-ii-iii_el-0.pdf*]. Λαμβάνοντας πλέον υπόψη όλες αυτές μελέτες, είναι πιθανό να υπάρξουν επανεκτιμήσεις όσον αφορά τη επικινδυνότητα αυτών των ουσιών, με αποτέλεσμα μία τιμή EDI η οποία με τα σημερινά δεδομένα δεν εγείρει ζητήματα δημόσιας υγείας, να αποτελέσει αιτία ανησυχίας στο μέλλον. Και αυτό γιατί οι εκτιμήσεις κινδύνου σχετικά με τα τρόφιμα, στηρίζονται σε επιστημονικά δεδομένα τα οποία εμπλουτίζονται κατά καιρούς με τη διεξαγωγή νεότερών μελετών.

Στην εν λόγω μελέτη, τα αποτελέσματα της EDI, εκφρασμένη ως επί τοις εκατό (%) αναλογία της ADI, σε κατάλοιπα αντιμικροβιακών ουσιών μέσω του χοιρινού κρέατος στην Κύπρο, διέφεραν σημαντικά ανά ουσία, φύλο και ηλικία. Υπολογίζοντας την EDI, αλλά και την EDI ως % της ADI για παιδιά (αγόρια και κορίτσια) ηλικίας 6-9 ετών και έφηβους (10-17 ετών) συγκριτικά με ενήλικες >18 ετών, διαπιστώθηκε ότι τα παιδιά εκτίθενται σε μεγαλύτερο βαθμό από τους εφήβους και ενήλικες. Μελέτες αναφέρουν ότι η έκθεση σε ορισμένες αντιμικροβιακές ουσίες, σχετίζεται με την εκδήλωση παιδικής παχυσαρκίας και διαβήτη τύπου ΙΙ. Επιπρόσθετα, πειραματικές μελέτες σε επίμυες απέδειξαν ότι σε μικρές ηλικίες η μακροπρόθεσμη έκθεση σε χαμηλές συγκεντρώσεις επηρεάζει τον μεταβολισμό, την εντερική μικροχλωρίδα, τη διαδικασία διαφοροποίησης των λιποκυττάρων και την ανάπτυξη του λιπώδους ιστού που οδηγεί στο φαινότυπο του ώριμου λιποκυττάρου (*adipogenesis*), προκαλώντας παχυσαρκία και διαβήτη [Na Lia κ.ά. 2017]. Ακόμη, επιδημιολογικές μελέτες υποστηρίζουν τέτοια ευρήματα, αφού επίσης καταδεικνύουν ότι η έκθεση στα αντιβιοτικά σε νεαρή ηλικία πιθανόν να συνδέεται με το φαινόμενο της παιδικής παχυσαρκίας. Οι επιβλαβείς επιπτώσεις των αντιβιοτικών κατά την αναπτυξιακή περίοδο, μπορούν να συμβούν με έκθεση σε πολύ χαμηλότερες συγκεντρώσεις αντιβιοτικών απ΄αυτές που θεωρούνται επιζήμιες για τους ενήλικες. Τέτοιες επιπτώσεις σε νεαρή ηλικία είναι σημαντικές, καθώς κάποια νοσήματα σχετίζονται με δυσμενείς επιδράσεις στην εμβρυική και πρώιμη βρεφική ηλικία. Αξίζει να σημειωθεί ότι σήμερα οι πλείστες μελέτες, για τους πιθανούς κινδύνους που ελλοχεύει η χρήση αντιβιοτικών, βασίζονται στις συγκεντρώσεις ανίχνευσης στα ούρα, σε συνδυασμό με την προβλεπόμενη

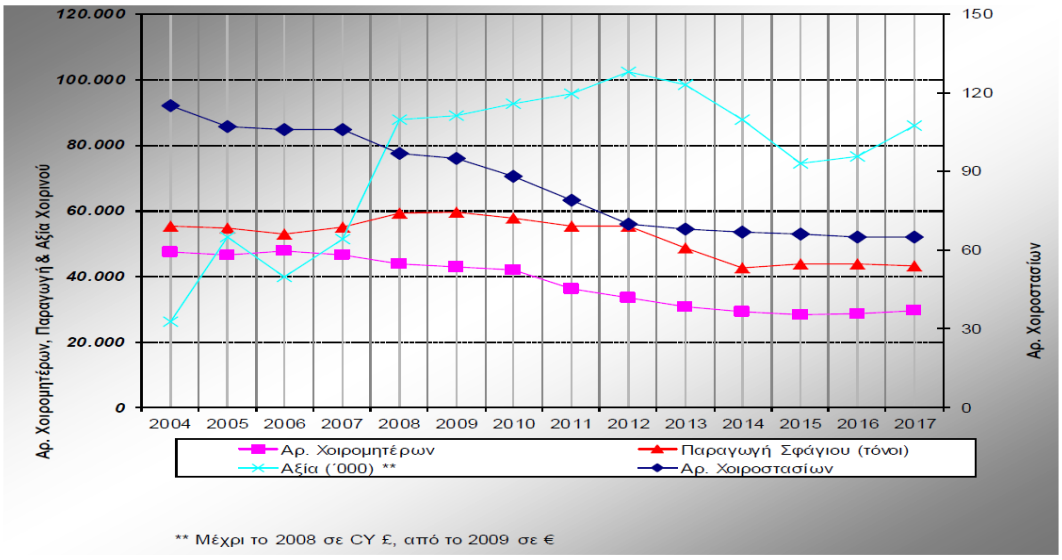
καθημερινή πρόσληψη συγκέντρωσης ουσιών στα δείγματα τροφίμων [Na Lia κ.ά. 2017].

Επιπρόσθετα, νέα έρευνα από το Πανεπιστήμιο της Ουψάλα δείχνει ότι η έκθεση ακόμη και χαμηλές συγκεντρώσεις αντιμικροβιακών ουσιών μπορεί να προκαλέσει υψηλή αντοχή των βακτηρίων στις αντιμικροβιακές ουσίες. Η μελέτη αυτή είναι ιδιαίτερα σημαντική, αφού αποδεικνύει πως η παρατεταμένη έκθεση σε χαμηλά επίπεδα αντιμικροβιακών ουσιών συμβάλλει στην ανάπτυξη της βακτηριακής αντοχής. Στην ίδια έρευνα διαπιστώθηκε ότι, η λήψη αντιμικροβιακών ουσιών από τα ζώα, έχει μεγάλο αντίκτυπο και στο περιβάλλον. Αυτό γιατί, ένα μεγάλο ποσοστό της χορηγούμενης δόσης απεκκρίνεται στα ούρα σε αμετάβλητη ενεργό μορφή και μπορεί στη συνέχεια, ιδιαίτερα στις μεγάλες κτηνοτροφικές περιοχές, να εξαπλωθεί σε υδάτινες πηγές, λίμνες και λύματα. Κατά συνέπεια, το περιβάλλον και κατ΄επέκταση όλο το οικοσύστημα, δύναται εξ ’αυτού να περιέχουν χαμηλά επίπεδα καταλοίπων αντιμικροβιακών ουσιών. Επιπρόσθετα, στην μελέτη αυτή οι ερευνητές έδειξαν ότι με την πάροδο του χρόνου, τα βακτήρια που εκτέθηκαν σε χαμηλές δόσεις αντιβιοτικών ανέπτυξαν υψηλή ανθεκτικότητα και απέκτησαν αρκετές μεταλλάξεις, κάθε μια από τις οποίες προκάλεσε μικρή αντοχή, αλλά όλες μαζί επέφεραν μια πολύ σημαντική αντίσταση στα αντιβιοτικά. Οι μεταλλάξεις πραγματοποιήθηκαν κυρίως σε γονίδια που δεν είχαν θεωρηθεί ως τυπικά γονίδια ανθεκτικότητας, υποδηλώνοντας ότι ο αριθμός των γονιδίων που είναι ικανά να προάγουν την αντοχή έχει υποτιμηθεί σε μεγάλο βαθμό. Ιδιαίτερα σημαντική αποτελεί η παρατήρηση ότι οι μεταλλάξεις στο βακτηριακό DNA που προκαλούν αντίσταση στα αντιβιοτικά, λόγω χαμηλής δοσολογίας, είναι διαφορετικού τύπου από αυτές που προκαλούν οι υψηλές δόσεις [Wistrand-Yuen κ.ά. 2018]. Τα αποτελέσματα είναι άκρως ενδιαφέροντα ακριβώς επειδή δείχνουν ότι οι πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις αντιβιοτικών μπορούν να οδηγήσουν σε υψηλό βαθμό αντίστασης.

Από την έρευνά μας προκύπτει ότι δεκατρείς, από τις 45 αντιμικροβιακές ουσίες που εξετάσθηκαν, ανιχνεύθηκαν σε αξιοσημείωτες και μη συγκεντρώσεις σε δείγματα χοιρινού κρέατος, που προέρχονται από εκμεταλλεύσεις όλων των επαρχιών της Κυπριακής Δημοκρατίας. Σε μερικές περιπτώσεις η συγκέντρωση των ουσιών αυτών βρέθηκε πάνω από το τρέχον ΑΟΚ, ενώ στην πλειοψηφία των δειγμάτων ανιχνεύθηκαν ουσίες κάτω από το ΑΟΚ. Άρα, μπορεί από την παρούσα μελέτη να προκύπτει ότι η κατανάλωση χοιρινού κρέατος δεν εγείρει ανησυχίες για τη δημόσια υγεία, ωστόσο δεν πρέπει να υπάρχει εφησυχασμός. Η υπερβολική και ανεξέλεγκτη χρήση αντιβιοτικών, ευνοεί τον πολλαπλασιασμό των ανθεκτικών μικροοργανισμών, θέτοντας σε κίνδυνο τα επιτεύγματα των προηγούμενων δεκαετιών στον τομέα της υγείας. Το γεγονός ότι, οι νοσογόνοι μικροοργανισμοί (βακτηρίδια, ιοί, μύκητες, παράσιτα και πρωτόζωα) έχουν μια αξιοσημείωτη ικανότητα να προσαρμόζονται, ιδίως να αποκτούν και να μεταδίδουν την μικροβιακή αντοχή, αυτό αποτελεί πλέον μια από τις σημαντικότερες απειλές του μέλλοντος για τη δημόσια υγεία. Η σχέση μεταξύ της χρήσης των αντιμικροβιακών ουσιών στην κτηνιατρική και της ανάπτυξης της μικροβιακής αντοχής, μελετάται πλέον σε παγκόσμιο επίπεδο. Πολλές προσπάθειες έγιναν και γίνονται προς περιορισμό του φαινομένου αυτού, για παράδειγμα η ενίσχυση των προγραμμάτων επιτήρησης σε σχέση με την κατανάλωση αντιβιοτικών και την μικροβιακή

αντοχή σε διάφορα είδη ζώων. Ακόμη η ενίσχυση του νομοθετικού πλαισίου όσον αφορά τα κτηνιατρικά φάρμακα και τις φαρμακούχες ζωοτροφές είναι δυνατόν να επιφέρει θετικότατα αποτελέσματα στην καταπολέμηση του προβλήματος αυτού. Επιπρόσθετα, ένα από τα σημαντικότερα μέτρα περιορισμού του προβλήματος αυτού, είναι η μείωση της κατανάλωσης των καίριας σημασίας για τον άνθρωπο αντιμικροβιακών ουσιών στην κτηνιατρική πράξη.

Καταλήγοντας, θα πρέπει να αναφέρουμε ότι στα αποτελέσματα της μελέτης μας για την αξιολόγηση του κινδύνου διατροφικής πρόσληψης αντιμικροβιακών ουσιών μέσω του χοιρινού κρέατος εγχώριας παραγωγής, υπάρχει ένα μικρό ποσοστό αβεβαιότητας. Ο πρώτος παράγοντας αβεβαιότητας προκύπτει από το γεγονός ότι δεν λήφθηκε υπόψη η πρόσληψη των σχετικών ουσιών από το εισαγόμενο κρέας, προερχόμενο από την ΕΕ, το οποίο διατίθεται κάθε χρόνο στο καταναλωτικό κοινό της Κύπρου. Συγκεκριμένα, με οδηγό την επισκόπηση της κυπριακής χοιροτροφίας το 2017 [Υπουργείο Γεωργίας Επισκόπηση Χοιροτροφίας 2017] (Διάγραμμα 10), παρατηρούμε ότι η εγχώριος παραγωγή σφάγιου το 2012-2013 ήταν κατά προσέγγιση 50.000-60.000 τόνοι και το 2014-2017 ήταν περίπου 40,000 τόνοι. Σύμφωνα με στοιχεία των ΚΥ για τα έτη 2015, 2016 και 2017, το ποσοστό του εισαγόμενου χοιρινού κρέατος αποτελούσε το 14, 10 και 12% αντίστοιχα του συνολικού χοιρινού που διατέθηκε στην κυπριακή αγορά κατά τις συγκεκριμένες χρονιές. Συνεπώς, η ημερήσια κατανάλωση χοιρινού κρέατος από το καταναλωτικό κοινό της Κύπρου, ενδέχεται να περιλαμβάνει και εισαγόμενο κρέας κατά 10-14% το οποίο πολύ πιθανόν να μην είναι απαλλαγμένο από υπολείμματα αντιμικροβιακών και άλλων ουσιών.



Διάγραμμα 10: Παραγωγή σφάγιου (τόνοι) χοιρινού κρέατος, για τα έτη 2004-2017 [Υπουργείο Γεωργίας Επισκόπηση Χοιροτροφίας 2017].

Ένας δεύτερος παράγοντας αβεβαιότητας αποτελεί το γεγονός ότι, η δειγματοληψία από τυχαιοποιημένη γίνεται στοχευμένη για τις εκτροφές ζωών στις οποίες συστηματικά ανιχνεύθηκαν ύποπτα δείγματα σε αντιμικροβιακές ουσίες. Συγκεκριμένα, στην περίπτωση αυτή η μεθοδολογία της τυχαίας δειγματοληψίας παρακάμπτεται και γίνεται στοχευμένη επαναληπτική

δειγματοληψία, βάση υποψίας. Εντούτοις, τα αποτελέσματα της επαναληπτικής δειγματοληψίας συμπεριλαμβάνονται στο χρονιαίο συνολικό αποτέλεσμα των θετικών δειγμάτων, διαμορφώνοντας έτσι μια πιθανή απόκλιση από τα αποτελέσματα της τυχαίας δειγματοληψίας. Κλείνοντας, αναφέρουμε ένα τελευταίο παράγοντα πιθανής αβεβαιότητας, ο οποίος συνδέεται με το γεγονός ότι για περιορισμό του κόστους της χημικής ανάλυσης δεν μεταφέρονται στο εργαστήριο αναφοράς του ΓΧΚ, όλα τα ύποπτα δείγματα της ίδιας παρτίδας που ανιχνεύθηκαν με το βιολογικό τεστ στο ΕΕΤΖΠ. Αντιθέτως, καθαρά για οικονομικούς λόγους μεταφέρεται μόνο ένα ποσοστό εξ αυτών. Σε διαφορετική περίπτωση, πιθανότερο είναι πως το ποσοστό ανεύρεσης θετικών δειγμάτων να ήταν πολύ μεγαλύτερο. Η μοναδική φορά που αναλύονται στο εργαστήριο αναφοράς, όλα τα ύποπτα δείγματα της ίδιας παρτίδας, είναι όταν μετά από χημική ανάλυση παρατηρηθεί μεγάλη διακύμανση στην συγκέντρωση και στα αποτελέσματα ταυτοποίησης της ουσίας.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7. ΓΕΝΙΚΑ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΕΙΣΗΓΗΣΕΙΣ

Η χορήγηση αντιβιοτικών ανθρώπινής χρήσης σε εκτρεφόμενα ζώα, αποτελεί κοινή κτηνιατρική πρακτική από τη δεκαετία του 1940. Τα ανθρώπινα αντιβιοτικά, συμβάλουν στην ανάπτυξη των ζώων και τα βοηθούν να διπλασιάσουν τη μάζα τους σε πολύ σύντομο χρονικό διάστημα αυξάνοντας έτσι την κερδοφορία. Πέραν από τα ζητήματα ηθικής που εγείρονται επί τούτου, η επιστημονική κοινότητα είναι πλέον πολύ ευαισθητοποιημένη σε σχέση με το θέμα της χρήσης αντιβιοτικών και κυρίως με τις δραματικές μεταβολές που παρατηρούνται στο γενετικό προφίλ των ανθεκτικών πλέον βακτηρίων. Παράλληλα έρευνες έχουν αρχίσει να ρίχνουν φως στον τρόπο με τον οποίο οι μακροπρόθεσμη διατροφική έκθεση σε υπολείμματα αντιβιοτικών, μπορεί να προκαλέσει διαφόρων ειδών προβλήματα υγείας όπως αλλεργίες, διαταραχές του γαστρεντερικού και παχυσαρκία. Είναι πλέον γεγονός ότι, όσο περισσότερες έρευνες διεξάγονται τόσο πιο ξεκάθαρη γίνονται οι επιπτώσεις στη δημόσια υγεία.

Τα αποτελέσματα της έρευνας μας δεν υποδηλώνουν άμεση απειλή για την ανθρώπινη υγεία. Εντούτοις, η ανίχνευση για έξι συνεχή έτη, με εξαίρεση την μεμονωμένη περίπτωση της δοξυκυκλίνης, χαμηλών συγκεντρώσεων αντιμικροβιακών ουσιών στο χοιρινό κρέας, προκαλεί ανησυχία και ιδιαίτερα σε σχέση με το φαινόμενο της μικροβιακής αντοχής. Η κοινή έκθεση της EFSA και του ΕΚΠΕΝ σχετικά με τη μικροβιακή αντοχή δείχνει πως τα βακτήρια που προκαλούν συχνότερα τροφιμογενείς λοιμώξεις, όπως η σαλμονέλα και το

καμπυλοβακτηρίδιο, έχουν επιδείξει μεγάλη αντοχή στις κοινές αντιμικροβιακές ουσίες. Επιπρόσθετα, έχει αποδειχτεί ότι οι χοίροι αποτελούν σημαντική δεξαμενή ενός νεοεμφανιζόμενου τύπου MRSA, ο οποίος σήμερα αποτελεί μια πολύ σημαντική αιτία ανθεκτικών ενδονοσοκομιακών λοιμώξεων. Η επιστημονική έκθεση του Ευρωπαϊκού Κέντρου Πρόληψης και Ελέγχου Νόσων (ECDC), της EFSA και του EMA καταγράφει ότι η εκτεταμένη χρήση αντιμικροβιακών ουσιών για την πρόληψη ασθενειών φαίνεται να αποτελεί σημαντικό παράγοντα κινδύνου για τη διάδοση του MRSA [Υπουργείο Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων 2016].

Στο σημείο αυτό, πρέπει να τονίσουμε πόσο σημαντικός είναι ο ρόλος των κτηνίατρων. Οι κτηνίατροι, εφαρμόζοντας ορθή κτηνιατρική πρακτική μπορούν να περιορίσουν τους κινδύνους που προκύπτουν από την αλόγιστη χρήση αντιβιοτικών, να προωθήσουν και να ενισχύσουν την υπεύθυνη και ορθολογική κτηνιατρική πρακτική, συμπεριλαμβανομένου της χρήσης αντιμικροβιακών φαρμακούχων ζωοτροφών στα χοιροστάσια. Με τον τρόπο αυτό, μπορεί να μετριαστούν οι διατροφικοί κίνδυνοι και το κρέας να παραδίδεται όσο το δυνατόν ελεύθερο από υπολείμματα στους καταναλωτές. Είναι ξεκάθαρο ότι η συνταγογράφηση, των αντιμικροβιακών ουσιών, πρέπει να γίνεται μόνο μετά από επίσκεψη του κτηνιάτρου στην εκτροφή και άμεση εκτίμηση της κατάστασης του ζωικού κεφαλαίου. Απαραίτητη είναι και η τήρηση αρχείου επισκέψεων κτηνιάτρου και χορήγησης κτηνιατρικών φαρμάκων. Με τον τρόπο αυτό, περιορίζονται οι περιπτώσεις υπέρμετρης ή λανθασμένης χρήσης αντιμικροβιακών ουσιών, ιδιαίτερα αυτών που περιλαμβάνονται στον κατάλογο της ΠΟΥ ως κρίσιμης σημασίας για τον άνθρωπο αντιμικροβιακές ουσίες. Τέλος, κρίνεται απαραίτητη η ενίσχυση εναλλακτικών παραγόντων που μειώνουν τη χρήση φαρμάκων, θεσπίζοντας επαρκείς μεθοδολογίες και θέτοντας ως προτεραιότητα την καταπολέμηση της περαιτέρω εξέλιξης της μικροβιακής αντοχής. Η μείωση της χρήσης αντιβιοτικών στα ζώα επιβάλλεται και μπορεί να γίνει εξαλείφοντας σταδιακά τη χρήση τους για την πρόληψη ασθενειών, αλλά και περιορίζοντας την ανάγκη μεταφύλαξης, δηλαδή τη μαζική φαρμακευτική αγωγή των ζώων με σκοπό τη θεραπεία των νοσούντων ζώων και την αποτροπή εκδήλωσης λοιμώξεων στα υγιή ζώα. Τονίζουμε ότι η κατάργηση της προφυλακτικής χρήσης αντιβιοτικών στην κτηνοτροφία επιβάλλεται και ότι οι τομείς της κτηνοτροφίας πρέπει να επικεντρώνονται περισσότερο στην πρόληψη των ασθενειών μέσω ορθών πρακτικών υγιεινής, στέγασης και φροντίδας των ζώων, καθώς και με αυστηρά μέτρα βιοασφάλειας που στο σύνολο τους αποσκοπούν στην αποφυγή της συστηματικής προφυλακτικής χρήσης αντιμικροβιακών ουσιών.

Ο κρατικός μηχανισμός οφείλει να προωθήσει εκστρατείες ευαισθητοποίησης σχετικά με την υπεύθυνη χρήση αντιμικροβιακών ουσιών στην εντατική κτηνοτροφία, δίνοντας κίνητρα για την ανάπτυξη βιολογικών ή εκτατικών μοντέλων κτηνοτροφίας. Σημαντικό μέτρο, αποτελεί η υλοποίηση της συνεχούς κατάρτισης των επαγγελματιών στον τομέα της υγείας των ζώων και των ιδιοκτήτων ζώων. Η εφαρμογή ενός προγράμματος αποφυγής καταλοίπων (Residue Avoidance Program), το οποίο εφαρμόζει η κρατική υπηρεσία FDA των Η.Π.Α [Botsoglou και Fletouris 2000:507–13], αποτελεί ιδανικό παράδειγμα εκπαίδευσης υιοθετώντας δογματικά την άποψη ότι η νομοθεσία ενισχύεται και αποδίδει όταν συνδυάζεται με επιμορφωτικά προγράμματα και επικοινωνία

μεταξύ όλων των άμεσα ενδιαφερόμενων. Το συγκεκριμένο πρόγραμμα, αφορά ένα εθελοντικό πρόγραμμα εκπαίδευσης των κτηνοτρόφων από κρατικούς φορείς, σε θέματα διαχείρισης του ζωικού τους κεφαλαίου και της χρήσης κτηνιατρικών φαρμάκων. Αποσκοπεί στην μετάδοση βασικών γνώσεων στους παραγωγούς για την ορθότητα των πρακτικών διαχείρισης της εκτροφής τους, με στόχο τη βελτίωση του ζωοϋγειονομικού καθεστώτος και τη μείωση της ανάγκης χρήσης αντιμικροβιακών ουσιών στη ζωοτεχνία, ώστε τελικά τα προϊόντα ζωικής προέλευσης να παραδίδονται στην αγορά χωρίς κατάλοιπα φαρμάκων. Αυτό γίνεται και με την καθιέρωση του συστήματος HACCP στις εκτροφές ζώων. Είναι προφανές ότι ο μόνος τρόπος να αντιμετωπιστεί το πρόβλημα των καταλοίπων στη ρίζα του, είναι η ενίσχυση της ποιότητας της πρωτογενούς παραγωγής. Για το λόγο αυτό, είναι αναγκαία η εστίαση των αρμόδιων κρατικών υπηρεσιών σε θέματα εκπαίδευσης των κτηνοτρόφων και εκσυγχρονισμού των πρακτικών διαχείρισης του ζωικού κεφαλαίου. Ένα άλλο σημαντικό πρόγραμμα για την εκπαίδευση των κτηνοτρόφων, είναι η βάση δεδομένων Food Animal Residue Avoidance Databank (FARAD) [Botsoglou και Fletouris 2000:507–13], που δημιουργήθηκε από το Residue Avoidance Program (Πρόγραμμα Αποφυγής Καταλοίπων) του FDA. Η διπλή φύση της βάσης αυτής είναι ιδανική, αφού αποτελεί πηγή πληροφοριών για την αποφυγή εμφάνισης των καταλοίπων, αλλά και πηγή γνώσης για θέματα επιμόρφωσης.

Στρατηγικές ή σχέδια δράσης σχετικά με τη χρήση αντιβιοτικών στις κτηνοτροφικές εκτροφές και την καταπολέμηση της μικροβιακής αντίστασης, πρέπει να οργανώνονται ακατάπαυστα και να υλοποιούνται τόσο σε ευρωπαϊκό όσο σε εθνικό επίπεδο. Αυτό μπορεί να γίνει με την ενίσχυση των υφιστάμενων διαδικασιών εκτίμησης κινδύνων και ιδιαίτερα για τις νέες κτηνιατρικές αντιμικροβιακές ουσίες, αναγνωρίζοντας τους βασικούς πιθανούς κινδύνους για τη δημόσια υγεία, σε πολύ πρώιμο στάδιο της διαδικασίας έγκρισης ενός φαρμάκου. Επιπλέον, η παρακολούθηση της ανάπτυξης αντοχής σε συγκεκριμένα βακτήρια, σε συνεργασία μεταξύ των ρυθμιστικών αρχών και των εταιρειών, όταν εγκρίνεται για πρώτη φορά μια νέα αντιμικροβιακή ουσίας για κτηνιατρική χρήση, κρίνεται αναγκαία. Τέλος, η φαρμακοεπαγρύπνηση της χρήσης αντιμικροβιακών ουσιών στα ζώα, μέσα στα πλαίσια του έργου του Ευρωπαϊκού Δικτύου για την επιτήρηση της κατανάλωση αντιμικροβιακών ουσιών (ESVAC) σε συνεργασία με τον EMA, με επακόλουθο τον υπολογισμό του αντίκτυπου των δράσεων που υλοποιούνται, επιβάλλεται.

Κλείνοντας, σχετικά με την αντιμετώπιση της μικροβιακής αντοχής ιδιαίτερα μετά τα πρόσφατα γεγονότα στην Δανία όπου εντοπίστηκαν νέα υπερανθεκτικά βακτήρια τα οποία διαθέτουν ένα γονίδιο που τα καθιστά ιδιαίτερα ανθεκτικά στην κολιστίνη και στα τελευταίας γενιάς αντιβιοτικά, η ανάγκη για προστασία της παγκόσμιας δημόσιας υγείας γίνεται ακόμη πιο επιτακτική. Τέτοια παθογόνα βακτήρια είχαν εντοπιστεί και στην Κίνα, όπου βακτήρια *E.coli* τα οποία είχαν απομονωθεί από χοίρους, κρέας πουλερικών αλλά και ανθρώπους, διαπιστώθηκε ότι διαθέτουν το νέο γονίδιο MCR-1 που τα καθιστά ανθεκτικά στην κολιστίνη. Λαμβάνοντας υπόψη ότι η κολιστίνη αποτελεί μία από τις τελευταίες θεραπευτικές επιλογές για την αντιμετώπιση σοβαρών λοιμώξεων στον άνθρωπο, από τα παραπάνω πολυανθεκτικά

εντεροβακτηριοειδή και προκειμένου να αποφευχθούν οι κίνδυνοι που ελλοχεύουν για τη δημόσια υγεία, η Ευρωπαϊκή Επιτροπή και ο ΠΟΥ, συστήνουν όπως τα κρίσιμης σημασίας για τον άνθρωπο αντιβιοτικά, δηλαδή οι κινολόνες, φλουοροκινολόνες, κεφαλοσπορίνες γ΄ και δ΄ γενιάς καθώς και η κολιστίνη, να μη χρησιμοποιούνται στην κτηνιατρική πράξη ως αντιβιοτικά πρώτης επιλογής, αλλά μόνο όταν έχει αποτύχει οποιαδήποτε άλλη θεραπεία. Επιπρόσθετα, η χρήση των παραπάνω αντιβιοτικών πρέπει πλέον να γίνεται μόνο μετά από ταυτοποίηση του παθογόνου μικροοργανισμού, με τη διενέργεια δοκιμής ευαισθησίας (αντιβιογράμματος). Τέλος, είναι απαραίτητο όπως η χρήση των αντιβιοτικών περιορίζεται μόνο στα ασθενή ζώα και όχι για προληπτικούς λόγους σε συλλογική θεραπεία μιας ολόκληρης ομάδας ζώων.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8. EXTENDED SUMMARY (ABSTRACTS)

A.

- *Kyriakides, D.; Panderi, I.; Hadjigeorgiou, M.; Christou, K.; Maou, M.; Kavantzas, N.; Lazaris, A. Veterinary antimicrobial residues in pork meat in Cyprus: An exposure assessment. J Food Comp Anal 2020, 90, 103512. DOI: https://doi.org/10.1016/j.jfca.2020.103512*

Abstract:

This work provides original analytical data on the levels of 45 commonly used veterinary antimicrobials in raw pork meat samples in Cyprus for six consecutive years between 2012 and 2017. A total of 15,484 raw pork meat samples were collected and screened for antibiotic residues by a microbiological screening method. A total of 1766 samples which were found suspected positive for antimicrobial residues were analyzed by means of a tandem LC–MS/MS confirmatory method.

Thirteen veterinary antimicrobials were detected in 596 positive samples, with a detection frequency of 3.8% and nine antimicrobials exceeded the Maximum Residue Limits. The estimated daily exposure dose was found to be less than 1.8 μ g/kg/day for all the compounds in both men and women above twenty years of age. These findings suggest that raw pork meat, do not present a potential health risk through its consumption in Cyprus.

B.

- *Kyriakides, D.; Lazaris, A.; Arsenoglou K.; Emmanouil, M.; Kyriakides, O.; Kavantzas, N.; Panderi, I. Dietary Exposure Assessment of Veterinary Antibiotics in Pork Meat on Children and Adolescents in Cyprus. Foods 2020, 9, 1479; DOI: https://doi:10.3390/foods9101479*

Abstract:

In recent years, huge amounts of antibiotics are administered to farm animals and as a result, residues of these antibiotics can accumulate in livestock products and once consumed, may be transmitted to humans. Farm animals' antibiotic treatment may therefore present a risk for consumers health and especially for children and adolescents. In children the immune system is not fully developed, and thus they are more susceptible than adults to resistant bacteria. Our research aimed to contact a dietary exposure assessment on veterinary antibiotics found in raw pork meat among children and adolescents in Cyprus, since pork is the most consumed red meat in Cypriot population. The study was based on the results of the occurrence of 45

residual antibiotics in raw pork meat samples in Cyprus between 2012 and 2017 in combination with data on the consumption of pork meat on children and adolescents taken from the latest demographic report in Cyprus. Estimated daily intake (EDI) values of veterinary antibiotics for children aged 6 to 9 years old, were higher compared to EDI values for adolescents aged 10 to 17 years old. The percentage ratio of the estimated daily intake to the acceptable daily intake for all the veterinary antibiotic residues was less than 5.65. These results indicate that antibiotic residues in pork meat of inland production, are below the acceptable daily intake and compose low risk to human health related to the exposure of antibiotics. Nevertheless, continuous exposure to low levels of antibiotic residues in respect to age vulnerability should be of a great concern.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 9. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

9.1 ΕΛΛΗΝΙΚΗ – ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Αρβανιτογιάννης Ι.Σ., Τζούρος Ν. (2006). Το νέο πρότυπο για ποιότητα και ασφάλεια τροφίμων ISO 22000. Παρουσίαση και ερμηνεία. Εκδόσεις Σταμούλη Α.Ε. 2006:37-40.

Βάσσος (2004). Τρόφιμα και υγεία του καταναλωτή (Τροφογενείς διαταραχές), εκδόσεις Παπασωτηρίου.

Βατόπουλος Α. Καθηγητής Μικροβιολογίας, Εθνική Σχολή Δημόσιας Υγείας. Η μικροβιακή αντοχή στα αντιβιοτικά. Ένα σημαντικό άγνωστο πρόβλημα της δημόσιας υγείας. Διατίθεται στο διαδίκτυο: http://helios-eie.ekt.gr/EIE/bitstream/10442/524/1/M01.036.07.pdf

Γενηγιώργης Κ. (2004). Βιολογικοί κίνδυνοι. Η σημερινή κατάσταση, Πρακτικά 3ου Πανελληνίου Συμποσίου Υγιεινής και Τεχνολογίας Τροφίμων: Τόμος Β', Αθήνα.

Γερμενής Α. (2000). Ιατρική Ανοσολογία. Εκδόσεις Παπαζήση 2000. Αθήνα, ISBN 960-02-1397-6.

Γεωργικές Στατιστικές (2015). Σειρά ΙΙ Αρ. Έκθεσης 45, Στατιστική Υπηρεσία, Κυπριακή Δημοκρατία (σελ.72). Διατίθεται στο διαδίκτυο: *http://www.mof.gov.cy/mof/cystat/statistics.nsf/All/F9A639CC1FAC3F3FC2257777004049A9/$file/AGRI_STAT-2015-091017.pdf?OpenElement*

Γιαμαρέλλου Ε. (2000). Ιατρική Μικροβιολογία (2000:327-349).

Γκόβαρης Α. (2005). Επίκουρος καθηγητής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας Σχολή Επιστημών Υγείας, Κτηνιατρικό Τμήμα, Εργαστήριο Υγιεινής Τροφίμων Ζωικής Προέλευσης, Καρδίτσα Διαχείριση ασφάλειας στην αλυσίδα τροφίμων – εφαρμογή HACCP: εμπειρίες – προβλήματα – εξελίξεις – πιστοποίηση, ΤΕΕ, Αθήνα, 7-8 Ιουλ. 2005.

Γούσια Π. και Παπαδοπούλου Χ. (2009). Εργαστήριο Μικροβιολογίας, Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων. Αντιβιοαντοχή και τρόφιμα, ένα αναδυόμενο πρόβλημα δημόσιας υγείας, Τόμος 54, Τεύχος 6, Νοέμβριος-Δεκέμβριος 2009.

Δημητρακόπουλος (1991). Εισαγωγή στην Κλινική Μικροβιολογία και τα Λοιμώδη Νοσήματα.

Εθνικός Οργανισμός Φαρμάκων (ΕΟΦ), Εθνικό Συνταγολόγιο 2007, Κεφάλαιο 5.1, p.273.

Εκτελεστική Απόφαση της Επιτροπής της 28ης Μαρτίου 2014 για την τροποποίηση της απόφασης **98/536/ΕΚ** όσον αφορά τον πίνακα των εθνικών εργαστηρίων αναφοράς. Διατίθεται στο διαδίκτυο: *https://www.moh.gov.cy/moh/sgl/sgl.nsf/all/67C287AFBD5A7456C2257D8500414ABA/$file/http___eur-lex.europa_%CE%B5%CF%81%CE%B3%CE%B1%CF%83%CF%84%CE%AE%CF%81%CE%B9%CE%B1%20%CE%B1%CE%BD%CE%B1%CF%86%CE%BF%CF%81%CE%AC%CF%82.pdf?openelement*

Εργαστήριο Οικολογίας και Προστασίας Περιβάλλοντος, Σημειώσεις: Κτηνιατρικά Φάρμακα και Περιβάλλον. Διατίθεται στο διαδίκτυο: http://ecoenvir.vet.auth.gr

Θεοδωρόπουλος Γ. Επίκουρος Καθηγητής Κτηνιατρικής Παρασιτολογίας, Τμήμα Ζωικής Παραγωγής, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών. Έλεγχος της τριχινέλλωσης για την ασφάλεια τροφίμων ζωικής προέλευσης.

Καλιαμπάκος Δ. Επίκ. Καθηγητής Ε.Μ.Π. 'Μεθοδολογίες Αξιολόγησης Κινδύνου'.

Καλογερόπουλος Ν. 'Τοξικοί Παράγοντες σε Τρόφιμα και Σχετική Νομοθεσία'.

Κανονισμός (ΕΕ) αριθ. 396/2005 του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου της 23ης Φεβρουαρίου 2005 για τα ανώτατα όρια καταλοίπων φυτοφαρμάκων μέσα η πάνω στα τρόφιμα και τις ζωοτροφές φυτικής και ζωικής

προέλευσης και για την τροποποίηση της οδηγίας 91/414/ΕΟΚ του Συμβουλίου.

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

Κανονισμός (ΕΕ) αριθ. 2018/782 της Επιτροπής της 29ης Μαΐου 2018 για τον καθορισμό των μεθοδολογικών αρχών της εκτίμησης του κινδύνου και των συστάσεων για τη διαχείριση του κινδύνου που αναφέρονται στον κανονισμό (ΕΚ) αριθ. 470/2009.

Κανονισμός (ΕΕ) αριθ. 2019/6 του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου της 11ης Δεκεμβρίου 2018 για τα κτηνιατρικά φάρμακα και για την κατάργηση της οδηγίας 2001/82/ΕΚ.

Κανονισμός (ΕΕ) αριθ. 2018/782 της Επιτροπής της 29ης Μαΐου 2018 για τον καθορισμό των μεθοδολογικών αρχών της εκτίμησης του κινδύνου και των συστάσεων για τη διαχείριση του κινδύνου που αναφέρονται στον κανονισμό (ΕΚ) αριθ. 470/2009.

Κατσαούνης Ν. και Σπαής Α.Β. (1998). Χοιροτροφία. Εκδόσεις Σύγχρονη Παιδεία Θεσσαλονίκη.

Κατσαφάδου Α.Η., Φθενάκης Γ.Χ., Αναγνωστόπουλος Α.Κ., Μπαρμπαγιάννη Μ.Σ., Σπανός, Σ.Α., Μαυρογιάννη Β.Σ., Μπιλλίνης Χ., Τσάγκαρης Γ.Θ. Πρωτεομική ανάλυση αίματος και γάλακτος προβατίνων με μαστίτιδα από *Mannheimia haemolytica* (σελ.147).
Κουνενής Γ. (1997). Φαρμακοκινητική. Φαρμακολογία Ι. Γενικό Μέρος ΙΙ. Ειδικό Μέρος (Αντιμικροβιακά Αντιπαρασιτικά Αντινεοπλασματικά Ανοσοκατασταλτικά) 1997:13-27.

Κρήτας Σ.Κ. (2004): Σημειώσεις Παθολογίας Χοίρου. Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Θεσσαλίας, Καρδίτσα.

Λαγοδήμος Α.Γ. και Χουντάλας Π., Σημειώσεις Μαθήματος «Συστήματα Διασφάλισης Ποιότητας», σελ131-133.

Λαΐνας Θ. (2015). Εφημερίδα: ΤΟ ΒΗΜΑ, Τίτλος: Κίνδυνος εμφάνισης ανθεκτικών μικροβίων. Διατίθεται στο διαδίκτυο: *http://www.ellinikigeorgia.gr/xrisi-antiviotikon-ektrefomena-zoa/*

Μαρσέλος Μ., Εργαστήριο Φαρμακολογίας, Ιατρική Σχολή - Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων - ΣΥΝΟΠΤΙΚΗ ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΑ Ι.

Μαστρονικολή Σ. (2007). Πανεπιστήμιο Αθηνών, Τμήμα Χημείας, Εργ. Χημείας Τροφίμων. Σημειώσεις για το μάθημα μικροβιολογίας Τροφίμων: Τροφογενείς Ασθένειες από Βακτήρια.

Μια και Ενιαία Υγεία. Διατίθεται στο διαδίκτυο: http://www2.keelpno.gr/blog/?p=7234&lang=el

Μουζούρας Σ.Γ. (1996) Κτηνιατρική Φαρμακολογία. Εκδόσεις Sawas Mouzouras, Αθήνα

Μπατζίας Γ. (2005): Κτηνιατρική Φαρμακολογία (V), Αντιμικροβιακά-Αντιμυκητιακά. Τμήμα Εκδόσεων Α.Π.Θ., Θεσσαλονίκη.

Οδηγία 81/852/ΕΟΚ του Συμβουλίου της 28ης Σεπτεμβρίου 1981 για την προσέγγιση των νομοθεσιών των κρατών μελών σχετικά με τα αναλυτικά, φαρμακοτοξικολογικά και κλινικά πρότυπα και πρωτόκολλα στον τομέα του ελέγχου των κτηνιατρικών φαρμακευτικών προϊόντων. Διατίθεται στο διαδίκτυο: https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EL/TXT/?uri=CELEX%3A31981L0852

Παπαδημητρίου Κ. (1988). Είδη κοκκιωματωδών φλεγμονών. Γενική Παθολογία και Παθολογική Ανατομική, 1988; 96, 113.

Παπαδοπούλου Χρ. (2006). Μικροβιολογία και Υγιεινή Τροφίμων.

Παπαπαναγιώτου Ι. και Κυριαζοπούλου-Δαλαϊνα Β. (2005). Εισαγωγή στην Ιατρική Μικροβιολογία, Ιολογία, και Ανοσολογία, 1η έκδοση University Studio Press, Θεσσαλονίκη, 2005.

Στατιστική Υπηρεσία, Υπουργείο Οικονομικών, Κυπριακή Δημοκρατία. Ευρωπαϊκή Έρευνα **2014** (σελ. 28). Διατίθεται στο διαδίκτυο: http://www.cystat.gov.cy/mof/cystat/statistics.nsf/All/C80AD38EAA44F2C3C22577DF00321134/$file/EU_HEALTH_SURVEY_2014-EL-141116.pdf?OpenElement

Στατιστική Υπηρεσία, Υπουργείο Οικονομικών, Κυπριακή Δημοκρατία, Δημογραφική Έκθεση **2016**. Πληθυσμιακές Στατιστικές, Σειρά ΙΙ. Αρ. Έκθεσης 53 (σελ.58, Πίνακας 28). Διατίθεται στο διαδίκτυο: http://www.cystat.gov.cy/mof/cystat/statistics.nsf/All/C106FD0599F64191C22583550034275E/$file/DEMOGRAPHIC_REPORT-2016-271117.pdf?OpenElement

Τζιά Κ. Αν. Καθηγήτρια ΕΜΠ. 'Ανάλυση επικινδυνότητας και ποσοτικοποίηση κινδύνων HACCP-FSOs (Food Safety Objectives) – Προϋποθέσεις Υγιεινής (PRPs)'.

Τζιά Κ. Αν. Καθηγήτρια ΕΜΠ. 'Αποτίμηση Ρίσκου και Ασφάλεια Τροφίμων'.

Τυρπένου Α.Ε., Τσιγουρή Α.Δ., Γούτα Ε.Η. (1998). ΔΕΛΤΙΟΝ ΕΛΑ. ΚΤΗΝ. ΕΤΑΙΡΕΙΑΣ 1998, 49(2): 115-127. Ανίχνευση, ταυτοποίηση και ποσοτικός προσδιορισμός σουλφοναμιδών στο νεφρό και το κρέας των παραγωγικών ζώων με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης και ανιχνευτή πολλαπλών φωτοδιόδων (HPLC-PDA).

Τυρπένου (2002). Ινστιτούτο Κτηνιατρικών Ερευνών Θεσσαλονίκης: Φυσικοί και Χημικοί κίνδυνοι στα τρόφιμα, '*From Stable to Table*', 2002 AFSIS.

Υπουργείο Γεωργίας, Αγροτικής Ανάπτυξης και Περιβάλλοντος, Τμήμα Γεωργίας, Επισκόπηση Χοιροτροφίας 2014 & 2017, Κλάδος Ζωικής Παραγωγής και Διατροφής Ζώων, ISSN 1450-4820, Μάρτιος 2018 Λευκωσία – Κύπρος.

Υπουργείο Γεωργίας, Αγροτικής Ανάπτυξης και Περιβάλλοντος. Τμήμα Γεωργίας. Επισκόπηση Χοιροτροφίας **2017**. Κλάδος Ζωικής Παραγωγής και Διατροφής Ζώων. ISSN 1450-4820 Μάρτιος 2018 Λευκωσία – Κύπρος.

Υπουργείο Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων, Δ/νση Κτηνιατρικής Αντίληψης Φαρμάκων και Εφαρμογών, Τμήμα Κτηνιατρικών Φαρμάκων, Εφοδίων και Βιολογικών Προϊόντων. Συνετή χρήση Κτηνιατρικών Φαρμάκων – Αντιμικροβιακών Ουσιών στα Παραγωγικά Ζώα – Κίνδυνος Ανάπτυξης Μικροβιακής Αντοχής, Αθήνα 16 Δεκεμβρίου 2016.

Χριστοδουλάκης Π. (1998). 'Φυτοφάρμακα-Περιβάλλον', Πρακτικά 2ης Πανελλήνιας Συνάντησης Φυτοπροστασίας, Λάρισα, 5-7 Μαΐου 1998, σελ. 169-177.

9.2 ΞΕΝΟΓΛΩΣΣΗ – ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Aarestrup F., Schwarz S. (2006). Chapter 12: Antimicrobial Resistance in Staphylococci and Streptococci of Animal Origin. In: Antimicrobial Resistance in bacteria of animal origin by F. M. Aarestrup, American Society for Microbiology Press, Washington D.C.

Adkinson Franklin N. (1980) The Effects on Human Health of Subtherapeutic Use of Antimicrobials in Animal Feeds. National Research Council (US) Committee to Study the Human Health Effects of Subtherapeutic Antibiotic Use in Animal Feeds. Washington (DC): National Academies Press (US).

Ajslev T.A., Andersen C.S., Gamborg M., Sorensen T.I.A., Jess T. (2011). Childhood overweight after establishment of the gut microbiota: the role of delivery mode, pre pregnancy weight and early administration of antibiotics. Int. J. Obes. 2011;35:522–529. DOI: https://doi.org/10.1038/ijo.2011.27

Alekshun M.N., Levy S.B. (2000). Bacterial drug resistance: response to survival threats, in: Storz, G., Hengge-Aronis R. (Eds), Bacterial stress responses, ASM Press, Washington D.C., pp.323-366.

Alonso A., Sanchez P. and Martinez. (2001). Environmental selection of antibiotic resistance genes. Environ. Microbiol. 3:1-9.

American Veterinary Medical Association (2008). One Health: A New Professional Imperative. One Health Initiative Task Force: Final Report, July 15, 2008.

Anonymous (2006). Annual Report on Zoonoses in Denmark 2005. Ministry of Food, Agriculture and Fisheries 2006.

Arnich N., Sirot V., Riviere G., Jean J., Noll L., Guerin T., Leblanc J. (2012). 'Dietary exposure to trace elements and health risk assessment in the 2nd French Total Diet Study', Food and Chemical Toxicology, 50, 2432–2449.

Bager F. & Helmuth R. (2001). Epidemiology of quinolone resistance in Salmonella. Vet. Res. 32, 285-290.

Baines J., Cunningham J., Leemhuis C., Hambridge T., Mackerras D. (2011). 'Risk Assessment to Underpin Food Regulatory Decisions: An Example of Public Health Nutritional Epidemiology', Nutrients, 3 (2011) 164-185.

Bailey & Scott. (2002). *Enterobacteriaceae*. In: Betty A. Forbes, Daniel F. Sahm, Alice S. Welssfeld. (ed.) Diagnostic Microbiology. 11th Edition by Mosby Inc, Missouri, 2002 p. 365-377.

Bailey L., Forrest C.B., Zhang P., Richards T.M., Livshits A., DeRusso P.A. (2014). Association of antibiotics in infancy with early childhood obesity. JAMA Pediatr. 2014;168(11):1063–1069. DOI: https://doi.org/10.1001/jamapediatrics.2014.1539

Barragry T.B. (1994). Veterinary Drug Therapy. Lea & Febriger, Pennsylvania, U.S.A.

Barton D.M. (2000). Nutrition Research Reviews. School of Pharmacy and Medical Sciences, University of South Australia, Antibiotic use in animal feed and its impact on human health (2000), 13, 279±299.

Baynes R.E., Martin-Jimenez T., Craigmill A.L. (1999). Estimating Provisional Acceptable Residues for Extralabel Drug Use in Livestock. Regul Toxicol Pharm 1999; 29:287-99 .

Beckalski A., Lau B.P., Lewis D., Seaman S.W. (2003). Acrylamide in Foods Occurrence, Sources and modeling, 51, 802-808. J Agric Food Chem. 2003 Jan 29;51(3):802-8.

Bennett P.M. (1995). The spread of drug resistance, in: Baumberg S., Young J.P.W., Wellington E.M.H., Saunders J.R., (Eds), Population Genetics in Bacteria, University Press, Cambridge, pp.317-344.

Berends B.R., Snijders J.M.A. and Van Logtestijn J.G., (1993). Efficacy of current E.C. meat inspection procedures and some proposed revisions with respect to microbiological safety: a critical review. Vet Rec., 133:411-415.

Boatman M. (1998). Survey of antimicrobial usage in animal health in the European Union, Boatman consulting, Sept.1998, by order of FEDESA.

Bories G., Louisot, P. (1998). Rapport concemant l' utilisation d' antibiotiques comme facteurs de croissance en alimentation. Rapport presente au Ministere de l' Agriculture, de la Peche et de Alimentation, p. 23.

Botsoglou N.A., Fletouris D.J. (2000) Factors influencing the occurrence of residues in foods. In: Fletouris DJ, Botsoglou NA, eds. Drug Residues in Foods Pharmacology: Food Safety, and Analysis. CRC Press 2000:491–500.

Botsoglou N.A. & Fletouris DJ. (2000). Drug Residues and Public Health. In: Fletouris DJ, Botsoglou NA, eds. Drug Residues in Foods Pharmacology: Food Safety, and Analysis. CRC Press 2000:269–98.

Botsoglou N.A., Fletouris DJ. (2000). Safety assessment and control of residues. In: Fletouris DJ, Botsoglou NA, eds. Drug Residues in Foods Pharmacology: Food Safety, and Analysis. CRC Press 2000:299–407.

Botsoglou N.A., Fletouris D.J. (2000). Residue Avoidance Management. In: Fletouris DJ, Botsoglou NA, eds. Drug Residues in Foods Pharmacology: Food Safety, and Analysis. CRC Press 2000:507–13.

Botsoglou N.A., Fletouris D.J. (2001). Drug residues in foods: pharmacology, food safety, and analysis (Food science and technology) New York: Marcel Dekker.

Boxall (2003). Cranfield Centre for Ecochemistry, United Kingdom – Dana Kolpin – *USGS* Bent Holling-Sorensen – *The Danish University of Pharmaceutical Sciences* – Johannes Tolls – *Henkel KCAA, Germany* 8-1-2003 Are Veterinary Medicines Causing Environmental Risks?

Boxall (2010). Veterinary medicines in the environment. In Cunningham F., Elliott J., Lees P. (Eds): Comparative and veterinary pharmacology, Springer, Berlin, Germany, p.291-314.

Bridges B.A. (2001). Hypermutation in bacteria and other cellular systems. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 2001 Jan 29;356(1405):29-39.

Budka H., Aguzzi A, Brown P, et al. (1995). Neuropathological diagnostic criteria for Creutzfeldt-Jakob (CJD) and other human spongiform encephalopathies (prion diseases). Brain Pathol 1995; 5: 459-466.

Burgat V. (1984): Allergy and residues. In: Safety and quality in food (DSA, ed.), p. 143-157, Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam.

CAC/GL 53-2003. Guidelines on the judgement of equivalence of sanitary measures associated with food inspection and certification systems.

Capleton C.A., Courage C., Rumsby P., Holmes P., Stutt E., Boxall B.A., Levy S.L. (2006). Prioritizing veterinary medicines according to their potential indirect human exposure and toxicity profile. Toxicology Letters 163 (2006) 213–223.

Cemiglia C.E. & Kotarski S. (1999). Evaluaion of vertinary drug residues in food for their potential to affect human intestinal micro flora. Regulatory Toxicology and Pharmacology, 29: 238-261.

CFSAN, Center for Food Safety and Applied Nutrition and Food and Drug Administration (FDA), Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins Handbook. Bad Bug Book. Vol. 2009. 2003, College Park Md.: CFSAN/FDA.

Chan-Hon-Tong A., Charles M., Forhan A., Heude B., Sirot V. (2013). 'Exposure to food contaminants during pregnancy', Science of the Total Environment 458-460, 27–35.

Chopra I., O'Neill A.J., Miller K. (2003). The role of mutators in the emergence of antibiotic-resistance bacteria. Drug Resist Update. 2003 Jun;6(3):137-45.

Chou H.-W., Wang J.-L., Chang C.-H., Lee J.-J., Shau W.-Y., Lai M.-S. (2013). Risk of severe dysglycemia among diabetic patients receiving levofloxacin, ciprofloxacin, or moxifloxacin in Taiwan. Clin. Infect. Dis. 2013;57 (7):971–980. DOI: http://dx.doi.org/10.1093/cid/cit439

Committee for Veterinary Medicinal Products (CVMP). *Trimethoprim*. Summary Report (2). EMEA/MRL/255/97-FINAL. September 1997. Available on line: *https://www.ema.europa.eu/documents/mrl-report/trimethoprim-summary-report-2-committee-veterinary-medicinal-products_en.pdf* *(26)*

Committee for Veterinary Medicinal Products (CVMP). *Doxycycline Hyclate*. Summary Report (1). EMEA/MRL/101/96-FINAL. June 1996. Available on line: *https://www.ema.europa.eu/documents/mrl-report/doxycycline-hyclate-summary-report-committee-veterinary-medicinal-products_en.pdf*

Commission Decision 657/2002/EC of 12 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results, Official J. Eur. Commun., L 221, 2002, 8-36.

Connor E.E. (1998). Sulfonamides Antibiotics. Honorable mentioned paper Primary Care, Update for OB/GYNS, 5: 32-35.

Corley J. (2003). Best practices in establishing detection and quantification limits for pepticide residues in food. Handbook of residue analytical methods for agrochemicals, Wiley.

Council Directive 89/397/EC of 14 June 1989 on the official control of foodstuffs, Official J. Eur. Commun. L 186, 1989, 23-26.

Council Directive 96/23/EC of 29 April 1996 on measures to monitor certain substances and residues thereof in live animals' products and repealing Directives 85/358/EEC and 86/469/EEC and Decisions 89/187/EEC and 91/664/EEC, Official J. Eur. Commun. L 125, 1996, 10-32.

Council Regulation 90/2377/EC of 26 June 1990 laying down a Community procedure for the establishment of maximum residue limits of veterinary medicinal products in foodstuffs of animal origin, Brussels, Belgium, Official J. Eur. Commun. L 224, 1990, 1-124.

Couturier M., Bex F., Bergquist P.L. and Maas W.K. (1988). Identification and classification of bacterial plasmids Microbiol Reviews 1988.

Cox L.M., Blaser M.J. (2014). Antibiotics in early life and obesity. Nat. Rev. Endocrinol. 2014:11(3):182–190. DOI: http://dx.doi.org/10.1038/nrendo.2014.210

Cox L.M., Yamanishi S., Sohn J., Alekseyenko A.V., Leung J.M., Cho I., Kim S.G., Li H., Gao Z., Mahana D., Zárate Rodriguez J.G., Rogers A.B., Robine N., Loke P., Blaser M.J. (2014). Altering the intestinal microbiota during a critical developmental window has lasting metabolic consequences. Cell 2014;158(4):705–721. DOI: http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2014.05.052

Cunningham F., Jonathan l. Elliott, Peter l. Lees (2010). Springer Heidelberg Dordrecht, London - New York, Library of Congress Control Number: 2010920286 # Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2010 Comparative and Veterinary Pharmacology, p.273.

CYSTAT (2017). Population Statistics, Series II. Demographic Report No 53, pp 58, Table 28. Republic of Cyprus, Statistical Service, Retrieved November 2017 from: http://www.cystat.gov.cy/mof/cystat/statistics.nsf/All/C106FD0599F64191C22583550034275E/$file/DEMOGRAPHIC_REPORT-2016-271117.pdf?

D'Allaire S., Drolet R., Brodeur D. (1996). Sow mortality associated with high ambient temperatures. Can Vet J Volume 37, April 1996, pp.237-239

Davies L., O'Connor M., Logan S. (2004). 'Pesticide residues in food and drinking water' εκδ. Hamilton D. and Crossley S., Wiley, 2004.

Davies J. (1994). Inactivation of antibiotics and the dissemination of resistance genes. Science 1994 Apr 15;264(5157):375-381.

Davies (2014). 'Antimicrobial resistance – why the irresponsible use of antibiotics in agriculture must stop. A briefing from the Alliance to save our antibiotics'.

De Boer W.J., Van der Voet H. (2007). MCRA, Release 6. A web-based programme for Monte Carlo Risk Assessment. Bilthoven and Wageningen (the Netherlands): Biometris, Wageningen University and Research Centre and National Institute for Public Health and the Environment (RIVM).

De Kruif Paul. Microbe Hunters. Pocket Books, Inc.-1926.

De Ruyck H. (2003). Development of confirmatory methods and disposition of some veterinary drugs in food.

Dewdney J.M., Maes L., Raynaud J.P., Blanc F., Scheid J.P., Jackson T., Lens S. and Verschueren C. (1991). Risk assessment on antibiotic residues of β-lactams and macrolides in food products with regard to their immune-allergic potential – Allergy/Immunotoxicology Working Party, FEDESA, Brussels (accepted 3 April 1991).

DiPietre D., Tubbs R., Fuchs L. (2001). Critical Control Points of cost containment and financial management for swine production. London, Swine Conference - The Pork Industry and Public Issues 5-6 April 2001, pp.95-108.

Dona A.A., Arvanitoyannis I.S. (2009). Health effects of genetically modified food. Archives of Hellenic Medicine 2009, 26(6):727–740.

Dougherty C., Holtz S., Reinert J., Panyacosit L., Axelrad D., Woodruff T., (2000). 'Dietary Exposures to Food Contaminants across the United States', Environmental Research Section A 84, 170-185.

Duffy G., Cloak O., O'Sullivan M., Guillet A., Sheridan J., Blair I., McDowell D. (1999). The incidence and antibiotic resistance profiles of Salmonella spp. on Irish retail meat. Food Microbiology 16: 623-631.

EFSA (2006). The Community Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Antimicrobial Resistance in the European Union in 2006. EFSA Journal 2006.

EFSA (2009). The Community Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses and Zoonotic Agents in the European Union in 2007, The EFSA journal, 2009; 223

EFSA (2010$^{\alpha}$). Standard sample description for food and feed. EFSA Journal 2010;8(1):1457 [54 pp.]. doi:10.2903/j.efsa.2010.1457. Available online: www.efsa.europa.eu

EFSA (2011). Official Website (20 Apr 2011). Available on line: *http://www.efsa.europa.eu/en/faqs/faqchemicalsinfood.htm#4*

EFSA 2011$^{\alpha}$. Evaluation of the FoodEx, the food classification system applied to the development of the EFSA Comprehensive European Food Consumption Database. EFSA Journal 2011; 9(3):1970. [27pp.] doi:10.2903/j.efsa.2011.1970. Available online: www.efsa.europa.eu/efsajournal

EFSA 2011$^{\beta}$. The food classification and description system FoodEx 2 (draft-revision 1). Supporting Publications 2011:215. [438 pp.]. Available online: www.efsa.europa.eu

EFSA 2011$^{\gamma}$. Use of the EFSA Comprehensive European Food Consumption Database in Exposure Assessment. EFSA Journal 2011;9(3):2097. [34 pp.] doi:10.2903/j.efsa.2011.2097. Available online: www.efsa.europa.eu/efsajournal

EFSA (2012). The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2010. EFSA Journal, 2012. 10(3)

EFSA (2012$^{\alpha}$); Lead dietary exposure in the European population. EFSA Journal 2012; 10(7):2831. [59 pp.] doi:10.2903/j.efsa.2012.2831. Available online: www.efsa.europa.eu/efsajournal

EFSA (2012$^{\beta}$). Cadmium dietary exposure in the European population. EFSA Journal 2012;10(1):2551. [37 pp.] doi:10.2903/j.efsa.2012.2551. Available online: www.efsa.europa.eu/efsajournal

EFSA (2012$^{\gamma}$). Scientific Opinion on the risk for public health related to the presence of mercury and methylmercury in food. EFSA Journal 2012;10(12):2985. [241 pp.] doi:10.2903/j.efsa.2012.2985. Available online: www.efsa.europa.eu/efsajournal

EFSA (2013). http://www.efsa.europa.eu/en/datexfoodcdb/datexeumenu.htm; visit 06-12-2013

EFSA (2014). Dietary exposure to inorganic arsenic in the European population. EFSA Journal 2014;12(3):3597, 68 pp. doi:10.2903/j.efsa.2014.3597. Available online: www.efsa.europa.eu/efsajournal

EMEA (2000). Evaluation of medicines for human use. Note for guidance on the investigation of bioavailability and bioequivalence. Committee for proprietary medicinal products (CPMP), 2000. CPMP/EWP/QWP/1401/98.

Esbjerg L. & Bruun P., (2003). Legislation, Standardization, Bottlenecks and Market Trends in Relation to Safe and High Quality Food Systems and Networks in Denmark, MAPP Centre for Research in the Food Sector (Aarhus School of Business, Aarhus Denmark).

Eurostat (2011). Food: from farm to fork statistics. 2011 edition (p.135). Available on line: *https://ec.europa.eu/eurostat/documents/3930297/5966590/KS-32-11-743-EN.PDF*

FAO/WHO (2008[b]). Dietary exposure assessment of chemicals in food. Report of a Joint FAO/WHO Consultation, Annapolis, MD, Geneva, World Health Organization.

FAO/WHO (2009). Chapter 6. «DIETARY EXPOSURE ASSESSMENT OF CHEMICALS IN FOOD», Principles and methods for the risk assessment of chemicals in food, World Health Organization, Switzerland, 2009. Available online: http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/44065/WHO_EHC_240_9_eng_Chapter6.pdf;jsessionid=BDC84FCD92B60A0FB0196D06FF7E1C55?sequence=9

FAO/WHO (2009). Chapter 7 «Risk Characterization», Principles and methods for the risk assessment of chemicals in food, World Health Organization, Switzerland, 2009. Available online: http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/44065/WHO_EHC_240_10_eng_Chapter7.pdf;jsessionid=770E46A811F84691155D455779DA6420?sequence=10

FAO/WHO (2009[c]**)**. Principles and methods for the risk assessment of chemicals in food (A joint publication of the Food and Agriculture Organization of the United Nations and the World Health Organization). Geneva, World Health Organization, Environmental Health Criteria 240; http://www.who.int/entity/foodsafety/chem/principles/en/index.html

Francois A.C. (1962). Mode of action of antibiotics on growth. World Rev. Nutr. Diet. 3:21.

Franz C., Holzapfel W., Stiles M. (1999). *Enterococci* at the crossroads of food safety? International Journal of Food Microbiology 47: 1-24.

Gajdusek D.C. & Zigas V. (1957). Degenerative disease of the centralnervous system in New Guinea: the endemic occurrence of «kuru» in the native population. N Engl J Med 1957; 257:974-978 November 14, 1957 DOI: 10.1056/NEJM195711142572005.

Girardi C. & Odore R. (2008). Pharmacological treatments and risks for the food chain. Vet Res Commun 2008;32:11-8.

Goodtz T.D. (2006): The forgotten Gram-negative bacilli: what genetic determinants are telling us about the spread of antibiotic resistance. Biochem Pharmacol 71(7):1073-1084.

Gotham E. (2000). Agricultural Biotechnology (Questions and Answers) Cornell University.

Gould H. et al. (2003): "The biology of IGE and the basis of allergic disease". Annual Review of Immunology. Vol. 21:579–628 https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.21.120601.141103

Grape M., Sundstrom L., Kronvall G. (2003). New *dfr2* gene as a single-gene cassette in a class 1 integron from a trimethoprim resistance *E. coli* isolate. Microb Drug Resist. 2003 Winter;9(4):317-22.

Guardabassi L. & Courvalin P. (2006). Modes of Antimicrobial Action and Mechanisms of Bacterial Resistance. In F. Aarestrup (ed.). Antimicrobial resistance in bacteria of animal origin, 1st ed. ASM Press, Washington, pp.8-17.

Halling-Sorenson B., Nors Nielsen S., Lanzky P.F., Ingerslev F., Holten Lutzhoft H.C., Jorgensen S.E. (1998). Occurrence, fate and effect of pharmaceutical substances in the environment-a review. Chemosphere, 36: 357-393.

Harbottle H., Thakur S., Zhao S., and White D.G. (2006). Genetics of Antimicrobial Resistance. Animal Biotechn, 17: 111-124.

Hassal K.A. (1990). 'The biochemistry and uses of pesticides' 2nd Ed., VCH New York, Weinheim, σελ.10-13, 31-44.

Hawkey P.M. (2000). Mechanisms of resistance to antibiotics. Intensive Care Med. 2000;26 Suppl. 1: S9-13.

Henrike C.H., Broekman, Thomas Eiwegger, Julia Upton, Katrine L. Bøgh (2016). 'IgE – the main player of food allergy', 2016 Elsevier Ltd.

Herrman J. & Younes M. (1999), 'Background to the ADI/TDI/PTWI', Regulatory Toxicology and Pharmacology 30, S109–S113.

Heshmati A. (2015). Impact of Cooking Procedures on Antibacterial Drug Residues in Foods. J. Food Qual. Hazards Control 2015, 2(2): 33-37.

Heuer H. & Smalla K. (2007). Manure and sulfadiazine synergistically increased bacterial antibiotic resistance in soil over at least two months. Environmental Microbiology, 9: 657-666.

Hey C.R. & Edwards P.R. (1958). Resistance of *Salmonella typhimurium* to tetracyclines. Exp. Biol. Med. 97: 550-551.

Hof H. (1991): Intracellular microorganisms: a particular problem for chemotherapy. Infection 19 (Suppl 4): 193-194.

Holleran E. (1999). Private incentives for adopting food safety and quality assurance. Food policy.

Hooper D.C. (2001). Emerging mechanism of fluoroquinolone resistance. Emerg. Infect Dis. 2001 Mar-Apr;7(2):337-41.

Hopkins K.L., Davies R.T., Threlfall E.J. (2005). Mechanisms of quinolone resistance in *Escherichia Coli* and *Salmonella*: recent developments. *Int J Antimicrob. Agents.* 2005 May;25(5):358-73.

Hughes J., Stutt E., Capleton A.C., Holmes P., Boxall A., Johnson J., Mongan L., James K., Shuker L., Levy L.S. (2006). Evaluation of the potential risks to consumers from indirect exposure to veterinary medicines. Department for Environment, Food and Rural Affairs (DEFRA), London, U.K.

Isenberg H. (2004). Clinical Microbiology Procedures Handbook, 2nd edition.

ISO/IEC 17025:2005. General requirements for the competence of testing and calibration laboratories. Available on line: *https://www.iso.org/standard/39883.html*

Ji K., Kho Y., Park C., Paek D., Ryu P., Paek D., Kim M., Kim P., Choi K. (2010a). Influence of water and food consumption on inadvertent antibiotics intake among general population. Environmental Research. 2010a;110(7):641-649. DOI: https://doi.org/10.1016/j.envres.2010.06.008

Ji K., Kho Y., Park Y., Choi K. (2010b). Influence of a five-day vegetarian diet on urinary levels of antibiotics and phthalate metabolites: a pilot study with "Temple Stay" participants. Environmental Research. 2010b;110:375–382. DOI: https://doi.org/10.3390/toxics8010003

Johnson R.T. & Gibbs CJ. (2004). Creutzfeldt-Jakob disease and related transmissible spongiform encephalopathies. N Engl J Med 1998; 339: 1994-2004.

Jose L.D., Mart-Cida R., Castell V., Llobet M.J. (2008). 'Human exposure to PBDEs through the diet in Catalonia, Spain: Temporal trend A review of recent literature on dietary PBDE intake', Toxicology 248, 25–32.

Jukes T.H. & Williams W.L. (1953). Nutritional effects of antibiotics. Pharmacology Review 5: 381.

Kapotas N.M. (2003). Laboratory of Microbiology, University of Athens, Medical School, Athens, Greece. Are emerging waterborne and foodborne parasitic zoonoses a significant public health issue? Archives of Hellenic Medicine 2003, 20(4):407–424.

Karg H., Bilkei G. (2002). Causes of sow mortality in Hungarian indoor and outdoor pig production units. Berl Munch Tierarztl Wochenschr, 2002, 115(9-10), pp. 366-368. Available online: *http://europepmc.org/abstract/MED/12357674*

Kathariou S. (2002). *Listeria monocytogenes* virulence and pathogenicity, a food safety perspective, Journal of Food Protection, 65(11), 1811–1829.

Koketsu Y. (2000). Productivity characteristics of high-performing commercial swine breeding farms. J Am Vet Med Assoc. doi: 10.2460/javma.2000.216.376

Kugler K.C., Denys G.A., Wilson M.L. and Jones R.N. (2000). Serious streptococcal infections produced by isolates resistant to *streptogramins* (quinupristin/dalfopristin): Case reports from the SENTRY antimicrobial surveillance program. Diag. Microbiol. Infect. Dis. 36:269-272. από FDA July 2001, Volume 1, Issue 1.

Kummerer K. (2004). Pharmaceuticals is the Environment: Sources, Fate, Effects and Risks. Klaus Kummerer. Second Edition-ISBN 3-540-21342, Springer.com

Labigne-Roussel A., Briaux-Gerbaud S., Courvalin P. (1983). *Tn1525*, a kanamycin R determinant flanked by two direct copies of IS15. Mol Gen Genet. 1983;189(1):90-101.

Leclercq R. & Courvalin P. (1991). Bacterial resistance to macrolide, lincosamide, and streptogramin antibiotics by target modification. Antimicrob. Agents Chemother. 35, 1267-1272.

Lees P. & Aliabadi F.S. (2002). Rational dosing of antimicrobial drugs: animal versus humans. Intern. J. of Antimicrob. Agents 19, 269-84.

Levesque C., Piche L., Larose C. and Roy P. (1995). PCR mapping of integrons reveals several novel operons of resistance genes. Antimicrob. Agents Chemother. 1995. 39: 185-191.

Lianou A. & Sofos J.N. (2007). A review of the incidence and transmission of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat products in retail and food service environments. Journal of Food Protection, 70, 2172-98.

Lohajova L., Nagy J., Rozanska H., Popelka P., Jevinova P. (2006). Suitability of Star and Premi®Test for the Detection of Amoxycillin Residues in Laying Hens. Bull Vet Inst Pulawy 50, 367-371, 2006.

Luning P.A., Marcelis W.J., Jongen W.M.F (2002). Food Quality Management: A Techno-managerial approach (Wageningen Press, Wageningen).

Madigan M., Martinko J., Parker J. (2005). Μετάφραση: Σύνθεση πεπτιδογλυκάνης και κυτταρική διαίρεση. Βιολογία των μικροοργανισμών, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης.

Martinez-Martinez L., Pascual A., Jacoby G.A. (1998). Quinolone resistance from a transferable plasmid. Lancet. 1998 Mar 14;351(9105):797-9.

Maximum Residue Limits (MRLs) and Risk Management Recommendations (RMRs) for Residues of Veterinary Drugs in Foods CX/MRL 2-2018.

Maximum Residue Limits (MRLs) and Risk Management Recommendations (RMRs) for Residues of Veterinary Drugs in Foods CAC/MRL 2-2015. Updated as at the 38th Session of the Codex Alimentarius Commission (July 2015).

Mayrhofer S., Paulsen P., Smulders F., Hilbert F. (2004). Antimicrobial resistance profile of five major foodborne pathogens isolated from beef, pork and poultry. International Journal of Food Microbiology 97: 23-29.

Mazel D. & Davies J. (1999). Antibiotic resistance in microbes. Cell Mol Life Sci. 1999 Nov 30:56(9-10):742-54.

McDermott P.F., Walker R.D., White D.G. (2003). Antimicrobials: modes of action and mechanisms of resistance. Int J Toxicol 22:135-143.

McDermott P.F., Zhao S., Wagner D.D., Simjee S., Walker R.D. and White D.G. (2002). The food safety perspective of antibiotic resistance. Animal Biotechnology Vol. 13, No. 1, 71–84.

McErlane K.M. and Kitts D.D. (1994). «Antimicrobials» (Chapter 10). In: Analysis of Contaminants in Edible Aquatic Resources (Ed. By J.W. Kiceniuk & S. Ray). VCH, pp 479-508.

McEvoy J.D.G. (2002). Analytica Chimica Acta, 2002,473 3-26.

McEwen S.A. & Fedorka-Cray J. (2002). Antimicrobial Use and resistance in Animals. Clin. Infect. Dis.; 34 (Suppl 3): S93-106. Conventional antibiotics. J. Assoc. Physicians India 51, 593-596.

McGill A.S. and Hardy R. (1991). Review of the methods used in the determination of antibiotics and their metabolites in farmed fish. In: Chemotherapy in Aquaculture: From theory to reality (ed. By D.J. Alderman & C. Michel), pp 343-380. Office Internationale des Epizooties (OIE), Paris.

Miller J.H., Funchain P, Clendenin W, Huang T, Nguyen A, Wolff E, Yeung A, Chiang JH, Garibyan L, Slupska MM, Yang H. (2002). *Escherichia Coli* strains (ndk) lacking nucleoside diphosphate kinase are powerful mutators for base substitutions and frameshifts in mismatch-repair-deficient strains. Genetics. 2002 Sep;162(1):5-13.

Mims C., Dockrell M.H., Goering R.V., Roitt I., Wakelin D., Zuckerman M. (2004). Medical Microbiology, 3rd edition.

Modigan M.T., Martinko J.M., Parket J. (2003): Brock Biology of Microorganisms. Pearson Education Inc, N.J. 07458, U.S.A.

Müller H.E., Brenner D. J., Fanning G. R., Grimont P. A. D. and Kampfer P. (1996). Emended description of *Buttiauxella agrestis* with recognition of six new species of *Buttiauxella* and two new species of *Kluyvera*: *Buttiauxella ferragutiae sp. nov., Buttiauxella gaginiae sp. nov., Buttiauxella brennerae sp. nov., Buttiauxella izardii sp. nov., Buttiauxella noackiae sp. nov., Buttiauxella*

wormboldiae sp. nov., Kluyvera cochleae sp. nov. and Kluyvera georgiana sp. nov., Int J. Syst. Bacteriology 1996, 46: 50-63.

M7 Assessment and Control of DNA Reactive (Mutagenic) Impurities in Pharmaceuticals to Limit Potential Carcinogenic Risk (2015). U.S. Department of, Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Center for Biologics Evaluation and Research (CBER), May 2015, ICH, p.7.

Na Lia, Keith W.K. Hoa, Guang-Guo Yingb, Wen-Jing Deng (2017). Veterinary antibiotics in food, drinking water, and the urine of preschool children in Hong Kong. Environment International 108 (2017) 246–252.

Nightingale C.H., Murakawa T., & Ambrose, P.G., Eds. (2001). Antimicrobial Pharmakodynamics in Theory and Clinical Practice. Marcel Dekker Inc., New York, NY, USA.

Odeh R., Kelkar S, Hujer AM, Bonomo RA, Schreckenberger PC, Quinn JP. (2002). Broad resistance due to plasmid-mediated AmpC beta-lactamases in clinical isolates of *Escherichia Coli*. Clin Infect Dis. 2002 Jul 15;35(2):140-5. Epub 2002 Jun 24.

OECD (2000). Guideline for the testing of chemicals 106: Adsorption-desorption using a batch equilibrium method. OECD, Paris, France.

Overall summary of the scientific evaluation of water soluble powders and oral solutions containing *doxycycline hyclate*. Available on line: *https://www.ema.europa.eu/documents/referral/doxycycline-50-wsp-article-34-referral-annex-i-ii-iii_el-0.pdf*

Paulsen I.T., Brownn M.H., Skurray R.A. (1996). Proton-dependent multidrug efflux systems. Microbiol. Rev. 60, 575-608.

Pfischer W.C.E., Ishak K.G., Neptune E.M. et al. (1957). Brucellosis in Egypt: A review of experience with 288 patients. Am. J. Med, 1957; 22:915-27.

Piddock L.J. (1996). Does the Use of Antimicrobial Agents in Veterinary Medicine and Animal Husbandry Select Antibiotic-Resistant Bacteria that Infect Man and Compromise Antimicrobial Chemotherapy? J. Antimicrob. Chemother. 1996, 38, 1–3.

Piddock L.J. (2006). Clinically relevant chromosomally encoded multidrug resistance efflux pumps in bacteria. Clin Microbiol Rev 19(2):382-402.

Pope L., Boxall A, Corsing C, Halling-Sorensen B, Tait A, Topp E. (2009). Exposure assessment of veterinary medicines in terrestrial systems. In: Crane M., Boxall A., Barrett K. (Editors): Veterinary medicines in the environment, CRC Press, New York, U.S.A. pp. 129-153.

Prescott J.F. (2006). History of Antimicrobial Usage in Agriculture: An Overview. In: F. Aarestrup (ed.). Antimicrobial resistance in bacteria of animal origin. 1st ed. ASM Press, Washington, 19–27.

Prescott J., Baggot J.D., Walker R.D. (2000). Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine. Iowa State University Press, Iowa U.S.A.

Prusiner S.B. Stanley (1991). Molecular Biology of Prion Diseases. Source: Science, New Series, Vol. 252, No. 5012 (Jun. 14, 1991), pp. 1515-1522, Published by: American Association for the Advancement of Science.

Prusiner S.B., Hsia KK. Human prion diseases (1994). Ann Neurol 1994; 35: 385-395.

Putman M., Van Veen H.W., Konings W.N. (2000). Molecular properties of bacterial multidrug transporters. Microbiol. Mol. Boil. Rev. 64, 672-693.

Quintiliani R.Jr., Sahm D.F., Courvalin P. (1999). Mechanisms of resistance to antimicrobial agents in: Murray P.R., Baron E.J., Pfaller M.A., Tenover F.C., Yolken R.H., (Eds), Manual of Clinical Microbiology, 7th ed., ASM Press, Washington D.C., pp.1505-1525.

Rantsios A.T. (2016). EBTE (Biologic Technological Applications), Consultants, Marousi, Greece, Zoonoses 2016 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Recchia G.D., Hall R.M. (1995). Gene cassetes: a new class of mobile element. Microb. 141, 3015-3027.

Renwick A.G. (2002). 'Pesticide residue analysis and its relationship to hazard characterization (ADI/ARfD) and intake estimations (NEDI/NESTI)' Pesticide Management Science, 58(2002) 1073-1082.

Roberts M.C. (1996). Tetracycline resistance determinants: mechanisms of action, regulation of expression, genetic mobility, and distribution, FEMS Microbiol. Rev 19 1-24.

Ruprich J. (2000), «Generation of Reliable Food Consumption Data and Estimation of Dietary Intake of Nutrients, Additives, Contaminants & Residues in Cyprus», Nicosia, Cyprus.

Salyers A.A., Whitt D.D. (1994). Bacterial pathogenesis: a molecular approach. ASM Press, Washington D.C., USA.

Salyers A.A., Whitt D.D. (2002). How Bacteria Become Resistant to Antibiotics. In: Salyer A., Whitt D. (eds). Bacterial Pathogenesis, A Molecular Approach, 2nd ed. ASM Press, Washington, USA, p.168-181.

Sarmah A.K., Meyer MT, Boxall ABA (2006). A global perspective on the use, sales, exposure pathways, occurrence, fate and effects of veterinary antibiotics (VAs) in the environment. Review: Chemosphere 65:725–759.

Savvas C. Savva, Yiannis A. Kourides, Charalampos Hadjigeorgiou, Michael J. Tornaritis (2014). Overweight and obesity prevalence and trends in children and adolescents in Cyprus 2000—2010. Obesity Research & Clinical Practice (2014) 8, e426—e434.

Schiermeier Q. (2003). Studies assess risks of drugs in water cycle. Nature, 424: 5.

Schmitz F.J., Higgins P.G., Mayer S., Fluit A.C. (2002). Activity of Quinolones Against Gram-positive Cocci: Mechanisms of Drug Action and Bacterial Resistance, European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases 21: 647–659.

Schwarz S., Noble W.C. (1999). Aspects of bacterial resistance to antimicrobial agents used in veterinary dermatological practice. Vet. Dermatol. 10, 163-176.

Schwarz S., Noble W.C. (1999). Aspects of bacterial resistance to antimicrobial agents used in veterinary dermatological practice. Vet.Dermatol. 10, 163-176.

Schwarz S., Chaslus-Dancla E. (2001). Use of antimicrobials in veterinary medicine and mechanisms of resistance. Vet. Res. 32, 201-225.

Schwarz S. & Chaslus-Dancla E. (2001). Use of antimicrobials in veterinary medicine and mechanisms of resistance, Vet. Res. 32, 201-225.

Schwarzenbach R.P., Gschwend P.M., Imboden D.M. (2003). Environmental Organic Chemistry 2nd Edition, A John Wiley and Sons Publication, U.S.A.

Segura P., Francois M., Gagnon C., Sauve S. (2009). Review of the Occurrence of Antiinfectives in Contaminated Wastewaters and Natural and Drinking Waters. Envir. Health Persp. 117, 675-684.

Shah A.A., Hasan F., Ahmet S., Hameed A. (2004). Extended-spectrum beta-lactamases (ESbLs): characterization, epidemiology and detection. Crit Rev Microbiol. 2004;30(1):25-32122.

Shaw K.J., Rather P.N., Hare R.S., Miller G.H. (1993). Molecular genetics of aminoglycoside resistance genes and familiar relationships of the aminoglycoside-modifying enzymes. Microbiol Rev. 1993 Mar;(57) 1:138-63.

Shaw W.V. (1984). Bacterial resistance to chloramphenicol. Br Med Bull. 1984 Jan;(40) 1:36-41.

Sibila M., Nofrarías M., López-Soria S., Segalés J., Riera P., Llopart D., Calsamiglia M. (2007). Exploratory field study on Mycoplasma hyopneumoniae infection in suckling pigs. Vet Microbiol. doi: 10.1016/j.vetmic.2006.12.028.

Sorensen V., Jorsal S.E., Mousing J. (2006). Diseases of the respiratory tract. In: Straw B, Zimmermann J, D'Allaire S, Taylor D, editors. Diseases of Swine. 9 ed. Oxford: Blackwell Scientific. pp. 149–177.

Stanisich V.A. (1988). Identification and analysis of plasmids at the genetic level, in: Gristed J., Bennett P.M.(Eds), Plasmid Technology, Academic Press, London, pp.11-48.

Stärk D.C. Katharina, Montserrat Arroyo Kuribrena, Gwenaelle Dauphin, Sandra Vokaty, Michael P. Wardf, Barbara Wieland, Ann Lindberg (2015). 'One Health surveillance – More than a buzz word?' Preventive Veterinary Medicine 120 (2015) 124–130.

Swartz M. (2002). Human diseases caused by foodborne pathogens of animal origin. Clinical Infectious Diseases 34 (suppl.3): S111-122.

Tauch A., Krieft S., Kalinowski J., Puhler A. (2000). The 51,409-bp R-plasmid pTP10 from multiresistance clinical isolate *Corynebacterium striatum M82B* is composed of DNA segments initially identified in soil bacterial and in plat, animal and human pathogens. Mol Gen Genet. 2000. 263(1):1-11.

Tenover F.C. (2001). Development and spread of bacterial resistance to antimicrobial agents: an overview. Clin Infect Dis 33, Suppl.3, S108-15.

Teuber M. (1999). Spread of antibiotic resistance with food-borne pathogens. Cellular and Molecular Life Sciences, 56: 755-763.

Teuber M. (2001). Veterinary use and antibiotic Resistance. Cur. Op. in Microbiol, 4: 493-499.

The European journal for science teachers. 'Deadly proteins: prions', Issue 15:Summer 2010. Available on line: *http://www.scienceinschool.org/el/2010/issue15/prions*

Thomas H., Haight Willard E., Pierce (1955). Effect of Prolonged Antibiotic Administration on the Weight of Healthy Young Males: One Figure. *The Journal of Nutrition*, Volume 56, Issue 1, 1 May 1955, Pages 151–161.

Thomas Ternes, Adriano Joss (2006). Human Pharmaceuticals, Hormones and Fragrances.

Thomson J.R. (2006). Diseases of the digestive system. In: LEMAN, A.D. et al. Diseases of swine. 9 ed. Ames: Iowa State University, 2006. Cap.3, p.37-55.

Threlfall E.J., Ward L. R. and Rowe B. (1997). Increasing incidence of resistance to trimethoprim and ciprofloxacin in epidemic *Salmonella typhimurium DT 104* in England and Wales. Euro Surveillance 2: 81–84.

Todd ECD (2003). Microbiological safety standards and public health goals to reduce foodborne disease. Meat Science 66:33-43.

Tolls J. (2001). Sorption of veterinary pharmaceuticals in soils: A review. Environmental Science and Technology, 35: 3397-3406.

Tomerlin J.R., Petersen B.J. (2004). 'Pesticide Residues in Food and Drinking Water' εκδ. Hamilton D. and Crossley S., Wiley, 2004.

Tyrpenou A.E. (2009). Drugs and environment, Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society 2009, 60(2): 161-178.

Tyrpenou A.E. (2008). Safe foods for the European consumers. Journal of the Hellenic Veterinary Medicinal Society 2008, 59(2): 139-161.

Ungemach F.R., Muller-Bahrdt D., Abraham G. (2006). Guidelines for prudent use of antimicrobials and their implications on antibiotic usage in veterinary medicine. Int. J. of Med. Microb. 296 S2, 33-38.

Ungemach F.R. (2000). Figures on quantities of antibacterials used for different purposes in the EU countries and interpretation. Acta Vet. Scand. 93 (Suppl.), 89-103.

Urieta I., M. Jalon, I. Eguileor (1996). 'Food surveillance in the Basque Country (Spain) II. Estimation of the dietary intake of organochlorine pesticides, heavy metals, arsenic, aflatoxin M1, iron and zinc through the Total Diet Study, 1990/91', Food Additives and Contaminants, VOL.13, NO. 1, 29-52.

U.S. EPA. Guidelines for Exposure Assessment. U.S. Environmental Protection Agency, Risk Assessment Forum, Washington, DC, EPA/600/Z-92/001, 1992.

Valazquez-Arellano A. & Encarnation S. (2008). Role of proteomics in the study of nutrition. Journal of Nutrigenetics & Nutrigenomics, 1, 55-58.

Van Klaveren J.D., Goedhart P., Wapperom D. and Van der Voet H. (2012). A European tool for usual intake distribution estimation in relation to data collection by EFSA. EXTERNAL SCIENTIFIC REPORT. Supporting Publications 2012:EN-300 [42 pp.].

VICH (2000). Environmental Impact Assessments (EIAs) for Veterinary Medicinal Products (VMPS) - Phase I - VICH GL6 (Ecotoxicity Phase I), 2000.

Vollard E.J. and Clasener H.A.L. (1994). Colonization resistance. Antimicrobial Agents Chemotherapy, 38: 409-414.

Voutsa D., Samara C. (1998). 'Dietary intake of trace elements and polycyclic aromatic hydrocarbons via vegetables grown in an industrial Greek area', The Science of the Total Environment 218, 203-216.

Walsh C. (2000). Molecular mechanisms that confer antibacterial drug resistance. Nature. 2000 Aug 17;406(6797):775-81.

Walters J. (2003). Antibiotic resistance – the interplay between antibiotic use in animals and human beings. The Lancet Infectious Diseases 3: 47-51.

Werner G., Klare I., Heier H., Hinz K.H., Bohme G., Wendt M., Witte W. (2000). Quinupristin/dalfopristin-resistant *enterococci* of the *satA (vatD)* and *satG (vatE)* genotypes from different ecological origins in Germany. Micro. Drug Res.-Mech. Epid. Dis. 6:37-47.

Whitford F., Kronenberg J., Manager, Lunchick C., Driver J., Tomerlin R., Wolt J., Spencer H., Winter C., Whitmyre G., Blessing A. (2012). 'Pesticides and Human Health Risk Assessment', Purdue Pesticides Programme, Purdue University Cooperative Extension Service. Available on line: http://www.ppp.purdue.edu/Pubs/ppp-48pdf

WHO (1998). Outbreak of quinilone-resistant, multiresistant *Salmonella typhimurium DT104*, Denmark. Weekly Epidemiology Rec. 42: 327–328.

WHO (2016). Guidance document for the establishment of Acute Reference Dose (ARfD) for veterinary drug residues in food, p.1-3.

Wilson K.A. (2000). Diagnostic notes: Diagnostic approach to enteric diseases of swine. Swine Health Prod. 2000; 8(5):235-236.

Wistrand-Yuen, Knopp, Hjort, Koskiniemi, Berg G. and Andersson (2018). Evolution of high-level resistance during low-level antibiotic exposure. Nature Communications volume 9, Article number: 1599-2018/

Woodward K.N. (2008). Assessment of user safety, exposure and risk to veterinary medicinal products in the European Union. Regul Toxicol Pharm 2008; 50:114-28.

Wright G.D. (2005). Bacterial resistance to antibiotics: enzymatic degradation and modification. Adv Drug Deliv Rev, 57(10): 1451-1470.

Yamamoto T., Watanabe M., Matsumoto K., Sawai T. (1983). *Tn2610*, a transposon involved in the spread of the carbenicillin-hydrolyzing beta-lactamase gene. Mol Gen Genet. 1983;189(2):282-8.

Yucel N., Citak S., Onder M. (2005). Prevalence and antibiotic resistance of Listeria species in meat products in Ankara, Turkey. Food Microbiology 22: 241-245.

Zou W. et al. (2012). Prediction system for rapid identification of *Salmonella* serotypes based on pulsed-field gel electrophoresis fingerprints. Journal of Clinical Microbiology, 2012. 50(5): p.524-1532.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 10. ΔΗΜΟΣΙΕΥΜΕΝΕΣ ΕΡΓΑΣΙΕΣ

1η Δημοσίευση

Kyriakides, D.; Panderi, I.; Hadjigeorgiou, M.; Christou, K.; Maou, M.; Kavantzas, N.; Lazaris, A. Veterinary antimicrobial residues in pork meat in Cyprus: An exposure assessment. J Food Comp Anal **2020**, 90, 103512.

DOI: https://doi.org/10.1016/j.jfca.2020.103512

2η Δημοσίευση

Kyriakides, D.; Lazaris, A.; Arsenoglou K.; Emmanouil, M.; Kyriakides, O.; Kavantzas, N.; Panderi, I. Dietary Exposure Assessment of Veterinary Antibiotics in Pork Meat on Children and Adolescents in Cyprus. *Foods **2020**, 9, 1479.*

DOI: https://doi:10.3390/foods9101479