



## **ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

### **«Η Ανίχνευση Αντιβιοτικών σε Τρόφιμα Ζωικής Προέλευσης με την Χρήση Χρωματογραφικών Μεθόδων»**

**Μαρία Ακριβούση**

**Επιβλέπων Καθηγητής: κ. Μπακέας Ευάγγελος**



**Σχολή Θετικών Επιστημών και Τεχνολογίας  
Χημική και Βιομοριακή Ανάλυση**

Η παρούσα εργασία αποτελεί πνευματική ιδιοκτησία της φοιτήτριας (Ακριβούση Μαρίας) που την εκπόνησε. Στο πλαίσιο της πολιτικής ανοικτής πρόσβασης ο συγγραφέας/δημιουργός εκχωρεί στο ΕΑΠ, μη αποκλειστική άδεια χρήσης του δικαιώματος αναπαραγωγής, προσαρμογής, δημόσιου δανεισμού, παρουσίασης στο κοινό και ψηφιακής διάχυσής τους διεθνώς, σε ηλεκτρονική μορφή και σε οποιοδήποτε μέσο, για διδακτικούς και ερευνητικούς σκοπούς, άνευ ανταλλάγματος και για όλο το χρόνο διάρκειας των δικαιωμάτων πνευματικής ιδιοκτησίας. Η ανοικτή πρόσβαση στο πλήρες κείμενο για μελέτη και ανάγνωση δεν σημαίνει καθ' οιονδήποτε τρόπο παραχώρηση δικαιωμάτων διανοητικής ιδιοκτησίας του συγγραφέα/δημιουργού ούτε επιτρέπει την αναπαραγωγή, αναδημοσίευση, αντιγραφή, αποθήκευση, πώληση, εμπορική χρήση, μετάδοση, διανομή, έκδοση, εκτέλεση, «μεταφόρτωση» (downloading), «ανάρτηση» (uploading), μετάφραση, τροποποίηση με οποιονδήποτε τρόπο, τμηματικά ή περιληπτικά της εργασίας, χωρίς τη ρητή προηγούμενη έγγραφη συναίνεση του συγγραφέα/δημιουργού. Ο συγγραφέας/δημιουργός διατηρεί το σύνολο των ηθικών και περιουσιακών του δικαιωμάτων.

## Ευχαριστίες

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στα πλαίσια της φοίτησης μου στη Σχολή Θετικών Επιστημών και Τεχνολογίας, του τμήματος Χημικής και Βιομοριακής Ανάλυσης .

Ένα ταξίδι έφτασε στο τέλος του. Αρχικά γεμάτο φόβο, όντας άγνωστο, έπειτα κατακλίστηκε από έντονο ενδιαφέρον για τον κόσμο της ανάλυσης , χημικής και βιομοριακής , καθώς αντιλήφθηκα ότι για το καθετί που μας απασχολεί ,μέσα από διάφορες διεργασίες , δύναται η λήψη της απάντησης.

Θα ήθελα εδώ να ευχαριστήσω εγκάρδια τον συνοδοιπόρο στο έργο μου αυτό , τον κύριο Μπακέα Ευάγγελο, που έδειξε αμέριστη εμπιστοσύνη στο προτεινόμενο θέμα της διπλωματικής μου εργασίας ,συνυφασμένο με την ήδη υπάρχουσα επαγγελματική μου δραστηριότητα , στον τομέα του ελέγχου των τροφίμων . Ο τίτλος αυτής, << Η Ανίχνευση Αντιβιοτικών σε Τρόφιμα Ζωικής Προέλευσης με την Χρήση Χρωματογραφικών Μεθόδων>>.

Το πολύτιμο, μονάκριβο και αγαπητό μου παιδί ,που δικαιοματικά του ανήκει αυτή η επιτυχία , δεν θα μπορούσα να το ξεχάσω στην πορεία του ταξιδιού μου, που αν και μονάχα δυο ετών επέδειξε την απαραίτητη υπομονή ,για να καταφέρω να ολοκληρώσω το όνειρο μου . Συνάμα, από καρδιάς θα ήθελα να ευχαριστήσω τους λατρεμένους μου γονείς, Ελένη και Βασίλη ,που για ακόμη μια φορά αποτέλεσαν τον αρωγό αυτής της προσπάθειας , με την άνευ όρων αγάπη ,συμπαράσταση , ενθάρρυνση , και υπομονή τους , επιτευχθεί ο στόχος μου.

## Περιεχόμενα

Λίστα Εικόνων.....	vi
Κατάλογος συντομεύσεων .....	vi
Περίληψη.....	1
Abstract .....	3
1. Ο ρόλος των αντιβιοτικών στην εκτροφή ζώων.....	7
1.1. Ιστορική αναδρομή .....	7
1.2. Πλεονεκτήματα από τη χρήση αντιβιοτικών στη κτηνοτροφία .....	8
1.2.1. Ενίσχυση της ευημερίας και της υγείας των ζώων.....	9
1.2.2. Ενίσχυση της Αποτελεσματικότητας της Ζωικής Παραγωγής.....	10
1.3. Οι πιθανοί κίνδυνοι από τη χρήση αντιβιοτικών στην κτηνοτροφία .....	12
1.3.1. Ανάπτυξη της ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά σε βακτήρια .....	13
1.3.2. Οι Επιπτώσεις της Μόλυνσης του Περιβάλλοντος στα Οικοσυστήματα.....	14
1.4. Χρήση αντιβιοτικών στη γεωργία των ζώων: μία παγκόσμια προοπτική .....	16
1.5. Συμπέρασμα και μελλοντικές κατευθύνσεις.....	17
2. Υπολείμματα αντιβιοτικών σε τρόφιμα ζωικής προέλευσης.....	19
2.1. Το νομικό πλαίσιο.....	21
2.2. Φυσικοχημικές ιδιότητες διαφόρων αντιβιοτικών.....	23
2.2.1. Σουλφοναμίδια .....	27
2.2.2. Τετρακυκλίνες.....	27
2.2.3. Πενικιλίνες.....	28
2.2.4. Κεφαλοσπορίνες.....	29
2.2.5. Μακρολίδια.....	29
2.2.6. ΚΙΝΟλόνες, συμπεριλαμβανομένων των φθοριοΚΙΝΟλόνων.....	30
2.2.7. ΑμιΝΟγλυκοσίδες.....	31
2.2.8. ΦαιΝικόλες.....	31
2.2.9. ΛΙΝκοσαμίδες.....	31
2.2.10. Πολυμυξίνες.....	32
2.2.11. ΒακΙτρακίνη.....	32
2.2.12. ΝοβοβΙΟκίνη .....	32
2.2.13. Τιαμουλίνη.....	32
2.2.14. Ιωνοφόρα .....	33

2.2.15.	Ριφαμυκίνες .....	33
3.	Μέθοδοι Ανίχνευσης Αντιβιοτικών σε Τρόφιμα Ζωικής Προέλευσης.....	34
3.1.	Κανονισμοί και η σημασία της ανίχνευσης αντιβιοτικών στα τρόφιμα .....	35
3.2.	Φυσικοχημικά Χαρακτηριστικά Αντιβιοτικών .....	36
3.3.	Συμβατικές Μέθοδοι Ανίχνευσης Αντιβιοτικών στα Τρόφιμα .....	37
3.4.	Χρωματογραφία.....	38
3.4.1.	Τύποι χρωματογραφίας .....	39
3.5.	Φασματοσκοπία .....	46
3.5.1.	Θεμελιώδεις Έννοιες Φασματοσκοπίας.....	47
3.5.2.	Διαφορετικοί τύποι Φασματοσκοπικών Τεχνικών .....	48
3.5.3.	Αξιοποίηση Φασματοσκοπικών Μεθόδων Ανίχνευσης Αντιβιοτικών.....	49
3.5.4.	Ανίχνευση αντιβιοτικών σε δείγματα περιβάλλοντος και τροφίμων .....	50
3.5.5.	Η Νανοτεχνολογία στη Φασματοσκοπία .....	51
3.6.	Φασματομετρία Μάζας.....	53
3.6.1.	Μέθοδοι Ιονισμού .....	54
3.6.2.	Η ποσοτική ανάλυση των αντιβιοτικών με τη χρήση φασματομετρίας μάζας. 55	
3.6.3.	Η φασματομετρία μάζας χρησιμοποιείται για τη διεξαγωγή ποιοτικής ανάλυσης αντιβιοτικών .....	55
3.7.	Ανοσοδοκιμές.....	57
3.7.1.	Τύποι ανοσοδοκιμών.....	59
3.7.2.	Η δημιουργία αναλύσεων με βάση τα αντισώματα για την ανίχνευση αντιβιοτικών .....	62
3.7.3.	Παραγωγή αντισωμάτων για ανοσοπροσδιορισμούς .....	63
3.8.	Βιοαισθητήρες.....	65
4.	Εναλλακτικές λύσεις στη χρήση αντιβιοτικών στην κτηνοτροφία.....	67
4.1.	Τρέχουσα έρευνα και καινοτομίες στις εναλλακτικές λύσεις αντιβιοτικών ....	67
5.	Συμπεράσματα .....	70
	Βιβλιογραφικές αναφορές.....	71

## Λίστα Εικόνων

Εικόνα 1	Δομές των αντιπροσωπευτικών συστατικών των αντιβιοτικών .....	26
Εικόνα 2	Η χρωματογραφία στήλης (Coskun 2016) .....	40
Εικόνα 3	Ιοντοανταλλακτική χρωματογραφία (Coskun 2016) .....	41
Εικόνα 4	Χρωματογραφία διείσδυσης γέλης (Coskun 2016) .....	42
Εικόνα 5	Χρωματογραφία συγγένειας (Coskun 2016) .....	43

## Κατάλογος συντομεύσεων

MDR: πολυανθεκτικά βακτήρια

IR: υπέρυθη ακτινοβολία

ESR: συντονισμός spin ηλεκτρονίων

EPR: παραμαγνητικός συντονισμός ηλεκτρονίων

RF: ραδιοσυχνότητες

NMR: πυρηνικός μαγνητικός συντονισμός

MRL: ανώτατο όριο υπολειμμάτων

ELISA: ενζυμικές ανασοπροσροφητικές δοκιμασίες

## Περίληψη

Η χορήγηση αντιβιοτικών στην κτηνιατρική παίζει καθοριστικό ρόλο στη διασφάλιση της υγείας και της ευημερίας των ζώων. Εν τω μεταξύ, παραβιάσεις δεοντολογίας που σημειώνονται κατά τη χρήση φαρμάκων από ζωοπαραγωγούς έχουν αναδειχθεί ως σημαντικός παράγοντας που συμβάλλει στη μόλυνση των ζωικών προϊόντων, η οποία στη συνέχεια οδηγεί σε σοβαρές δυσμενείς επιπτώσεις στη δημόσια υγεία μετά την κατανάλωση. Οι πιθανές επιπτώσεις μπορεί να είναι σημαντικές, διαρκείς και ακόμη και θανατηφόρες. Για να διασφαλιστεί ότι τα μολυσμένα προϊόντα δεν φθάνουν στον καταναλωτή, είναι σημαντικό να εφαρμόζονται εκ των προτέρων γρήγορες και αποτελεσματικές μέθοδοι ανάλυσης ως ζωτικής σημασίας μέτρο διασφάλισης της ασφάλειας.

Κατά συνέπεια, έχει δημιουργηθεί μια ολοκληρωμένη ρυθμιστική δομή, η οποία περιγράφει τα ανώτατα επιτρεπτά επίπεδα στα τρόφιμα και εφαρμόζει πρωτοβουλίες παρακολούθησης για την επίβλεψη της παρουσίας αυτών των ουσιών. Τα επίσημα εργαστήρια ελέγχου τροφίμων, για να εγγυηθούν ένα υψηλό επίπεδο ασφάλειας των καταναλωτών, πρέπει να αντιμετωπίσουν την πρόκληση της ενίσχυσης και της τυποποίησης της αποτελεσματικότητας των αναλυτικών τεχνικών που χρησιμοποιούνται για την εξέταση υπολειμμάτων τόσο από εγκεκριμένες όσο και από μη εγκεκριμένες φαρμακολογικά δραστικές ουσίες. Τα εργαστήρια θα πρέπει να λαμβάνουν υπόψη τις πιο πρόσφατες εξελίξεις στις αναλυτικές τεχνικές και τα πρότυπα απόδοσης που ορίζονται από τους ισχύοντες κανονισμούς.

Το ευρύ φάσμα των φυσικοχημικών χαρακτηριστικών αυτών των ουσιών αποτελεί πρόκληση για την επίτευξη βέλτιστων αναλυτικών αποτελεσμάτων για μεγάλο αριθμό ενώσεων που αξιολογούνται ταυτόχρονα. Καινοτόμες μέθοδοι προετοιμασίας δειγμάτων προωθούνται συνεχώς για να επιτευχθεί μια ισορροπία μεταξύ των βέλτιστων ανακτήσεων και των εκχυλισμάτων που είναι απαλλαγμένα από παρεμβολές (καθαρά εκχυλίσματα). Η πιο συχνά χρησιμοποιούμενη αναλυτική προσέγγιση για τον προσδιορισμό των υπολειμμάτων των αντιβιοτικών είναι η υγρή χρωματογραφία σε συνδυασμό με τη φασματομετρία μάζας.

Η χρωματογραφία είναι μια κρίσιμη βιοφυσική μέθοδος που επιτρέπει τον διαχωρισμό, την ταυτοποίηση και τον καθαρισμό των συστατικών του μείγματος τόσο για ποιοτική όσο και για ποσοτική ανάλυση. Οι πρωτεΐνες μπορούν να απομονωθούν λαμβάνοντας υπόψη διάφορα χαρακτηριστικά, όπως τις διαστάσεις και τη μορφή τους, το συνολικό φορτίο, την παρουσία υδρόφοβων ομάδων στο εξωτερικό τους και την ικανότητά τους να αλληλεπιδρούν με τη στατική φάση. Διάφορες τεχνικές στη χρωματογραφία βασίζονται στη στατική φάση, όπως η χρωματογραφία στήλης, λεπτής στιβάδας και χρωματογραφία χαρτιού. Η χρωματογραφία στήλης είναι μια ευρέως χρησιμοποιούμενη τεχνική για τον καθαρισμό πρωτεϊνών.



## Abstract

The use of antibiotics in veterinary medicine plays a crucial role in ensuring the health and welfare of animals. Meanwhile, ethical violations in the use of medicines by livestock producers have emerged as a major factor contributing to the contamination of animal products, which then leads to serious adverse public health effects after consumption. The potential effects can be significant, long-lasting and even fatal. To ensure that contaminated products do not reach the consumer, it is important to implement rapid and effective analytical methods in advance as a vital safety measure.

Consequently, a comprehensive regulatory structure has been established, which outlines maximum permitted levels in food and implements monitoring initiatives to oversee the presence of these substances. Official food control laboratories, in order to guarantee a high level of consumer safety, must face the challenge of strengthening and standardizing the efficiency of analytical techniques used to test for residues of both approved and non-approved pharmacologically active substances. Laboratories should take into account the latest developments in analytical techniques and the performance standards set by the applicable regulations.

The wide range of physicochemical characteristics of these substances poses a challenge to achieve optimal analytical results for a large number of compounds evaluated simultaneously. Innovative sample preparation methods are constantly being promoted to achieve a balance between optimal recoveries and extracts that are free from interferences (clean extracts). The most commonly used analytical approach for the determination of antibiotic residues is liquid chromatography coupled to mass spectrometry.

Chromatography is a critical biophysical method that allows the separation, identification, and purification of mixture components for both qualitative and quantitative analysis. Proteins can be isolated by considering various characteristics, such as their size and shape, overall charge, the presence of hydrophobic groups on their exterior, and their ability to interact with the stationary phase. Various techniques in chromatography rely on the stationary phase, such as column chromatography, thin

layer chromatography, and paper chromatography. Column chromatography is a widely used technique for protein purification.

## ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ο σκοπός των κτηνιατρικών φαρμάκων είναι η βελτίωση της εκτροφής και της σίτισης των ζώων, η θεραπεία ασθενειών και η διατήρηση της υγείας των ζώων. Ωστόσο, τα φάρμακα μπορεί να φτάσουν μέχρι το τραπέζι των καταναλωτών και τα υπολείμματά τους μπορεί να θέτουν σε κίνδυνο την ανθρώπινη υγεία. Αυτός ο κίνδυνος αυξάνεται και προκαλεί σημαντική ανησυχία σε πολλές περιοχές του πλανήτη (Socas-Rodríguez et al., 2021). Η παρουσία αυτών των υπολειμμάτων θεωρείται ως δείκτης μη συμμόρφωσης με το νομοθετικό πλαίσιο που ισχύει για τα φάρμακα. Τα φάρμακα που δεν έχουν μεταβολιστεί, οι μεταβολίτες τους και τα προϊόντα αποδόμησής τους απεκκρίνονται και μπορεί στη συνέχεια να βιοδιασπαστούν ή να επιμείνουν. Οι αρμόδιες αρχές καθορίζουν εάν ένα πρωτότυπο φάρμακο, μεταβολίτης ή προϊόν αποικοδόμησης προκαλεί τοξικολογική ανησυχία (Bhandari et al., 2020).

Η πιθανή επιμόλυνση των τροφίμων που παράγονται από τα παραγωγικά ζώα και τα ζητήματα που σχετίζονται με τη χρήση αντιβιοτικών στη ζωική παραγωγή αποτελούν επί του παρόντος αντικείμενο πολλών ερευνών και ανησυχιών. Η κακή χρήση κτηνιατρικών φαρμάκων έχει τη δυνατότητα να έχει δυσμενείς επιπτώσεις στους καταναλωτές, συμπεριλαμβανομένης της πρόκλησης καρκίνου, αλλεργικών αντιδράσεων και της ανάπτυξης τοξικολογικών επιπτώσεων (Hassan et al. 2021). Ο πρωταρχικός στόχος των ιατρικών προϊόντων είναι να ενισχύσουν την ανάπτυξη και την καλή διαβίωση των ζώων εκτροφής με τη θεραπεία και την πρόληψη μιας ποικιλίας ασθενειών. Ωστόσο, η εισαγωγή φαρμάκων ή υπολειμμάτων τους στο ανθρώπινο σώμα μέσω των υποπροϊόντων είναι ένα από τα πιο σημαντικά ζητήματα που σχετίζονται με τα υπολείμματα φαρμάκων (Treiber and Beranek-Knauer, 2021).

Τα αντιβιοτικά έχουν χρησιμοποιηθεί από κτηνιάτρους σε όλο τον κόσμο από τον περασμένο αιώνα είτε για να θεραπεύσουν άρρωστα ζώα είτε για να τα αποτρέψουν την προσβολή αυτών από μολυσματικές ασθένειες. Επιπλέον, σε πολλές περιοχές του πλανήτη, εφαρμόζονται αντιβιοτικά για τη διευκόλυνση της αύξησης του αριθμού των ζώων. Από τους τρεις προαναφερθέντες λόγους, η πρόληψη ασθενειών είναι η πιο κρίσιμη αιτία για τη χρήση αντιβιοτικών στις σύγχρονες γαλακτοκομικές μονάδες. Υπάρχουν διάφορες πτυχές της χρήσης αντιβιοτικών στην κτηνοτροφία που παρέχουν

στους επαγγελματίες κτηνιάτρους και στους κτηνοτρόφους ένα αίσθημα ικανοποίησης, συμπεριλαμβανομένου του οικονομικού κόστους, της ευκολίας χορήγησης και του ελάχιστου κινδύνου σε σύγκριση με πιθανά ζητήματα, καθώς και της εφαρμογής προστατευτικών μέτρων (Treiber and Beranek-Knauer 2021). Ωστόσο, οι ρυθμιστικές αρχές, οι καταναλωτές και η φαρμακοβιομηχανία ανησυχούν για την παρουσία υπολειμμάτων αντιβιοτικών στα τρόφιμα.

Υποστηρίζεται ότι η ανάπτυξη ανθεκτικών στα αντιβιοτικά μικροοργανισμών είναι άμεσο αποτέλεσμα της αλόγιστης χρήσης αντιβιοτικών ουσιών. Η παγκόσμια συναίνεση είναι ότι απαιτείται παρέμβαση μετά τη διερεύνηση της αντοχής στα αντιβιοτικά και τον εντοπισμό ενός κινδύνου ως συνέπεια της συμβατικής επιστημονικής μεθόδου εξέτασης των ερευνητικών ευρημάτων. Απαιτείται πρόσθετη έρευνα για τη διερεύνηση των μακροπρόθεσμων συνεπειών στην υγεία λόγω των υπολειμμάτων αντιβιοτικών στα τρόφιμα (Ghimpețeanu et al.2022).

Η συνειδητοποίηση ότι η σύγχρονη υγεία περιλαμβάνει τη συστημική σκέψη τόσο για την κτηνιατρική όσο και την ανθρώπινη ιατρική, ήταν ένας από τους καθοριστικούς παράγοντες στη σύνθεση ορθολογικών πολιτικών για τα υπολείμματα φαρμακευτικών προϊόντων. Οι κτηνίατροι πρέπει να γνωρίζουν ότι οι πολιτικές δημόσιας υγείας και οι κτηνιατρικές πρακτικές είναι περίπλοκα αλληλένδετες και εξελίσσονται συνεχώς ως απάντηση στις νέες γνώσεις και τις πρόσφατες εξελίξεις. Μόλις πρόσφατα έγιναν δεκτοί νέοι κανονισμοί σχετικά με τη χρήση αντιβιοτικών στη κτηνοτροφία (Hosain et al., 2021). Σε σύγκριση με τα αντιβιοτικά που προορίζονται για ανθρώπινη χρήση, η παγκόσμια παραγωγή αντιβιοτικών για κτηνιατρική χρήση είναι σημαντικά υψηλότερη. Η ποσοτικοποίηση των αντιβιοτικών που χρησιμοποιούνται στην κτηνοτροφία είναι εξαιρετικά δύσκολη, όμως η ποσότητα των αντιβιοτικών που χρησιμοποιούνται σε διάφορες περιοχές του πλανήτη, αποκλειστικά για την ιατρική των ζώων, είναι σημαντικά μεγαλύτερη από αυτή για ανθρώπινη χρήση. Σε πολλά συστήματα παραγωγής, είναι σύνηθες να χορηγείται στρατηγικά η κατάλληλη δόση αντιβιοτικού. Δυστυχώς, οι προδιαγεγραμμένες βέλτιστες πρακτικές δεν τηρούνται στο έπακρο, γεγονός που οδηγεί σε έναν φαύλο κύκλο δημιουργίας ανθεκτικών στελεχών των βακτηρίων-στόχων (Mulchandani et al.2023).

## 1. Ο ρόλος των αντιβιοτικών στην εκτροφή ζώων

Τα αντιβιοτικά έχουν χρησιμοποιηθεί στη κτηνοτροφία για μεγάλο χρονικό διάστημα και αποτελούν ουσιαστικό στοιχείο των σύγχρονων συστημάτων παραγωγής ζωοτροφών. Τα αντιβιοτικά είναι πολυλειτουργικά φάρμακα που μπορούν και βοηθούν στη διαχείριση και τη θεραπεία ασθενειών. Ωστόσο, η χρήση αυτών των ουσιών εγκυμονεί εγγενείς κινδύνους, συμπεριλαμβανομένης της παρουσίας υπολειμμάτων σε προϊόντα διατροφής, πιθανές δυσμενείς επιπτώσεις στην ανθρώπινη υγεία και τη μόλυνση του περιβάλλοντος (Hosain et al., 2021). Σε συνδυασμό, τα αντιβιοτικά είναι ένα σχετικά φθινό στοιχείο ενός συστήματος παραγωγής τροφίμων για ζώα. Η συνολική τους αξία είναι σημαντική στη μεταποίηση και την παραγωγή τροφίμων κατάντη και κατανέμεται μεταξύ όλων των ενδιαφερόμενων μερών σε ένα ολοκληρωμένο σύστημα διανομής τροφίμων. Συνεπώς, δεν αποτελεί έκπληξη το γεγονός ότι μια ποικιλία φορέων ενδιαφέρεται και συμμετέχει στη συζήτηση πολιτικής σχετικά με τις προσαρμογές στις πρακτικές χρήσης αντιβιοτικών στα συστήματα παραγωγής τροφίμων για ζώα (Nowakiewicz et al., 2020).

### 1.1. Ιστορική αναδρομή

Σε όλες τις περιοχές του κόσμου τα αντιβιοτικά χρησιμοποιούνται για περισσότερα από πενήντα χρόνια για την πρόληψη, τον έλεγχο ή τη θεραπεία βακτηριακών ασθενειών συμπεριλαμβανομένων και αυτών που χρησιμοποιούνται στο πεδίο της ζωικής παραγωγής (Zalewska et al., 2021). Οι αρχικές εφαρμογές των αντιβιοτικών περιορίζονταν σε ανθρώπινους πληθυσμούς που κινδύνευαν σημαντικά από βακτηριακές ασθένειες (Nazarska, 2021).

Η κάποτε ευρέως διαδεδομένη πεποίθηση ότι νέες και μεγαλύτερες ζωοτροφές και άλλα εντατικά συστήματα ζωικής παραγωγής τροφίμων χρησιμοποιούσαν αντιβιοτικά κυρίως για να περιορίσουν τις απώλειες λόγω θανάτων και να αποτρέψουν τεράστιες επιδημίες θανατηφόρων ασθενειών έχει διαψευστεί από πρόσφατες μελέτες και ιστορικές πληροφορίες. Μία από τις τρέχουσες κύριες χρήσεις των αντιβιοτικών είναι η διατήρηση υγιών πληθυσμών ζώων (Nowakiewicz et al., 2020, Mann et al. 2021).

Η εφαρμογή των αντιβιοτικών σε αυτό το πλαίσιο αποτελεί συνέχεια των ευρέως αποδεκτών εφαρμογών στην κτηνοτροφία, οι οποίες χρονολογούνται από την εκτροφή οικόσιτων ζώων πριν από περίπου 10.000 χρόνια και έκτοτε έχουν εξελιχθεί σε επιστημονική θεωρία και σχέσεις αιτίας-αποτελέσματος που περιβάλλουν την ασθένεια (Lara και Prado, 2023). Τα επιστημονικά αποτελέσματα βοήθησαν στην εδραίωση της άποψης ότι η χρήση αντιβιοτικών θα μπορούσε να επιταχύνει τη διαδικασία πάχυνσης, μειώνοντας έτσι την ποσότητα της δαπάνης τροφής που απαιτείται για να επιτευχθεί το επιθυμητό βάρος σφαγής και η υψηλή αναλογία κρέατος σε ένα ζώο (Divan and Sharma 2024). Από τα μέσα της δεκαετίας του 1940, η αντοχή των βακτηρίων στα αντιβιοτικά που χρησιμοποιούνται ευρέως για μεγάλο χρονικό διάστημα παρουσίασε αύξηση (Christou, 2022).

## **1.2. Πλεονεκτήματα από τη χρήση αντιβιοτικών στη κτηνοτροφία**

Υπάρχουν πολυάριθμα αναφερόμενα πλεονεκτήματα στη χρήση των αντιβιοτικών στη κτηνοτροφία, όπως η αυξημένη παραγωγικότητα, η οικονομική απόδοση και η βελτίωση της υγείας των ζώων (Åkerfeldt et al., 2021). Οι λοιμώξεις είναι διαδεδομένες στα σύγχρονα συστήματα κτηνοτροφίας, ιδιαίτερα σε επιχειρήσεις περιορισμού στέγασης. Πολλά βακτήρια που προκαλούν λοιμώξεις στα παραγωγικά ζώα μπορούν να αποτελέσουν απειλή για την ανθρώπινη υγεία όταν εισέλθουν στην τροφική αλυσίδα. Ως εκ τούτου, είναι απαραίτητη η διαχείριση αυτών των παθογόνων παραγόντων προκειμένου να μειωθούν οι κίνδυνοι για τη δημόσια υγεία που συνδέονται με την κατανάλωση ζώων και ζωικών προϊόντων (Hayek, 2022). Η χρήση αντιβιοτικών εγκυμονεί όπως προαναφέρθηκε ορισμένους κινδύνους. Ωστόσο, η έγκαιρη θεραπεία με αντιβιοτικά και η πρόληψη νέων περιπτώσεων μόλυνσης μέσω αντιβιοτικών και η πρόληψη ασθενειών είναι κρίσιμα εργαλεία στη κτηνοτροφία. Η συνεχιζόμενη έρευνα επικεντρώνεται κυρίως στα πλεονεκτήματα και τους κινδύνους που συνδέονται με τη χρήση αντιβιοτικών στη κτηνοτροφία, ενώ παράλληλα διερευνώνται εναλλακτικές μέθοδοι (Delsart et al., 2020).

Τα αντιβιοτικά χρησιμοποιούνται για την πρόληψη ενός ευρέος φάσματος λοιμώξεων. Ο πρωταρχικός λόγος για την ουσιαστική οικονομική απόδοση της χρήσης αντιβιοτικών είναι η ικανότητά τους να αποτρέπουν τις μολύνσεις. Ενώ μια μεγάλη

δόση αντιβιοτικού απαιτείται για τη θεραπεία ενός ζώου από λοίμωξη, μια μικρότερη δόση μπορεί να χρησιμοποιηθεί για πρόληψη, με αποτέλεσμα την πιο αποτελεσματική χρήση των πόρων (Avershina et al., 2021). Με την έγκαιρη διαχείριση των λοιμώξεων, η ανάλυση κόστους-οφέλους των ζώων, των αυγών και των γαλακτοκομικών προϊόντων μπορεί να ευθυγραμμιστεί περισσότερο, καθώς η ενέργεια που δαπανήθηκε προηγουμένως για την καταπολέμηση της μόλυνσης μπορεί να ανακατευθυνθεί προς την αύξηση βάρους ή την παραγωγή γάλακτος (Subramaniam and Girish, 2020). Σε ορισμένες περιπτώσεις, μπορεί να εφαρμοστούν αντιβιοτικά για να διευκολυνθεί η ταχύτερη ανάπτυξη και τα αυξημένα επίπεδα παραγωγής όταν δεν υπάρχει κίνδυνος. Ελλείψει ασθένειας, πολλά ζώα αποβάλλουν μικρούς αριθμούς παθογόνων, αλλά οι αριθμοί αυτοί αυξάνονται όταν τα ζώα μολυνθούν. Ως εκ τούτου, η χρήση αντιβιοτικών για την πρόληψη επιδημιών είναι επωφελής. Ο αριθμός των ζώων που προσβλήθηκαν ή χάθηκαν από ασθένεια μειώνεται σημαντικά με τον έλεγχο και την εξάλειψη της εξάπλωσης αυτών των παθογόνων (Rhee et al. 2020).

### 1.2.1. Ενίσχυση της ευημερίας και της υγείας των ζώων

Η χρήση αντιβιοτικών στη κτηνοτροφία υποτίθεται ότι αποσκοπεί στη βελτίωση της υγείας και της ευημερίας των ζώων εκτροφής. Η ανεπαρκής θεραπεία μολυσματικών ασθενειών μπορεί να οδηγήσει σε δυσφορία στα ζώα (Kalashgarani and Babaroor, 2022). Για παράδειγμα, στην περίπτωση των χοίρων, που είναι γνωστά για την κοινωνική τους συμπεριφορά, η ικανότητα ενός ζώου να αλληλεπιδρά μπορεί να διακυβευτεί σε περιπτώσεις που η υγεία του δεν είναι καλή (Godman et al 2021 ). Μία υποκείμενη πάθηση που μπορεί να προκαλέσει βασανιστικά συμπτώματα θεραπεύεται με τη χρήση αντιβιοτικών. Στην χοιροτροφία, έχει παρατηρηθεί ότι η συχνότητα των β δυσάρεστων συμπεριφορών, όπως το δάγκωμα της ουράς, μειώνεται όταν αντιμετωπίζονται τα υποκείμενα προβλήματα υγείας των χοίρων. Αντίθετα, η συχνότητα αυτών των συμπεριφορών αυξάνεται όταν οι επώδυνες καταστάσεις δεν ανακουφίζονται (Lee et al. 2021).

Σήμερα, τα αντιβιοτικά χρησιμοποιούνται κυρίως για τη θεραπεία κοινών λοιμώξεων σε πληθυσμούς ζώων και ορισμένων μη μολυσματικών καταστάσεων που προδιαθέτουν σε λοιμώξεις, όπως η μαστίτιδα ή η μητρίτιδα στα βοοειδή γαλακτοπαραγωγής. Αυτές οι καταστάσεις προκαλούνται εν μέρει από την καταστολή του ανοσοποιητικού που συμβαίνει ως αποτέλεσμα των φυσιολογικών απαιτήσεων της



κύησης και των μεταβολικών απαιτήσεων της παραγωγής γάλακτος. Μπορούν επίσης να χρησιμοποιηθούν για τη διαχείριση υποκλινικών λοιμώξεων, στις οποίες τα ζώα δεν παρουσιάζουν ακόμη συμπτώματα ασθένειας, αλλά τα επίπεδα παθογόνων παραγόντων αυξάνονται (Callaway et al., 2021). Για παράδειγμα, σε παρτίδες βοείου κρέατος που βρίσκονται σε εξαιρετικά ψυχρές περιοχές, χορηγούνται συγκεκριμένα προϊόντα οξυτετρακυκλίνης μακράς δράσης. Αυτό εκτελείται με τρόπο εκτός σήμανσης για την καταστολή παθογόνων σύνθετων αναπνευστικών ασθενειών των βοοειδών που μπορεί να είναι "σιωπηλές" στους εκτροφείς αλλά μολυσματικές εάν τα ζώα μεταφερθούν σε θερμότερες περιοχές, συγκεντρωθούν, αναμειχθούν ή υποστούν οποιοδήποτε άλλο στρες όπως κατά τον απογαλακτισμό και τη μεταφορά. Οι πρόσθετες εφαρμογές αντιβιοτικών περιλαμβάνουν τη ρύθμιση των κύκλων παραγωγής (π.χ., η ενίσχυση της έκθεσης στην κοκκιδίωση για την προώθηση της δια βίου ανοσίας στη βιομηχανία κοτόπουλων κρεατοπαραγωγής) (Aslam et al., 2021).

Η δημόσια πολιτική και η σύγχρονη διαχείριση αντιβιοτικών αποθαρρύνουν πλέον τον πρωταρχικό κτηνιατρικό στόχο της χρήσης αντιβιοτικών προληπτικά ή αποκλειστικά για τη βελτίωση της απόδοσης των ζώων, κάτι που είναι εξαιρετικά αμφιλεγόμενο (Van et al., 2020). Τα τελευταία χρόνια παρατηρείται αύξηση της κατανάλωσης και της διάδοσης ζωικών προϊόντων που παράγονται βιολογικά (Rahman et al., 2022). Το κύριο κίνητρο των καταναλωτών για την αγορά κρέατος, γαλακτοκομικών και αυγών βιολογικής παραγωγής, σύμφωνα με έρευνες, θεωρείται από περισσότερο από το 50% του πληθυσμού ότι είναι «πιο υγιεινό» (Cook and Wright, 2022). Η χρήση αντιβιοτικών σε βιολογικά γεωργικά συστήματα είτε απαγορεύεται είτε, σε ασυνήθιστες περιπτώσεις, όπως η αναπνευστική νόσος, όταν οι βιολογικές εναλλακτικές δεν είναι διαθέσιμες, επιτρέπεται. Ωστόσο, τα προϊόντα του ζώου απαγορεύεται να καταναλωθούν για συγκεκριμένο χρονικό διάστημα μετά τη θεραπεία (Lees et al., 2021).

### **1.2.2. Ενίσχυση της Αποτελεσματικότητας της Ζωικής Παραγωγής**

Η δεύτερη κύρια ομάδα ιδιοτήτων που έχει μετατρέψει τα αντιβιοτικά σε εργαλείο και ενδεχομένως φάρμακο στη ζωική παραγωγή είναι η αναμενόμενη και, με έναν ορισμένο βαθμό ακρίβειας, μετρήσιμη ικανότητά τους να βελτιώνουν την



αποτελεσματικότητα της παραγωγής (Rafiq et al. 2022). Τα κέρδη λόγω της αποτελεσματικότητας είναι κατά κύριο λόγο το αποτέλεσμα δραστηριοτήτων που προάγουν την ανάπτυξη, οι οποίες είναι ένας τύπος φαρμακολογικής παρέμβασης που έχει σχεδιαστεί για να προκαλέσει ταχύτερη αύξηση βάρους (Getabalew et al. 2020). Εναλλακτικά αυτές οι δραστηριότητες αυξάνουν την ποσότητα της τροφής που μετατρέπεται σε ζωικό προϊόν ανά μονάδα χρόνου με αποτέλεσμα την τροποποίηση της αποδοτικότητας των ζωοτροφών, η οποία περιλαμβάνει την παραγωγή περισσότερης βιομάζας με την ίδια ή λιγότερη τροφή (Gopal and Dhanasekaran 2021). Εκτός από τους αυξητικούς παράγοντες, μια ευρύτερη κατηγορία πρόσθετων ζωοτροφών και νερού, που περιλαμβάνουν μεταβολικά ή προφυλακτικά αντιβιοτικά, επηρεάζουν την αποτελεσματικότητα μειώνοντας την ενεργειακή δαπάνη ως απάντηση σε ανοσολογικές προκλήσεις, παρέχοντας έτσι περισσότερη ενέργεια για ανάπτυξη. Οι βελτιώσεις της αποτελεσματικότητας έχουν ως αποτέλεσμα τη βελτιωμένη χρήση των πόρων, η οποία αποτελεί κρίσιμο παράγοντα στη ζήτηση πρόσθετων τροφίμων για την κάλυψη του αυξανόμενου παγκόσμιου πληθυσμού (Rahman et al. 2022). Αυτό είναι επίσης ένας κινητήριος παράγοντας για την εφαρμογή της γνώσης που αποκτήθηκε στη γενετική των ζώων, τη διατροφή και την κτηνοτροφία για την ανακούφιση της πείνας και τη βελτίωση της ποιότητας ζωής (Rodrigues et al. 2021).

Αναμφίβολα, η δυνατότητα για αυξημένη αποδοτικότητα και οικονομικά οφέλη ήταν ένας σημαντικός παράγοντας για την αύξηση της ζωικής παραγωγής. Αυτό οφείλεται σε διάφορους παράγοντες. Η πληθυσμιακή έκρηξη που τροφοδότησε την παγκόσμια υλική και οικονομική πρόοδο μπορεί να αποδοθεί εν μέρει στα πλεονεκτήματα των προϊόντων διατροφής που εισέρχονται σε σύγχρονα και εκσυγχρονισμένα διατροφικά συστήματα (de Cunha Xavier et al. 2021). Αυτά τα προϊόντα μπορούν να ληφθούν με χαμηλότερη χρήση των πόρων παραγωγής, καθώς και με μειωμένες απώλειες τροφίμων μετά τη συγκομιδή. Η ανάγκη για παραγόμενο πλούτο στη κτηνοτροφία οδηγεί σε πρακτικές βιώσιμης εντατικοποίησης που προορίζονται να χρησιμοποιηθούν σε επίπεδο εκμετάλλευσης, διασφαλίζοντας ότι η αυξημένη παραγωγή είναι σε θέση να καλύψει τη σταθερά υψηλή ζήτηση στις γεωργικές αγορές (Zhao et al. 2021). Ένα καλό συστημικό παράδειγμα του συστήματος τροφίμων των ΗΠΑ που χρησιμοποιεί ολοκληρωμένες αρχές της Κυκλικής Οικονομίας είναι το κέντρο της λεγόμενης δεύτερης αγροτικής επανάστασης σε παγκόσμια

κλίμακα, ειδικά στις Ηνωμένες Πολιτείες, όπου πρόσφατες γενετικές αλλαγές, πρωτόκολλα διαχείρισης και προμήθειες ζώων έχουν εφαρμοστεί τόσο Greenfield όσο και σε γενετικά τροποποιημένα συστήματα παραγωγής (Van et al. 2020). Μια προκαταρκτική αξιολόγηση έδειξε ότι η χρήση αντιβιοτικών στη κτηνοτροφία είχε αυξήσει την αναλογία των συμπτωμάτων και θα μπορούσε ενδεχομένως να ωφελήσει τον τομέα των ζωοτροφών κατά περίπου 10:1. Κάθε δολάριο που δαπανάται αναμένεται να επιστρέψει περίπου 9 δολάρια, ανάλογα με τον βαθμό υιοθέτησης και τη συμβατότητα της τεχνολογίας με το υπάρχον σύστημα παραγωγής (Virto et al. 2022). Αυτή η προκαταρκτική έρευνα έδειξε τη συμμετοχή ποικίλων ενδιαφερομένων σε κάθε στάδιο του συστήματος παραγωγής ζωοτροφών, συμπεριλαμβανομένων των χρηματοπιστωτικών ιδρυμάτων, των κτηνιάτρων, της βιομηχανίας ζωοτροφών και του επιπέδου παραγωγής. Ωστόσο, τα αντιβιοτικά αποτυπώματα αποτελούν κρίσιμο συστατικό της υγιεινής χρήσης γης και συστημάτων τροφίμων σε συστήματα με φτωχούς πόρους, καθώς οι εκ των προτέρων εκτιμήσεις δείχνουν ότι η αναποτελεσματική ζωική παραγωγή είναι λιγότερο πιθανό να φτάσει σε εμπορικά επίπεδα (Li et al., 2021).

### **1.3. Οι πιθανοί κίνδυνοι από τη χρήση αντιβιοτικών στην κτηνοτροφία**

Η χρήση αντιβιοτικών στη κτηνοτροφία συνδέεται με σημαντικούς κινδύνους. Η επίδραση των αντιβιοτικών στην ανάπτυξη ανθεκτικών στελεχών βακτηρίων είναι δυνητικά ο πιο σημαντικός κίνδυνος. Εκτός από τους άμεσους κινδύνους για την υγεία και την καλή διαβίωση των ζώων λόγω της ανάπτυξης ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά, η χρήση αντιβιοτικών σε ζώα συνδέεται επίσης με ανησυχίες για τη δημόσια υγεία, όπως η ανάπτυξη ανθεκτικών στα αντιβιοτικά λοιμώξεων στον άνθρωπο και ανθρώπινες αλλεργικές αντιδράσεις. Επιπλέον, η παρουσία υπολειμμάτων αντιβιοτικών στα ζωικά προϊόντα και στο περιβάλλον αποτελεί πηγή ανησυχίας τόσο για την ανθρώπινη υγεία όσο και για τη γεωργική υγεία, καθώς τα ζώα δεν μεταβολίζουν πλήρως τα αντιβιοτικά (Serwecińska, 2020). Αντίθετα, απεκκρίνονται με τα ούρα και τα περιττώματα. Για παράδειγμα, η χρήση αντιβιοτικών για τη θεραπεία των ζώων μπορεί να μειώσει τη μικροβιακή ποικιλομορφία και να εμποδίσει τον αποικισμό ωφέλιμων βακτηρίων στο έντερο, αυξάνοντας έτσι την ευαισθησία σε

παθογόνα βακτήρια (Mancuso et al., 2021). Αυτός ο κίνδυνος εκτείνεται πέρα από το συγκεκριμένο αγρόκτημα (Terreni et al., 2021).

Τέλος, η χρήση αντιβιοτικών στη κτηνοτροφία είναι επιζήμια για τη βιοποικιλότητα και τα οικοσυστήματα. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι αυτές οι ενώσεις, οι οποίες απεκκρίνονται στα περιττώματα των ζώων, μαζεύονται σε περιβαλλοντικές δεξαμενές, συμπεριλαμβανομένου του εδάφους, των υπόγειων υδάτων και των επιφανειακών υδάτων (Feckler et al.2023). Οι τοπικές και περιφερειακές κοινότητες και οικοσυστήματα ενδέχεται να επηρεαστούν αρνητικά από τις άμεσες και έμμεσες επιπτώσεις της ευρείας και μακροχρόνιας χρήσης. Οι ατμοσφαιρικές εκπομπές, η απορροή στα επιφανειακά ύδατα και η επιστροφή ρύπων στο έδαφος μέσω της εφαρμογής κοπριάς είναι όλα παραδείγματα του τρόπου με τον οποίο οι κτηνοτροφικές δραστηριότητες απορρίπτουν ρύπους (Zhao et al.2022). Αν και τα κτηνιατρικά φαρμακευτικά προϊόντα έχουν σχεδιαστεί τυπικά για να στοχεύουν το σημείο δράσης στο ζώο, μπορεί να έχουν ανεπιθύμητες επιδράσεις σε οργανισμούς μη στόχους που έρχονται σε επαφή με τις ενώσεις μέσω της απέκκρισης του ζώου. Οι πιθανές επιδράσεις των αντιβιοτικών σε επίπεδο κοινότητας ή οικοσυστήματος σε ζώα που παράγουν τρόφιμα είναι δύσκολο να αξιολογηθούν λόγω της πολυπλοκότητας των οδών έκθεσης (Könninger et al.2021).

### **1.3.1. Ανάπτυξη της ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά σε βακτήρια**

Η ανάπτυξη ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά αποτελεί κρίσιμη ανησυχία για την υγεία των ανθρώπων και των ζώων (Terreni et al 2021). Οι εξελικτικές δυνάμεις παρακινούν ορισμένους μολυσματικούς παράγοντες, συμπεριλαμβανομένων των μικροβίων, να προσαρμοστούν και να υπερνικήσουν τις προσπάθειες ρύθμισής τους (Shaikh et al. 2023). Αν και η εμφάνιση πολυανθεκτικών βακτηρίων (MDR) δεν είναι μια νέα πρόκληση, έχει αποκτήσει σημαντική δυναμική τον τελευταίο μισό αιώνα ως αποτέλεσμα των αλλαγών στη γεωργία, την κτηνιατρική και τις πρακτικές δημόσιας υγείας. Τα στελέχη βακτηρίων MDR έχουν εμφανιστεί ως αποτέλεσμα της κακής χρήσης, της υπερβολικής χρήσης και της ακατάλληλης χρήσης αντιβιοτικών (Malhotra et al. 2021). Αυτή η φαινοτυπική αλλοίωση στα βακτήρια αποτελεί σημαντική ανησυχία για τη δημόσια υγεία. Τα αντιβιοτικά έχουν αναφερθεί ως «ξίφη με δύο άκρες» εξαιτίας της αλόγιστης χρήσης τους για την διασφάλιση της υγείας του ανθρώπινου είδους αλλά και των ζώων, καθώς μπορεί να μεταδοθεί αντίσταση μεταξύ

των δύο ειδών. Το παγκόσμιο ζήτημα της χρήσης αντιβιοτικών και των προτύπων αντοχής είναι ένα συνδυασμένο συστημικό ζήτημα μεγάλης κλίμακας. (Mittal et al., 2020).

Παρά την ικανότητά τους να εξαλείφουν ή να αναστέλλουν αποτελεσματικά την ανάπτυξη μικροοργανισμών, τα αντιμικροβιακά δεν πληρούν αυτό το πρότυπο παγκοσμίως (Serwecińska, 2020). Μεταλλάξεις μπορεί να συμβούν σε μεμονωμένους μικροοργανισμούς, καθιστώντας τους ανθεκτικούς στις επιδράσεις ενός αντιμικροβιακού παράγοντα. Η μετάλλαξη μεταδίδεται στην επόμενη γενιά μέσω της αντιγραφής όταν ο μεταλλαγμένος μικροοργανισμός επιβιώσει (Vidovic and Vidovic, 2020). Κατά συνέπεια, μικροοργανισμοί μπορούν να αναπτύξουν αντοχή σε συγκεκριμένους αντιμικροβιακούς παράγοντες με την πάροδο του χρόνου μέσω της έκθεσης, με αποτέλεσμα την ανάπτυξη ανθεκτικών βακτηριακών στελεχών που μπορούν να διατηρήσουν την έκθεση στα αντιβιοτικά. Αυτή η αντίσταση μπορεί να μεταδοθεί εντός και μεταξύ των μελών του ίδιου μικροβιακού πληθυσμού, καθώς και σε μια ποικιλία οικολογικών τοπίων. Τα βακτήρια είναι ικανά να ανταλλάσσουν γενετικό υλικό μεταξύ στελεχών και ακόμη και μεταξύ ειδών, ανταλλάσσοντας έτσι καθοριστικούς παράγοντες αντοχής, λόγω της ικανότητάς τους να πολλαπλασιάζονται γρήγορα (Aljeldah, 2022). Η υπερβολική αφθονία αντιβιοτικών λειτουργεί ως πίεση επιλογής, καθώς η αντίσταση είναι το αποτέλεσμα της επιλογής για ευεργετικές μεταλλάξεις. Ένα υψηλό επίπεδο αντιμικροβιακής έκθεσης είναι απαραίτητο για να διασφαλιστεί η πλήρης εξάλειψη ενός συγκεκριμένου συνόλου μικροοργανισμών. Ανθεκτικά βακτήρια, τα οποία είναι οι αρχικοί επιζώντες της έκθεσης σε αντιμικροβιακό παράγοντα, θα εμφανιστούν γρήγορα και θα αντικαταστήσουν τα μη ανθεκτικά βακτήρια που καταλάμβαναν προηγουμένως την πλειοψηφία του πληθυσμού. Κατά συνέπεια, η εμφάνιση και η διάδοση της αντοχής επιταχύνεται από ένα ανεπαρκές ή ασυνεπές επίπεδο έκθεσης σε κατάλληλη συγκέντρωση αντιμικροβιακών παραγόντων (EFSA et al. 2021)

### **1.3.2. Οι Επιπτώσεις της Επιμόλυνσης του Περιβάλλοντος στα Οικοσυστήματα**

Η χρήση αντιβιοτικών στη γεωργία μπορεί να οδηγήσει σε αντιμικροβιακή μόλυνση, η οποία μπορεί να δημιουργήσει περιβαλλοντικούς κινδύνους και ανησυχίες.

Τα γονίδια ανθεκτικότητας και τα αντιβιοτικά εισάγονται τακτικά στα οικοσυστήματα λόγω του τεράστιου εύρους και της έκτασης της βιομηχανικής κτηνοτροφίας (Serwecińska, 2020). Τα αντιβιοτικά και τα ανθεκτικά γονίδια που υπάρχουν στα ζωικά απόβλητα μπορούν να μεταφερθούν στο περιβάλλον μέσω ποικίλων μεθόδων μετά την απέκκρισή τους (Ahmad et al. 2021). Για παράδειγμα, μπορεί να διεισδύσουν στο περιβάλλον με τη μορφή των αρχικών ενώσεων ή των μεταβολιτών τους, εισχωρώντας σε υδάτινα σώματα ως απορροή ή με έκπλυση στο έδαφος (Kaviani et al. 2022). Η ικανότητα του εδάφους να δεσμεύει ενώσεις το έχει καταστήσει ευρέως αναγνωρισμένο φυσικό «νεροχύτη» για αντιβιοτικά που προέρχονται από ζωικά απόβλητα. Η χρήση φαρμακευτικών σκευασμάτων είναι πιθανό να μεταβάλει τα συνολικά εδαφικά οικοσυστήματα με την πάροδο του χρόνου, καθιστώντας τα δυνητικά επιρρεπή σε πρόσθετη αντίσταση στα αντιβιοτικά και άλλες επιζήμιες επιπτώσεις κατά μήκος της τροφικής αλυσίδας (Miller et al., 2022).

Τα υπολείμματα αντιβιοτικών που διεισδύουν σε εδάφη και γειτονικά νερά προκαλούν ιδιαίτερη ανησυχία, καθώς μπορεί να έχουν αντιβακτηριδιακές επιδράσεις σε οργανισμούς μη στόχους και μη παθογόνα που είναι ευεργετικά. Η επιβίωση των ανθεκτικών στα αντιβιοτικά μικροοργανισμών και γονιδίων στα οικοσυστήματα του εδάφους μπορεί επίσης να διευκολυνθεί από πιέσεις από μόλυνση με αντιβιοτικά (Mishra Rakesh et al.). Επιπλέον, η παρουσία αυτών των υπολειμμάτων μπορεί επίσης να οδηγήσει σε διαταραχή της δυναμικής του πληθυσμού και αλλαγές στη μικροβιακή βιοποικιλότητα (Maguire and Gardner 2023). Επιπλέον, ορισμένοι επιστήμονες υποστηρίζουν ότι οι υψηλές δόσεις που χορηγούνται συχνά στα ζώα επιλέγουν άμεσα τους καθοριστικούς παράγοντες αντοχής. Στη συνέχεια, η αντίσταση μπορεί να διαδοθεί περαιτέρω μέσω της επαγωγής εκλεκτικών μεταλλάξεων σε φυσικούς πληθυσμούς (Gray 2020). Τα υδάτινα συστήματα κινδυνεύουν όταν τα υγρά αποχέτευσης επιτρέπεται να διαφύγουν στο περιβάλλον. Οι αρχικές προσπάθειες περιορισμού αυτού του φαινομένου προήλθαν από κανονισμούς που απαγορεύουν την απόρριψη ρύπων σε υδάτινα συστήματα. Η αιτιολόγηση αυτών των νόμων ήταν ότι η επιβολή τους θα αποτρέψει την οικολογική καταστροφή, μια αρχή που υπογραμμίζει τη συνάφεια και τη σημασία των βιώσιμων προσεγγίσεων τόσο στη γεωργία όσο και στη δημόσια υγεία τοποθετώντας τα οικοσυστήματα και τη γεωργία σε μια διασταυρούμενη συνέχεια (Cheng and Cheng, 2024).

#### 1.4. Χρήση αντιβιοτικών στη γεωργία των ζώων: μια παγκόσμια προοπτική

Ο αριθμός των αντιβακτηριακών φαρμάκων που χρησιμοποιούνται στην κτηνοτροφία, η διάρκεια χορήγησης κάθε φαρμάκου στα ζώα και άλλες μεταβλητές ποικίλλουν μεταξύ διαφορετικών χωρών και περιοχών. Αυτές οι περιφερειακές παραλλαγές επηρεάζονται από διάφορους παράγοντες, συμπεριλαμβανομένων πολιτιστικών, επιδημιολογικών, οικονομικών και ρυθμιστικών παραγόντων (Tiseo et al. 2020). Περιπτωσιολογικές μελέτες επιτυχίας και αποτυχίας στη κτηνοτροφία σε σχέση με τη χρήση αντιβακτηριδιακής θεραπείας είναι παρούσες παγκοσμίως. Ο κόσμος μπορεί να φαίνεται να χωρίζεται σε δύο τομείς: τις Ηνωμένες Πολιτείες, οι οποίες προωθούν την ατομική θεραπεία ζώων εκτροφής με σχετικά χαμηλή πυκνότητα αντιβιοτικής θεραπείας, και την Ευρωπαϊκή Ένωση και την Ιαπωνία, που ενθαρρύνουν κυρίως την προσεκτική και χαμηλής πυκνότητας χρήση αντιβακτηριακών φαρμάκων (Kasimanickam et al. 2021). Η καθολικά σωστή προσέγγιση για την υπεύθυνη και περιορισμένη χρήση αντιβιοτικών σε παραγωγικά ζώα, η οποία βασίζεται σε αρχές ανάλυσης κινδύνου και κατάλληλη επιτήρηση και ικανότητα, είναι παγκοσμίως αποδεκτή από τους διεθνείς οργανισμούς, παρά αυτές τις διαφορές (Mulchandani et al. 2023). Οι διεθνείς διαβουλεύσεις, στις οποίες έχουν συμμετάσχει πολλά έθνη, έχουν προωθήσει και κατευθύνει μια λογική πολιτική σε κάθε έθνος μέσω διεθνών κατευθυντήριων γραμμών (Hosain et al., 2021) (More, 2020).

Ο πρωταρχικός στόχος της παγκοσμιοποίησης και η αναγκαιότητα να διασφαλιστεί ότι κάποιο προϊόν είναι αποδεκτό από μια άλλη χώρα είναι να πείσει τη χώρα εμπορίας για την υγιεινή και την ασφάλεια των τροφίμων του προϊόντος (Ben et al. 2022). Μερικές φορές, η χρήση των προτύπων παραγωγής του εμπορικού εταίρου μπορεί να θεωρηθεί ως τεχνητή επιδότηση του εμπορίου. Αυτός είναι ο λόγος για τον οποίο, σε παγκόσμια κλίμακα, η πολιτική της χώρας εξαγωγής μπορεί περιστασιακά να αντανakλά πρότυπα παραγωγής που οι εμπορικοί εταίροι θεωρούν επικίνδυνα (Sartelli et al 2020). Οι πρακτικές άλλων χωρών θα επηρεαστούν από τις αποφάσεις που λαμβάνονται από μια χώρα, καθώς η αντίσταση στα αντιβιοτικά είναι μια παγκοσμίως αναγνωρισμένη πολιτική με συνέπειες για τον άνθρωπο. Έτσι ορισμένοι οικονομολόγοι πιστεύουν ότι η μόνη λύση είναι να εμπλακούν οι χώρες σε συνεργατική συμπεριφορά. Οι Treiber και Beranek-Knauer (2021) έχουν προτείνει ότι το εθνικό



συμφέρον μπορεί να απαιτεί ένα αρχείο συνθηκών, διαπραγματεύσεων και λύσεων ποικίλων αναλογιών.

### 1.5. Συμπέρασμα και μελλοντικές κατευθύνσεις

Τα πλεονεκτήματα που μπορούν να επιτευχθούν μέσω της συνετής εφαρμογής των αντιβιοτικών στη κτηνοτροφία, όπως η πρόληψη, ο έλεγχος και η θεραπεία ασθενειών των ανθρώπων και των ζώων, είναι εμφανή όπως εμφανής είναι και η δυνατότητα βελτίωσης της αποτελεσματικότητας της κτηνοτροφικής παραγωγής (Abd et al.2022). Είναι εξίσου προφανές ότι η χρήση αντιβιοτικών συνδέεται με κινδύνους. Η βιώσιμη κτηνοτροφική παραγωγή μπορεί να επιτευχθεί χωρίς αντιβιοτικά και η χρήση αντιβιοτικών είναι απλώς ένα μέσο στο σύστημα παραγωγής (Vasala et al.2020). Αυτό είναι ένα κρίσιμο σημείο πρέπει να υπογραμμιστεί. Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι η πραγματική ανησυχία είναι η βιωσιμότητα, η οποία ενσωματώνει μια ποικιλία θεμάτων, όπως η βιοασφάλεια, η αγροτική ανάπτυξη, η ασφάλεια των τροφίμων, η υγεία και η ευημερία των ζώων και η διατήρηση του περιβάλλοντος (More, 2020).

Έχοντας υπόψη τα προαναφερθέντα, η χρήση αντιβιοτικών σε συστήματα ζωικής παραγωγής πρέπει να εξετάζεται στο πλαίσιο της υπεύθυνης και συνετής χρήσης των κτηνιατρικών φαρμάκων. Απαιτείται μια ουσιαστική μετάβαση από την προφύλαξη και τη συνεχή χρήση, στην υπεύθυνη χρήση και την υιοθέτηση εναλλακτικών λύσεων (Grundin et al.). Είναι προφανές ότι πολλές τεχνολογίες, συμπεριλαμβανομένων των εμβολίων, των στρατηγικών διατροφής και εκτροφής, της καλής διαχείρισης και των πρακτικών υγειονομικής περίθαλψης, θα μπορούσαν να συμβάλουν σημαντικά στη μείωση της θεραπευτικής εξάρτησης από αντιβιοτικά στην κτηνιατρική. Παρόλο που η επιστήμη και η τεχνολογία ικανότατα μπορούν να συνδράμουν στη διασφάλιση της υγείας και του προσδόκιμου ζωής των ζώων, ιδιαίτερα στην κτηνοτροφία, καλό είναι οι αγρότες να μην είναι αποκλειστικά υπεύθυνοι (Baudoin et al., 2021). Η παροχή εργαλείων που μπορούν να επηρεάσουν ζητήματα υγείας και καλής διαβίωσης των ζώων στην ευρύτερη βιομηχανική κλίμακα εξαρτάται από τη συνεργασία ερευνητών, φαρμακευτικών εταιρειών και παραγωγών. Η αγορά μπορεί να επηρεαστεί για πιο βιώσιμη κτηνοτροφία από τη συνεχή ευαισθητοποίηση των καταναλωτών και της βιομηχανίας, καθώς και από την πίεση των καταναλωτών, η οποία μπορεί να ενθαρρύνει τη βιομηχανία και την έρευνα να

επενδύσουν στην ανάπτυξη βιώσιμων εναλλακτικών λύσεων αντί των αντιβιοτικών στην κτηνοτροφική παραγωγή (Magnusson, 2020). Οι υπεύθυνοι χάραξης πολιτικής θα πρέπει να εγκρίνουν πρωτοβουλίες που εφαρμόζονται σε ευρωπαϊκό και διεθνές επίπεδο που ενισχύουν τη συνεργασία μεταξύ αυτών των τομέων, καλύπτοντας έτσι τις ευρύτερες απαιτήσεις της κτηνοτροφικής βιομηχανίας, του ευρύτερου κοινού και προσελκύοντας την προσοχή των διακυβερνητικών χρηματοπιστωτικών ιδρυμάτων (Hosain et al., 2021). Επιπλέον, υπάρχουν πρόσθετοι ερευνητικοί τομείς που απαιτούν περαιτέρω διερεύνηση. Αυτά περιλαμβάνουν τη χρήση γονιδιωματικών για την ενίσχυση του ελέγχου ασθενειών και την καλύτερη κατανόηση των μικροβιακών πληθυσμών, καθώς και ανοσορυθμιστές κυτταρικού τοιχώματος και φυτικά εκχυλίσματα που μπορεί να συμβάλλουν στη μείωση της χρήσης αντιβιοτικών. Συνιστάται η συνέχιση της διερεύνησης αυτών των περιοχών και η διεξαγωγή περιεκτικών, *in vivo* μελετών των πιθανών εναλλακτικών ουσιών, προκειμένου να αποκτηθεί μια πιο ολοκληρωμένη κατανόηση. Επιπλέον, φαίνεται ότι η μελλοντική έρευνα για τα αντιβιοτικά στα συστήματα κτηνοτροφικής παραγωγής προχωρά προς τη δημιουργία «πολυπαραγοντικών» αλλά εστιασμένων στρατηγικών για την παραγωγή υγιέστερων ζώων που απαιτούν λιγότερη χρήση αντιβιοτικών. Αναμένεται ότι ο κλάδος θα ωφεληθεί σημαντικά από τη συνεχιζόμενη παγκόσμια έρευνα σε αυτούς τους τομείς και συνιστάται αυτή η έρευνα να συνεχιστεί προς αυτή την κατεύθυνση (Pinto et al. 2022) (More, 2020).



## 2. Υπολείμματα αντιβιοτικών σε τρόφιμα ζωικής προέλευσης

Ως κτηνιατρικά φάρμακα ορίζονται οι ενώσεις ή τα μείγματα ουσιών που χρησιμοποιούνται για τη θεραπεία, την πρόληψη ή τη διάγνωση ασθενειών σε ζώα. Αναφέρονται επίσης ως ιατρικά προϊόντα για κτηνιατρική χρήση ή κτηνιατρικά φαρμακευτικά προϊόντα (VMPs) (Commission 2022).

Τα κτηνιατρικά φάρμακα χορηγούνται ως επί το πλείστον για την πρόληψη ασθενειών, ειδικά σε καταστάσεις που προκαλούν άγχος, όπως κατά τη μεταφορά των ζώων ή σε υπερπλήρη περιβάλλοντα αναπαραγωγής (Patel, et al 2020). Τα αντιμικροβιακά είναι ενώσεις που είτε συντίθενται είτε παράγονται φυσικά και χρησιμοποιούνται για την εξάλειψη ή την παρεμπόδιση του πολλαπλασιασμού μικροοργανισμών, συμπεριλαμβανομένων των βακτηρίων, των ιών, των μυκήτων και των παρασίτων, ιδιαίτερα των πρωτόζωων.

Τα αντιβιοτικά είναι χημικές ουσίες που έχουν αντιμικροβιακές ιδιότητες και παράγονται ή εξάγονται από μικροοργανισμούς. Έχουν την ικανότητα να σκοτώνουν ή να εμποδίζουν την ανάπτυξη άλλων βακτηρίων (The European Parliament and the Council of the European Union 2003). Επί του παρόντος, ο όρος «αντιβιοτικό» χρησιμοποιείται περιστασιακά για να συμπεριλάβει ολόκληρη την κατηγορία των φαρμάκων, χρησιμεύοντας ως συνώνυμο του ευρύτερου όρου «αντιβακτηριακό» (Marazuela, Bogialli 2009). Ο Οργανισμός Τροφίμων και Φαρμάκων των ΗΠΑ (FDA) χορήγησε έγκριση για τη χρήση αντιβιοτικών σε ζώα το 1951 (The European Parliament and the Council of the European Union 2003).

Η παγκόσμια χρήση αντιβιοτικών αναμένεται να αυξηθεί κατά 67% από το 2010 έως το 2030, κυρίως λόγω της ζήτησης για εντατική και μεγάλης κλίμακας κτηνοτροφία, η οποία βασίζεται σε μεγάλο βαθμό στη χρήση αντιβιοτικών. Επιπλέον, αυτό συνδέεται με την αυξανόμενη ανάγκη για ζωική πρωτεΐνη, ιδιαίτερα στην Ασία (Patel, et al 2020). Η αναμενόμενη αύξηση στη χρήση αντιβιοτικών σε χώρες υποανάπτυκτες, αναπτυσσόμενες και αναπτυγμένες ( Βραζιλία, Νότια Αφρική, Κίνα,

Ινδία και Ρωσία ) προβλέπεται να είναι 99%, που είναι επτά φορές μεγαλύτερη από τον προβλεπόμενο ρυθμό αύξησης του πληθυσμού κατά την ίδια περίοδο.

Αρκετές χώρες ενδέχεται να μην έχουν πρόσβαση σε δεδομένα σχετικά με τη χρήση αντιβιοτικών και μπορεί να υπάρχει ανεπαρκής ρυθμιστική εποπτεία. Αρκετές ομάδες αντιβιοτικών που χρησιμοποιούνται συνήθως στην ανθρώπινη ιατρική χρησιμοποιούνται επί του παρόντος στις βιομηχανίες πουλερικών, γαλακτοκομικών, βοοειδών και χοίρων.

Ένα σημαντικό ποσοστό των πωλήσεων αντιβιοτικών προέρχεται κυρίως από τις επιχειρήσεις παραγωγής τροφίμων. Στις Ηνωμένες Πολιτείες, το 42% των πωλήσεων προέρχεται από την κτηνοτροφία, ενώ το 39% προέρχεται από τις βιομηχανίες χοίρων. Το 2018, οι τετρακυκλίνες αποτελούσαν το 66% των πωλήσεων αντιβιοτικών για τα ζώα, ενώ οι πενικιλίνες αντιπροσώπευαν το 13%, οι μακρολίδες για 8%, οι φθοροκινολόνες λιγότερο από 1%, οι λινκοσαμίδες για το 2%, οι αμινογλυκοσίδες για το 5%, οι κεφαλοσπορίνες για το 1% και οι σουλφοναμίδες για 5% (Patel, et al 2020). Ωστόσο, η χρήση αντιβιοτικών στα κοτόπουλα έχει μειωθεί. Το 2018, στο 92% των κοτόπουλων που πωλήθηκαν στις Ηνωμένες Πολιτείες δεν είχαν λάβει κατ' εξακολούθηση σημαντικές ποσότητες αντιβιοτικών. Οι τετρακυκλίνες και οι πενικιλίνες είναι τα αντιβιοτικά που χρησιμοποιούνται πιο συχνά στους χοίρους (Lechner, et al 2020).

Τα τελευταία χρόνια, η χρήση των κτηνιατρικών αντιβιοτικών έχει τεκμηριωθεί ότι προκαλεί μόλυνση σε διάφορα περιβάλλοντα, όπως το έδαφος, τα φυτά, το νερό και τον αέρα. Αυτή η μόλυνση έχει συνδεθεί με την εμφάνιση και εξάπλωση βακτηρίων ανθεκτικών στα φάρμακα (Kurpusamy, et al 2018).

Κατά συνέπεια, ακόμη και όταν υπάρχουν σε μικρές ποσότητες, τα κτηνιατρικά αντιβιοτικά αποτελούν ενδεχόμενο κίνδυνο τόσο για την ανθρώπινη ύπαρξη όσο και για την οικολογική ευημερία. Μπορούν να συμβάλουν στην ανάπτυξη μικροβιακής αντοχής στο περιβάλλον και να οδηγήσουν σε σοβαρές αλλεργίες ή τοξικότητα στα φυτά και στον άνθρωπο (Tirado, et al 2010, Stavroulaki, et al 2022).

Μεταξύ των παγκόσμιων καταναλωτών, τα παιδιά είναι τα πιο ευαίσθητα στην παρουσία κτηνιατρικών φαρμάκων στη διατροφή τους. Επιπλέον, λόγω του υψηλότερου ποσοστού κατανάλωσης ανά μονάδα βάρους, αυτή η ομάδα θεωρείται ότι

διατρέχει μεγαλύτερο κίνδυνο καθώς είναι πιο ευαίσθητη σε κτηνιατρικά φάρμακα σε σύγκριση με τους ενήλικες (Mainero Rocca et al 2017).

Η ΕΕ έχει απαγορεύσει τη χρήση αντιμικροβιακών φαρμάκων για την ενίσχυση της ανάπτυξης των ζωοτροφών από τον Ιανουάριο του 2006, όπως αναφέρεται στον κανονισμό (ΕΚ) αριθ. 1831/2003 (The European Parliament and the Council of the European Union 2003). Ωστόσο, η χρήση αντιμικροβιακών ενώσεων σε ζωικά προϊόντα παραμένει ευρέως διαδεδομένη σε χώρες όπως η Βόρεια Αμερική, η Αυστραλία, η Βραζιλία και άλλες (Marazuela, Bogialli 2009). Αναμφίβολα, η βακτηριακή αντοχή είναι ένα πρωταρχικό ζήτημα που αυξάνεται σταθερά, με σημαντικές επιπτώσεις στον παγκόσμιο πληθυσμό.

Αυτό το κεφάλαιο παρέχει μια διεξοδική εξέταση της παρουσίας αντιβιοτικών στα ζωικά τρόφιμα. Αναδεικνύει συγκεκριμένα τις πιο πρόσφατες και πιο αποτελεσματικές μεθόδους για την εξαγωγή και την ανάλυση πολλών τύπων αντιβιοτικών, τόσο ποιοτικά όσο και ποσοτικά. Ιδιαίτερη έμφαση δίνεται σε μεθοδολογίες που περιλαμβάνουν την εξέταση της κατηγορίας των αμινογλυκοσιδών. Συγκρίνονται επίσης τα νομοθετικά μέσα που εφαρμόζονται από διάφορες χώρες ή ομάδες χωρών για τον καθορισμό των ανώτατων ορίων υπολειμμάτων (MRL) αυτών των ενώσεων στα τρόφιμα.

Το κεφάλαιο εξετάζει εκτενώς την επίδραση της επεξεργασίας τροφίμων στην παρουσία υπολειμμάτων αντιβιοτικών στα ζωικά τρόφιμα. Προτρέπει μια συζήτηση σχετικά με τα προκαθορισμένα επίπεδα υπολειμμάτων στα επεξεργασμένα τρόφιμα και την αναγκαιότητα δημιουργίας τεχνικών για τον εντοπισμό πολλαπλών υπολειμμάτων αντιβιοτικών σε δείγματα επεξεργασμένων τροφίμων. Τελικά, θα αναφέρουμε πιθανή μελλοντική πρόοδο στη μελέτη των υπολειμμάτων αντιβιοτικών σε τρόφιμα ζωικής προέλευσης.

## 2.1. Το νομικό πλαίσιο

Εντός της Ευρωπαϊκής Ένωσης, προκειμένου να κατοχυρωθεί η ασφάλεια των τροφίμων, τα υπολείμματα κτηνιατρικών φαρμακευτικών προϊόντων που υπάρχουν σε τρόφιμα ζωικής προέλευσης μετά τη θεραπεία πρέπει να υποβάλλονται σε επιστημονική αξιολόγηση σύμφωνα με τον κανονισμό (ΕΚ) αριθ. 470/2009 του

Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου, με ημερομηνία 6 Μαΐου 2009 (The European Commission 2009).

Προκειμένου να ελαχιστοποιηθεί η ανθρώπινη έκθεση, διάφοροι οργανισμοί όπως ο Codex Alimentarius (Cheng, 1993), η Ευρωπαϊκή Ένωση (The European Commission 2009) και ο FDA (2022) έχουν θέσει ανώτατα όρια υπολειμμάτων για φαρμακολογικά δραστικές ουσίες. Αυτά τα όρια καθορίζουν την υψηλότερη συγκέντρωση μιας φαρμακολογικά δραστικής ουσίας που επιτρέπεται σε τρόφιμα ζωικής προέλευσης (Commission 2022).

Κατά την εισαγωγή ή την εξαγωγή ζωικών προϊόντων, είναι σημαντικό να λαμβάνεται υπόψη το μέγιστο επίπεδο υπολειμμάτων (MRL) των κτηνιατρικών φαρμάκων. Οι αποκλίνοντες κανονισμοί μεταξύ των χωρών μπορούν να δημιουργήσουν εμπόδια στις εμπορικές δραστηριότητες. Ενδεικτικά, οι Ηνωμένες Πολιτείες και ο Καναδάς έχουν ορίσει ένα μέγιστο όριο υπολειμμάτων (MRL) 200  $\mu\text{g/kg}$  για τη χλωροτετρακυκλίνη στους μυς των χοίρων. Ωστόσο, η Ευρωπαϊκή Ένωση (EE) έχει αυστηρότερο MRL 100  $\mu\text{g/kg}$ .

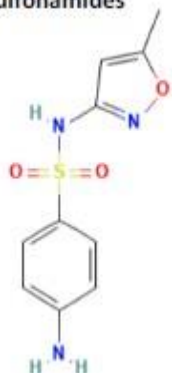
Η Ευρωπαϊκή Ένωση αναθέτει στα κράτη μέλη της να καταρτίσουν ετήσιο σχέδιο παρακολούθησης για επίσημους ελέγχους προκειμένου να εντοπιστεί οποιαδήποτε παράνομη χρήση (Ομάδα Α, Κανονισμός (ΕΟΚ) 2377/9 του Συμβουλίου) ή ακατάλληλη χρήση εγκεκριμένων κτηνιατρικών φαρμάκων (Ομάδα Β, Κανονισμός του Συμβουλίου ΕΟΚ) 2377/90). Αυτή η παρακολούθηση εποπτεύεται από το Γραφείο Τροφίμων και Κτηνιατρικών Θεμάτων (ΓΤΚΘ) (World Health Organization 2007). Επιπλέον, η απόφαση 2002/657/ΕΚ της Επιτροπής περιγράφει τα κριτήρια για την επικύρωση των αναλυτικών διαδικασιών και των αποτελεσμάτων υποβολής εκθέσεων (European Commission 2002). Το αποτέλεσμα είναι η απαίτηση για μια συστηματική προσέγγιση για την ενίσχυση της ευαισθησίας, της ακρίβειας, της ταχύτητας και της αξιοπιστίας. Ένα άλλο σημαντικό θέμα είναι το RASFF, ή Σύστημα Ταχείας Προειδοποίησης για Τρόφιμα και Ζωοτροφές. Αυτό το σύστημα χρησιμεύει ως μέσο εγγύησης της ανταλλαγής πληροφοριών και διευκόλυνσης της ταχείας δράσης για την καταπολέμηση επιβλαβών αποτελεσμάτων στην δημόσια υγεία, που προκύπτουν στην αλυσίδα εφοδιασμού τροφίμων. Το σύστημα ταχείας προειδοποίησης για τα τρόφιμα και τις ζωοτροφές (RASFF), που ιδρύθηκε το 1979, διευκολύνει την αποτελεσματική

ανταλλαγή πληροφοριών μεταξύ των μελών του, συμπεριλαμβανομένης της Ευρωπαϊκής Επιτροπής, των εθνικών αρχών για την ασφάλεια των τροφίμων των κρατών μελών της ΕΕ, της ESA, της EFSA, του Λιχτενστάιν, της Νορβηγίας, της Ισλανδίας και Ελβετία. Λειτουργεί 24ωρη υπηρεσία για να διασφαλίσει την έγκαιρη λήψη και επιβεβαίωση των επειγουσών ειδοποιήσεων. Οι ευρωπαίοι καταναλωτές προστατεύονται από πιθανή βλάβη που προκαλείται από διάφορους κινδύνους για την ασφάλεια των τροφίμων, χάρη στο Σύστημα Ταχείας Προειδοποίησης για Τρόφιμα και Ζωοτροφές (RASFF) (Rapid Alert System in Food and Feed 2019).

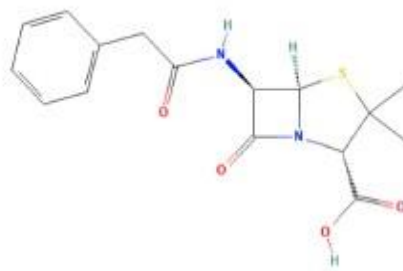
## 2.2. Φυσικοχημικές ιδιότητες διαφόρων αντιβιοτικών

Οι διάφορες κατηγορίες κτηνιατρικών φαρμάκων συνδέονται άμεσα με διακριτές χημικές συνθέσεις, οι οποίες με τη σειρά τους έχουν ως αποτέλεσμα διακριτά φυσικοχημικά χαρακτηριστικά (Εικόνα 5).

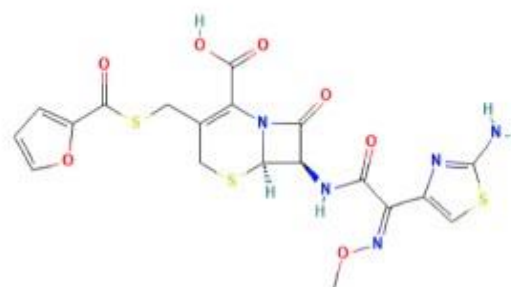
Sulfonamides



Penicillins



Cephalosporins



Macrolides



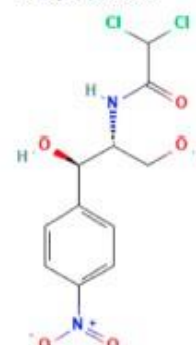
Tetracyclines



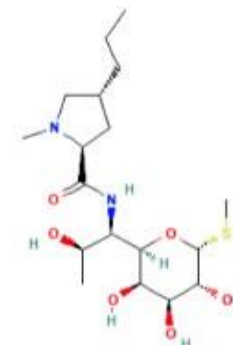
Aminoglycosides

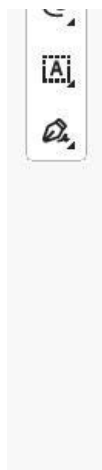


Amphenicols

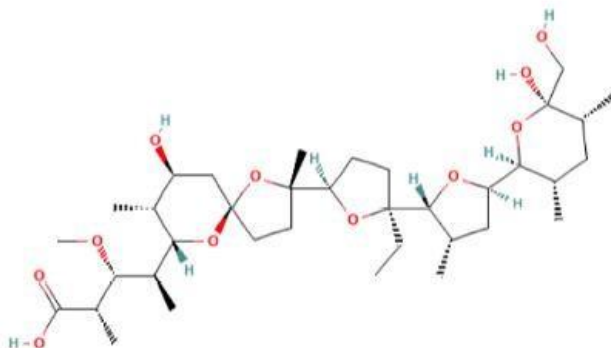


Lincosamides

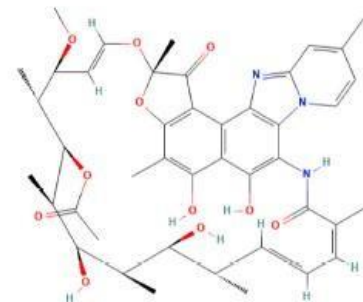




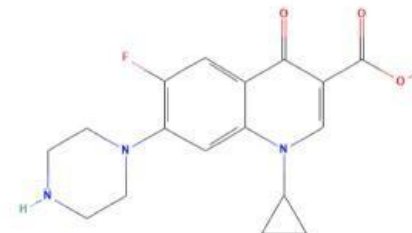
Ionophores



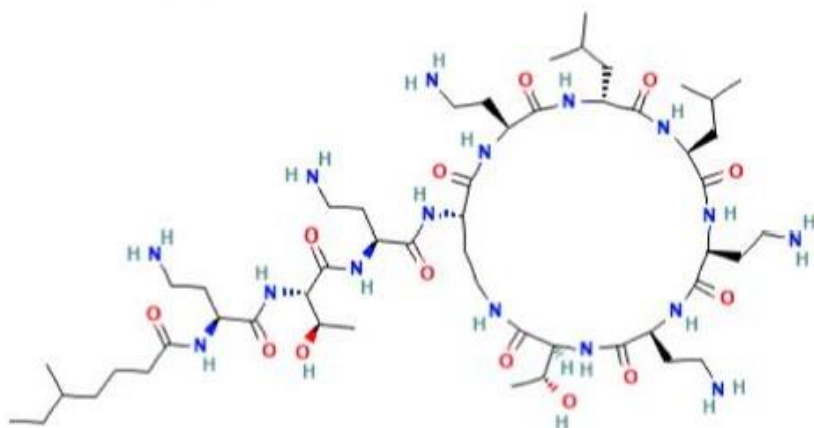
Rifamycins



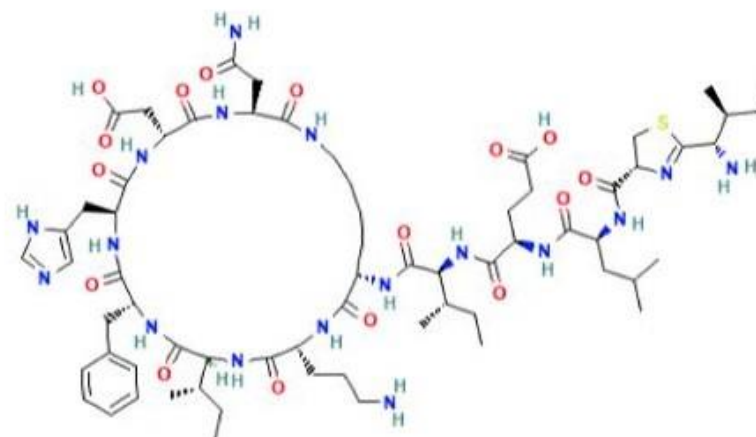
Quinolones



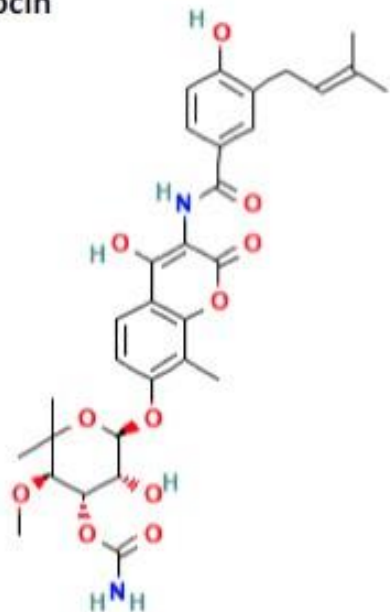
Polymyxin



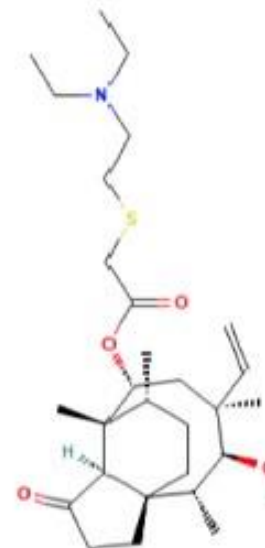
Peptides



**Novobiocin**



**Pleuromutilin**



Εικόνα 1 Δομές των αντιπροσωπευτικών συστατικών των αντιβιοτικών: Σουλφαμιδίνες, Πενικιλίνες, Κεφαλοσπορίνες, Μακρολίδες, Τετρακυκλίνες, Αμινογλυκοσίδες, Αμφενικόλες, Λινκοσαμίδες, Ιωνοφόροι, Ριφαμυκίνες, Κινολόνες, Πολυμυξίνη, Πεπτίδια, Νοβοβοκίνη, Πλευρομουτιλίνη.



### 2.2.1. Σουλφοναμίδια

Τα σουλφοναμίδια, συχνά γνωστά ως SA, είναι παράγωγα σουλφανιλαμίδης που αποτελούν τη βασική δομή για μια ποικιλία χημικών ουσιών αυτής της κατηγορίας. Τα φαρμακολογικά και βακτηριοκτόνα τους αποτελέσματα είναι ποικίλα και μπορούν να επηρεαστούν από την προσκόλληση ή την υποκατάσταση διαφορετικών λειτουργικών ομάδων στην αμινο ομάδα ή την αντικατάσταση της αμινομάδας, οδηγώντας σε αλλαγές στις φυσικοχημικές τους ιδιότητες.

Αν και τα SA έχουν επαμφοτερίζουσες ιδιότητες, συχνά συμπεριφέρονται ως ασθενή οργανικά οξέα και έχουν υψηλότερη διαλυτότητα σε αλκαλικά υδατικά διαλύματα σε σύγκριση με τα όξινα διαλύματα.

Η τιμή pKa κυμαίνεται από 4,8 έως 8,6 (Veterinary Manual 2022). Αν και μια ομάδα διαμινοπυριμιδινών (αδιτοπρίμη, μεθοπρίμη, πυριμεθαμίνη, τριμεθοπρίμη, ορμετοπρίμη) χρησιμοποιείται συχνά ως αυτόνομη θεραπεία, δεν είναι αποτελεσματική έναντι των βακτηρίων και αναπτύσσεται γρήγορα αντίσταση. Όταν συνενώνονται μεμονωμένα SA τα οποία έχουν αποδεδειγμένα αντιμικροβιακή δράση, λαμβάνει χώρα μια διαδοχική αναστολή των συστημάτων μικροβιακών ενζύμων, με αποτέλεσμα τη θανάτωση βακτηρίων. Η τριμεθοπρίμη/σουλφαμεθοξαζόλη (SMX), η τριμεθοπρίμη/σουλφαδιαζίνη (SDZ), η τριμεθοπρίμη/σουλφαδοξίνη και η ορμετοπρίμη/σουλφαδιμεθοξίνη είναι παραδείγματα ενισχυμένων σκευασμάτων SA (Remko, von der Lieth 2004).

### 2.2.2. Τετρακυκλίνες

Οι τετρακυκλίνες (TC) υπάρχουν σε τρεις φυσικές μορφές. Η χλωροτετρακυκλίνη (CTC), η οξυτετρακυκλίνη (OTC) και η δεσμεθυλτετρακυκλίνη, μαζί με άλλα ημι-συνθετικά παράγωγα όπως η ρολιτετρακυκλίνη, η μεταλλοκυκλίνη, η μινοκυκλίνη, η δοξυκυκλίνη (DC) και η λεμοκυκλίνη, είναι παραδείγματα αντιβιοτικών τετρακυκλίνης. Η διάρκεια της απομάκρυνσης από τον οργανισμό μπορεί να κατηγοριοποιηθεί σε βραχείας δράσης (TC, OTC, CTC), μέσης δράσης (δεσμεθυλοχλωροτετρακυκλίνη και μετκυκλίνη) και μακράς δράσης (DC και μινοκυκλίνη).

Οι τετρακυκλίνες (TCs) είναι εν μέρει συνθετικές ουσίες που έχουν μεγαλύτερη πλευρική αλυσίδα σε σύγκριση με τη μινοκυκλίνη. Είναι σε θέση να διατηρούν τη σταθερότητά τους όταν έχουν τη μορφή ξηρής σκόνης, αλλά δεν είναι σταθερά όταν βρίσκονται σε υδατικό διάλυμα, ειδικά σε υψηλότερα επίπεδα pH (7-8,5) (Veterinary Manual 2022). Αυτές οι χημικές ουσίες είναι διαλυτές στο νερό και έχουν ισχυρή πολικότητα (Pérez-Rodríguez et al 2018). Επιπρόσθετα, παρουσιάζουν χαμηλή βασικότητα, με τιμές pKa που κυμαίνονται από 3,2 έως 9,8, και διαθέτουν ποικίλο φάσμα χρωμοφόρων ομάδων. Οι τετρακυκλίνες έχουν μια ισχυρή ικανότητα σχηματισμού χηλικών ενώσεων λόγω της παρουσίας δύο ξεχωριστών ομάδων κετόνης στις θέσεις C1 και C11 (Manimekalai, et al 2019).

### 2.2.3. Πενικιλίνες

Οι πενικιλίνες, ιδιαίτερα ο δακτύλιος β-λακτάμης, παρουσιάζουν έναν βαθμό αστάθειας και ευαισθησίας σε πολλούς παράγοντες όπως το φως, η θερμότητα, οι οξειδωτικοί και αναγωγικοί παράγοντες, τα βαρέα μέταλλα και τα υψηλά επίπεδα pH. Κατά τη διαδικασία προετοιμασίας του δείγματος, είναι σύνηθες να επιδεικνύουν σημαντική έλλειψη σταθερότητας στην αναλυόμενη ουσία, όπως υποδεικνύεται από προηγούμενη έρευνα (Lopes et al 2012).

Οι πενικιλίνες παρουσιάζουν ευαισθησία τόσο στα οξέα όσο και στις βάσεις, με τον βαθμό ευαισθησίας να εξαρτάται από τη συγκεκριμένη πλευρική αλυσίδα που υπάρχει. Επιπλέον, το άζωτο στην ένωση β-λακτάμη προκαλεί αντίδραση με χημικές ενώσεις, όπως πυρηνόφιλα σαν τη μεθανόλη. Αυτή η αντίδραση ενισχύεται με θέρμανση και όξινη κατάλυση (Rossi, et al 2018). Η πιο αποτελεσματική χρήση της β-λακτάμης είναι σε συνδυασμό με αναστολείς β-λακταμάσης για την ενίσχυση της αποτελεσματικότητάς της. Η κεφοπεραζόνη με σουλβακτάμη ή αμοξικιλίνη με κλαβουλανικό οξύ είναι εξαιρετικοί συνδυασμοί που ενισχύουν την αποτελεσματικότητα αυτών των χημικών ομάδων. Μερικά παραδείγματα κοινώς χρησιμοποιούμενων β-λακταμικών αντιβιοτικών περιλαμβάνουν αμπικιλίνη, κεφαπρίνη, κλοξακιλλίνη, πενικιλίνη G και αμοξικιλίνη (Bessaire, et al 2018).

#### 2.2.4. Κεφαλοσπορίνες

Φυσικά και χημικά, οι κεφαλοσπορίνες είναι συγκρίσιμες με τις πενικιλίνες. Ωστόσο, είναι πιο ανθεκτικές στις διακυμάνσεις της θερμοκρασίας και του pH. Αποτελούνται από μια ομάδα ήπιων οξέων που προέρχονται από το 7-αμινοκεφαλοσπορανικό οξύ.

Ενώσεις με συγγενείς φυσικοχημικές ιδιότητες σε αυτή την κατηγορία είναι οι κεφαλοσπορίνες πρώτης γενιάς, οι οποίες περιλαμβάνουν κεφαλοθίνη (η οποία δεν είναι πλέον διαθέσιμη για αγορά στις Ηνωμένες Πολιτείες), κεφαλοριδίνη, κεφαλιδίνη, κεφαζολίνη, κεφαλεξίνη, κεφαλοπιρίνη και κεφαλοξίλη. Η κεφοπεραζόνη, η κεφοταξίμη, η κεφτιοφούρ, η κεφτριαξόνη και πολλές άλλες ταξινομούνται ως κεφαλοσπορίνες δεύτερης γενιάς. Αυτή η κατηγορία περιλαμβάνει επίσης την κεφοβεκίνη και την κεφποδοξίμη. Η κεφεπίμη είναι ένα αντιβιοτικό κεφαλοσπορίνης τέταρτης γενιάς (Veterinary Manual 2022).

#### 2.2.5. Μακρολίδια

Τα μακρολίδια είναι μια κατηγορία αντιβιοτικών που βρίσκουν ευρεία εφαρμογή στην κτηνιατρική για τη θεραπεία αναπνευστικών παθήσεων και ως πρόσθετο διατροφής που προάγει την ανάπτυξη.

Ένα μακρολίδιο είναι μια περίπλοκη συνένωση αντιβιοτικών που χαρακτηρίζεται από παραλλαγές στις χημικές υποκαταστάσεις των ουδέτερων αμινο σακχάρων και των πολυάριθμων ατόμων άνθρακα που αποτελούν τη δομή του. Η ερυθρομυκίνη, για παράδειγμα, αποτελείται κυρίως από τον τύπο A, αν και μπορεί να υπάρχουν και στελέχη B, C, D και E (Mazzei, et al 1993).

Η παρουσία μιας διμεθυλαμινο ομάδας καθιστά τα μακρολίδια βασικά. Αν και είναι αδιάλυτο στο νερό, διαλύεται εύκολα σε οργανικούς διαλύτες με μεγαλύτερη πολικότητα. Τα μακρολίδια συχνά καθίστανται ανενεργά υπό όξινες (pH για την ερυθρομυκίνη) και αλκαλικές (pH 10) συνθήκες. Επιπλέον, η εκτεταμένη σειρά λειτουργικών τους ομάδων τους επιτρέπει να διεξάγουν μια τεράστια γκάμα χημικών αντιδράσεων (Veterinary Manual 2022).

### 2.2.6. ΚΙΝΟΛΟΝΕΣ, συμπεριλαμβανομένων των φθοριοκινολόνων

Παρά την ποικιλία των δομών των δακτυλίων τους, οι κινολόνες διαθέτουν έναν αριθμό λειτουργικών ομάδων που είναι συγκρίσιμες και κρίσιμες για την αντιμικροβιακή τους δράση. Οι ενώσεις με μια καρβοξυλική ομάδα στη θέση τρία είναι όξινες. Παρόλα αυτά, οι 7-πιπεραζινυλ κινολόνες περιέχουν βασικές αμινομάδες. Οι 7-πιπεραζινυλοκινολόνες παρουσιάζουν κατιονική, αμφιτεριονική ή ανιονική συμπεριφορά σε διάλυμα, ενώ οι κινολόνες με το αντίθετο φορτίο παραμένουν ουδέτερες ή ανιονικές. Λόγω των διαφορετικών μορφών υποκαταστατών, οι φυσικές ιδιότητες των κινολονών είναι ουσιαστικά αντίθετες (Stolker, Brinkman 2005). Ορισμένες κινολόνες υφίστανται ατελές μεταβολισμό (π.χ. ενροφλοξασίνη), ενώ άλλες (π.χ. σιπροφλοξασίνη) αποβάλλονται αμετάβλητες (Parshikov, Sutherland 2012). Λίγες κινολόνες αποικοδομούνται πλήρως. Η σιπροφλοξασίνη προέρχεται από την ενροφλοξασίνη μέσω αποαιθυλίωσης.

Στα τέλη της δεκαετίας του 1980, η ενροφλοξασίνη, ένα αντιμικροβιακό φάρμακο, αναπτύχθηκε με γνώμονα την κτηνιατρική. Η ενροφλοξασίνη ταξινομείται ως αντιβακτηριδιακός παράγοντας φθοριοκινολόνης τρίτης γενιάς. Αυτό το αντιβιοτικό χρησιμοποιείται για την πρόληψη ή τη θεραπεία μολυσματικών ασθενειών και είναι αποτελεσματικό ενάντια σε ένα ευρύ φάσμα λοιμώξεων στα ζώα (Razzagh, Reza 2015). Χορηγείται από το στόμα σε πουλερικά, χοίρους, βοοειδή και κοτόπουλα (μέσω τροφής, υποκατάστατου γάλακτος ή/και πόσιμου νερού) ή παρεντερικά με ένεση σε χοίρους και βοοειδή (Moghadam, et al 2018). Μετά την από του στόματος κατάποση, η ενροφλοξασίνη απορροφάται αποτελεσματικά, κατανέμεται στους ιστούς και αποβάλλεται σε σημαντικές ποσότητες μέσω των ούρων και της απέκκρισης. Η σιπροφλοξασίνη είναι ένας κύριος μεταβολίτης της ενροφλοξασίνης που υφίσταται ηπατικό μεταβολισμό (Petrovic, et al 2006).

### 2.2.7. Αμινογλυκοσίδες

Τα αντιβιοτικά αμινογλυκοσίδης διακρίνονται από μια ομάδα αμινοκυκλιτόλης και έναν γλυκοσιδικό δεσμό που συνδέει το αμινοζάχαρο με τον δακτύλιο αμινοκυκλιτόλης.

Η νεομυκίνη είναι ένας συνδυασμός νεομυκίνης Β και C επιπλέον της φραμυκίνης (Veterinary Manual 2022), ενώ η γενταμυκίνη είναι ένα μείγμα γενταμυκίνης C1 και C2.

Η παρουσία υδροξυλομάδων ενισχύει τη διαλυτότητά του στο νερό, ενώ η παρουσία ομάδων αμίνης μειώνει τη διαλυτότητά του στο λίπος. Τα pKa αυτών των ενώσεων τυπικά κυμαίνονται από 8 έως 10 (Pagkalis, et al 2011).

### 2.2.8. Φαινικόλες

Η χλωραμφενικόλη είναι ένα ουδέτερο παράγωγο νιτροβενζολίου. Είναι εξαιρετικά διαλυτό στα λιπίδια και μπορεί να λειτουργήσει τόσο ως ελεύθερη βάση όσο και ως εστέρας (Veterinary Manual 2022).

Στη θειαμφενικόλη και τη φλορφαινικόλη, η ομάδα νιτροφαινόλης υποκαθίσταται με μεθυλσουλφονυλικές ομάδες. Η φλορφαινικόλη περιλαμβάνει επιπλέον μόρια φθορίου. Στην περίπτωση της φλορφαινικόλης, αυτές οι δομικές τροποποιήσεις μπορούν να ενισχύσουν την αποτελεσματικότητα ελαχιστοποιώντας την τοξικότητα. Επιπλέον, τα μόρια φθορίου μπορούν να μειώσουν την αντίσταση των βακτηρίων.

### 2.2.9. Λινκοσαμίδες

Μια κατηγορία φαρμακευτικών προϊόντων γνωστή ως λινκοσαμίδες (LCs) είναι εντυπωσιακά παρόμοια με τα μακρολιδικά φάρμακα. Ένα διακριτικό χημικό χαρακτηριστικό που τα ξεχωρίζει από τα μακρολίδια είναι η παρουσία ενός ασυνήθιστου σακχάρου οκτώ ανθράκων. Παρουσιάζουν μεγαλύτερη διαλυτότητα σε οκτώσες που περιέχουν θείο και μορφές άλατος αμινοξέων λόγω της μονοβασικής

φύσης τους (υδροχλωρικά και φωσφορικά άλατα). Έχουν την ικανότητα να συνδυάζουν καλά ισορροπημένες ενώσεις με υδροχλωρικό οξύ (HCl) (Manimekalai, et al 2019). Η κλινδαμυκίνη και η λινκομυκίνη είναι τα κύρια συστατικά του των συνόλου LS (Jank, et al 2015).

#### **2.2.10. Πολυμυξίνες**

Σε αυτή την κατηγορία πολυπεπτιδικών αντιβιοτικών περιλαμβάνονται η κολιστίνη, η πολυμυξίνη Β και η πολυμυξίνη Ε. Παρατηρείται συνεργιστική δράση όταν η πολυμυξίνη συνδυάζεται με άλλους αντιβακτηριακούς παράγοντες. Οι ενδοτοξίνες στα σωματικά υγρά καθίστανται επίσης λιγότερο ενεργές από αυτές, γεγονός που μπορεί να έχει θετικές επιπτώσεις για την ενδοτοξιναιμία (Veterinary Manual 2022).

#### **2.2.11. Βακιτρακίνη**

Η βακιτρακίνη είναι ένα αντιβιοτικό που αποτελείται από διακλαδισμένα, κυκλικά δεκαπεπτίδια. Το κύριο και πιο ισχυρό συστατικό της εμπορικής βακιτρακίνης είναι η βακιτρακίνη Α. Παρά το ευρύ φάσμα επιδράσεών της, η βακιτρακίνη χρησιμοποιείται κυρίως για τη θεραπεία θετικών κατά Gram βακτηρίων. Προκειμένου να ενισχυθεί το αντιβακτηριακό φάσμα, η βακιτρακίνη συχνά συνδυάζεται με νεομυκίνη και πολυμυξίνη, δεδομένης της περιορισμένης παρουσίας αντοχής (Tsuji, Robertson 1975).

#### **2.2.12. Νοβοβιοκίνη**

Η νοβοβιοσίνη ταξινομείται ως αντιβιοτικό στενού φάσματος και έχει βακτηριοκτόνες ή αντιβακτηριακές ιδιότητες σε υψηλότερες συγκεντρώσεις. Εκτός από τα θετικά κατά Gram βακτήρια, αναστέλλει έναν περιορισμένο αριθμό αρνητικών κατά Gram βακτηρίων. Λειτουργεί σε συνδυασμό με την τετρακυκλίνη (Veterinary Manual 2022).

#### **2.2.13. Τιαμουλίνη**

Η τιαμουλίνη είναι ένα ημισυνθετικό παράγωγο της πλευρομουτιλίνης. Η ένωση αποτελείται από έναν πυρήνα τρικυκλικής μοτιλίνης που διαθέτει μια πλευρική αλυσίδα γλυκολικού οξέος C-14, με αντιβακτηριακή δράση εξαρτώμενη από την

ομάδα κετο C-21. Η έρευνα έχει δείξει ότι η πλευρική αλυσίδα της τιαμουλίνης που περιέχει θειοοξικό άλας παρουσιάζει ιδιαίτερα ισχυρές αντιβακτηριακές ιδιότητες. Μια πιο ολοκληρωμένη ανάλυση της δέσμευσης των πλευρομουτιλινών μπορεί να επιτευχθεί μέσω της έρευνας ενώσεων που περιέχουν διάφορους υποκαταστάτες C-14.

Ενώ η καρβονυλική ομάδα C-21 φαίνεται να βρίσκεται σε θέση πολικής αλληλεπίδρασης και ο τρικυκλικός πυρήνας έχει υδρόφοβη αλληλεπίδραση στη θέση δέσμευσης, η υπόλοιπη πλευρική αλυσίδα C-14 στην εξεταζόμενη ένωση σχηματίζει μόνο μια ελάχιστη επαφή. Δεν παρατηρείται ότι εμπλέκεται σε κάποια σημαντική αλληλεπίδραση (Brown, Dawson 2015).

#### **2.2.14. Ιονοφόρα**

Τα ιονοφόρα είναι μόρια που μεταφέρουν ιόντα στις μεμβράνες των λιπιδικών κυττάρων και είναι διαλυτά στο λίπος. Συμβάλλουν σημαντικά στην ενίσχυση της αποδοτικότητας των ζωοτροφών και της υγείας των ζώων στην πτηνοτροφική και κτηνοτροφική παραγωγή. Ένα συχνά χρησιμοποιούμενο ιονοφόρο είναι η μονενσίνη. Αυτή η ένωση, η οποία προέρχεται από το *Streptomyces*, έχει την ικανότητα να σχηματίζει σύμπλοκα με μονοσθενή κατιόντα (όπως κάλιο και νάτριο). Με την παρεμπόδιση της μεταφοράς πρωτεΐνης μέσα στα κύτταρα, η μονενσίνη ασκεί αντιμικροβιακές και ανθελονοσιακές ιδιότητες. Προκειμένου να αποφευχθεί η κοκκιδίωση και να αυξηθεί η παραγωγή ζωοτροφών στις βιομηχανίες βοοειδών και γαλακτοκομικών προϊόντων, η μονενσίνη συχνά ενσωματώνεται στις ζωοτροφές (Veterinary Manual 2022).

#### **2.2.15. Ριφαμυκίνες**

Οι ριφαμυκίνες είναι μέλη της οικογένειας των αντιβιοτικών της ανσαμυκίνης, που ονομάζονται έτσι για τις αλειφατικές αλυσίδες που εκτείνονται στα δύο άκρα του πυρήνα της ναφθοκινόνης και συνθέτουν τη δομή που μοιάζει με καλάθι. Οι ριφαμυκίνες που έχουν εγκριθεί για χρήση στις Ηνωμένες Πολιτείες αποτελούνται από τέσσερις δομές: ριφαμικίνη, ριφαμπουτίνη, ριφαπεντίνη και ριφαξιμίνη (Maslow, Portal-Celhay 2015).

### 3. Μέθοδοι Ανίχνευσης Αντιβιοτικών σε Τρόφιμα Ζωικής Προέλευσης

Η προφύλαξη, η θεραπεία και ο έλεγχος των μολυσματικών ασθενειών των παραγωγικών ζώων διευκολύνονται από την ευρεία χρήση και τη συχνή κατάχρηση αντιβιοτικών, η οποία συμβάλλει στα οικονομικά οφέλη και στην υγεία των ζώων. Ωστόσο, η χρήση τους έχει προκαλέσει σημαντικές ανησυχίες για τη δημόσια υγεία σχετικά με την ασφάλεια των τροφίμων (Mokh et al., 2020). Οι πιθανές επιπτώσεις στην υγεία στους πληθυσμούς δεν είναι οι μόνες δυσμενείς επιπτώσεις της παρουσίας υπολειμμάτων αντιβιοτικών σε βρώσιμους ιστούς ζώων που παράγουν τρόφιμα. Έχουν επίσης αντίκτυπο στους κατασκευαστές φαρμάκων, ιδιαίτερα όταν οι καταναλωτές εκτίθενται συνεχώς σε χαμηλές συγκεντρώσεις αντιβιοτικών και μακροχρόνια υπολείμματα αντιβιοτικών. Η επιβολή αυστηρών κανονισμών για τη ρύθμιση των τελικών προϊόντων των χημικών διεργασιών καθορίζονται από αυτούς τους κινδύνους. Συγκεκριμένα, καθορίζεται το μέγιστο χαμηλότερο επίπεδο υπολειμμάτων ανεκτών υπολειμμάτων αντιβιοτικών σε τρόφιμα ζωικής προέλευσης (Ben et al., 2022).

Οι συζευγμένες με φασματομετρία μάζας χρωματογραφικές τεχνικές όπως οι HPLC-MS, HPLC-MS/MS, GC-MS, LC-MS, LC-MS/MS και άλλες τεχνικές για την παρακολούθηση και τον ποσοτικό προσδιορισμό των υπολειμμάτων αντιβιοτικών σε τρόφιμα ζωικής προέλευσης παραμένουν ισχυρές και ελπιδοφόρες λόγω της ευαισθησίας τους, της ευκολίας στη δειγματοληψία, του χαμηλού ορίου ανίχνευσης και του χαμηλού κόστους (Treiber and Beranek-Knauer, 2021).



### 3.1. Κανονισμοί και η σημασία της ανίχνευσης αντιβιοτικών στα τρόφιμα

Τα κριτήρια για ουσίες, ειδικότερα φαρμακολογικά δραστικές ουσίες, που μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως ουσίες εκκίνησης ή στόχοι στην επιτήρηση των υπολειμμάτων κτηνιατρικών φαρμάκων και των υπολειμμάτων τους σε ζώα και ζωικά προϊόντα, καθορίστηκαν με γνωμοδότηση (Parmar et al., 2021). Εάν μια ουσία είναι το πραγματικό ενεργό φαρμακευτικό συστατικό, ένα παράγωγό του με παρόμοια θεραπευτικά αποτελέσματα ή ένας μεταβολίτης του που μπορεί να εντοπιστεί στα τρόφιμα, ορίζεται ως φαρμακολογικά ενεργή (Lees et al., 2021). Στην πραγματικότητα, μια φαρμακολογικά δραστική ουσία δεν είναι μόνο μια ανεπιθύμητη ουσία, αλλά και μια ουσία που χρησιμοποιείται για τη βελτίωση ή την αύξηση της παραγωγικότητας ή της απόδοσης των παραγωγικών ζώων (Ibrahim et al., 2020). Ο κύριος λόγος για το πρωταρχικό ενδιαφέρον για αυτές τις ουσίες είναι ότι η συνεχής χρήση τους σε τρόφιμα ζωικής προέλευσης σε χαμηλές δόσεις μπορεί να προάγει την εμφάνιση βακτηριακών στελεχών που είναι ανθεκτικά σε αυτές τις ουσίες ή/και σε άλλες κατηγορίες αντιβιοτικών που χρησιμοποιούνται για τη θεραπεία ασθενειών τόσο σε ζώα όσο και σε ανθρώπους (Batiha et al., 2021).

Η χρήση αντιβιοτικών στην κατάλληλη δοσολογία και διάρκεια μειώνει σημαντικά τις μολυσματικές ασθένειες στις ανεπτυγμένες χώρες, βελτιώνοντας έτσι την καλή διαβίωση και την παραγωγικότητα των ζώων (Arsène et al. 2021). Τα αντιβιοτικά χρησιμοποιούνται συνήθως για θεραπευτικούς και προληπτικούς σκοπούς. Εντούτοις, η κακή χρήση και η κατάχρηση αντιβιοτικών σε υποθεραπευτικές συγκεντρώσεις ως αυξητικοί παράγοντες και προληπτικά ασθενειών έχουν οδηγήσει σε κινδύνους για την υγεία της ανθρωπότητας (Luise et al. 2022). Ο κίνδυνος ανάπτυξης βακτηριακής αντοχής υπάρχει με κάθε χρήση αντιβιοτικού. Το αποτέλεσμα είναι ένας ανταγωνισμός μεταξύ οικονομικών παραγόντων και παραγόντων που σχετίζονται με την υγεία. Τα αντιβιοτικά χρησιμοποιούνται εδώ και δεκαετίες για τη θεραπεία και την προώθηση της ανάπτυξης των ζώων εκτροφής, εκτός από τις θεραπευτικές τους εφαρμογές (Low et al. 2021). Οι ειδικοί ανησυχούν για την πιθανή μεταφορά βακτηριακών αντιστάσεων στον άνθρωπο, παρά τις τυπικά θετικές συνέπειες

από τη χρήση αντιβιοτικών στην κτηνοτροφία. Το θέμα δεν περιορίζεται στην ανθρώπινη κατανάλωση των τελικών προϊόντων που έχουν μολυνθεί από αυτές τις ουσίες. επεκτείνεται επίσης στην παγκόσμια ανταλλαγή τροφίμων και ζωοτροφών. Προκειμένου να εξαλειφθεί η κακή χρήση και η κατάχρηση αντιβιοτικών στα τροφικά ζώα, είναι επιτακτική ανάγκη να συνεργαστούν οι κυβερνήσεις, οι αγρότες, οι κατασκευαστές κτηνιατρικών φαρμάκων και οι επιστήμονες. Προκειμένου να αποτραπεί η είσοδος υπολειμμάτων στα τρόφιμα ζωικής προέλευσης, είναι απαραίτητο να ρυθμιστεί η συνεχής χρήση αντιμικροβιακών ουσιών στα κύρια ζωικά είδη διατροφής (Rahman et al., 2022).

### 3.2. Φυσικοχημικά Χαρακτηριστικά Αντιβιοτικών

Η χημική δομή και τα χαρακτηριστικά των αντιβιοτικών αποτελούν το θεμέλιο των αντιμικροβιακών τους ιδιοτήτων (Rusu and Buta, 2021). Τα αντιβιοτικά παρουσιάζουν μη ειδικές δράσεις, όπως αύξηση του βάρους στα ζώα. Ορισμένες χημικές ομάδες των μορίων των αντιβιοτικών είναι υπεύθυνες για τις ειδικές φαρμακολογικές επιδράσεις των αντιβιοτικών (Yang et al.2021). Τα αντιβιοτικά ταξινομούνται σε πολλαπλές κατηγορίες με βάση τον τύπο του μορίου που παράγει την αντιμικροβιακή δράση (O'Rourke et al.2020). Τα βακτηριοκτόνα αντιβιοτικά είναι παράγοντες που διαταράσσουν την παραγωγή ή τη δράση των ενζύμων και των πρωτεϊνικών μονάδων που αποτελούν τη δομή των βακτηριακών κυττάρων (Harrower et al.2021). Η χημική δομή των βακτηριοκτόνων αντιβιοτικών αποτελείται από ομάδες όπως το 5-ισοθειοκυανατοφαινύλιο, το νιτροφουράνιο, η νιτροθειαζόλη και ο δακτύλιος πυριδίνης του πυραζινοκαρβοξυλικού οξέος (Jafari et al. 2020).

Οι χημικές ιδιότητες των αντιβιοτικών είναι ζωτικής σημασίας για την ανίχνευση των υποπροϊόντων τους ή των μεταβολιτών τους στα τρόφιμα ζωικής προέλευσης. Τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά όλων των αντιβιοτικών χρησιμοποιούνται για την κατηγοριοποίησή τους σε πολλαπλές κατηγορίες (Majdinasab et al., 2020). Οι παράγοντες χωρίς τέφρα είναι εκείνοι που αντέχουν σε θερμοκρασίες μεταξύ 800 και 850°C και έχουν μοριακό βάρος μικρότερο από 317. Το σημείο τήξης του αντιβιοτικού ποικίλλει ανάλογα με τον τύπο του αντιβιοτικού που χρησιμοποιείται στις πρόσθετες ύλες ζωοτροφών, με εύρος 102- 300 °C (Yang et al., 2021). Τα αντιβιοτικά διαλύονται εύκολα σε αλκοόλ, λάδι και νερό και αραιώνονται σε ακετόνη. Ωστόσο, δεν είναι διαλυτά σε υδατικά διαλύματα υδροξειδίου του καλίου,

διαλύματα υδροξειδίου του νατρίου, αραιωμένα ανόργανα οξέα ή οξικό οξύ (Joshi and Kim, 2020). Η δοκιμή υπολειμμάτων μεμονωμένων αντιβιοτικών σε τρόφιμα ζωικής προέλευσης αναλύει αυτά τα χημικά και φυσικά χαρακτηριστικά, τα οποία καθορίζονται από τις ιδιότητες του αντιβιοτικού. Αν και δεν είναι οριστικά, συμβάλλουν στην ανάπτυξη προβλέψεων (Wang et al., 2021).

### 3.3. Συμβατικές Μέθοδοι Ανίχνευσης Αντιβιοτικών στα Τρόφιμα

Διάφορα βιολογικά υλικά ή προϊόντα διατροφής ζωικής προέλευσης, όπως γάλα, μυϊκός ιστός, συκώτι, αυγά και μέλι, μπορούν να εξεταστούν με ποικίλες μεθόδους, προκειμένου να εντοπιστούν υπολείμματα των ίδιων των αντιβιοτικών ή των μεταβολιτών τους. Οι παραδοσιακές και οι σύγχρονες μέθοδοι είναι οι δύο κύριες κατηγορίες στις οποίες έχουν αναπτυχθεί πολυάριθμες αναλυτικές μέθοδοι και συστήματα (Arsène et al. 2022).

Η χρωματογραφία, η τριχοειδική ηλεκτροφόρηση και άλλες χημικές μέθοδοι χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση αντιβιοτικών στα τρόφιμα. Μέσω της εφαρμογής αυτών των μεθοδολογιών μπορούν να επιτευχθούν ακριβή και αξιόπιστα αποτελέσματα αξιολόγησης (Virto et al., 2022). Ωστόσο, αυτές οι μέθοδοι απαιτούν την παρουσία ειδικών υψηλής εξειδίκευσης, ειδικών συσκευών και σημαντικό χρονικό διάστημα, το οποίο μπορεί να συνεπάγεται με κόστος. Επιπλέον, οι παραδοσιακές χημικές μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση φαρμακευτικών προϊόντων σε δείγματα τροφίμων ζωικής προέλευσης περιπλέκονται από την ταχεία υποβάθμιση ορισμένων τέτοιων προϊόντων στο περιβάλλον. Αντίθετα, οι βιολογικές μέθοδοι περιλαμβάνουν την ταυτοποίηση αντιμικροβιακών ουσιών ως αποτέλεσμα της ικανότητας των μικροοργανισμών να δημιουργούν περιοχές ανάπτυξης σε στερεά ή υγρά θρεπτικά μέσα παρουσία συγκεκριμένων συγκεντρώσεων των υπό διερεύνηση ουσιών (Oliveira et al., 2020). Στη συνέχεια, τα αντισώματα που δημιουργούνται είτε ανιχνεύονται χρησιμοποιώντας ανοσοχημικές μεθόδους είτε ταυτοποιούνται χρησιμοποιώντας μοριακές και βιολογικές μεθόδους. (Treiber και Beranek-Knauer, 2021) (Ghimpețeanu et al. 2022).

### 3.4. Χρωματογραφία

Η χρωματογραφία λειτουργεί με βάση την αρχή ότι τα μόρια σε ένα διάλυμα που είτε εναποτίθεται σε μια επιφάνεια είτε απορροφώνται από μια στερεή ή ρευστή στατική φάση, μπορούν να διαχωριστούν κατά την κίνησή τους. Οι μοριακές ιδιότητες που σχετίζονται με την προσρόφηση (υγρό-στερεό), τον καταμερισμό (υγρό-στερεό), τη συγγένεια ή τις διαφορές μοριακού βάρους έχουν επιρροή σε αυτή τη διαδικασία διαχωρισμού (Cuatrecasas et al 1968, Porath 1997). Ως αποτέλεσμα αυτών των διακρίσεων, ορισμένα συστατικά ενός μείγματος παραμένουν στη στατική φάση για παρατεταμένη χρονική περίοδο και κινούνται αργά μέσω του συστήματος χρωματογραφίας, ενώ άλλα εισέρχονται στην κινητή φάση γρήγορα και κινούνται γρήγορα (Harris 2004).

Η τεχνική της χρωματογραφίας βασίζεται σε τρία θεμελιώδη συστατικά :

- Στη στατική φάση.
- Στην κινητή φάση.
- Στις διακεκριμένες ενώσεις

Μια υγρή φάση ή μια στερεή φάση που εναποτίθεται στην επιφάνεια μιας στερεάς φάσης αποτελεί τη στατική φάση στη χρωματογραφία. Η κινητή φάση είναι μια αέρια ή υγρή φάση που ρέει πάνω από τη στατική φάση. Η διαδικασία είναι γνωστή ως υγρή χρωματογραφία (LC) εάν η κινητή φάση είναι υγρή και αέρια χρωματογραφία (GC) εάν είναι αέρια. Η αέρια χρωματογραφία χρησιμοποιείται για την ανάλυση στερεών ουσιών, μιγμάτων πτητικών υγρών και αερίων. Ιδιαίτερα κατάλληλη για θερμικά ασταθή και μη πτητικά δείγματα είναι η υγρή χρωματογραφία (Donald et al 2006).

Ο αποτελεσματικός μοριακός διαχωρισμός βασίζεται στη φύση της αλληλεπίδρασης που λαμβάνει χώρα μεταξύ της στατικής φάσης, της κινητής φάσης και των ουσιών που περιέχονται στο μείγμα. Οι μέθοδοι χρωματογραφίας που βασίζονται στην κατανομή είναι εξαιρετικά αποτελεσματικές στον διαχωρισμό και την αναγνώριση μικρών μορίων, συμπεριλαμβανομένων των υδατανθράκων, των λιπαρών οξέων και των αμινοξέων. Αντίθετα, οι χρωματογραφίες συγγένειας, ειδικά η

χρωματογραφία ανταλλαγής ιόντων, παρουσιάζουν μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα όταν πρόκειται για τον διαχωρισμό μακρομορίων όπως οι πρωτεΐνες και τα νουκλεϊκά οξέα. Η χρωματογραφία χάρτου βρίσκει εφαρμογή στον διαχωρισμό πρωτεϊνών και στην έρευνα που σχετίζεται με τη σύνθεση πρωτεϊνών. Η χρωματογραφία αερίου-υγρού χρησιμοποιείται για τον διαχωρισμό αλκοόλης, εστέρων, λιπιδίων και αμινομάδων, καθώς και για την παρατήρηση ενζυματικών αλληλεπιδράσεων. Από την άλλη πλευρά, η χρωματογραφία μοριακού διαχωρισμού χρησιμοποιείται ειδικά για τον προσδιορισμό των μοριακών βαρών των πρωτεϊνών. Ο καθαρισμός του RNA, του DNA και των ιικών σωματιδίων επιτυγχάνεται μέσω χρωματογραφίας γέλης αгарόζης (Gerberding, Byers 1998).

Εκτός από τη λειτουργία διαχωρισμού της, η εφαρμογή της χρωματογραφίας ως μεθόδου ποσοτικής ανάλυσης εξυπηρετεί τον στόχο της επίτευξης ενός ικανοποιητικού διαχωρισμού μέσα σε ένα κατάλληλο χρονικό διάστημα. Για το σκοπό αυτό, έχουν αναπτυχθεί πολυάριθμες τεχνικές χρωματογραφίας. Η χρωματογραφία εμφάνισης, η χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC), η χρωματογραφία στήλης, η αέρια χρωματογραφία, η χρωματογραφία διείδυσης γέλης (Gel permeation chromatography), η υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης και η χρωματογραφία ανταλλαγής ιόντων είναι μερικά παραδείγματα (Laurence et al 1989).

### **3.4.1. Τύποι χρωματογραφίας**

#### **3.4.1.1. Χρωματογραφία στήλης**

Λόγω του γεγονότος ότι οι πρωτεΐνες κάνουν εμφανείς τις διαφορές τους ως προς το μέγεθος, το σχήμα, το καθαρό φορτίο και την ικανότητα σύνδεσης στη χρησιμοποιούμενη στατική φάση, μπορούν να χρησιμοποιηθούν χρωματογραφικές τεχνικές για τον καθαρισμό καθενός από αυτά μόρια. Μεταξύ των χρωματογραφικών τεχνικών, η χρωματογραφία στήλης είναι η πιο συχνά χρησιμοποιούμενη για την απομόνωση βιομορίων.

Το δείγμα που πρόκειται να διαχωριστεί εισάγεται πρώτα σε μια στήλη στατικής φάσης, ακολουθούμενη από την εφαρμογή ενός ρυθμιστικού διαλύματος πλύσης (κινητή φάση) (Εικόνα 1). Η ροή τους εξασφαλίζεται με την τοποθέτηση υλικού στο εσωτερικό της στήλης σε ένα στήριγμα από υαλοβάμβακα. Τα δείγματα

συσσωρεύονται με τρόπο που εξαρτάται από το χρόνο και τον όγκο στο κάτω μέρος της διάταξης (Das, Dasgupta 1998).

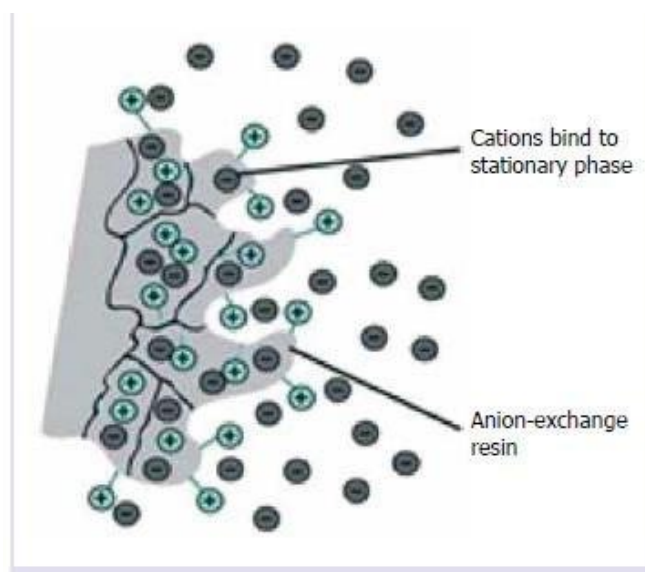


Εικόνα 2 Η χρωματογραφία στήλης (Coskun 2016)

#### 3.4.1.2. Ιοντοανταλλακτική χρωματογραφία

Η ιοντοανταλλακτική χρωματογραφία βασίζεται στις ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ φορτισμένων πρωτεϊνικών ομάδων και του στερεού υλικού υποστήριξης (μήτρα). Η μήτρα έχει ένα φορτίο ιόντων που είναι αντίθετο από αυτό της πρωτεΐνης που διαχωρίζεται, επιτρέποντας στην πρωτεΐνη να συνδεθεί στη στήλη μέσω ιοντικών αλληλεπιδράσεων. Οι πρωτεΐνες μπορούν να διαχωριστούν από τη στήλη αλλάζοντας το pH, τη συγκέντρωση των αλάτων ιόντων ή την ιοντική ισχύ του ρυθμιστικού διαλύματος (Karlsson et al 1998).

Οι μήτρες ανταλλαγής ανιόντων είναι γνωστές ως θετικά φορτισμένες μήτρες ανταλλαγής ιόντων και έχουν την ικανότητα να προσροφούν πρωτεΐνες που φέρουν αρνητικό φορτίο. Οι μήτρες που φέρουν αρνητικά φορτισμένες ομάδες αναφέρονται ως μήτρες ανταλλαγής κατιόντων. Αυτές οι μήτρες έχουν την ικανότητα να προσροφούν πρωτεΐνες που είναι θετικά φορτισμένες (Εικόνα 2) (Amercham Biosciences 2002).



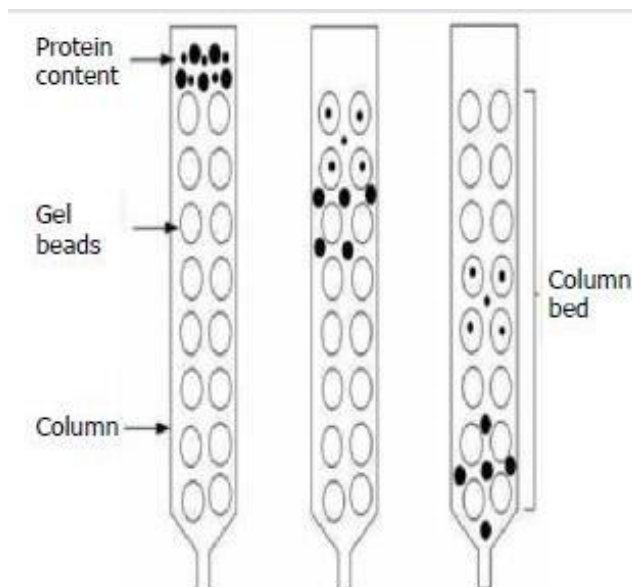
Εικόνα 3 Ιοντοανταλλακτική χρωματογραφία (Coskun 2016)

### 3.4.1.3. Χρωματογραφία διείσδυσης γέλης (μοριακό φίλτρο)

Αυτή η προσέγγιση χρησιμοποιεί υλικά που περιέχουν δεξτράνη για τον διαχωρισμό των μακρομορίων σύμφωνα με τις διακυμάνσεις τους στα μοριακά μεγέθη. Αυτή η προσέγγιση χρησιμοποιείται κυρίως για τον προσδιορισμό των μοριακών βαρών των πρωτεϊνών και τη μείωση της συγκέντρωσης άλατος στα διαλύματα πρωτεΐνης (Walls et al 2011). Η στατική φάση σε μια στήλη διείσδυσης γέλης αποτελείται από αδρανή μόρια που έχουν μικρούς πόρους. Το διάλυμα, που αποτελείται από μόρια διαφορετικών μεγεθών, τροφοδοτείται συνεχώς μέσω της στήλης με σταθερό ρυθμό ροής.

Τα μόρια που είναι μεγαλύτερα από το μέγεθος των πόρων δεν μπορούν να περάσουν μέσα από τα σωματίδια γέλης. Αντίθετα, παγιδεύονται και περιορίζονται σε περιορισμένο χώρο μεταξύ των σωματιδίων. Τα μακρομόρια διασχίζουν τα κενά μεταξύ των πορωδών σωματιδίων και παρουσιάζουν γρήγορη κίνηση μέσα στη στήλη. Τα μόρια που είναι μικρότερα από τους πόρους μπορούν να περάσουν μέσα από τους πόρους. Τα μικρότερα μόρια περνούν περισσότερο χρόνο στη στήλη πριν φύγουν (Εικόνα 3) (Helmut 1969). Το υλικό στήλης που χρησιμοποιείται πιο συχνά είναι ο τύπος Sephadex G. Εκτός από τη δεξτράνη, την αγοράζη και το πολυακρυλαμίδιο, χρησιμοποιούνται επίσης και άλλα υλικά στήλης όπως το πολυακρυλαμίδιο (Determann 2012).



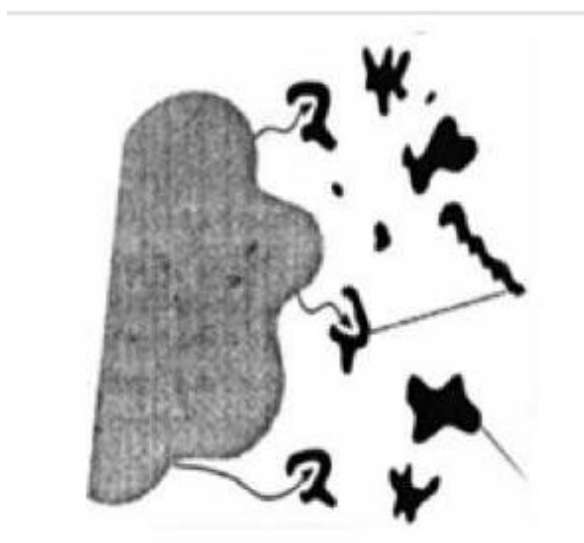


Εικόνα 4 Χρωματογραφία διείσδυσης γέλης (Coskun 2016)

#### 3.4.1.4. Χρωματογραφία συγγένειας

Αυτή η μέθοδος χρωματογραφίας χρησιμοποιείται για τον καθαρισμό ενζύμων, ορμονών, αντισωμάτων, νουκλεϊκών οξέων και συγκεκριμένων πρωτεϊνών (Wilchek, Chaiken 2000). Ένας συνδέτης ικανός να σχηματίσει ένα σύμπλοκο με μια ορισμένη πρωτεΐνη (όπως δεξτράνη, πολυακρυλαμίδιο, κυτταρίνη κ.λπ.) συνδέεται με το υλικό πλήρωσης της στήλης. Η συγκεκριμένη πρωτεΐνη που σχηματίζει σύμπλοκο με τον συνδέτη συνδέεται με το στερεό υπόστρωμα (μήτρα) και παραμένει στη στήλη, ενώ οι μη δεσμευμένες πρωτεΐνες εξέρχονται από τη στήλη. Στη συνέχεια, η πρωτεΐνη που είναι προσαρτημένη στη στήλη απελευθερώνεται τροποποιώντας την ιοντική της ισχύ μέσω της ρύθμισης του pH ή της εισαγωγής ενός διαλύματος άλατος (Εικόνα 4) (Firer 2001).





Εικόνα 5 Χρωματογραφία συγγένειας (Coskun 2016)

#### 3.4.1.5. Χρωματογραφία χάρτου

Το υλικό υποστήριξης που χρησιμοποιείται στη χρωματογραφία χαρτιού είναι ένα στρώμα κυτταρίνης που είναι πολύ κορεσμένο με νερό. Χρησιμοποιώντας αυτή τη μέθοδο, ένα παχύ διηθητικό χαρτί χρησιμοποιείται ως στήριγμα, με σταγόνες νερού να καθιζάνουν στους πόρους του για να δημιουργήσουν τη στατική «υγρή φάση». Η κινητή φάση αποτελείται από ένα κατάλληλο υγρό που τοποθετείται σε μια αναπτυσσόμενη δεξαμενή. Η χρωματογραφία χαρτιού είναι ένας τύπος χρωματογραφίας που περιλαμβάνει τον διαχωρισμό ουσιών με τη χρήση υγρού διαλύτη (Stoddard et al 2007).

#### 3.4.1.6. Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας

Η χρωματογραφία λεπτής στιβάδας είναι ένας τύπος χρωματογραφίας που περιλαμβάνει τη διαδικασία της «προσρόφησης στερεού-υγρού». Αυτή η μέθοδος περιλαμβάνει τη χρήση μιας στερεής προσροφητικής ουσίας που επικαλύπτεται σε γυάλινες πλάκες. Διάφορες στερεές ουσίες μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως προσροφητικό υλικό στη χρωματογραφία στήλης, όπως αλουμίνα, πυριτική γέλη και κυτταρίνη. Σε αυτή την τεχνική, η κινητή φάση κινείται προς τα πάνω μέσω της στατικής φάσης. Ο διαλύτης ανεβαίνει στη λεπτή πλάκα μέσω τριχοειδούς αλληλεπίδρασης. Κατά τη διάρκεια αυτής της διαδικασίας, το μείγμα που είχε προηγουμένως αποθεθεί στα κάτω τμήματα της πλάκας ωθείται προς τα πάνω και με τη χρήση μιας πιπέτας μπορούν να μεταβληθούν οι ρυθμοί. Ο ρυθμός με τον οποίο ο

διαλύτης κινείται προς τα πάνω επηρεάζεται από παράγοντες όπως η πολικότητα του υλικού, η στερεά φάση και ο διαλύτης (Sherman et al 1991).

Όταν τα μόρια του δείγματος στερούνται χρώματος, μπορεί να δημιουργηθεί ένα ορατό έγχρωμο αντιδραστικό προϊόν χρησιμοποιώντας φθορισμό, ραδιενέργεια ή μια συγκεκριμένη χημική ουσία. Αυτό επιτρέπει την αναγνώριση των θέσεων τους στο χρωματογράφημα. Ένα παρατηρήσιμο χρώμα μπορεί να φανεί υπό κανονικές συνθήκες φωτισμού ή UV. Ο υπολογισμός της αναλογίας μεταξύ των αποστάσεων που διανύει το μόριο και ο διαλύτης επιτρέπει τη μέτρηση της θέσης κάθε μορίου στο μείγμα. Αυτή η τιμή μέτρησης είναι γνωστή ως σχετική κινητικότητα και αντιπροσωπεύεται από το σύμβολο R<sub>f</sub>. Η τιμή R<sub>f</sub> χρησιμοποιείται για την ποιοτική περιγραφή των μορίων (Donald et al 2006).

#### **3.4.1.7. Αέρια χρωματογραφία**

Για αυτή την τεχνική, χρησιμοποιείται ως στατική φάση μια στήλη. Η στήλη τοποθετείται στη συσκευή και γεμίζεται με μια υγρή στατική φάση που προσροφάται στην επιφάνεια ενός αδρανούς στερεού. Η αέρια χρωματογραφία είναι ένας τύπος χρωματογραφίας που περιλαμβάνει τον διαχωρισμό ενώσεων με βάση την αλληλεπίδρασή τους με μια στατική φάση και μια κινητή φάση. Η κινητική φάση αποτελείται από αέρια όπως το ήλιο ή το άζωτο. Καθώς η κινητή φάση ρέει μέσω της στήλης, υπόκειται σε υψηλή πίεση. Το δείγμα υφίσταται εξάτμιση και εισέρχεται σε κινητή φάση σε αέρια μορφή. Τα συστατικά στο δείγμα κατανέμονται μεταξύ της κινητής φάσης και της στατικής φάσης στο στερεό στήριγμα. Η αέρια χρωματογραφία είναι μια ευέλικτη και ισχυρή τεχνική που επιτρέπει τον ακριβή διαχωρισμό ακόμη και των μικρότερων μορίων. Είναι μια απλή και αποτελεσματική μέθοδος που παρέχει εξαιρετικά ευαίσθητα αποτελέσματα σε σύντομο χρονικό διάστημα. Χρησιμοποιείται συνήθως για τον διαχωρισμό μικρών ποσοτήτων αναλυτών ([http://80.251.40.59/veterinary.ankara.edu.tr/fidanci/Ders\\_Notlari/Biyoteknoloji/Kromatografi.html](http://80.251.40.59/veterinary.ankara.edu.tr/fidanci/Ders_Notlari/Biyoteknoloji/Kromatografi.html)).

#### **3.4.1.8. Χρωματογραφία χρωστικού συνδέτη**

Αυτή η τεχνική αναπτύχθηκε αποδεικνύοντας την ικανότητα πολλών ενζύμων να δεσμεύουν νουκλεοτίδια πουρίνης με τη χρωστική Cibacron Blue F3GA (Amicon, 1989). Η δομή του επιπέδου δακτυλίου που περιέχει αρνητικά φορτισμένες ομάδες έχει

ομοιότητα με τη δομή του NAD. Αυτή η αναλογία έχει υποστηριχθεί από την επίδειξη της δέσμευσης της χρωστικής Cibacron Blue F3GA στις θέσεις δέσμευσης αδενίνης και ριβόζης του NAD. Η βαφή παρουσιάζει παρόμοιες ιδιότητες με την ADP-ριβόζη. Αυτός ο τύπος προσροφητικού έχει ικανότητα δέσμευσης που είναι 10-20 φορές ισχυρότερη από άλλα προσροφητικά. Μέσω του χειρισμού των επιπέδων pH και της χρήσης διαλυμάτων υψηλής ιοντικής ισχύος, οι πρωτεΐνες που έχουν προσροφηθεί στη στήλη μπορούν να διαχωριστούν αποτελεσματικά, χάρη στην ιδιότητα ανταλλαγής ιόντων του προσροφητικού (Scopes 1984, Cutler 2004).

#### **3.4.1.9. Χρωματογραφία υδροφοβικής αλληλεπίδρασης (H.I.C.)**

Αυτή η τεχνική χρησιμοποιεί προσροφητικά που έχουν κατασκευαστεί ως υλικό στήλης με σκοπό τη δέσμευση συνδέτη στη χρωματογραφία συγγένειας. Η προσέγγιση HIC βασίζεται σε υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις μεταξύ πλευρικών αλυσίδων που συνδέονται με τη χρωματογραφική μήτρα (Mahn, Asenjo 2005, Queiroz et al 2001).

#### **3.4.1.10. Χρωματογραφία ψευδοσυνάφειας**

Οι βαφές και οι αζωχρωστικές ανθρακινόνης μπορούν να χρησιμεύσουν ως συνδέτες λόγω της ισχυρής τους συγγένειας, ιδιαίτερα προς τις αφυδρογονάσεις, τις κινάσες, τις τρανσφεράσες και τις αναγωγάσες. Η πιο ευρέως αναγνωρισμένη μορφή αυτού του είδους χρωματογραφίας είναι η χρωματογραφία συγγένειας ακινητοποιημένου μετάλλου (IMAC) (Porath 1992).

#### **3.4.1.11. Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης**

Αυτή η χρωματογραφική τεχνική επιτρέπει την ταχεία δομική, λειτουργική διερεύνηση και καθαρισμό πολλών ενώσεων. Αυτή η μέθοδος παράγει ακριβή αποτελέσματα στην απομόνωση και τον χαρακτηρισμό αμινοξέων, υδατανθράκων, λιπιδίων, νουκλεϊκών οξέων, πρωτεϊνών, στεροειδών και άλλων φυσιολογικά ενεργών ενώσεων. Στην υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης (HPLC), η κινητή φάση ρέει μέσω στηλών σε πιέσεις που κυμαίνονται από 10 έως 400 ατμόσφαιρες, με γρήγορο ρυθμό ροής 0,1 έως 5 εκατοστά ανά δευτερόλεπτο. Αυτή η τεχνική χρησιμοποιεί μικρά σωματίδια και εφαρμόζει υψηλή πίεση για να ενισχύσει την ταχύτητα ροής του διαλύτη, αυξάνοντας έτσι την απόδοση διαχωρισμού της HPLC. Επιπλέον, αυτή η μέθοδος επιτρέπει την ταχύτερη ολοκλήρωση της ανάλυσης.

Τα θεμελιώδη στοιχεία ενός οργάνου Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Πίεσης (HPLC) περιλαμβάνουν μια δεξαμενή διαλύτη, μια αντλία υψηλής πίεσης, μια προσυσκευασμένη στήλη, έναν ανιχνευτή και έναν καταγραφέα. Το αυτοματοποιημένο σύστημα ελέγχει τη διάρκεια του διαχωρισμού και το υλικό που συσσωρεύεται (Regnier 1983).

### 3.5. Φασματοσκοπία

Η αλληλεπίδραση φωτός και ύλης είναι το αντικείμενο μιας συλλογής τεχνικών γνωστών ως φασματοσκοπία (Von et al.2022). Το ηλεκτρικό πεδίο του φωτός διέπει την πόλωση των ατόμων και το φως διαδίδεται στο χρόνο μέσω μιας υπέρθεσης ηλεκτρομαγνητικών πεδίων (Yu and Zhao, 2021). Ένα ηλεκτρομαγνητικό πεδίο μπορεί να εκπέμπεται ως αποτέλεσμα της επιτάχυνσης φορτισμένων σωματιδίων, το οποίο έχει ως αποτέλεσμα τη μη σφαιρικά συμμετρική κατανομή των πεδίων ηλεκτρονίων σε ένα άτομο (Fernandes et al.2020). Εάν το φως απορροφάται αποτελεσματικά, ο αριθμός των φωτονίων που απορροφώνται και εκπέμπονται είναι ίσος σε κατάσταση ισορροπίας. Επίσης είναι λογικό ότι η ποσότητα των φωτονίων που εκπέμπονται είναι ανάλογη με την ποσότητα των διεγερμένων ατόμων (Lamichhane et al.2022).

Η σκέδαση φωτός περιλαμβάνει την αλληλεπίδραση προσπίπτοντων φωτονίων με την αναλυόμενη ουσία, γεγονός που έχει ως αποτέλεσμα την επανεκπομπή φωτονίων. Η σκέδαση περιστασιακά ενσωματώνεται στη φασματοσκοπία λόγω του γεγονότος ότι η αλληλεπίδραση μεταξύ του φωτονίου και της αναλυόμενης ουσίας αποδίδει πληροφορίες ,ικανές για την χρήση τους στην ανίχνευση και τον ποσοτικό προσδιορισμό της αναλυόμενης ουσίας (Rodriguez -Saona και Ayvaz, 2024). Το φως εκπέμπεται όταν η αναλυόμενη ουσία υφίσταται μια ηλεκτρονική μετάβαση, η οποία έχει ως αποτέλεσμα την εκπομπή φωτονίων ως αποτέλεσμα διαδικασιών ενεργειακής μείωσης. Στη φασματοσκοπία φωταύγειας όταν η αναλυόμενη ουσία διεγείρεται από εξωτερικές πηγές ενέργειας (Beć et al., 2020, Bell et al., 2020). Η φωτοφωταύγεια είναι ένας από τους κλάδους της, που περιλαμβάνει την αλληλεπίδραση της αναλυόμενης ουσίας με ένα λέιζερ. Η κατανόηση ορισμένων πτυχών της εφαρμογής μεθόδων φασματοσκοπίας για την ανίχνευση αντιβιοτικών απαιτεί την κατανόηση αυτών των πλαισίων (Aitekenov et al., 2021, Fan et al., 2020).

### 3.5.1. Θεμελιώδεις Έννοιες Φασματοσκοπίας

Η ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία αποτελείται από φωτόνια με ενέργεια  $E$  ή γωνιακή συχνότητα  $\omega = 2\pi f$ , τα οποία σχετίζονται με το μήκος κύματος  $\lambda$  μέσω της ταχύτητας του φωτός  $c$  ως  $E = hf = hc/\lambda$ , όπου  $h$  είναι η σταθερά Planck και  $f$  είναι η συχνότητα σε Hz. Το ηλεκτρομαγνητικό φάσμα καταδεικνύει το εκτεταμένο εύρος ενέργειας που διαθέτει αυτή η ακτινοβολία. Οι τύποι ακτινοβολίας που υπάρχουν χρησιμοποιούνται συχνά σε φασματοσκοπικές τεχνικές (Wang et al.2023). Η ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία έχει την ικανότητα να προκαλεί μεταπτώσεις σε άτομα και μόρια όταν αλληλεπιδρά με αυτά. Οι φασματοσκοπίες UV και ορατού φωτός ανιχνεύουν μεταβάσεις μεταξύ ηλεκτρονικών επιπέδων. Οι φασματοσκοπίες καταδεικνύουν επίσης μεταβάσεις μεταξύ των επιπέδων δόνησης στο υπέρυθρο (IR) και τη διάδοση των αλλαγών στο μοριακό δίπολο σε συχνότητες δόνησης. Ο συντονισμός spin ηλεκτρονίων (ESR) ή ο παραμαγνητικός συντονισμός ηλεκτρονίων (EPR) ανιχνεύει τον συντονισμό του spin ηλεκτρονίων σε ένα μαγνητικό πεδίο. Κατά την ανίχνευση μέσω προσομοιώσεων ραδιοσυχνοτήτων (RF), οι μεταβάσεις πυρηνικού spin αποδεικνύονται στον πυρηνικό μαγνητικό συντονισμό (NMR), ο οποίος επίσης εκδηλώνεται κάτω από ένα μαγνητικό πεδίο (Cheng et al., 2021). Επιπλέον, η φασματοσκοπία μικροκυμάτων είναι ευαίσθητη σε διαμοριακές περιστροφές και η ακτινοβολία σε αυτές τις φασματικές ζώνες μπορεί να απορροφηθεί κατά τις μεταβάσεις ηλεκτρονίων μεταξύ διαδοχικών ατομικών τροχιακών, καθώς και κατά τις αλλαγές στον προσανατολισμό των μορίων λόγω παροδικών εξωτερικών πεδίων. Όταν μια ουσία υποβάλλεται σε ακτινοβολία, η απορρόφηση της ηλεκτρομαγνητικής ενέργειας ανυψώνει τα ηλεκτρόνια σε υψηλότερα επίπεδα κβαντικής ενέργειας. Η απορρόφηση είναι πιο ευαίσθητη όσο αυξάνεται η ενέργεια. Κατά συνέπεια, η απορρόφηση UV-Vis ορισμένων αντιβιοτικών χρησιμοποιείται για τη μέτρηση και τη διέγερσή τους. Στον φθορισμό και τη χημειοφωταύγεια, οι μεταφορές ηλεκτρονίων σε διεγερμένες καταστάσεις εντός μιας ουσίας μπορούν επίσης να διευκολυνθούν από την ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία. Όταν επιστρέφουν σε κατάσταση χαμηλότερης ενέργειας, τα διεγερμένα ηλεκτρόνια εκπέμπουν ακτινοβολία, όπως φαίνεται στη φωταύγεια (Zhong et al.2020). Αυτό μπορεί να συμβεί ως αποτέλεσμα της αποδιέγερσης του διεγερμένου μορίου ή της εκπομπής φωτονίων, με την

εναπομένονσα ενέργεια να μετατρέπεται σε θερμότητα ή σε άλλη διαδικασία που παράγει φως. Για παράδειγμα, το υλικό φθορίζει όταν τα διεγερμένα ηλεκτρόνια απελευθερώνονται σε καταστάσεις υψηλής ορμής ή όταν απορροφάται ενέργεια για να αναγκάσει ορισμένα μόρια να υπομείνουν μια συγκεκριμένη αλλαγή στη δομή και τη σύνθεση προκειμένου να επιστρέψουν στη θεμελιώδη κατάσταση, με αποτέλεσμα τη χημειοφωταύγεια (Uddin et al. 2022).

### 3.5.2. Διαφορετικοί τύποι Φασματοσκοπικών Τεχνικών

Οι προηγμένες τεχνολογίες φασματοσκοπίας διακρίνονται για την υψηλή ειδικότητά τους. Διάφορες μέθοδοι φασματοσκοπίας, όπως φασματοσκοπία UV-Vis, φασματοσκοπία υπερύθρου, φασματοσκοπία Raman, φασματοσκοπία φθορισμού, φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού και φασματοσκοπία μάζας, χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση αντιβιοτικών και υπολειμμάτων τους στα δείγματα (Girmatsion et al., 2021). Η τιμή  $\lambda_{\max}$  και η δομή διπλού δεσμού των φαρμακευτικών προϊόντων και των τροφίμων αναλύονται χρησιμοποιώντας φασματοσκοπία UV-Vis (Liu et al., 2022). Η αποτελεσματικότητα σύζευξης αντισωμάτων, πρωτεϊνών γάλακτος και αλληλεπίδρασης αντισώματος-αντιγόνου ανιχνεύονται όλα χρησιμοποιώντας φασματοσκοπία FT-IR. Η σκέδαση των δεσμών μικροκυμάτων βελτιώνεται σημαντικά με τη φασματοσκοπία Raman (Khatibi et al., 2021). Η εγγύς υπέρυθρη φασματοσκοπία είναι μια μέθοδος για την ανάλυση υγρών, στερεών, τροφίμων, κρέατος και φαρμάκων και βασίζεται στην περιοχή μοριακής προσρόφησης από 780 έως 2500 nm. Για σύνθετους πίνακες δειγμάτων, είναι απαραίτητο να χρησιμοποιηθεί N.I.R. σε συνδυασμό με χημειομετρικές μεθόδους (Bonerba et al., 2021) (de Faria et al., 2021).

Μια ξεχωριστή ευκαιρία ανάλυσης λιπιδίων σε ζωικούς ιστούς, σωματικά υγρά και σύνθετα τρόφιμα παρέχεται με τις τεχνικές NMR (Gaspar et al. 2021). Τα κύρια οφέλη είναι η δυνατότητα δημιουργίας σημάτων NMR για μια ποικιλία δειγμάτων, συμπεριλαμβανομένων δειγμάτων γέλης, ημιστερεού, υγρού και στερεού, χωρίς να διακυβεύονται οι ιδιότητές τους (Peris-Vicente et al. 2022). Η ανίχνευση αντιβακτηριακών φαρμακευτικών ουσιών και των μεταβολιτών τους είναι μια κοινή εφαρμογή της φασματομετρίας μάζας. Τα κύρια οφέλη της φασματομετρίας μάζας



περιλαμβάνουν την ικανότητά της να αναγνωρίζει ενώσεις μικρού μοριακού βάρους σε περίπλοκες μήτρες δειγμάτων, την ταχεία ανάλυσή τους, την υψηλή ειδικότητά της και την υψηλή αποτελεσματικότητά της (Drabińska et al.2022). Ωστόσο, τα ακόλουθα είναι τα μειονεκτήματα αυτής της μεθόδου: το υψηλό κόστος της συσκευής, η υψηλή ειδικότητα και η βαριά επεξεργασία δεδομένων (Li et al.2022). Οι πρακτικές εφαρμογές της φασματομετρίας μάζας περιορίζονται από τα μειονεκτήματά της. Η ανάλυση μικρών μοριακών βαρών, προσθέτων και υπολειμμάτων φαρμακευτικών προϊόντων και άλλων συστατικών πραγματοποιείται συχνά χρησιμοποιώντας αυτή τη μέθοδο. Η βάση δεδομένων φάσματος μάζας για την πλειονότητα των φαρμακευτικών προϊόντων δεν είναι συγκρίσιμη με τους απαραίτητους υπολογιστές φασματομετρίας μάζας. Η φασματομετρία μάζας είναι μία από τις λίγες τεχνικές που μπορεί να διαφοροποιήσει τα εναντιομερή (Ogundairo et al.2023).

### 3.5.3. Αξιοποίηση Φασματοσκοπικών Μεθόδων Ανίχνευσης Αντιβιοτικών

Μία από τις κύριες εφαρμογές των φασματοσκοπικών τεχνικών είναι η ανίχνευση αντιβιοτικών σε διάφορους τομείς, συμπεριλαμβανομένης της βιοϊατρικής, της ασφάλειας/ποιότητας των τροφίμων και της περιβαλλοντικής παρακολούθησης. Η υγρή χρωματογραφία-φασματομετρία μάζας και οι μικροβιακές δοκιμασίες είναι οι πιο συχνά χρησιμοποιούμενες αναλυτικές τεχνικές για την ανίχνευση και την απομόνωση αντιβιοτικών από πολύπλοκες μήτρες (Petersen et al., 2021). Το πρωταρχικό πλεονέκτημα των φασματοσκοπικών τεχνικών στην ανίχνευση είναι η υψηλή τους επιλεκτικότητα, η ευαισθησία και η ικανότητα παροχής πληθώρας δομικών πληροφοριών (Wang et al., 2021).

Σήμερα, η ανίχνευση υπολειμμάτων αντιβιοτικών σε σύνθετες μήτρες σε επίπεδο ίχνους αποτελεί ρητή απαίτηση. Αυτό απαιτεί εξαιρετική επιλεκτικότητα και, κατά συνέπεια, εξαιρετική ευαισθησία, ποιότητα της ανίχνευσης και δυνατότητα να αξιολογηθεί (Girmatsion et al., 2021).

Σε αντίθεση με τις προαναφερθείσες δοκιμασίες, μια ποικιλία φασματομετρικών τεχνικών μπορεί να παρέχει το πλεονέκτημα της χημικής ειδικότητας και ευαισθησίας, καθώς και του περιεχομένου πληροφοριών (Picó, 2020). Αυτές οι τεχνικές είναι γρήγορες και δεν απαιτούν την καλλιέργεια μικροοργανισμών. Επιπλέον, έχουν τη δυνατότητα για πλήρως αυτοματοποιημένη ανάλυση μετά την

αρχική προετοιμασία του δείγματος (Medina et al.2020). Αυτές οι τεχνικές έχουν ως κίνητρο τις αυξανόμενες ανησυχίες σχετικά με τη διάδοση μικροοργανισμών ανθεκτικών στα αντιβιοτικά και τη συσχέτισή τους με υπολείμματα αντιβιοτικών. Στην Ευρωπαϊκή Ένωση, η χρήση τεχνικών φασματομετρίας μάζας συζευγμένης με υγρή χρωματογραφία είναι πλέον υποχρεωτική τόσο για ανθρώπινες όσο και για κτηνιατρικές εφαρμογές (de Koster and Schoenmakers 2020). Η Ευρωπαϊκή Ένωση έχει θεσπίσει ανώτατα όρια υπολειμμάτων για διάφορα τρόφιμα, τα οποία επιβάλλονται από τις χώρες μέσω δοκιμών ρουτίνας. Οι οδηγίες του Συμβουλίου έχουν αναθεωρηθεί με αποφάσεις της Ευρωπαϊκής Επιτροπής, οι οποίες έχουν θεσπίσει όλες αυτές τις απαιτήσεις. Σε πολλές περιπτώσεις, είναι απαραίτητο να αξιολογηθούν και να επαληθευτούν τα υπολείμματα χρησιμοποιώντας μεθόδους δοκιμής (Medina et al.2020).

#### 3.5.4. Ανίχνευση αντιβιοτικών σε δείγματα περιβάλλοντος και τροφίμων

Πιστεύεται ότι τα υπολείμματα αντιβιοτικών στους ιστούς των ζώων που παράγουν τρόφιμα ή που χρησιμοποιούνται στην υδατοκαλλιέργεια μπορεί να προκαλέσουν προβλήματα υγείας στους καταναλωτές. Ακόμη και αν τηρηθούν ή παραταθούν οι απαιτούμενες περίοδοι παρακράτησης, αυτές οι ουσίες παραμένουν στους ιστούς αυτών των ζώων και η κατανάλωσή τους μπορεί να οδηγήσει σε επακόλουθα προβλήματα υγείας (Bilal et al. 2020). Επιπλέον, η περιβαλλοντική ρύπανση του νερού και του εδάφους μπορεί επίσης να έχει επιβλαβείς επιπτώσεις σε οργανισμούς μη στόχους. Κατά συνέπεια, τα αντιβιοτικά μπορούν να έχουν σημαντική συνολική περιβαλλοντική επίπτωση. Ανησυχίες έχουν επίσης εκφραστεί τις τελευταίες δεκαετίες σχετικά με την απόρριψη σημαντικών ποσοτήτων αντιβακτηριακών φαρμάκων στις υδάτινες οδούς και στο περιβάλλον. Εδώ και αρκετό καιρό, υπάρχουν κανονισμοί για την αντιμετώπιση της παρουσίας ανθεκτικών στα αντιβιοτικά βακτηρίων στο περιβάλλον, καθώς και νόμους για την πρόληψη μιας μη αναστρέψιμης κατάστασης. (Yang et al. 2021). Η πλειονότητα των αντιμικροβιακών παραγόντων χρησιμοποιείται εκτενώς στην παραγωγή γεωργικών προϊόντων διατροφής και υδατοκαλλιέργειας. Η μόλυνση έχει αναγνωριστεί ως σημαντικό ζήτημα ανησυχίας που μπορεί να προκαλέσει προβλήματα αυξανόμενης εμβέλειας ως αποτέλεσμα του αυξανόμενου επιπέδου αντοχής που παρατηρείται ως αποτέλεσμα της χορήγησης αντιβιοτικών στον άνθρωπο. Κατά συνέπεια, αυτό κατέστησε αναγκαία τη θέσπιση



ανώτατων ορίων υπολειμμάτων (MRL) για την παρουσία αυτών των φαρμάκων σε τρόφιμα ζωικής προέλευσης (Wang et al., 2021).

Πολλές συμβατικές αναλυτικές τεχνικές έχουν χρησιμοποιηθεί για την ανάπτυξη αναλυτικών μεθοδολογιών για τον προσδιορισμό των υπολειμμάτων αντιβιοτικών. Ωστόσο, η απόδοση αυτών των μεθοδολογιών είναι χρονοβόρα λόγω της πολυπλοκότητας του στόχου, του χρόνου κατανάλωσης, της σχετικά χαμηλής ευαισθησίας, του υψηλού κόστους και της απαίτησης για μεγάλους όγκους δειγμάτων (Rahman et al., 2021). Η ανάπτυξη νέων μεθόδων, ιδιαίτερα φορητών τεχνολογιών πεδίου, που είναι ικανές για παρακολούθηση ενός ή πολλαπλών υπολειμμάτων και παρέχουν εξαιρετική ευαισθησία, επιλεκτικότητα και προστασία της υγείας και του περιβάλλοντος είναι μια συνεχής προσπάθεια (Koike et al. 2021). Είναι επίσης σε θέση να ανιχνεύουν ουσίες σε πολύ μεγάλες ποσότητες και να συγκρίνουν τη διαμόρφωσή τους με εκείνες που εντοπίζονται σε μια εγκατάσταση (Ghareghani et al. 2023). Φυσικά, οι μεθοδολογίες ενός ή πολλαπλών υπολειμμάτων λειτουργούν σε επίπεδο ανίχνευσης μικρογραμμαρίου ανά λίτρο έως νανογραμμαρίου ανά λίτρο για να επιβεβαιώσουν και να χρησιμοποιήσουν την υποκατάσταση ή τη μη υποκατάσταση ως συστατικό της καλής διαβίωσης των ζώων και της πρόληψης ασθενειών σε τρόφιμα ζωικής προέλευσης. Επιπλέον, η λειτουργία προαπαιτούμενων δοκιμών μεμονωμένων ή πολλαπλών υλικών σε θαλάσσια ύδατα για σκοπούς καθαρισμού φαρμάκων είναι συγκρίσιμη (Treiber and Beranek-Knauer, 2021). Αυτό είναι σημαντικό λόγω του γεγονότος ότι η παρουσία ναρκωτικών στα θαλάσσια ύδατα είναι γνωστό ότι παρουσιάζει διακυμάνσεις κατά την διάρκεια του χρόνου. Αυτές οι μέθοδοι έχουν επιπτώσεις στους τομείς της γεωργίας, της φροντίδας του περιβάλλοντος και της ποιότητας και της ασφάλειας των τροφίμων ως αποτέλεσμα αυτών των εξελίξεων (Bhawan 2022).

### **3.5.5. Η Νανοτεχνολογία στη Φασματοσκοπία**

Πολυάριθμες επιτυχημένες εφαρμογές νανοτεχνολογίας έχουν ανακαλυφθεί ως αποτέλεσμα φασματοσκοπικών τεχνικών για την ανίχνευση αντιβιοτικών (Joshi and Kim, 2020). Τα νανοϋλικά, με τη μορφή νανοσωματιδίων, είναι κυρίως αποτελεσματικά στην ενίσχυση της ευαισθησίας και της επιλεκτικότητας των τεχνικών, επιτρέποντας έτσι την ανίχνευση αντιβιοτικών και των υπολειμμάτων τους σε εξαιρετικά χαμηλές συγκεντρώσεις (Salek et al. 2021). Όλες οι προδιαγραφές

σχετικά με την πλατφόρμα που απαιτούν διάφορες φασματοσκοπικές τεχνικές από τα νανοϋλικά για την εφαρμογή τους επικεντρώνονται στη μείωση των ορίων ανίχνευσης. Αυτή η μείωση χρησιμεύει για την παροχή ευρύτερης επιλεκτικότητας και μειωμένης πιθανότητας παρεμβολής, καθώς και στενότερης επιλεκτικότητας, προσαρμογής για μια συγκεκριμένη αναλυόμενη ουσία και ταχύτερους χρόνους απόκρισης (Mukhtar et al.2021). Τα νανοσωματίδια χρησιμοποιούνται ως νανοπομποί ή νανοφορείς σε μεθόδους που βασίζονται στον φθορισμό για τη διευκόλυνση της ενισχυμένης και επιλεκτικής ανίχνευσης, η οποία βασίζεται στην ενίσχυση ή την απόσβεση του φθορισμού (Zhou et al., 2021, Sun et al., 2021).

Τα νανοϋλικά παρουσιάζουν μια σημαντικά διαφορετική αλληλεπίδραση με την ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία από ότι οι χύδην ουσίες. Η αλληλεπίδρασή τους με το φως επηρεάζεται κυρίως από το μέγεθος, το σχήμα, την οπτική και το υλικό τους, τα οποία μεταβάλλουν τη φάση και τη διαδίδουν κατά μήκος της επιφάνειάς τους. Αυτό διευκρινίζει τη βελτίωση τόσο της ευαισθησίας όσο και της ενίσχυσης σε μια ποικιλία εφαρμογών φασματοσκοπίας που βασίζονται στη νανοτεχνολογία (Kumar et al.2020). Τα νανοϋλικά αυτής της κλίμακας, τα οποία ανταποκρίνονται σε ηλεκτρομαγνητικά πεδία και προκαλούν εξαιρετικά ενισχυμένες φασματικές αποκρίσεις, έχουν την ικανότητα να αυξάνουν να την ανάπτυξη νέων βιοαισθητήρων που λειτουργούν στην πρώτη γραμμή της απαιτούμενης χρονικής διάρκειας για την επίτευξη σταθερής κατάστασης (Laraib et al.2022). Αυτοί οι αισθητήρες θα χρησιμοποιηθούν για την ανίχνευση μιας ποικιλίας ουσιών, συμπεριλαμβανομένων τοξινών, μεταβολιτών και άλλων ουσιών που μας ενδιαφέρουν, καθώς και χημικών και βιολογικών ουσιών. Σε λίγα χρόνια, οι νανο-βιοδιεπαφές αναμένεται να ενσωματωθούν σε εργαστήρια κλινικής και περιβαλλοντικής παρακολούθησης για την επιτόπια ανίχνευση μιας ποικιλίας αναλυτών (Thwala et al.2023 ).

### 3.6. Φασματομετρία Μάζας

Η φασματομετρία μάζας είναι μια αναλυτική τεχνική που χρησιμοποιείται συχνά από ερευνητές και βιομηχανίες για την εκτίμηση της μάζας του μορίου (Stavrianidi, 2020). Η φασματομετρία μάζας είναι η διαδικασία παραγωγής ιόντων μέσω μιας αέριας φάσης, ο διαχωρισμός τους με βάση την αναλογία μάζας προς φορτίο ή την ταχύτητά τους σε ένα μαγνητικό πεδίο και στη συνέχεια ανίχνευση ολόκληρου του παραγόμενου ιόντος (Zhang et al., 2020). Η φασματομετρία μάζας ξεκινά με τον ψεκασμό και τη μετατροπή ενός δείγματος σε ιόντα αέριας φάσης μέσω της χρήσης μιας συγκεκριμένης τεχνικής ιονισμού (Goodwin et al., 2020). Εδώ, είναι σημαντικό η βιβλιοθήκη ή η διαθέσιμη μέθοδος να προσφέρει μεθόδους για τον ποσοτικό προσδιορισμό των φαινολικών ενώσεων, καθώς ένας σημαντικός αριθμός αντιβιοτικών που προκαλούν ανησυχία ανήκουν σε αυτήν την κατηγορία (Macklin et al., 2020).

Αναλυτές μάζας ή φίλτρα μάζας χρησιμοποιούνται για την ανάλυση καθορισμένων ιόντων στην αέρια φάση προκειμένου να ληφθεί ένα ρεύμα που επηρεάζεται από τους αντίστοιχους λόγους μάζας προς φορτίο (Shi et al.2022). Ο ιονισμός ηλεκτρονίων, ο χημικός ιονισμός, ο ιονισμός λόγω πεδίου και ο γρήγορος βομβαρδισμός ατόμων είναι οι πιο συχνά χρησιμοποιούμενες πηγές ιόντων σε εφαρμογές φασματομετρίας μάζας. Άλλες μέθοδοι, όπως ο ιονισμός με θερμοψεκασμό, ο χημικός ιονισμός με ατμοσφαιρική πίεση και ο ιονισμός με ηλεκτροψεκασμό, βρίσκονται επί του παρόντος υπό διερεύνηση (Zhao et al., 2024).

Μπορούν να χρησιμοποιηθούν αναλυτές μάζας ή φίλτρα μάζας για τον προσδιορισμό της μάζας κάθε ιόντος που παράγεται μετά τον σχηματισμό ιόντων, με βάση μια σειρά είτε μηχανικού διαχωρισμού είτε με την ταχύτητα αυτών των ιόντων (Randolph et al., 2020) (Mandal and Paul 2022). Η διαδοχική φασματομετρία μάζας είναι ένα επιπλέον χρήσιμο προϊόν που είναι ανώτερο από τη φασματομετρία μάζας υψηλής ανάλυσης για μελέτες που απαιτούν τον προσδιορισμό της δομής κατακερματισμού των ιόντων. Ο ακριβής ποσοτικός προσδιορισμός είναι απαραίτητος για τα αντιβιοτικά που εντοπίζονται σε υψηλές συγκεντρώσεις (Ramzan et al., 2021).

### 3.6.1. Μέθοδοι Ιονισμού

Ένα φασματόμετρο μάζας είναι μοναδικό στην ικανότητά του να διακρίνει μεταξύ ισοβαρών παρεμβολών και να μετρά τη μάζα ενός μόνο μορίου. Η τεχνική ιονισμού, η οποία είναι το αρχικό συστατικό ενός φασματόμετρου μάζας, είναι υπεύθυνη για τη φόρτιση του μορίου που μας ενδιαφέρει (Varenina et al. 2022). Αυτό το μόριο μπορεί να αναλυθεί ανεξάρτητα (Moga et al., 2021). Τα πλεονεκτήματα πολλών πηγών ιονισμού για ανάλυση αντιβιοτικών είναι ποικίλα και χρησιμοποιούνται συχνά σε ποικίλες εφαρμογές (Yoon and Jeong 2021). Η επιλογή μιας τεχνικής ιονισμού είναι ζωτικής σημασίας, καθώς μπορεί να έχει άμεσο αντίκτυπο στο όριο ανίχνευσης, την επιλεκτικότητα, την ειδικότητα, την ανεκτικότητα της μήτρας, την ευρωστία και τη συνολική επιτυχία της ανίχνευσης αντιβιοτικών (Pauter et al., 2020) (Peris-Vicente et al., 2022)

Η ενέργεια ιονισμού, η συγγένεια πρωτονίων ή η βασικότητα του αντιβιοτικού είναι οι πρωταρχικοί παράγοντες που καθορίζουν τον καταλληλότερο τρόπο ιονισμού για τα αντιβιοτικά (Chen and Wang, 2021). Παρά το γεγονός ότι αυτό δεν αναγνωρίζεται ή συζητείται πάντα ως κρίσιμο σημείο, είναι απαραίτητο για την επιλογή της τεχνικής ιονισμού. Οι αναλυτές μάζας είναι τα αρχικά συστατικά ενός φασματόμετρου μάζας, ακολουθούμενα από τους ανιχνευτές, μετά από θετικό και αρνητικό ιονισμό. Ωστόσο, τα δείγματα που εξετάζονται αυτή τη στιγμή μπορεί να είναι σε υγρή, στερεή, ημιστερεή ή αέρια φάση (Tian et al. 2020). Κατά συνέπεια, η εφαρμογή διαδικασιών για την ανίχνευση αντιβιοτικών θα διευκολυνθεί από την πλήρη κατανόηση των αρχών ιονισμού και των πρόσφατων τάσεων. Συνοπτικά, η ευαισθησία ανίχνευσης επηρεάζεται σημαντικά από τις καταστάσεις φορτίου και της έντασης, καθώς και από το μέγεθος των σταγονιδίων (Li et al., 2020).

Η πηγή ιονισμού που χρησιμοποιείται κυρίως στην υγρή χρωματογραφία είναι ο ιονισμός με ηλεκτροψεκασμό, η κατά κόρον χρησιμοποιούμενη τεχνική ιονισμού. Ο ιονισμός με ηλεκτροψεκασμό είναι ικανός να παράγει πολυφορισμένα ιόντα, ιδιαίτερα όταν χρησιμοποιείται με βασικές ενώσεις. Αυτή η διαδικασία παράγει ιόντα στη φάση ατμού (Rawat et al. 2023). Ο χημικός ιονισμός ατμοσφαιρικής πίεσης είναι μια

πρόσθετη τεχνική ιονισμού που γενικά χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με υγρή χρωματογραφία για τον διαχωρισμό θετικών και αρνητικών ιόντων. Σε περίπτωση άμεσης έγχυσης, μπορεί να πραγματοποιηθεί φωτοϊοντισμός ατμοσφαιρικής πίεσης και ιονισμός λέιζερ ατμοσφαιρικής πίεσης. Η τεχνική ιονισμού που χρησιμοποιείται συχνότερα σε συνδυασμό με μικροσκοπικές τεχνικές αιχμής για την απεικόνιση είναι η εκρόφηση/ιονισμός με λέιζερ υποβοηθούμενη από μήτρα (Lv et al., 2022). Επιπλέον, χρησιμοποιούνται εναρμονισμένες τεχνικές για την αναγνώριση αντιβιοτικών τόσο στα τρόφιμα όσο και στα λύματα, αποδεικνύοντας ότι είναι δυνατός ο εντοπισμός αντιβιοτικών σε επίπεδο ppb. Ορισμένοι ερευνητές αναπτύσσουν και εφαρμόζουν νέες πηγές ιόντων με ενισχυμένη ευαισθησία, που θα αυξήσουν την ποσότητα των δεδομένων που μπορούν να δημιουργηθούν σε ένα μόνο πείραμα (Ye et al. 2020).

### **3.6.2. Η ποσοτική ανάλυση των αντιβιοτικών με τη χρήση φασματομετρίας μάζας.**

Μια καμπύλη βαθμονόμησης αντιβιοτικού μπορεί να δημιουργηθεί σχεδιάζοντας την ένταση του σήματος που λαμβάνεται από τις ιχνοποσότητες ή, ιδανικά, μια περιοχή συγκέντρωσης αντιβιοτικών διαλυμάτων για ποσοτική ανάλυση (Wang et al., 2021). Η ανιχνευόμενη ένταση σήματος της αναλυόμενης ουσίας για το νέο δείγμα μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον εκ των υστέρων υπολογισμό της συγκέντρωσης των ουσιών που υπάρχουν στο δείγμα όταν δημιουργείται μια γραμμή σε μοντέλα βαθμονόμησης με ένα σύνολο γνωστών συγκεντρώσεων. Έχει προταθεί ότι η δημιουργία μιας καμπύλης βαθμονόμησης είναι το πρωταρχικό βήμα στη διαδικασία ακριβούς και αξιόπιστου ποσοτικού προσδιορισμού των αντιβιοτικών στο δείγμα (Alseekh et al., 2021). Προκειμένου να διασφαλιστεί η αναπαραγωγιμότητα της ποσοτικής ανάλυσης αντιβιοτικών, είναι εξίσου σημαντικό να επικυρωθούν τα πρωτόκολλα βαθμονόμησης και να επαληθευτεί η καμπύλη βαθμονόμησης χρησιμοποιώντας αναπτυγμένη μέθοδο (Klymus et al., 2020).

### **3.6.3. Η φασματομετρία μάζας χρησιμοποιείται για τη διεξαγωγή ποιοτικής ανάλυσης αντιβιοτικών.**

Η φασματομετρία μάζας είναι ένα κρίσιμο συστατικό των ποιοτικών μεθόδων που αναλύουν την παρουσία και τη δομή των αντιβιοτικών. Σε αντίθεση με τις ποσοτικές μετρήσεις των συγκεντρώσεων αντιβιοτικών, οι ποιοτικές μέθοδοι έχουν

σχεδιαστεί για την αναγνώριση αντιβιοτικών σε ένα δείγμα, ακόμη και αν υπάρχουν σε άγνωστες συγκεντρώσεις (Er Demirhan and Demirhan, 2022). Η φασματομετρία μάζας γίνεται ουσιαστικό όργανο σε αυτό το πλαίσιο, καθώς πρόσθετες δομικές λεπτομέρειες παρέχονται από περαιτέρω εξελίξεις, όπως η φασματομετρία μάζας σε σειρά (Fabregat-Safont et al.2023) ή η φασματομετρία μάζας υψηλής ευκρίνειας (Feliu et al.2021). Επιπλέον, η φασματομετρία μάζας μπορεί να συμπληρωθεί με συμπληρωματικές τεχνικές, όπως η αέρια χρωματογραφία και η υγρή χρωματογραφία, για ενίσχυση του διαχωρισμού και της ανάλυσης (Meklati et al.2022). Η LC-MS/MS είναι η πιο συχνά χρησιμοποιούμενη μέθοδος για τον έλεγχο και την ανίχνευση αντιβιοτικών σε μια ποικιλία δειγμάτων. Παρέχει ανώτερο χρωματογραφικό διαχωρισμό με πιο ευαίσθητη ανίχνευση με ταχύτερο ρυθμό (Nunes et al. 2022).

Πληροφορίες σχετικά με τα μοτίβα θραυσμάτων των μορίων λαμβάνονται μέσω φασματομετρικών μεθόδων μάζας. Αυτή η ανάλυση δημιουργεί πολυάριθμα αντιβιοτικά θραύσματα που μπορούν να συναρμολογηθούν για την ανακατασκευή ολόκληρου του μορίου (Lewis, 2020). Το μόριο αναγνωρίζεται με αναζήτηση σε βιβλιοθήκης ή με χημικές αρχές αφού έχει ανακατασκευαστεί από τα θραύσματα. Οι φασματικές βιβλιοθήκες μάζας είναι απαραίτητες για την αναγνώριση του αντιβιοτικού (Bauermeister et al.2022). Ωστόσο, η διαθεσιμότητα βιβλιοθηκών αντιβιοτικών είναι περιορισμένη. Η μέθοδος περιορίζεται σε αναμενόμενες αναλυόμενες ουσίες λόγω της ανάγκης προηγούμενης γνώσης του υπό διερεύνηση μορίου. Η ανάλυση φασματομετρίας μάζας των αντιβιοτικών τυπικά παρουσιάζει μια ποιοτική τάση. Ο πρωταρχικός στόχος αυτών των μεθόδων ανίχνευσης είναι η αναγνώριση της δομής των αντιβιοτικών. Ένα φάσμα μάζας ή ένα πρότυπο κατακερματισμού που είναι μοναδικό για ένα συγκεκριμένο αντιβιοτικό μπορεί να χρησιμεύσει ως απόδειξη αναγνώρισης. Κλινικά, φαρμακευτικά και περιβαλλοντικά παραδείγματα παρέχουν πληροφορίες για τις πρακτικές εφαρμογές των ποιοτικών μεθόδων και τους έμμεσους τρόπους με τους οποίους τα δεδομένα μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την περαιτέρω κατανόηση της αποτελεσματικότητας και της χρήσης των αντιβιοτικών (Weis et al.2022) (Meissner et al.2022).

### 3.7. Ανοσοδοκιμές

Οι ανοσοδοκιμές είναι βιοχημικές δοκιμές που ανιχνεύουν μια ποικιλία αντιβιοτικών ή άλλων ενώσεων αξιοποιώντας την αλληλεπίδραση υψηλής εξειδίκευσης του αντισώματος με τον αντίστοιχο στόχο του. Σε μια ανοσοδοκιμή, το δείγμα που περιέχει την προς μελέτη ένωση (το αντιγόνο) ανταγωνίζεται ένα επισημασμένο αντιγόνο (δείκτη) για ένα συγκεκριμένο αντίσωμα, με αποτέλεσμα μια αλλαγή στο σήμα. Εναλλακτικά, ο δείκτης χάνει την επισημασμένη του ουσία και συνδέεται με το ακινητοποιημένο αντίσωμα εάν δεν χρησιμοποιείται επισημασμένο αντίσωμα. Τα αντιγόνα μεγαλύτερων συζεύξεων μορίου-ενζύμου είναι τα συστατικά που ανιχνεύονται συχνότερα χρησιμοποιώντας ανοσοπροσδιορισμούς.

Η πλειονότητα των συστημάτων ανοσοπροσδιορισμού λειτουργούν με βάση μια ενιαία αρχή, η οποία περιλαμβάνει δύο διακριτά στάδια: αλληλεπίδραση αντιγόνου-αντισώματος και μέτρηση σήματος. Αυτά τα στάδια χρησιμοποιούνται για την ποσοτικοποίηση των συλλεγόμενων σημάτων και τον προσδιορισμό του επιπέδου έκθεσης σε ανοσοαντιδραστήριο (Serebrennikova et al. 2020). Η ευαισθησία μιας δοκιμασίας είναι η ικανότητα ανίχνευσης εξαιρετικά μικρών ποσοτήτων του παράγοντα, η οποία είναι η μικρότερη συγκέντρωση του παράγοντα που μπορεί να μετρηθεί με ένα αποδεκτό επίπεδο ακρίβειας και αξιοπιστίας (Pietschmann et al. 2020). Αυτή η ικανότητα εξαρτάται κυρίως από τους ανοσοποιητικούς μηχανισμούς. Η ειδικότητα της ανοσολογικής αλληλεπίδρασης και της λειτουργίας που μετράται αναφέρεται ως εξειδίκευση προσδιορισμού. Οι ανοσοδοκιμές που έχουν σχεδιαστεί για την ανίχνευση αντιβιοτικών θα πρέπει να είναι εξαιρετικά εξειδικευμένες και ευαίσθητες. Τα ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα μπορεί να προκύψουν από χαμηλή ευαισθησία, ενώ τα ψευδώς θετικά μπορεί να προκύψουν από χαμηλή ειδικότητα (Zhao et al. 2023). Ο κλάδος μπορεί να υποστεί σημαντικές απώλειες σε κάθε σενάριο. Συνεπώς, οι ανοσοδοκιμές πρέπει να λειτουργούν στα βέλτιστα επίπεδα. Σε πολλές περιπτώσεις, μπορούν να χρησιμοποιηθούν ανοσοπροσδιορισμοί για την ανίχνευση αντιβιοτικών (Hendrickson et al. 2021). Ωστόσο, τα αντισώματα ενάντια σε ένα ευρύ



φάσμα ενώσεων με συγκρίσιμες δομές είναι πιο συχνά απαραίτητα λόγω της ομόλογης δομής του γονικού μορίου ή/και ενός ενεργού μεταβολίτη (Ahmed et al.2020).

Γενικά, οι τεχνικές ανοσοδοκιμασίας για την ανίχνευση αντιβιοτικών μπορούν να κατηγοριοποιηθούν είτε ως ανταγωνιστικοί είτε ως μη ανταγωνιστικοί τρόποι ανίχνευσης. Από τη μία πλευρά, οι μη ανταγωνιστικές μέθοδοι, οι οποίες σχετίζονται με άμεσες αναλύσεις, διεξάγονται κυρίως με βάση τις αλλαγές σήματος (Sotnikov et al.2021). Αντίθετα, οι ανταγωνιστικές μέθοδοι βασίζονται στον ανταγωνισμό μεταξύ της αναλύμενης ουσίας και ενός επισημασμένου αναλόγου αντιβιοτικού (Bai et al.2021). Είναι επιτακτική ανάγκη να αξιολογηθούν τα πλεονεκτήματα και οι περιορισμοί και των δύο μορφών ανάλυσης στο σύνολό τους (Sotnikov et al.2022). Για παράδειγμα, οι μη ανταγωνιστικές μορφές τυπικά παρουσιάζουν ανώτερη ευαισθησία σε προσδιορισμούς που βασίζονται σε μονοκλωνικά αντισώματα, αλλά αυτές οι μορφές απαιτούν μεγαλύτερη διάρκεια από τις ανταγωνιστικές δοκιμασίες. Στην πράξη, μπορούν να δημιουργηθούν πακέτα ταχείας δοκιμής για τη διεξαγωγή επιτόπιων δοκιμών προσυμπτωματικού ελέγχου, οι οποίες συνήθως έχουν περιορισμούς ευαισθησίας, με βάση τη στρατηγική ανίχνευσης (Harada et al., 2021). Η επιλογή μιας κατάλληλης μεθόδου ανοσοδοκιμασίας για έναν συγκεκριμένο στόχο εξαρτάται από τα χαρακτηριστικά του αντιβιοτικού στόχου σε συνδυασμό με τον συγκεκριμένο τύπο δείγματος, καθώς και από την αρχή μιας δοκιμασίας (Liang et al.2024) (Liu et al.2024).

Είναι σημαντικό να βελτιστοποιηθεί μια ανοσοδοκιμασία προκειμένου να επιτευχθεί το επιθυμητό επίπεδο απόδοσης στην ανίχνευση αντιβιοτικών (Gorris and Soukka , 2022). Ο σχεδιασμός της ανοσοδοκιμασίας απαιτεί την επιλογή των θεμελιωδών ιδιοτήτων αντισωμάτων. Η ανάπτυξη μιας κατάλληλης μορφής ανάλυσης είναι ζωτικής σημασίας για την καταπολέμηση των αιτίων που σχετίζονται με την ευαισθησία (Minic and Zivkovic, 2020). Η κατασκευή μεμονωμένων μορφών απαιτεί έναν συμβιβασμό μεταξύ της θεμελιώδους θεωρίας και των πραγματικών τεχνικών, καθώς κάθε μορφή έχει τις δικές της μοναδικές αρχές λειτουργίας και απαιτήσεις. Αυτές οι μορφές μπορούν να κατηγοριοποιηθούν σε τυπική μορφή και σε μεγάλο αριθμό παραλλαγών. Η ευαισθησία των μεθόδων που χρησιμοποιούνται είναι κρίσιμος παράγοντας για την ακρίβεια και την αξιοπιστία μιας μορφής ανοσοδοκιμασίας και είναι σημαντικό να δίνεται προσοχή (Favresse et al. 2020). Το ευφάνταστο σύνολο των



μεθόδων που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την αναγνώριση του στόχου δημιουργείται από το συνδυασμό μιας θεμελιώδη αρχή και μιας συγκεκριμένης τεχνικής (Luo et al.2023).

### **3.7.1. Τύποι ανοσοδοκιμών**

Τα αντιβιοτικά εξετάζονται εκτενώς χρησιμοποιώντας ανοσοπροσδιορισμούς (Ahmed et al. 2020). Μπορούν να αναπτυχθούν διάφορες ποικιλίες ανοσοπροσδιορισμών με βάση την ανοσοχημική αρχή. Αυτές οι ανοσοδοκιμές μπορούν να μετατραπούν σε ετερογενείς και ομοιογενείς ανοσοπροσδιορισμούς, οι οποίοι χαρακτηρίζονται με χειροκίνητη ή αυτόματη ανάλυση, αντίστοιχα (Guly and Dykman, 2024, Haiping et al., 2021, Alnassrallah et al., 2022)

Σύμφωνα με τα διάφορα υπολείμματα αντιβιοτικών και τους τύπους δειγμάτων, είναι επιτακτική η επιλογή της κατάλληλης μορφής και μεθόδου ανοσοδοκιμασίας. Οι ανοσοδοκιμές βασίζονται σε εκλεκτικά και ειδικά αντισώματα που μπορούν είτε να συλλάβουν αντιγόνα είτε να επισημαίνονται σε αντιγόνα με διάφορους τρόπους. Οι άμεσες ανοσοδοκιμές (ομογενείς), οι ανταγωνιστικές ανοσοδοκιμές (ετερογενείς) και οι πολυαναλυτικές ανοσοδοκιμές που βασίζονται σε αντισώματα κατά της ανάλυσης είναι οι κύριες κατηγορίες στις οποίες χωρίζονται (Haiping et al., 2021). Οι ανοσοδοκιμές προσφέρουν πολυάριθμα οφέλη, όπως υψηλή ειδικότητα, ευαίσθητη ανίχνευση, γρήγορη εφαρμογή και ευκολία στη λειτουργία. Ωστόσο, η επιλογή της κατάλληλης ανοσοδοκιμασίας επηρεάζει σημαντικά την ανίχνευση των αντιβιοτικών. Αυτή η ενότητα θα παρέχει μια ολοκληρωμένη ανασκόπηση των διαφόρων ανοσοδοκιμών, των χαρακτηριστικών τους και των εφαρμογών τους, υπό το φως της εισαγωγής των ανοσοδοκιμών (Ahmed et al. 2020).

#### **3.7.1.1. Ενζυμική Ανοσοροφητική Δοκιμασία (ELISA)**

Η ανίχνευση αντιβιοτικών χρησιμοποιεί συχνά ενζυμικές ανοσοπροσροφητικές δοκιμασίες (ELISAs). Γενικά, η ELISA είναι μια δοκιμασία σάντουιτς που εξαρτάται από τη δέσμευση ενός ειδικού αντισώματος σε ένα αντιγόνο. Η αναλυόμενη ουσία (αντιγόνο) ακινητοποιείται σε μια στερεά φάση, και στη συνέχεια, ένα σημασμένο με ένζυμο αντίσωμα συνδέεται με την αναλυόμενη ουσία. Το ένζυμο έρχεται σε άμεση γειτνίαση με το ειδικό του υπόστρωμα ως αποτέλεσμα της δέσμευσης των

επισημασμένων με ένζυμο αντισωμάτων (Zhao et al., 2020). Η ποσότητα του αντιγόνου στο άγνωστο δείγμα μπορεί να εξακριβωθεί παρακολουθώντας τον κύκλο εργασιών αυτού του υποστρώματος. Ένα χρώμα παράγεται τυπικά με τη χρήση ενός υποστρώματος του ενζύμου. Η συγκέντρωση της αναλυόμενης ουσίας προσδιορίζεται με μέτρηση της απορρόφησης ή της φωταύγειας. Τα χαρακτηριστικά του άγνωστου δείγματος εξάγονται σχεδιάζοντας μια τυπική καμπύλη γνωστών συγκεντρώσεων αναλυόμενης ουσίας έναντι της απορρόφησης ή της φωταύγειας. Υπάρχει μια ποικιλία υποστρωμάτων και ετικετών που η χρήση τους μπορεί να αυξήσει σημαντικά την ευαισθησία και την ειδικότητα ή για να μειώσει τον χρόνο που απαιτείται για μια ανάλυση (Ahmed et al., 2020). Η δέσμευση ενός επισημασμένου με ένζυμο δευτερογενούς αντισώματος στο πρωτεΐν αντίσωμα, το οποίο στρέφεται εναντίον ενός συγκεκριμένου αντιγόνου, είναι μία από τις σημαντικές τροποποιήσεις σχεδιασμού (Kumar et al., 2020). Μια τοπική ενζυματική αντίδραση ξεκινά από δεσμευμένες ενζυμικές ετικέτες στη στερεά φάση, οι οποίες μετατρέπουν ένα χρωμογόνο υπόστρωμα σε ένα έγχρωμο προϊόν που μπορεί να ποσοτικοποιηθεί φασματοφωτομετρικά. Η συγκέντρωση του δείγματος αντιβιοτικού σε ng/mL είναι αντιστρόφως ανάλογη με την ένταση του χρώματος (Adabi et al., 2024).

Οι δοκιμές αναστολής διεξάγονται με συνδυασμό μιας γνωστής ποσότητας επισημασμένου με ένζυμο αντισώματος με το δείγμα. Η ανταγωνιστική αντίδραση θα παράγει το αναλογικό με το φάρμακο επισημασμένο αντίσωμα στο υπερκείμενο, το οποίο θα ανιχνευθεί. Η ακρίβεια των ανοσοδοκιμών, όπως η ELISA και οι ανοσοαισθητήρες, για την ανίχνευση αντιβιοτικών σε τρόφιμα και ζωοτροφές είναι βελτιωμένη σε σύγκριση με τη μικροβιακή αναστολή λόγω της υψηλής ευαισθησίας τους (Pietschmann et al., 2020). Το κύριο όφελος αυτών των αναλύσεων είναι η ικανότητά τους να αναλύουν μια σημαντική ποσότητα δειγμάτων σε εύλογο χρονικό διάστημα. Η έρευνα επικεντρώθηκε κυρίως στις επιμολύνσεις των τροφίμων και στην κλινική διάγνωση. Τα εμπορικά κιτ ELISA χρησιμοποιούνται ιδιαίτερα στην κτηνιατρική δοκιμή υπολειμμάτων φαρμάκων γάλακτος, μελιού, αυγών, ζώων και υδατοκαλλιέργειας. Σε ορισμένες χώρες, αυτά τα κιτ θεωρούνται νόμιμες δοκιμές υπολειμμάτων αντιβιοτικών. Το μόνο μειονέκτημα είναι η ανάγκη για προετοιμασία δείγματος και μια παρατεταμένη διαδικασία για να ληφθεί ένα καθαρό εκχύλισμα.

Επομένως, οι τεχνικές ELISA είναι τόσο εφαρμόσιμες όσο και αξιόπιστες για την παρακολούθηση αντιβιοτικών (Xiong et. al., 2020, Pounmalai et al., 2021).

### 3.7.1.2. Ανοσοδοκιμασία φθορισμού

Από την ανακάλυψη των φθορίζουσών ενώσεων, η ανίχνευση φθορισμού έχει γίνει μια ευρέως χρησιμοποιούμενη και καθιερωμένη μέθοδος. Τα σήματα φθορισμού διαθέτουν τα πλεονεκτήματα της υψηλής ευαισθησίας και ακρίβειας στο μέσο διασποράς εντός συγκεκριμένων περιοχών, γεγονός που τα καθιστά ικανά να διακρίνουν μικρές αλλαγές που είναι πέρα από τα όρια ανίχνευσης των συμβατικών ανοσοδοκιμών (Guo et al.2023). Για παράδειγμα, η ανίχνευση του ATP ήταν ουσιαστικά πιο ευαίσθητη μέθοδος από ό,τι οι παραδοσιακοί ανοσοπροσδιορισμοί λόγω της ενίσχυσης τριών σταδίων που διευκολύνθηκε από την τεχνική ανίχνευσης σήματος χημειοφωταύγειας, η οποία περιλάμβανε αλκαλική φωσφατάση και μια όξινη ουσία (Chen et al., 2021). Οι τεχνικές πολύχρωμης επισήμανσης φθορισμού μπορούν να χρησιμοποιηθούν στη μικροσκοπία φθορισμού για τον εντοπισμό διαφόρων πρωτεϊνών που εκφράζονται από διαφορετικά γονίδια. Το σήμα φθορισμού συνοδεύεται σταθερά από υψηλή αναλογία σήματος ως αποτέλεσμα της αυξημένης ευαισθησίας. Η ευαισθησία της ανάλυσης θα ενισχυθεί με τη συμπερίληψη μιας φθορίζουσας ετικέτας. Μια πρόσθετη ορατή ετικέτα θα αυξήσει την ισοδύναμη συγκέντρωση κατά 1000 φορές, με αποτέλεσμα μια τελική ποσότητα  $1 \times 10^8$  μορίων, υποθέτοντας ότι το τυπικό μικροσκόπιο φθορισμού έχει ευαισθησία ανίχνευσης  $10^{-1}$  m συγκέντρωση ισοδύναμη με μια τελική ποσότητα τουλάχιστον  $1 \times 10^5$  μόρια (Sargazi et al.2022) (Dai et al., 2020).

Η ανοσοδοκιμασία φθορισμού είναι απλή στη λειτουργία, με γρήγορο ρυθμό ανίχνευσης και μειωμένη μη ειδική δέσμευση, επιπλέον της ενίσχυσης σήματος. Η φθοριοανοσοδοκιμασία έχει σημαντικές δυνατότητες για την ανίχνευση υπολειμμάτων αντιβιοτικών, συμπεριλαμβανομένης της ανίχνευσης υπολειμμάτων τετρακυκλίνης στο μέλι (Wang et al.2020). Πρόσφατα, έχει αναφερθεί ανοσοχρωματογραφική λωρίδα βασισμένη σε φθορισμό για την ταυτόχρονη ανάλυση πολλαπλών αναλυτών σε μία μόνο συσκευή. Το μικροόργανο με υψηλή ευαισθησία για χαμηλής ισχύος υπεριώδη ακτινοβολία μπορεί να κατασκευαστεί χρησιμοποιώντας τα στιβαρά, φθηνά UV-LED

και UV-CCD (Dong et al., 2024). Η ένταση του σήματος φθορισμού σχετίζεται με τη συγκέντρωση του βακτηρίου με γραμμικό τρόπο. Τα αποτελέσματα των τυπικών δειγμάτων δεν είναι αναπαραγώγιμα, παρά τα χαμηλά όρια ανίχνευσης (Ashuo et al. 2020). Συνοπτικά, η δυνατότητα ανίχνευσης αντιβιοτικών είναι υψηλή λόγω της συμπερίληψης αντισωμάτων που εμφανίζουν φθορισμό. Νέα συστήματα ανοσοπροσδιορισμού με αυξημένη ευαισθησία και σκοπιμότητα θα μπορούσαν να δημιουργηθούν εάν γίνουν περαιτέρω εξελίξεις στην ευαισθησία του ανιχνευτή και στο μήκος κύματος του φωτός. Η δομή και το όργανο ανίχνευσης είναι τα κύρια πλεονεκτήματα των τεχνικών φθοριοανοσοδοκιμασίας (Tao et al., 2020). Αυτή η μέθοδος είναι οικονομικά αποδοτική και δεν απαιτεί την ενίσχυση του φωτός, όπως συνέβη με τη μέθοδο ανοσοαισθητήρα (Pan et al. 2022).

### **3.7.2. Η δημιουργία αναλύσεων με βάση τα αντισώματα για την ανίχνευση αντιβιοτικών**

Η ανάπτυξη ειδικών, υψηλής ποιότητας αντισωμάτων είναι η παραδοσιακή προσέγγιση για την ανίχνευση αντιβιοτικών σε ανοσοπροσδιορισμούς. Οι φάσεις αποτελούνται από την επιλογή ενός κατάλληλου ανοσογόνου, την ποιότητα και τον τρόπο χρήσης των ζώων παραγωγής, τη μέθοδο διαλογής για τον εντοπισμό αντισωμάτων υψηλής συγγένειας και ελέγχους ποιότητας για την επαλήθευση της εξειδίκευσης του στόχου (Bossuyt et al. 2020). Υπάρχουν δύο κύριες μέθοδοι για την παραγωγή αντισωμάτων: ανάπτυξη τεχνολογίας υβριδίου, η οποία διευκολύνεται από κυτταρικές συντήξεις και η κατασκευή αντισωμάτων με χρήση εμφάνισης φάγου (Liu et al., 2021). Καθώς και οι δύο είναι εξαιρετικά ισχυρές τεχνολογίες, η απόφαση καθορίζεται πρωτίστως από το εύρος του έργου και την επιθυμητή λειτουργία αντισωμάτων. Στο τέλος του 20ου αιώνα, η μηχανική αντισωμάτων, η οποία χρησιμοποιούσε τεχνικές ανασυνδυασμού, εμφανίστηκε ως μια πολλά υποσχόμενη τεχνολογία. Η εργαλειοθήκη για προσαρμοσμένα αντισώματα έχει επεκταθεί σημαντικά από αυτές τις τεχνολογίες. Η ειδικότητα και η ευαισθησία μιας ανοσοδοκιμασίας είναι οι πιο κρίσιμοι παράγοντες για την καθιέρωσή της και η παραγωγή αντισωμάτων επηρεάζει άμεσα αυτές τις παραμέτρους (Fox et al. 2022).

Υπάρχουν πολλές διαθέσιμες μέθοδοι για την παραγωγή ή την ενίσχυση αντισωμάτων για ανοσοπροσδιορισμούς. Τα πιο σημαντικά εμπόδια στην ανάπτυξη

αντισωμάτων είναι η σταθερή και ειδική βιοχημική δέσμευση αντισωμάτων με τον στόχο, καθώς και η ποσότητα των διασταυρούμενων αντισωμάτων στην περίπτωση πολυκλωνικών, υβριδωμάτων και συνθετικών αντισωμάτων, σε μικρότερο βαθμό. Η επικύρωση είναι απαραίτητη για τη διασφάλιση της εξαιρετικής ποιότητας της ανάλυσης (Pettinato, 2021). Αυτό μπορεί να περιλαμβάνει εκτενείς μελέτες σύγκρισης πινάκων και επικύρωση σε ένα μόνο εργαστήριο. Το δυναμικό της μηχανικής αντισωμάτων έχει δημιουργήσει ευκαιρίες για την ενίσχυση των υπάρχουσών αναλύσεων, καθώς και για την τυποποίηση των αναλύσεων, τη μείωση του κόστους και την τυποποίηση των αντιδραστηρίων (Akbar et al., 2022). Αυτό είναι ιδιαίτερα κρίσιμο για την ανάπτυξη δοκιμών υπερευαισθησίας, όπως αυτές που χρησιμοποιούνται σε περιβάλλοντα σημείου φροντίδας. Η ανοσοδοκιμασία μπορεί να δημιουργηθεί πιο γρήγορα μέσω τεχνικών μηχανικής αντισωμάτων, όπως η παραγωγή αντισωμάτων υψηλής απόδοσης και η ενισχυμένη ανοσοποίηση. Ο χρόνος που απαιτείται για τη δημιουργία ανασυνδυασμένων αντισωμάτων μπορεί να κυμαίνεται από μερικές εβδομάδες έως δύο μήνες (Lu et al., 2020). Επιπλέον, η διαδικασία ανασυνδυασμού είναι πιο εύκολα επεκτάσιμη από τη διαδικασία υβριδώματος όταν απαιτούνται πολυκλωνικά αντισώματα (Carter and Rajpal, 2022).

### **3.7.3. Παραγωγή αντισωμάτων για ανοσοπροσδιορισμούς**

Το πιο κρίσιμο συστατικό μιας ανοσοδοκιμής για αυτούς τους τύπους υπολειμμάτων είναι τα αντισώματα που έχουν σχεδιαστεί ειδικά για την ανίχνευση αντιβιοτικών, τα οποία είναι μέθοδοι που βασίζονται στα αντισώματα ως υποδοχείς (Hendrickson et al., 2021). Προκειμένου να προκληθεί ανοσοαπόκριση, η δέσμευση της πρωτεΐνης σε αποκαψυλωμένα βακτήρια σε συνδυασμό με ένα σύνθετο ανοσοενισχυτικό είναι απαραίτητη για την έγχυση αντιγόνων χαμηλού μοριακού βάρους, όπως τα απτένια. Μόλις αναγνωριστεί ένα συζυγές απτενίου-φορέα που παράγει αντιγόνο ή προσροφημένη πρωτεΐνη, μπορούν να ληφθούν αντισώματα (Majdinasab et al., 2020). Η τεχνολογία υβριδώματος μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη δημιουργία ενός μονοκλωνικού αντισώματος με τη σύντηξη Β λεμφοκυττάρων ενός ανοσοποιημένου ποντικού με κύτταρα μυελώματος, το οποίο απαθανατίζει το Β-κύτταρο (Lei et al., 2022). Στη συνέχεια μπορούν να επιλεγούν τα πιο αποτελεσματικά μονοκλωνικά αντισώματα. Τα μονοκλωνικά αντισώματα είναι ομοιόμορφα, ειδικά και

παράγονται και απελευθερώνονται από κλωνικά B-κύτταρα (Ahmed et al., 2020; Haiping et al., 2021).

Τα πολυκλωνικά αντισώματα, τα οποία συλλέγονται από πολλαπλά B-κύτταρα, είναι ένα πιο ετερογενές μείγμα αντισωμάτων, παρόλο που είναι πιο απλά στην παραγωγή από τα μονοκλωνικά αντίστοιχά τους (Keating et al.2020). Η χρήση πολυκλωνικών αντισωμάτων περιλαμβάνει την αλληλεπίδραση μεταξύ πολλαπλών B-κυττάρων, τα οποία προέρχονται από διαφορετικά κύτταρα, και την έκθεση σε περισσότερους από έναν επίτοπους κατά τη διάρκεια μιας ανοσοποίησης. Ορισμένες από τις σημαντικές ανταλλαγές περιλαμβάνουν τις σταθερές διαφορές από παρτίδα σε παρτίδα, τη γενικά χαμηλή σταθερά δέσμευσης σε πολλά αντιγόνα και την παραγωγή υψηλότερου όγκου αντισωμάτων στα ζώα (Lehmann et al.2024). Τα πολυκλωνικά και μονοκλωνικά αντισώματα υπόκεινται σε πολλά σημαντικά μειονεκτήματα, όπως ακάθαρτα δείγματα, μεταβλητές αποδόσεις παραγωγής και μακροχρόνια μόρια στόχευσης, παρά τα ουσιαστικά πλεονεκτήματά τους. Τα αντισώματα στη συνέχεια τροποποιούνται για να βελτιώσουν την αποτελεσματικότητά τους σε εφαρμογές ανοσοδοκιμασίας αφού ληφθούν. Αυτό μπορεί να επιτευχθεί με τη χρήση τεχνικών PEGylation, βιοτινυλίωσης και κατακερματισμού αντισωμάτων. Τόσο οι μετρήσεις βάρους όσο και οι μεθοδολογίες μέτρησης είναι κρίσιμα συστατικά των πρωτοκόλλων ανοσοδοκιμών (Yao et al.2024). Συνεπώς, είναι υψίστης σημασίας η συνεχής παρακολούθηση της απορρόφησης ενός ανοσογόνου σε συγκεκριμένες μήτρες φορέα, όπως γυαλί, πλαστικό ή οποιοδήποτε άλλο στερεό. Η μεθοδολογία καθαρισμού εφαρμόζεται για την αποκατάσταση της καθαρότητάς του για χρήση σε συστήματα ανοσολογικών δοκιμασιών. Οι ακινητοποιημένες καθαρισμένες πρωτεΐνες αντιγόνου αναλύονται χρησιμοποιώντας ανοσολογική ανίχνευση (Keating et al.2021).

Συνοψίζοντας, για να ακινητοποιηθούν αποτελεσματικά μεγάλες ποσότητες αντιγόνων με ελάχιστη τροποποίηση, οι μέθοδοι πρέπει να είναι απλές στην εκτέλεση, όχι με κίνητρα κόστους και μικρού όγκου (Fernández et al. 2020). Ο ποιοτικός έλεγχος του αντιγόνου μετά τη διαδικασία ακινητοποίησής του είναι απαραίτητος για την έγκριση τέτοιων εφαρμοστέων τεχνικών (Cavaco et al., 2022). Όλες οι διαδικασίες στη διαδικασία πρέπει να διασφαλίζουν επαρκές αντιγόνο (Ahmed et al. 2020). Η μάζα ενός αντισώματος είναι υψίστης σημασίας στην εφαρμογή μιας ανεπτυγμένης ανοσοδοκιμασίας για αυτό το συγκεκριμένο αντιγόνο (Gopal et al. 2022). Η παραγωγή



ενός αντισώματος για την ανίχνευση ενός αντιβιοτικού απαιτεί την πλήρη διασφάλιση όλων των διαδικασιών προκειμένου να ληφθεί το επιθυμητό αντίσωμα (Regulski et al. 2021 ).

### 3.8. ΒΙΟΑΙΣΘΗΤΗΡΕΣ

Οι βιοαισθητήρες ταξινομούνται ως συσκευές ανίχνευσης που βασίζονται σε υποδοχείς, οι οποίες συνήθως αποτελούνται από ένα βιολογικό αισθητήριο στοιχείο που είναι αποτελεσματικά ενσωματωμένο με ένα στοιχείο σήματος ή μεταγωγής (Chadha et al.2022). Γενικά, οι βιοαισθητήρες είναι σχηματικές διατάξεις που μπορούν να μετατρέψουν την παρουσία ή τη συγκέντρωση επιθυμητών ουσιών σε ηλεκτρονικά, οπτικά και ηλεκτροχημικά σήματα (Naresh and Lee, 2021). Οι βιομιμητικοί καταλύτες και οι ουσίες βιοαναγνώρισης, όπως ένζυμα, αντισώματα, νουκλεϊκά οξέα, ιστοί ή κύτταρα, αποδίδονται σε μεγάλο βαθμό στις πρωταρχικές απαιτήσεις κάθε βιοαισθητήρα: ευαίσθητη ανίχνευση, ταχεία απόκριση, απλή χρήση και σμίκρυνση. Μια «γεννήτρια» σήματος, ένας υποδοχέας, η συσκευή ένδειξης και ο μετατροπέας είναι τα τέσσερα κύρια συστατικά ενός βιοαισθητήρα (Singh et al.2020).

Η δυνατότητα των βιοαισθητήρων να αναλύουν μια τεράστια γκάμα ενώσεων, ιδιαίτερα αντιβιοτικών, είναι σημαντική. Οι βιοαισθητήρες θεωρούνται ως μια νέα τεχνολογία για την ανίχνευση ενώσεων λόγω της υψηλής απόδοσης, της γρήγορης απόκρισης, του ελάχιστου χειρισμού δειγμάτων και της ακρίβειας ανίχνευσης (Naresh and Lee, 2021). Οι βιοαισθητήρες χρησιμοποιούνται ως εναλλακτική μέθοδος σε σχέση με τις τρέχουσες συμβατικές τεχνικές για την ταχεία ανίχνευση αντιβιοτικών στα τρόφιμα και ως μια πρακτική και συμφέρουσα μέθοδος για μια ποικιλία εφαρμογών, συμπεριλαμβανομένης της προστασίας του περιβάλλοντος, της κλινικής διάγνωσης και των υπολειμμάτων φαρμάκων στα τρόφιμα (Abdelbasset et al. 2022). Συμπερασματικά, οι βιοαισθητήρες μπορούν να χρησιμοποιηθούν αποτελεσματικά σε εθνικά προγράμματα εξ' ολοκλήρου για την προστασία της υγείας του κοινού, την καταπολέμηση της τρομοκρατίας και τη συμμετοχή σε βιοπόλεμο (Chadha et al.2022).

Προκειμένου να διευκολυνθεί μια πιο ολοκληρωμένη κατανόηση των βιοαισθητήρων, έχουν κατηγοριοποιηθεί σε διάφορες κατηγορίες με βάση τους μηχανισμούς που χρησιμοποιούνται στα αντίστοιχα πεδία εφαρμογής τους: (1) Ενζυματικοί

βιοαισθητήρες (2) Ανοσοαισθητήρες (3) Βιοαισθητήρες βασισμένοι σε DNA (απτααισθητήρες) (4) Βιοαισθητήρες για μικροοργανισμούς (Huang et al., 2021).

Ένζυμα, μιμητικά νανοσωματίδια ζιρκονίας, θειοχολίνη και ακετυλοχολινεστεράση χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση αντιβιοτικών, συμπεριλαμβανομένων των τετρακυκλινών, σε έναν ενζυματικό βιοαισθητήρα που χρησιμοποιείται συχνά για την ανίχνευση αντιβιοτικών (Tetyana et al., 2021). Οι ανοσοαισθητήρες είναι μια κατηγορία βιοαισθητήρων που βασίζονται σε δύο κύρια συστατικά: έναν μορφοτροπέα, ο οποίος εξαρτάται από την ενσωμάτωση του ανοσολογικού στοιχείου ή του βιολογικού στοιχείου (π.χ. αντισώματα, αντιγόνα) είτε με αμπερομετρικούς είτε με ποτενσιομετρικούς αισθητήρες Kulkarni et al., 2022). Οι επικαλυμμένοι με αντιγόνο ανοσοαισθητήρες, οι οποίοι χρησιμοποιούν βακτηριοφάγους ή μεθόδους εμφάνισης φάγων για την παραγωγή αντιγόνων που αναγνωρίζουν το καθορισμένο δεσμευτικό αντίσωμα ή πεπτίδιο, και οι ανοσολογικοί βιοαισθητήρες, που χρησιμοποιούν βιολογικά στοιχεία όπως αντισώματα, είναι οι δύο τύποι ανοσοαισθητήρων που χρησιμοποιούνται αυτήν τη στιγμή (Naresh and Lee, 2021). Στο πρόσφατο παρελθόν, υβρίδια DNA-αντισώματος έχουν επίσης χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση αντιβιοτικών, παρουσιάζοντας υψηλότερη ικανότητα φόρτωσης και βελτιωμένη εκλεκτικότητα, καθώς και γρήγορη κινητική. Για τον σκοπό της μικροβιακής ανίχνευσης, χρησιμοποιούνται ενζυματικοί βιοαισθητήρες ή κύτταρα, όπως το *Escherichia coli* (Singh et al. 2020).

Εκτός από τους περιορισμούς τους, καθένας από τους βιοαισθητήρες που αναφέρονται έχει το δικό του σύνολο πλεονεκτημάτων που χρησιμοποιούνται για τις αντίστοιχες εφαρμογές τους. Ενώ καθεμία από τις προαναφερθείσες κατηγορίες έχει τη δική της προηγμένη εφαρμογή στο σύστημα ανίχνευσης, οι δοκιμές σημείου εφαρμογής και η περιβαλλοντική παρακολούθηση είναι τομείς στους οποίους αντιμετωπίζονται τα ζητήματα της ελάχιστης ανάλυσης δειγμάτων, της υψηλής κατανάλωσης χρόνου κ.λπ. Επιπλέον, οι βιοαισθητήρες αναπτύσσονται επί του παρόντος με σκοπό την ανίχνευση αντιβιοτικών, και αναμένεται ότι θα είναι ευεργετικοί για μελλοντικές ανιχνεύσεις. (Zhang et al., 2020).



## 4. Εναλλακτικές λύσεις στη χρήση αντιβιοτικών στην κτηνοτροφία

### 4.1. Τρέχουσα έρευνα και καινοτομίες στις εναλλακτικές λύσεις αντιβιοτικών

Τα τελευταία χρόνια, η έρευνα έχει εντοπίσει καινοτόμες εναλλακτικές λύσεις που έχουν τη δυνατότητα να χρησιμοποιηθούν αντί για αντιβιοτικά (Meisner et al.2022). Μια συμπληρωματική στρατηγική περιλαμβάνει τη χρήση μοριακών τεχνικών αιχμής για την πρόληψη των λοιμώξεων από τα ζώα και την εξάλειψη της ανάγκης για αντιβιοτικά (Qadri et al.2020) (Peixoto et al.2021).

Η αποτελεσματικότητα των αιθέριων ελαίων στη ρύθμιση της εντερικής μικροχλωρίδας και στην προώθηση της παραγωγής ωφέλιμων βακτηρίων έχει αποδειχθεί μέσω της χρήσης άλλων παρεμβάσεων ή συμπληρωμάτων διατροφής, συμπεριλαμβανομένων φυτοβιοτικών και αντιμικροβιακών πεπτιδίων ( Hussein et al. 2020). Ένας νέος τομέας αναδύεται που αξιοποιεί τις πλεονεκτικές ιδιότητες των βιοδραστικών ενώσεων που προέρχονται από φυτά για τη βελτίωση της υγείας του εντέρου των κοτόπουλων κρεατοπαραγωγής. Προηγούμενη έρευνα έχει δείξει ότι τα φυτοβιοτικά μπορούν να ενισχύσουν την πρόσληψη τροφής, την αύξηση βάρους και τους ρυθμούς μετατροπής της τροφής (Biyatmoko et al. 2021). Είναι ζωτικής σημασίας να δοθεί προτεραιότητα στις εργασίες που σχετίζονται με αυτές τις ολοκαίνουργιες προσεγγίσεις ή να αναπτυχθεί μια συνεκτική διερεύνηση αυτών των παρεμβάσεων σε συνεργασία με τους ειδικούς, προκειμένου να δημιουργηθεί ένα κατάλληλο περιβάλλον για συνεργασίες μεταξύ ερευνητών σε διάφορους επιστημονικούς τομείς, καθώς και της βιομηχανίας και των υπευθύνων χάραξης πολιτικής (Olayemi et al. 2020). Επιπλέον, πρέπει να αξιολογηθεί η δυνατότητα για συνέργεια με το σύστημα παραγωγής, καθώς και η ποικιλομορφία των επιπτώσεων αυτών των προσεγγίσεων. Είναι επιτακτική ανάγκη αυτές οι καινοτόμες ερευνητικές γραμμές, μερικές από τις οποίες βρίσκονται επί του παρόντος σε εμβρυακό στάδιο, να ενσωματώνουν τη γνώση από διάφορες οπτικές γωνίες για να στερεοποιήσουν τα θεμέλια της βιώσιμης κτηνοτροφίας (Alghirani et al. 2021). Γενικά, η έρευνα για τις εναλλακτικές λύσεις που συζητούνται εκτιμάται ή χρηματοδοτείται λιγότερο σε σύγκριση με άλλα πιο ενδιαφέροντα εμπορικά και επιστημονικά θέματα. Προκειμένου να δημιουργηθεί ένα

βιώσιμο σύστημα αγροδιατροφικών προϊόντων, υπάρχει σημαντική ευκαιρία τόσο για τη βιομηχανία όσο και για την έρευνα να επωφεληθούν από τις αυξημένες επενδύσεις και την ανάπτυξη αντιμικροβιακών εναλλακτικών λύσεων από τις κυβερνήσεις ή τις επιχειρήσεις (Tavangar et al. 2021). Έχοντας αυτό κατά νου, ο εντοπισμός πιθανών εναλλακτικών λύσεων δεν υποδηλώνει απαραίτητα ότι θα υιοθετηθούν ή ότι είναι κοινωνικά αποδεκτές. Η αποδοχή αυτής της προσέγγισης θα αξιολογηθεί μέσω συζητήσεων με διαχειριστές, καταναλωτές και διάφορους ρυθμιστικούς και υποστηρικτικούς οργανισμούς (Zaikina et al. 2022).

Διάφορες εναλλακτικές λύσεις στη χρήση αντιβιοτικών αναπτύσσονται ολοένα και συχνότερα στη κτηνοτροφία. Πολλές από αυτές τις εναλλακτικές λύσεις, παρόμοιες με τα αντιβιοτικά, έχουν αποδειχθεί ότι έχουν ιδιότητες προαγωγής της ανάπτυξης ή άλλες πλεονεκτικές επιδράσεις στην υγεία των ζώων (Mann et al. 2021). Ορισμένα προϊόντα, συμπεριλαμβανομένων των προβιοτικών, έχει αποδειχθεί ότι έχουν ευεργετικά αποτελέσματα στην ανάπτυξη και τη λειτουργικότητα του γαστρεντερικού σωλήνα σε πτηνά και χοίρους. Πολλά άλλα είναι μη εύπεπτα υποστρώματα υδατανθράκων που είτε έχουν άμεσες επιδράσεις στο έντερο είτε προορίζονται να χρησιμοποιηθούν ως υποστρώματα για προβιοτικά για την τόνωση της ανάπτυξης ωφέλιμων μικροοργανισμών (More, 2020). Τα φυτογονικά είναι πρόσθετα ζωοτροφών που προέρχονται από φυτικά υλικά και έχουν ευεργετικές επιδράσεις στον γαστρεντερικό σωλήνα των ζώων. Αναγνωρίζονται επίσης για τις δυνατότητές τους ως φυσικοί αυξητικοί παράγοντες και ως παράγοντες πρόληψης ασθενειών (Callaway et al., 2021). Στη βιομηχανία κτηνοτροφίας και πουλερικών, υπάρχει αυξανόμενο ενδιαφέρον για τη χρήση βοτανικών συμπληρωμάτων ως παράγοντες βιώσιμης εναλλακτικής λύσης στη χρήση αντιβιοτικών. Τα προγράμματα εμβολιασμού έχουν επίσης χρησιμοποιηθεί ως ασφαλείς και αποτελεσματικές μέθοδοι για την καταπολέμηση μολυσματικών ασθενειών, μειώνοντας έτσι την αναγκαιότητα για αντιβιοτικά (Callaway et al., 2021).

Η δυνατότητα καθεμίας από αυτές τις εναλλακτικές λύσεις στη χρήση αντιβιοτικών όχι μόνο να μειώσει την ανάγκη για χρήση αντιβιοτικών, αλλά και να έχει διάχυτη ευεργετική επίδραση στην υγεία τόσο του ανθρώπου όσο και των ζώων, είναι σημαντική εάν εφαρμοστούν ευρέως και αποτελεσματικά (Serwecińska, 2020). Η εκτεταμένη χρήση αντιβιοτικών ήταν σημαντικός παράγοντας για την πρόληψη

ασθενειών στα ζώα για πολλά χρόνια. Οι περιβαλλοντικές πιέσεις που προκύπτουν από την υπερβολική χρήση αντιβιοτικών είναι η τρέχουσα προσέγγιση. Η χρήση αντιβιοτικών σε ζώα παραγωγής τροφίμων έχει οδηγήσει σε κανονισμούς που έχουν περιορίσει σοβαρά τη χρήση αντιβιοτικών για μη θεραπευτικούς σκοπούς σε ορισμένες περιοχές των Ηνωμένων Πολιτειών και της Ευρώπης λόγω ανησυχιών σχετικά με την εξάπλωση ανθεκτικών βακτηρίων σημαντικών για τη δημόσια υγεία (Muteeb et al., 2023). Κατά συνέπεια, υπάρχει μια αυξανόμενη δημόσια ζήτηση για κρέας, πουλερικά και γάλα που στερούνται υπολείμματα αντιβιοτικών και άλλα δυνητικά επιβλαβή πρόσθετα.

Ωστόσο, υπάρχουν επίσης ευκαιρίες άμεσου μάρκετινγκ για ζωικά προϊόντα που έχουν αναπτυχθεί με υψηλά πρότυπα καλής μεταχείρισης, χρησιμοποιώντας φυσικά προϊόντα και έχουν διεθνώς αναγνωρισμένη αξιοπιστία. Ως απάντηση στις πρόσφατες απώλειες πουλερικών στην ευρωπαϊκή αγορά, ένας σημαντικός αριθμός καταναλωτών είναι πλέον διατεθειμένος να πληρώσει παραπάνω για προϊόντα που είναι 100% χωρίς αντιβιοτικά. Κατά συνέπεια, προκύπτει εξέλιξη ενάντια στην περιττή μη θεραπευτική χρήση αντιβιοτικών παραγόντων και θα μπορούσε να εφαρμοστεί μια ποικιλία στρατηγικών για την ενίσχυση της διαχείρισης των ζώων και την τροποποίηση των διατροφικών σχημάτων (Ahmad et al., 2023). Φιλοδοξία μας είναι αυτές οι γεωργικές πρακτικές να συνδράμουν στη αναβάθμιση της ποιότητας και της ποσότητας των τροφίμων σε παγκόσμια κλίμακα (Mutuku et al., 2022).

## 5. Συμπεράσματα

Δεν υπάρχει αμφιβολία ότι μια σημαντική βελτίωση στην επίτευξη της μέγιστης επιλεκτικότητας, ευαισθησίας και ταχύτητας σε έναν προσδιορισμό θα προκύψει από την αποτελεσματική ενσωμάτωση μιας ποικιλίας τεχνικών διαχωρισμού και συστημάτων ανίχνευσης. Αυτές οι μέθοδοι αποτελούν σημαντική πρόοδο στη διαχείριση των υπολειμμάτων, καθώς επιτρέπουν τον γρήγορο και οικονομικά αποδοτικό έλεγχο των υπολειμμάτων αντιβιοτικών. Μια άλλη εναλλακτική είναι η χρήση ανοσοαισθητήρων σε ένα σύστημα έγχυσης ροής. Το ισχυρό δυναμικό για τη βελτίωση κάθε στρατηγικής ανίχνευσης αντιπροσωπεύεται από τη συνεπή εφαρμογή νέων υλικών, καινοτόμων στρατηγικών και την ανάπτυξη νέων αισθητηρίων στοιχείων με βελτιωμένες ιδιότητες για χρήση σε χημικούς αισθητήρες. Η πιο πολλά υποσχόμενη αναλυτική μέθοδος στο πλαίσιο των υπολειμμάτων τροφίμων και φαρμάκων είναι αυτή που μπορεί να ανιχνεύσει ταυτόχρονα τον μέγιστο αριθμό διακριτών ομάδων υπολειμμάτων.

Επιπρόσθετα, είναι επιτακτική ανάγκη να κατέχουμε μια ολοκληρωμένη κατανόηση των συστατικών τροφίμων προκειμένου να αποτραπεί η εμφάνιση αναλυτικών προκλήσεων που είναι αποτέλεσμα της εγγενούς πολυπλοκότητάς τους. Η φάση της επεξεργασίας του δείγματος θα πρέπει να βελτιωθεί ώστε να ανταποκρίνεται στις διάφορες απαιτήσεις σε επιτυχημένες μεθοδολογίες. Η τεχνολογία για τη βελτίωση της προετοιμασίας και του διαχωρισμού των δειγμάτων είναι ευρέως αναγνωρισμένη. Ωστόσο, απαιτούνται πρόσθετες βελτιώσεις για την επιτάχυνση της διαδικασίας επεξεργασίας, επιτρέποντας έτσι την αποτελεσματική αυτοματοποίηση και την προσαρμογή των τεχνολογιών σε ρομποτικά συστήματα για επεξεργασία και ανάλυση δεδομένων.

Τέλος, η παραγωγή ζωικών τροφών επηρεάζεται επίσης άμεσα από την ανησυχία για τα ζώα και το περιβάλλον, γεγονός που μπορεί να οδηγήσει στην αναζήτηση εναλλακτικών ουσιών ή/και προϊόντων με μειωμένες προειδοποιήσεις ασφαλείας.

## Βιβλιογραφικές αναφορές

- Abd El-Hack, Mohamed E., Mohamed T. El-Saadony, Heba M. Salem, Amira M. El-Tahan, Mohamed M. Soliman, Gehan BA Youssef, Ayman E. Taha et al. "Alternatives to antibiotics for organic poultry production: types, modes of action and impacts on bird's health and production." Poultry science 101, no. 4 (2022): 101696. sciencedirect.com
- Abdelbasset, Walid Kamal, Saade Abdalkareem Jasim, Dmitry Olegovich Bokov, Maria Sergeevna Oleneva, Anvar Islamov, Ali Thaeer Hammid, Yasser Fakri Mustafa, Ghulam Yasin, Arnold C. Alguno, and Ehsan Kianfar. "Comparison and evaluation of the performance of graphene-based biosensors." Carbon Letters 32, no. 4 (2022). researchgate.net
- Adabi, Maryam, Mohammad Reza Faryabi, Amir Nili-Ahmadabadi, Jamal Gharekhani, and Fereshteh Mehri. "Evaluation of tetracycline antibiotics residues in chicken tissues using the four-plate test, ELISA, and HPLC methods in Iran." International Journal of Environmental Analytical Chemistry 104, no. 9 (2024): 2014-2023. [HTML]
- Ahmad, Iqbal, Hesham A. Malak, and Hussein H. Abulreesh. "Environmental antimicrobial resistance and its drivers: a potential threat to public health." Journal of Global Antimicrobial Resistance 27 (2021): 101-111. sciencedirect.com
- Ahmad, N., Joji, R. M., and Shahid, M. "Evolution and implementation of One Health to control the dissemination of antibiotic-resistant bacteria and resistance genes: A review." Frontiers in Cellular and Infection ... (2023). frontiersin.org
- Ahmed, Saeed, Jianan Ning, Dapeng Peng, Ting Chen, Ijaz Ahmad, Aashaq Ali, Zhixin Lei, Muhammad Abu bakr Shabbir, Guyue Cheng, and Zonghui Yuan. "Current advances in immunoassays for the detection of antibiotics residues: A review." Food and Agricultural Immunology 31, no. 1 (2020): 268-290. tandfonline.com
- Aitekenov, S., Gaipov, A., and Bukasov, R. "Detection and quantification of proteins in human urine." Talanta (2021). sciencedirect.com
- Akbar, Rahmad, Habib Bashour, Puneet Rawat, Philippe A. Robert, Eva Smorodina, Tudor-Stefan Cotet, Karine Flem-Karlsen et al. "Progress and

challenges for the machine learning-based design of fit-for-purpose monoclonal antibodies." In MAbs, vol. 14, no. 1, p. 2008790. Taylor & Francis, 2022. tandfonline.com

- Åkerfeldt, Magdalena Presto, Stefan Gunnarsson, Gun Bernes, and Isabel Blanco-Penedo. "Health and welfare in organic livestock production systems—a systematic mapping of current knowledge." Organic Agriculture 11, no. 1 (2021): 105-132. springer.com
- Alghirani, Mohamed M., Eric Lim Teik Chung, Faez Firdaus Abdullah Jesse, Awis Qurni Sazili, and Teck Chwen Loh. "Could phytobiotics replace antibiotics as feed additives to stimulate production performance and health status in poultry? An overview." Journal of Advanced Veterinary Research 11, no. 4 (2021): 254-265. advetresearch.com
- Aljeldah, M. M. "Antimicrobial resistance and its spread is a global threat." Antibiotics (2022). mdpi.com
- Alnassrallah, M. N., Alzoman, N. Z., and Almomen, A. "Qualitative immunoassay for the determination of tetracycline antibiotic residues in milk samples followed by a quantitative improved HPLC-DAD method." Scientific Reports (2022). nature.com
- Alseekh, S., Aharoni, A., Brotman, Y., and Contrepois..., K. "Mass spectrometry-based metabolomics: a guide for annotation, quantification and best reporting practices." Nature ... (2021). nih.gov
- Al-Shawi, Sarmad G., David S. Dang, Asraa Y. Yousif, Zena K. Al-Younis, Teif A. Najm, and Sulaiman K. Matarneh. "The potential use of probiotics to improve animal health, efficiency, and meat quality: a review." Agriculture 10, no. 10 (2020): 452. mdpi.com
- Amercham Biosciences, Ion Exchange chromatohgraphy, Principles and methods, Amercham Pharmacia. Biotech, SE 751;2002.
- Amicon, Dye-ligand chromatography. Applications method. Theory of matrix gel media, Amicon Division, N.R. Grace&Company- Conn. 24 Cherry Hill Drive, MA 01923;1989.
- Anee, Ismat Jahan, Shamimul Alam, Rowshan Ara Begum, Reza Md Shahjahan, and Ashfaul Muid Khandaker. "The role of probiotics on animal

health and nutrition." The Journal of Basic and Applied Zoology 82 (2021): 1-16. [springer.com](https://www.springer.com)

- Arsène, Mbarga Manga Joseph, Anyutoulou Kitio Linda Davares, Podoprighora Irina Viktorovna, Smolyakova Larissa Andreevna, Souadkia Sarra, Ibrahim Khelifi, and Das Milana Sergueïevna. "The public health issue of antibiotic residues in food and feed: Causes, consequences, and potential solutions." Veterinary world 15, no. 3 (2022): 662. [nih.gov](https://www.nih.gov)
- Arsène, Mbarga MJ, Anyutoulou KL Davares, Smolyakova L. Andreevna, Ermolaev A. Vladimirovich, Bassa Z. Carime, Razan Marouf, and Ibrahim Khelifi. "The use of probiotics in animal feeding for safe production and as potential alternatives to antibiotics." Veterinary world 14, no. 2 (2021): 319. [nih.gov](https://www.nih.gov)
- Ashuo, Asha, Wenjia Zou, Jingjie Fu, Tengkun Yang, Linlin Yu, Wei Liu, Liu Yang, Ghulam Mujtaba Mari, and Haiyang Jiang. "High throughput detection of antibiotic residues in milk by time-resolved fluorescence immunochromatography based on QR code." Food Additives & Contaminants: Part A 37, no. 9 (2020): 1481-1490. [HTML]
- Aslam, Bilal, Mohsin Khurshid, Muhammad Imran Arshad, Saima Muzammil, Maria Rasool, Nafeesa Yasmeen, Taif Shah et al. "Antibiotic resistance: one health one world outlook." Frontiers in cellular and infection microbiology 11 (2021): 771510. [frontiersin.org](https://www.frontiersin.org)
- Avershina, E., Shapovalova, V., and Shipulin, G. "Fighting antibiotic resistance in hospital-acquired infections: current state and emerging technologies in disease prevention, diagnostics and therapy." Frontiers in microbiology (2021). [frontiersin.org](https://www.frontiersin.org)
- Ayalew, Habtamu, Haijun Zhang, Jing Wang, Shugeng Wu, Kai Qiu, Guanghai Qi, Ayalew Tekeste, Teketay Wassie, and Demissie Chanie. "Potential feed additives as antibiotic alternatives in broiler production." Frontiers in Veterinary Science 9 (2022): 916473. [frontiersin.org](https://www.frontiersin.org)
- Azad, M. A. K., Gao, J., Ma, J., Li, T., Tan, B., Huang, X., and Yin, J. "Opportunities of prebiotics for the intestinal health of monogastric animals." Animal Nutrition (2020). [sciencedirect.com](https://www.sciencedirect.com)



- Bai, Yuchen, Leina Dou, Weilin Wu, Zhimin Lu, Jiaqian Kou, Jianzhong Shen, Kai Wen, and Zhanhui Wang. "Anti-Metatype Antibody Screening, Sandwich Immunoassay Development, and Structural Insights for  $\beta$ -Lactams Based on Penicillin Binding Protein." *Molecules* 26, no. 18 (2021): 5569. [mdpi.com](https://doi.org/10.3390/molecules26185569)
- Bajagai, Yadav S., Jenifer Alsemgeest, Robert J. Moore, Thi TH Van, and Dragana Stanley. "Phytogenic products, used as alternatives to antibiotic growth promoters, modify the intestinal microbiota derived from a range of production systems: an in vitro model." *Applied Microbiology and Biotechnology* 104 (2020): 10631-10640. [springer.com](https://doi.org/10.1007/s00253-020-10631-1)
- Barco, Sebastiano, Alessio Mesini, Laura Barbagallo, Angelo Maffia, Gino Tripodi, Federico Pea, Carolina Saffioti, Elio Castagnola, and Giuliana Cangemi. "A liquid chromatography-tandem mass spectrometry platform for the routine therapeutic drug monitoring of 14 antibiotics: application to critically ill pediatric patients." *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 186 (2020): 113273. [HTML]
- Batiha, Gaber El-Saber, Diaa E. Hussein, Abdelazeem M. Algammal, Toyosi T. George, Philippe Jeandet, Ali Esmail Al-Snafi, Achyut Tiwari et al. "Application of natural antimicrobials in food preservation: Recent views." *Food Control* 126 (2021): 108066. [HTML]
- Baudoin, F., Hogeveen, H., and Wauters, E. "Reducing antimicrobial use and dependence in livestock production systems: a social and economic sciences perspective on an interdisciplinary approach." *Frontiers in Veterinary Science* (2021). [frontiersin.org](https://doi.org/10.3389/fvets.2021.684441)
- Bauermeister, Anelize, Helena Mannocho-Russo, Letícia V. Costa-Lotufo, Alan K. Jarmusch, and Pieter C. Dorrestein. "Mass spectrometry-based metabolomics in microbiome investigations." *Nature Reviews Microbiology* 20, no. 3 (2022): 143-160. [nih.gov](https://doi.org/10.1038/s41579-022-00901-1)
- Beć, K. B., Grabska, J., and Huck, C. W. "Biomolecular and bioanalytical applications of infrared spectroscopy—A review." *Analytica chimica acta* (2020). [HTML]

- Becchetti, L., Candio, P., and Salustri, F. "Vaccine uptake and constrained decision making: The case of Covid-19." *Social science & medicine* (2021). nih.gov
- Bell, Steven EJ, Gaëlle Charron, Emiliano Cortés, Janina Kneipp, Marc Lamy de la Chapelle, Judith Langer, Marek Procházka, Vi Tran, and Sebastian Schlücker. "Towards reliable and quantitative surface-enhanced Raman scattering (SERS): from key parameters to good analytical practice." *Angewandte Chemie International Edition* 59, no. 14 (2020): 5454-5462. wiley.com
- Ben, Yujie, Min Hu, Fengxia Zhong, Erhu Du, Yu Li, Hong Zhang, Charles B. Andrews, and Chunmiao Zheng. "Human daily dietary intakes of antibiotic residues: Dominant sources and health risks." *Environmental Research* 212 (2022): 113387. sciencedirect.com
- Ben, Yujie, Min Hu, Fengxia Zhong, Erhu Du, Yu Li, Hong Zhang, Charles B. Andrews, and Chunmiao Zheng. "Human daily dietary intakes of antibiotic residues: Dominant sources and health risks." *Environmental Research* 212 (2022): 113387. sciencedirect.com
- Benkova, M., O. Soukup, and J. Marek. "Antimicrobial susceptibility testing: currently used methods and devices and the near future in clinical practice." *Journal of applied microbiology* 129, no. 4 (2020): 806-822. wiley.com
- Bessaire, T.; Mujahid, C.; Beck, A.; Tarres, A.; Savoy, M.C.; Woo, P.M.; Mottier, P.; Desmarchelier, A. Screening of 23  $\beta$ -lactams in foodstuffs by LC-MS/MS using an alkaline QuEChERS-like extraction. *Food Addit. Contam.-Part A Chem. Anal. Control Expo. Risk Assess.* 2018, 35, 661–673. [CrossRef]
- Bezdekova, Jaroslava, Tomas Rypar, Marcela Vlcnovska, Marketa Vaculovicova, and Mirek Macka. "From Natural to Artificial Biorecognition Elements: From Antibodies to Molecularly Imprinted Polymers." In *BioSensing, Theranostics, and Medical Devices: From Laboratory to Point-of-Care Testing*, pp. 185-206. Singapore: Springer Singapore, 2021. academia.edu
- Bhandari, G., Atreya, K., Scheepers, P. T. J., and Geissen, V. "Concentration and distribution of pesticide residues in soil: Non-dietary human health risk assessment." *Chemosphere* (2020). sciencedirect.com

- Bhawan, F. "Guidance document & standard operating procedures for fixation of maximum residue limits (MRLs) of pesticides in food commodities." India: Food Safety & Standards Authority of India (FSSAI) (2022). [fssai.gov.in](https://fssai.gov.in)
- Bhogoju, S. and Nahashon, S. "Recent advances in probiotic application in animal health and nutrition: A review." Agriculture (2022). [mdpi.com](https://mdpi.com)
- Bilal, Muhammad, Shahid Mehmood, Tahir Rasheed, and Hafiz MN Iqbal. "Antibiotics traces in the aquatic environment: persistence and adverse environmental impact." Current opinion in environmental science & health 13 (2020): 68-74. [HTML]
- Biyatmoko, D., B. Prasetyo Juhairiyah, U. Santoso, and T. Rostini. "The phytobiotic effect of herbs as a growth promoter on the performance and digestibility of alabio meat ducks." Journal of Biosciences 8, no. 2 (2021): 202-208. [cipav.org.co](https://cipav.org.co)
- Bonerba, Elisabetta, Sara Panseri, Francesco Arioli, Maria Nobile, Valentina Terio, Federica Di Cesare, Giuseppina Tantillo, and Luca Maria Chiesa. "Determination of antibiotic residues in honey in relation to different potential sources and relevance for food inspection." Food Chemistry 334 (2021): 127575. [HTML]
- Boppart, Timo, Karl Harmenberg, Per Krusell, and Jonna Olsson. "Integrated epi-econ assessment of vaccination." Journal of Economic Dynamics and Control 140 (2022): 104308. [sciencedirect.com](https://sciencedirect.com)
- Bossuyt, Xavier, Ellen De Langhe, Maria Orietta Borghi, and Pier Luigi Meroni. "Understanding and interpreting antinuclear antibody tests in systemic rheumatic diseases." Nature Reviews Rheumatology 16, no. 12 (2020): 715-726. [researchgate.net](https://researchgate.net)
- Brown, P.; Dawson, M.J. A Perspective on the Next Generation of Antibacterial Agents Derived by Manipulation of Natural Products. In Progress in Medicinal Chemistry; Lawton, G., Witty, D.R., Eds.; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2015; Volume 54, pp. 135–184, ISBN 0079-6468.
- Buchy, Philippe, Sibel Ascioğlu, Yves Buisson, Sanjoy Datta, Michael Nissen, Paul Anantharajah Tambyah, and Sirenda Vong. "Impact of vaccines on

antimicrobial resistance." International Journal of Infectious Diseases 90 (2020): 188-196. sciencedirect.com

- Callaway, T. R., Lillehoj, H., Chuanchuen, R., and Gay, C. G. "Alternatives to antibiotics: a symposium on the challenges and solutions for animal health and production." (2021). mdpi.com
- Callaway, T. R., Lillehoj, H., Chuanchuen, R., and Gay, C. G. "Alternatives to antibiotics: a symposium on the challenges and solutions for animal health and production. Antibiotics 2021; 10: 471." (2021). academia.edu
- Canton, L., Lanusse, C., and Moreno, L. "Rational pharmacotherapy in infectious diseases: issues related to drug residues in edible animal tissues." Animals (2021). mdpi.com
- Carter, P. J. and Rajpal, A. "Designing antibodies as therapeutics." Cell (2022). cell.com
- Cavaco, M., Castanho, M. A. R. B., and Neves, V. "The use of antibody-antibiotic conjugates to fight bacterial infections." Frontiers in microbiology (2022). frontiersin.org
- Chadha, Utkarsh, Preetam Bhardwaj, Rushali Agarwal, Priyanshi Rawat, Rishika Agarwal, Ishi Gupta, Mahek Panjwani et al. "Recent progress and growth in biosensors technology: A critical review." Journal of Industrial and Engineering Chemistry 109 (2022): 21-51. [HTML]
- Chen, S. Y., Li, Z., Li, K., and Yu, X. Q. "Small molecular fluorescent probes for the detection of lead, cadmium and mercury ions." Coordination Chemistry Reviews (2021). [HTML]
- Chen, X. and Wang, J. "Degradation performance and mechanism of penicillin G in aqueous solution by ionizing radiation." Journal of Cleaner Production (2021). [HTML]
- Cheng, C. Codex alimentarius. Encycl. Food Secur. Sustain. 1993, 31, 50–55.
- Cheng, G. M. and Cheng, H. "Overcoming China's animal waste disposal challenge brought by elevated levels of veterinary antimicrobial residues and antimicrobial resistance." Environment International (2024). sciencedirect.com
- Cheng, S., Zhang, J., Liu, Y., Wang, Y., Xiao, Y., and Zhang, Y. "One-step synthesis of N, S-doped carbon dots with orange emission and their application

- in tetracycline antibiotics, quercetin sensing, and cell imaging." *Microchimica Acta* (2021). [HTML]
- Christou, P. A. "Tourism during the Contemporary Period (1945-early 2020s)..". (2022). [HTML]
  - Chu, Libing, Jianlong Wang, Shijun He, Chuanhong Chen, László Wojnárovits, and Erzsébet Takács. "Treatment of pharmaceutical wastewater by ionizing radiation: Removal of antibiotics, antimicrobial resistance genes and antimicrobial activity." *Journal of Hazardous Materials* 415 (2021): 125724. [HTML]
  - Colzani, Edoardo, Kari Johansen, Helen Johnson, and Lucia Pastore Celentano. "Human papillomavirus vaccination in the European Union/European Economic Area and globally: a moral dilemma." *Eurosurveillance* 26, no. 50 (2021): 2001659. [eurosurveillance.org](https://eur01.safelinks.europa.eu/eurosurveillance)
  - Commission, E. Veterinary Medicines and Medicated Feed. Available online: [https://food.ec.europa.eu/animals/animal-health/vet-meds-med-feed\\_en](https://food.ec.europa.eu/animals/animal-health/vet-meds-med-feed_en) (accessed on 20 November 2022).
  - Cook, M. A. and Wright, G. D. "The past, present, and future of antibiotics." *Science translational medicine* (2022). [HTML]
  - Coskun O. Separation techniques: Chromatography. *North Clin Istanbul* 2016;3(2):156–60 doi: 10.14744/nci.2016.32757
  - Cuatrecasas P, Wilchek M, Anfinsen CB. Selective enzyme purification by affinity chromatography. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1968;61:636–43.
  - Cutler P. Methods in molecular biology, Dye-ligand affinity chromatography, Second Edition. Humana Press 2004.
  - da Cunha Xavier, Jayze, Francisco WQ de Almeida-Neto, Janaina E. Rocha, Thiago S. Freitas, Priscila R. Freitas, Ana CJ de Araujo, Priscila T. da Silva et al. "Spectroscopic analysis by NMR, FT-Raman, ATR-FTIR, and UV-Vis, evaluation of antimicrobial activity, and in silico studies of chalcones derived from 2-hydroxyacetophenone." *Journal of Molecular Structure* 1241 (2021): 130647. [HTML]
  - da Silveira Deminicis, Renata Gomes, Camila Meneghetti, Elizângela Bonfim de Oliveira, Antônio Amândio Pinto Garcia Júnior, Ronaldo Vasconcelos Farias

- Filho, and Bruno Borges Deminicis. "Systematic review of the use of phytobiotics in broiler nutrition." *Revista de Ciências Agroveterinárias* 20, no. 1 (2021): 098-106. [udesc.br](http://udesc.br)
- Dai, J., Ma, C., Zhang, P., Fu, Y., and Shen, B. "Recent progress in the development of fluorescent probes for detection of biothiols." *Dyes and Pigments* (2020). [HTML]
  - Das M, Dasgupta D. Pseudo-affinity column chromatography based rapid purification procedure for T7 RNA polymerase. *Prep Biochem Biotechnol* 1998;28:339–48.
  - Das, Tridip K., Shrabani Pradhan, Sudipta Chakrabarti, Keshab Chandra Mondal, and Kuntal Ghosh. "Current status of probiotic and related health benefits." *Applied Food Research* 2, no. 2 (2022): 100185. [sciencedirect.com](https://www.sciencedirect.com)
  - de Campos, J. Leite, A. Kates, A. Steinberger, A. Sethi, G. Suen, J. Shutske, N. Safdar, T. Goldberg, and P. L. Ruegg. "Quantification of antimicrobial usage in adult cows and preweaned calves on 40 large Wisconsin dairy farms using dose-based and mass-based metrics." *Journal of Dairy Science* 104, no. 4 (2021): 4727-4745. [sciencedirect.com](https://www.sciencedirect.com)
  - de Faria, Lucas Vinicius, Thalles Pedrosa Lisboa, Náira da Silva Campos, Guilherme Figueira Alves, Maria Auxiliadora Costa Matos, Renato Camargo Matos, and Rodrigo Alejandro Abarza Munoz. "Electrochemical methods for the determination of antibiotic residues in milk: A critical review." *Analytica Chimica Acta* 1173 (2021): 338569. [HTML]
  - de Koster, Chris G., and Peter J. Schoenmakers. "History of liquid chromatography—mass spectrometry couplings." In *Hyphenations of Capillary Chromatography with Mass Spectrometry*, pp. 279-295. Elsevier, 2020. [HTML]
  - Delsart, M., Pol, F., Dufour, B., Rose, N., and Fablet, C. "Pig farming in alternative systems: strengths and challenges in terms of animal welfare, biosecurity, animal health and pork safety." *Agriculture* (2020). [mdpi.com](https://www.mdpi.com)
  - Determann H. *Gel Chromatography Gel Filtration· Gel Permeation· Molecular Sieves: A Laboratory Handbook Chapter 2. Materyals and Methods*; 2012.

- Divan, Deepak, and Suresh Sharma. "Historical Perspective on Energy (4000 BCE–2000 CE)." In ENERGY 2040: Aligning Innovation, Economics and Decarbonization, pp. 13-54. Cham: Springer Nature Switzerland, 2024. [HTML]
- Dkhar, Daphika S., Rohini Kumari, Supratim Mahapatra, Rahul Kumar, Timir Tripathi, and Pranjal Chandra. "Antibody-receptor bioengineering and its implications in designing bioelectronic devices." International Journal of Biological Macromolecules 218 (2022): 225-242. [HTML]
- Donald PL, Lampman GM, Kritz GS, Engel RG. Introduction to Organic Laboratory Techniques (4th Ed.). Thomson Brooks/Cole 2006. p. 797–817.
- Donald PL, Lampman GM, Kritz GS, Randall G. Engel Introduction to Organic Laboratory Techniques (4th Ed.). Thomson Brooks/Cole 2006. p. 797–817.
- Dong, B., Hu, K., Mao, Y., Wen, K., Wang, Z., Qu, H., and Zheng, L. "A nanomaterial-independent and fluorescent immunoassay based on Eu-micelles for rapid and sensitive detection of fluoroquinolones in chicken." Food Chemistry (2024). [HTML]
- Drabińska, Natalia, Keith Hewett, Paul White, Matthew B. Avison, Raj Persad, Norman M. Ratcliffe, and Ben de Lacy Costello. "Application of a solid-phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry/metal oxide sensor system for detection of antibiotic susceptibility in urinary tract infection-causing Escherichia coli—a proof of principle study." Advances in Medical Sciences 67, no. 1 (2022): 1-9. [HTML]
- EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ), Konstantinos Koutsoumanis, Ana Allende, Avelino Álvarez-Ordóñez, Declan Bolton, Sara Bover-Cid, Marianne Chemaly et al. "Role played by the environment in the emergence and spread of antimicrobial resistance (AMR) through the food chain." Efsa Journal 19, no. 6 (2021): e06651. wiley.com
- Er Demirhan, B. and Demirhan, B. "Detection of antibiotic residues in blossom honeys from different regions in Turkey by LC-MS/MS method." Antibiotics (2022). mdpi.com
- European Commission (EC). Commission Decision 2002/657/EC of 12 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of



analytical methods and the interpretation of results. Off. J. Eur. Communities 2002, 221, 8–36.

- European Food Safety Authority. Report for 2019 on the results from the monitoring of veterinary medicinal product residues and other substances in live animals and animal products. EFSA Support. Publ. 2021, 18, 1–82.
- Fabregat-Safont, David, Elisa Gracia-Marín, María Ibáñez, Elena Pitarch, and Félix Hernández. "Analytical key issues and challenges in the LC-MS/MS determination of antibiotics in wastewater." *Analytica Chimica Acta* 1239 (2023): 340739. sciencedirect.com
- Fan, M., Andrade, G. F. S., and Brolo, A. G. "A review on recent advances in the applications of surface-enhanced Raman scattering in analytical chemistry." *Analytica chimica acta* (2020). [HTML]
- Favresse, Julien, Christine Eucher, Marc Elsen, Marie Tré-Hardy, Jean-Michel Dogné, and Jonathan Douxflis. "Clinical performance of the Elecsys electrochemiluminescent immunoassay for the detection of SARS-CoV-2 total antibodies." *Clinical chemistry* 66, no. 8 (2020): 1104-1106. unamur.be
- FDA. The Code of Federal Regulations, U.S.F.& D.A. TITLE 21–FOOD AND DRUGS. Available online: <https://www.accessdata.fda.gov/> (accessed on 20 November 2022).
- Feckler, Alexander, Jakob Wolfram, Ralf Schulz, and Mirco Bundschuh. "Reducing pollution to levels not harming biodiversity and ecosystem functions—one perspective on the post-2020 Global Biodiversity Framework." *Current Opinion in Environmental Science & Health* (2023): 100495. sciencedirect.com
- Feliu, Catherine, Celine Konecki, Tristan Candau, Damien Vautier, Cyril Haudecoeur, Claire Gozalo, Yoann Cazaubon, and Zoubir Djerada. "Quantification of 15 antibiotics widely used in the critical care unit with a LC-MS/MS system: an easy method to perform a daily therapeutic drug monitoring." *Pharmaceuticals* 14, no. 12 (2021): 1214. mdpi.com
- Fernandes, Gabriel Martins, Weida R. Silva, Diandra Nunes Barreto, Rafaela S. Lamarca, Paulo Clairmont F. Lima Gomes, João Flávio da S Petrucí, and Alex

- D. Batista. "Novel approaches for colorimetric measurements in analytical chemistry—a review." *Analytica Chimica Acta* 1135 (2020): 187-203. [HTML]
- Fernández, Lucía, María Dolores Cima-Cabal, Ana Catarina Duarte, Ana Rodriguez, Pilar García, and María del Mar García-Suárez. "Developing diagnostic and therapeutic approaches to bacterial infections for a new era: implications of globalization." *Antibiotics* 9, no. 12 (2020): 916. [mdpi.com](https://doi.org/10.3390/antib9120916)
  - Ferreira, Fernando AF, Devika Kannan, Ieva Meidutė-Kavaliauskienė, and Inês MT Vale. "A sociotechnical approach to vaccine manufacturer selection as part of a global immunization strategy against epidemics and pandemics." *Annals of Operations Research* (2022): 1-30. [springer.com](https://doi.org/10.1007/s10230-022-10000-0)
  - Firer MA. Efficient elution of functional proteins in affinity chromatography. *J Biochem Biophys Methods* 2001;49:433–42.
  - Fox, Tilly, Julia Geppert, Jacqueline Dinnes, Katie Scandrett, Jacob Bigio, Giorgia Sulis, Dineshani Hettiarachchi et al. "Antibody tests for identification of current and past infection with SARS-CoV-2." *Cochrane database of Systematic reviews* 11 (2022). [cochranelibrary.com](https://doi.org/10.1002/chr.1458)
  - Gao, X. G., Cheng, L. X., Jiang, W. S., Li, X. K., and Xing, F. "Graphene and its derivatives-based optical sensors." *Frontiers in Chemistry* (2021). [frontiersin.org](https://doi.org/10.3389/fchem.2021.684441)
  - Gaspar, Vanessa P., Sahar Ibrahim, René P. Zahedi, and Christoph H. Borchers. "Utility, promise, and limitations of liquid chromatography-mass spectrometry-based therapeutic drug monitoring in precision medicine." *Journal of Mass Spectrometry* 56, no. 11 (2021): e4788. [wiley.com](https://doi.org/10.1002/jms.5148)
  - Gerberding SJ, Byers CH. Preparative ion-exchange chromatography of proteins from dairy whey. *J Chromatogr A* 1998;808:141–51.
  - Getabalew, M., Alemneh, T., and Zewdie, D. "Types and uses of growth promoters in beef cattle." *J Vet Med Sci* (2020). [researchgate.net](https://doi.org/10.1186/s13028-020-00600-0)
  - Ghareghani, Shiva, Shokoufeh Goudarzi, Maryam Amirahmadi, Sara Kheirandish, Homanaz Ghafari, Bahram Daraei, and Mahmoud Ghazi-Khansari. "Development and validation of a multi-residue method for determination of antimicrobial sulfonamides, macrolides and quinolones in

Iranian feta cheese by SPE clean-up and LC-MS/MS." International Dairy Journal 137 (2023): 105506. [HTML]

- Ghimpețeanu, Oana Mărgărita, Elena Narcisa Pogurschi, Dana Cătălina Popa, Nela Dragomir, Tomița Drăgotoiu, Oana Diana Mihai, and Carmen Daniela Petcu. "Antibiotic use in livestock and residues in food—A public health threat: A review." Foods 11, no. 10 (2022): 1430. mdpi.com
- Ghimpețeanu, Oana Mărgărita, Elena Narcisa Pogurschi, Dana Cătălina Popa, Nela Dragomir, Tomița Drăgotoiu, Oana Diana Mihai, and Carmen Daniela Petcu. "Antibiotic use in livestock and residues in food—A public health threat: A review." Foods 11, no. 10 (2022): 1430. mdpi.com
- Ghosh, R., Aslam, M., and Kalita, H. "Graphene derivatives for chemiresistive gas sensors: A review." Materials Today Communications (2022). [HTML]
- Girmatsion, Mogos, Abdu Mahmud, Bereket Abraha, Yunfei Xie, Yuliang Cheng, Hang Yu, Weirong Yao, Yahui Guo, and He Qian. "Rapid detection of antibiotic residues in animal products using surface-enhanced Raman Spectroscopy: A review." Food Control 126 (2021): 108019. academia.edu
- Godman, Brian, Abiodun Egwuenu, Mainul Haque, Oliver Ombeva Malande, Natalie Schellack, Santosh Kumar, Zikria Saleem et al. "Strategies to improve antimicrobial utilization with a special focus on developing countries." Life 11, no. 6 (2021): 528. mdpi.com
- Goodwin, Richard JA, Zoltan Takats, and Josephine Bunch. "A critical and concise review of mass spectrometry applied to imaging in drug discovery." SLAS DISCOVERY: Advancing the Science of Drug Discovery 25, no. 9 (2020): 963-976. sagepub.com
- Gopal, Ashna, Li Yan, Saima Kashif, Tasnim Munshi, Vellaisamy AL Roy, Nicolas H. Voelcker, and Xianfeng Chen. "Biosensors and point-of-care devices for bacterial detection: Rapid diagnostics informing antibiotic therapy." Advanced Healthcare Materials 11, no. 3 (2022): 2101546. gla.ac.uk
- Gopal, Ashna, Li Yan, Saima Kashif, Tasnim Munshi, Vellaisamy AL Roy, Nicolas H. Voelcker, and Xianfeng Chen. "Biosensors and point-of-care devices for bacterial detection: Rapid diagnostics informing antibiotic therapy." Advanced Healthcare Materials 11, no. 3 (2022): 2101546. gla.ac.uk

- Gopal, V. and Dhanasekaran, D. "Probiotics as a growth promotant for livestock and poultry production." *Advances in Probiotics* (2021). [HTML]
- Gorris, H. H. and Soukka, T. "What digital immunoassays can learn from ambient analyte theory: A perspective." *Analytical Chemistry* (2022). [HTML]
- Grajek, H., Justyna Jonik, Z. Witkiewicz, T. Wawer, and Marcin Purchała. "Applications of graphene and its derivatives in chemical analysis." *Critical Reviews in Analytical Chemistry* 50, no. 5 (2020): 445-471. [HTML]
- Gray, H. K. "Non-therapeutic antimicrobial resistance in wastewater and wastewater impacted surface waters: patterns, determinants and new approaches." (2020). jhu.edu
- Grundin, J., Blanco-Penedo, I., Fall, N., and Lewerin, S. S. "and prudent use of antibiotics in animal production." pub.epsilon.slu.se . sl.se
- Guliy, O. I. and Dykman, L. A. "Immunoassay Analysis Using Full-Length and Phage Antibodies for Detection of Antibiotics: A Review of the Literature." *Applied Biochemistry and Microbiology* (2024). [HTML]
- Guliy, O. I., B. D. Zaitsev, A. KM Alsowaidi, O. A. Karavaeva, L. G. Lovtsova, and I. A. Borodina. "Biosensor systems for antibiotic detection." *Biophysics* 66 (2021): 555-564. researchgate.net
- Guo, Xuanran, Luyi Zhou, Xuezhong Liu, Guijian Tan, Fei Yuan, Alireza Nezamzadeh-Ejhi, Na Qi, Jianqiang Liu, and Yanqiong Peng. "Fluorescence detection platform of metal-organic frameworks for biomarkers." *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 229 (2023): 113455. [HTML]
- Haiping, L., Jiangyue, W., Fanping, M., and Aifeng, L. "Immunochromatographic assay for the detection of antibiotics in animal-derived foods: A review." *Food Control* (2021). [HTML]
- Harada, Y., Ohmuro-Matsuyama, Y., Tsuna, M., and Ueda, H. "An Open Sandwich Immunochromatography for Non-competitive Detection of Small Antigens." *Analytical Sciences* (2021). jst.go.jp
- Harris DC. *Exploring chemical analysis*. 3rd ed, WH. Freeman&Co 2004.
- Harrower, Jamie, Moyra McNaughtan, Colin Hunter, Rupert Hough, Zulin Zhang, and Karin Helwig. "Chemical fate and partitioning behavior of

antibiotics in the aquatic environment—a review." *Environmental toxicology and chemistry* 40, no. 12 (2021): 3275-3298. wiley.com

- Hassan, Mohammad Mahmudul, Mohamed E. El Zowalaty, Åke Lundkvist, Josef D. Järhult, Md Raihan Khan Nayem, Abu Zubayer Tanzin, Md Rahim Badsha, Shahneaz Ali Khan, and Hossam M. Ashour. "Residual antimicrobial agents in food originating from animals." *Trends in food science & technology* 111 (2021): 141-150. sciencedirect.com
- Hayek, M. N. "The infectious disease trap of animal agriculture." *Science Advances* (2022). science.org
- Helmut D. Gel Chromatography, Gel Filtration, Gel Permeation, Molecular Sieves. A laboratory Hand book, Springer-Verlag;1969.
- Hendrickson, Olga D., Nadezhda A. Byzova, Elena A. Zvereva, Anatoly V. Zherdev, and Boris B. Dzantiev. "Sensitive lateral flow immunoassay of an antibiotic neomycin in foodstuffs." *Journal of Food Science and Technology* 58 (2021): 292-301. nih.gov
- Hosain, M. Z., Kabir, S. M. L., and Kamal, M. M. "Antimicrobial uses for livestock production in developing countries." *Veterinary World* (2021). nih.gov
- Hosain, M. Z., Kabir, S. M. L., and Kamal, M. M. "Antimicrobial uses for livestock production in developing countries." *Veterinary World* (2021). nih.gov
- [http://80.251.40.59/veterinary.ankara.edu.tr/fidanci/Ders\\_Notlari/Biyoteknoloji/Kromatografi.html](http://80.251.40.59/veterinary.ankara.edu.tr/fidanci/Ders_Notlari/Biyoteknoloji/Kromatografi.html).
- Huang, X., Zhu, Y., and Kianfar, E. "Nano biosensors: properties, applications and electrochemical techniques." *Journal of Materials Research and Technology* (2021). sciencedirect.com
- Hussein, Elsayed OS, Shamseldeen H. Ahmed, Alaeldeen M. Abudabos, Gamaleldin M. Suliman, Mohamed E. Abd El-Hack, Ayman A. Swelum, and Abdullah N. Alowaimer. "Ameliorative effects of antibiotic-, probiotic-and phytobiotic-supplemented diets on the performance, intestinal health, carcass traits, and meat quality of *Clostridium perfringens*-infected broilers." *Animals* 10, no. 4 (2020): 669. mdpi.com

- Hutubessy, Raymond, Jeremy A. Lauer, Birgitte Giersing, So Yoon Sim, Mark Jit, David Kaslow, and Siobhan Botwright. "The Full Value of Vaccine Assessments (FVVA): A framework for assessing and communicating the value of vaccines for investment and introduction decision-making." *BMC medicine* 21, no. 1 (2023): 229. [springer.com](https://www.springer.com)
- Ibrahim, Muhammad, Fiaz Ahmad, Bushra Yaqub, Ayesha Ramzan, Ayesha Imran, Muhammad Afzaal, Safdar Ali Mirza et al. "Current trends of antimicrobials used in food animals and aquaculture." In *Antibiotics and antimicrobial resistance genes in the environment*, pp. 39-69. Elsevier, 2020. [nih.gov](https://www.nih.gov)
- Jafari Ozumchelouei, Elnaz, Amir Hossein Hamidian, Yu Zhang, and Min Yang. "Physicochemical properties of antibiotics: A review with an emphasis on detection in the aquatic environment." *Water Environment Research* 92, no. 2 (2020): 177-188. [HTML]
- Jank, L.; Martins, M.T.; Arsand, J.B.; Hoff, R.B.; Barreto, F.; Pizzolato, T.M.; Campos Motta, T.M. High-throughput method for macrolides and lincosamides antibiotics residues analysis in milk and muscle using a simple liquid-liquid extraction technique and liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry analysis (LC-MS/MS). *Talanta* 2015, 144, 686–695. [CrossRef]
- Joshi, A. and Kim, K. H. "Recent advances in nanomaterial-based electrochemical detection of antibiotics: Challenges and future perspectives." *Biosensors and Bioelectronics* (2020). [HTML]
- Joshi, A. and Kim, K. H. "Recent advances in nanomaterial-based RusuBiosensors and Bioelectronics (2020). [HTML]
- Kaistha, Shilpa Deshpande, and Neelima Deshpande. "Traditional probiotics, next-generation probiotics and engineered live biotherapeutic products in chronic wound healing." *Wound Healing Research: Current Trends and Future Directions* (2021): 247-284. [HTML]
- Kalashgarani, M. Y. and Babapoor, A. "Application of nano-antibiotics in the diagnosis and treatment of infectious diseases." *Adv. Appl. NanoBio-Technol* (2022). [researchgate.net](https://www.researchgate.net)

- Kaprou, Georgia D., Ieva Bergšpica, Elena A. Alexa, Avelino Alvarez-Ordóñez, and Miguel Prieto. "Rapid methods for antimicrobial resistance diagnostics." *Antibiotics* 10, no. 2 (2021): 209. [mdpi.com](https://doi.org/10.3390/antib10020209)
- Karlsson E, Ryden L, Brewer J. Protein Purification. Principles, High Resolution Methods, and Applications, 2nd Edition, Ion exchange chromatography. Wiley-VCH, New York;1998.
- Kasimanickam, V., Kasimanickam, M., and Kasimanickam, R. "Antibiotics use in food animal production: escalation of antimicrobial resistance: where are we now in combating AMR?." *Medical Sciences* (2021). [mdpi.com](https://doi.org/10.3390/medsci10020010)
- Kaviani Rad, Abdullah, Siva K. Balasundram, Shohreh Azizi, Yeganeh Afsharyzad, Mehdi Zarei, Hassan Etesami, and Redmond R. Shamshiri. "An overview of antibiotic resistance and abiotic stresses affecting antimicrobial resistance in agricultural soils." *International Journal of Environmental Research and Public Health* 19, no. 8 (2022): 4666. [mdpi.com](https://doi.org/10.3390/ijerph19084666)
- Keating, Sheila M., Rena A. Mizrahi, Matthew S. Adams, Michael A. Asensio, Emily Benzie, Kyle P. Carter, Yao Chiang et al. "Capturing and recreating diverse antibody repertoires as multivalent recombinant polyclonal antibody drugs." *bioRxiv* (2020): 2020-08. [biorxiv.org](https://doi.org/10.1101/2020.08.10.336111)
- Keating, Sheila M., Rena A. Mizrahi, Matthew S. Adams, Michael A. Asensio, Emily Benzie, Kyle P. Carter, Yao Chiang et al. "Generation of recombinant hyperimmune globulins from diverse B-cell repertoires." *nature biotechnology* 39, no. 8 (2021): 989-999. [nature.com](https://doi.org/10.1038/s41587-021-00800-0)
- Khan, Imran Mahmood, Sobia Niazi, Wasim Akhtar, Lin Yue, Imran Pasha, Muhammad Kashif Iqbal Khan, Ali Mohsin, Muhammad Waheed Iqbal, Yin Zhang, and Zhouping Wang. "Surface functionalized AuNCs optical biosensor as an emerging food safety indicator: Fundamental mechanism to future prospects." *Coordination Chemistry Reviews* 474 (2023): 214842. [HTML]
- Khatibi, Seyed Amin, Samin Hamidi, and Mohammad Reza Siahi-Shadbad. "Current trends in sample preparation by solid-phase extraction techniques for the determination of antibiotic residues in foodstuffs: a review." *Critical reviews in food science and nutrition* 61, no. 20 (2021): 3361-3382. [HTML]



- Klymus, Katy E., Christopher M. Merkes, Michael J. Allison, Caren S. Goldberg, Caren C. Helbing, Margaret E. Hunter, Craig A. Jackson et al. "Reporting the limits of detection and quantification for environmental DNA assays." *Environmental DNA* 2, no. 3 (2020): 271-282. [wiley.com](https://www.wiley.com)
- Koike, Hiroshi, Maki Kanda, Hiroshi Hayashi, Yoko Matsushima, Takayuki Nakajima, Souichi Yoshikawa, Yumi Ohba et al. "Monitoring of residual antibacterial agents in animal and fishery products in Tokyo from 2003 to 2019: application and verification of a screening strategy based on microbiological methods." *Food Additives & Contaminants: Part B* 14, no. 1 (2021): 66-73. [HTML]
- Köninger, Julia, Emanuele Lugato, Panos Panagos, Mrinalini Kochupillai, Alberto Orgiazzi, and Maria JI Briones. "Manure management and soil biodiversity: Towards more sustainable food systems in the EU." *Agricultural Systems* 194 (2021): 103251. [sciencedirect.com](https://www.sciencedirect.com)
- Kowalska-Krochmal, B. and Dudek-Wicher, R. "The minimum inhibitory concentration of antibiotics: Methods, interpretation, clinical relevance." *Pathogens* (2021). [mdpi.com](https://www.mdpi.com)
- Kulkarni, M. B., Ayachit, N. H., and Aminabhavi, T. M. "Biosensors and microfluidic biosensors: from fabrication to application." *Biosensors* (2022). [mdpi.com](https://www.mdpi.com)
- Kumar, Harsh, Kamil Kuča, Shashi Kant Bhatia, Kritika Saini, Ankur Kaushal, Rachna Verma, Tek Chand Bhalla, and Dinesh Kumar. "Applications of nanotechnology in sensor-based detection of foodborne pathogens." *Sensors* 20, no. 7 (2020): 1966. [mdpi.com](https://www.mdpi.com)
- Kumar, Harsh, Kanchan Bhardwaj, Talwinder Kaur, Eugenie Nepovimova, Kamil Kuča, Vinod Kumar, Shashi Kant Bhatia et al. "Detection of bacterial pathogens and antibiotic residues in chicken meat: a review." *Foods* 9, no. 10 (2020): 1504. [mdpi.com](https://www.mdpi.com)
- Kuppusamy, S.; Kakarla, D.; Venkateswarlu, K.; Megharaj, M.; Yoon, Y.-E.; Lee, Y.B. Veterinary antibiotics (VAs) contamination as a global agro-ecological issue: A critical view. *Agric. Ecosyst. Environ.* 2018, 257, 47–59. [CrossRef]

- Lamichhane, Pradeep, Tirtha Raj Acharya, Neha Kaushik, Linh N. Nguyen, Jun Sup Lim, Volker Hessel, Nagendra Kumar Kaushik, and Eun Ha Choi. "Non-thermal argon plasma jets of various lengths for selective reactive oxygen and nitrogen species production." *Journal of Environmental Chemical Engineering* 10, no. 3 (2022): 107782. [HTML]
- Lara, C. and Prado, S. "From boom to gloom: Brazilian labour productivity in manufacturing relative to the United States, 1912–2019." *The Economic History Review* (2023). wiley.com
- Laraib, Ushna, Saman Sargazi, Abbas Rahdar, Mehrdad Khatami, and Sadanand Pandey. "Nanotechnology-based approaches for effective detection of tumor markers: A comprehensive state-of-the-art review." *International Journal of Biological Macromolecules* 195 (2022): 356-383. [HTML]
- Laurence M. Harwood, Christopher J. Moody. *Experimental organic chemistry: Principles and Practice*. Wiley, John & Sons, Incorporated 1989. p. 180–5.
- Lechner, I.; Freivogel, C.; Stärk, K.D.C.; Visschers, V.H.M. Exposure Pathways to Antimicrobial Resistance at the Human-Animal Interface—A Qualitative Comparison of Swiss Expert and Consumer Opinions. *Front. Public Health* 2020, 8. [CrossRef]
- Lee, Rachael A., Robert M. Centor, Linda L. Humphrey, Janet A. Jokela, Rebecca Andrews, Amir Qaseem, and Scientific Medical Policy Committee of the American College of Physicians\*. "Appropriate use of short-course antibiotics in common infections: best practice advice from the American College of Physicians." *Annals of internal medicine* 174, no. 6 (2021): 822-827. acpjournals.org
- Lees, Peter, Ludovic Pelligand, Etienne Giraud, and Pierre-Louis Toutain. "A history of antimicrobial drugs in animals: Evolution and revolution." *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* 44, no. 2 (2021): 137-171. wiley.com
- Lees, Peter, Ludovic Pelligand, Etienne Giraud, and Pierre-Louis Toutain. "A history of antimicrobial drugs in animals: Evolution and revolution." *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* 44, no. 2 (2021): 137-171. wiley.com

- Lehmann, Paul V., Zhigang Liu, Noémi Becza, Alexis V. Valente, Junbo Wang, and Greg A. Kirchenbaum. "Monitoring Memory B Cells by Next-Generation ImmunoSpot® Provides Insights into Humoral Immunity that Measurements of Circulating Antibodies Do Not Reveal." In Handbook of ELISPOT: Methods and Protocols, pp. 167-200. New York, NY: Springer US, 2024. [springer.com](https://www.springer.com)
- Lei, H., Wang, Z., Eremin, S. A., and Liu, Z. "Application of antibody and immunoassay for food safety." Foods (2022). [mdpi.com](https://www.mdpi.com)
- Lewis, K. "The science of antibiotic discovery." Cell (2020). [cell.com](https://www.cell.com)
- Li, C., Li, Y., Li, X., Ma, X., Ru, S., Qiu, T., and Lu, A. "Veterinary antibiotics and estrogen hormones in manures from concentrated animal feedlots and their potential ecological risks." Environmental Research (2021). [HTML]
- Li, H., Li, T., He, S., Zhou, J., Wang, T., and Zhu, L. "Efficient degradation of antibiotics by non-thermal discharge plasma: Highlight the impacts of molecular structures and degradation pathways." Chemical Engineering Journal (2020). [HTML]
- Li, Lingyu, Zhichang Qiu, Yuanfeng Qi, Dantong Zhao, Iftikhar Ali, Chenglong Sun, Longhua Xu, Zhenjia Zheng, and Chunxia Ma. "AuNPs/NiFe-LDHs-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry for efficient analysis of metronidazole and its metabolites in water samples." Journal of Hazardous Materials 423 (2022): 126893. [HTML]
- Liang, Yi-Fan, Jin-Yi Yang, Yu-Dong Shen, Zhen-Lin Xu, and Hong Wang. "A breakthrough of immunoassay format for hapten: recent insights into noncompetitive immunoassays to detect small molecules." Critical Reviews in Food Science and Nutrition (2024): 1-11. [HTML]
- Liu, C., Li, B., Liu, M., and Mao, S. "Demand, status, and prospect of antibiotics detection in the environment." Sensors and Actuators B: Chemical (2022). [HTML]
- Liu, C., Li, B., Liu, M., and Mao, S. "Demand, status, and prospect of antibiotics detection in the environment." Sensors and Actuators B: Chemical (2022). [HTML]
- Liu, Rilong, Hangzhen Lan, Song Yan, Lu Huang, Daodong Pan, and Yichun Wu. "Penicillin binding proteins-based immunoassay for the selective and

quantitative determination of beta-lactam antibiotics." *Enzyme and Microbial Technology* (2024): 110507. [HTML]

- Liu, Y., Zhan, L., Qin, Z., Sackrison, J., and Bischof, J. C. "Ultrasensitive and highly specific lateral flow assays for point-of-care diagnosis." *ACS nano* (2021). [acs.org](https://doi.org/10.1021/acsnano.1c01111)
- Lopes, R.P.; Reyes, R.C.; Romero-González, R.; Frenich, A.G.; Vidal, J.L.M. Development and validation of a multiclass method for the determination of veterinary drug residues in chicken by ultra high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Talanta* 2012, 89, 201–208. [CrossRef]
- Low, Chuen Xian, Loh Teng-Hern Tan, Nurul-Syakima Ab Mutalib, Priyia Pusparajah, Bey-Hing Goh, Kok-Gan Chan, Vengadesh Letchumanan, and Learn-Han Lee. "Unveiling the impact of antibiotics and alternative methods for animal husbandry: A review." *Antibiotics* 10, no. 5 (2021): 578. [mdpi.com](https://doi.org/10.3390/ant10050578)
- Lu, Ruei-Min, Yu-Chyi Hwang, I-Ju Liu, Chi-Chiu Lee, Han-Zen Tsai, Hsin-Jung Li, and Han-Chung Wu. "Development of therapeutic antibodies for the treatment of diseases." *Journal of biomedical science* 27 (2020): 1-30. [springer.com](https://doi.org/10.1007/s12220-020-00111-1)
- Luan, Y., Wang, N., Li, C., Guo, X., and Lu, A. "Advances in the application of aptamer biosensors to the detection of aminoglycoside antibiotics." *Antibiotics* (2020). [mdpi.com](https://doi.org/10.3390/ant10050578)
- Luise, Diana, Paolo Bosi, Lena Raff, Laura Amatucci, Sara Viridis, and Paolo Trevisi. "Bacillus spp. probiotic strains as a potential tool for limiting the use of antibiotics, and improving the growth and health of pigs and chickens." *Frontiers in Microbiology* 13 (2022): 801827. [frontiersin.org](https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.801827)
- Luo, Yunyun, Martin Pehrsson, Lasse Langholm, Morten Karsdal, Anne-Christine Bay-Jensen, and Shu Sun. "Lot-to-lot variance in immunoassays—causes, consequences, and solutions." *Diagnostics* 13, no. 11 (2023): 1835. [mdpi.com](https://doi.org/10.3390/d13111835)
- Luo, Yuting, Yiwei Sun, Xiuxia Wei, Yuyang He, Haoxiang Wang, Zewen Cui, Jiaqi Ma et al. "Detection methods for antibiotics in wastewater: a review." *Bioprocess and Biosystems Engineering* 47, no. 9 (2024): 1433-1451. [HTML]

- Lv, Y., Tian, X., Li, Y., and Nie, Y. "A novel color-coded sensor array for visual recognition and traceability investigation of multiple antibiotics." *Sensors and Actuators B: Chemical* (2022). [HTML]
- Machado, António, Lizbeth Zamora-Mendoza, Frank Alexis, and José Miguel Álvarez-Suarez. "Use of plant extracts, bee-derived products, and probiotic-related applications to fight multidrug-resistant pathogens in the post-antibiotic era." *Future Pharmacology* 3, no. 3 (2023): 535-567. [mdpi.com](https://www.mdpi.com)
- Maciel, Edvaldo Vasconcelos Soares, Ana Lucia de Toffoli, Eduardo Sobieski, Carlos Eduardo Domingues Nazário, and Fernando Mauro Lancas. "Miniaturized liquid chromatography focusing on analytical columns and mass spectrometry: A review." *Analytica chimica acta* 1103 (2020): 11-31. [HTML]
- Macklin, A., Khan, S., and Kislinger, T. "Recent advances in mass spectrometry based clinical proteomics: applications to cancer research." *Clinical proteomics* (2020). [springer.com](https://www.springer.com)
- Magnusson, U. "Prudent and effective antimicrobial use in a diverse livestock and consumer's world." *Journal of Animal Science* (2020). [oup.com](https://www.oup.com)
- Maguire, L. W. and Gardner, C. M. "Fate and transport of biological microcontaminants bound to microplastics in the soil environment." *Science of the Total Environment* (2023). [sciencedirect.com](https://www.sciencedirect.com)
- Mahn A, Asenjo JA. Prediction of protein retention in hydrophobic interaction Chromatography. *Biotechnol Adv* 2005;2:359–68.
- Mainero Rocca, L.; Gentili, A.; Pérez-Fernández, V.; Tomai, P. Veterinary drugs residues: A review of the latest analytical research on sample preparation and LC-MS based methods. *Food Addit. Contam. Part A* 2017, 34, 766–784. [CrossRef]
- Majdinasab, Marjan, Rupesh Kumar Mishra, Xiaoqian Tang, and Jean Louis Marty. "Detection of antibiotics in food: New achievements in the development of biosensors." *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 127 (2020): 115883. [sciencedirect.com](https://www.sciencedirect.com)
- Majdinasab, Marjan, Rupesh Kumar Mishra, Xiaoqian Tang, and Jean Louis Marty. "Detection of antibiotics in food: New achievements in the development

- of biosensors." *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 127 (2020): 115883. sciencedirect.com
- Majdinasab, Marjan, Rupesh Kumar Mishra, Xiaoqian Tang, and Jean Louis Marty. "Detection of antibiotics in food: New achievements in the development of biosensors." *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 127 (2020): 115883. sciencedirect.com
  - Majumder, Md Anwarul Azim, Sayeeda Rahman, Damian Cohall, Ambadasu Bharatha, Keerti Singh, Mainul Haque, and Marquita Gittens-St Hilaire. "Antimicrobial stewardship: fighting antimicrobial resistance and protecting global public health." *Infection and drug resistance* (2020): 4713-4738. tandfonline.com
  - Malhotra, Ashna, Vimal Kumar, Deepak Juyal, Deepak Gautam, and Rajesh Malhotra. "Knowledge, attitude, and practices of health-care providers toward antibiotic prescribing, antibiotic resistance, and multidrug-resistant tuberculosis." *Perspectives in Clinical Research* 12, no. 3 (2021): 146-152. lww.com
  - Mancuso, G., Midiri, A., Gerace, E., and Biondo, C. "Bacterial antibiotic resistance: the most critical pathogens." *Pathogens* (2021). mdpi.com
  - Mandal, Santi M., and Debarati Paul. "MALDI-TOF MS for Bacterial Identification." In *Automation and Basic Techniques in Medical Microbiology*, pp. 77-86. New York, NY: Springer US, 2022. [HTML]
  - Mandey, J. S. and Sompie, F. N. "Phytogenic feed additives as an alternative to antibiotic growth promoters in poultry nutrition." *Adv. Stud. 21st Century Anim. Nutr* (2021). intechopen.com
  - Manimekalai, M.; Rawson, A.; Sengar, A.S.; Kumar, K.S. Development, Optimization, and Validation of Methods for Quantification of Veterinary Drug Residues in Complex Food Matrices Using Liquid-Chromatography—A Review. *Food Anal. Methods* 2019, 12, 1823–1837. [CrossRef]
  - Mann, Avantika, Kiran Nehra, J. S. Rana, and Twinkle Dahiya. "Antibiotic resistance in agriculture: Perspectives on upcoming strategies to overcome upsurge in resistance." *Current research in microbial sciences* 2 (2021): 100030. sciencedirect.com

- Marazuela, M.D.; Bogialli, S. A review of novel strategies of sample preparation for the determination of antibacterial residues in foodstuffs using liquid chromatography-based analytical methods. *Anal. Chim. Acta* 2009, 645, 5–17. [CrossRef]
- Maslow, M.J.; Portal-Celhay, C. Rifamycins. In *Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases*, 8th ed.; Bennett, J.E., Dolin, R., Blaser, M.J., Eds.; Elsevier Saunders: Philadelphia, PA, USA, 2015; pp. 339–349.e3, ISBN 978-1-4557-4801-3.
- Mazzei, T.; Mini, E.; Novelli, A.; Periti, P. Chemistry and mode of action of macrolides. *J. Antimicrob. Chemother.* 1993, 31, 1–9. [CrossRef]
- Medina, Deyber Arley Vargas, Edvaldo Vasconcelos Soares Maciel, Ana Lúcia de Toffoli, and Fernando Mauro Lanças. "Miniaturization of liquid chromatography coupled to mass spectrometry.: 2. Achievements on modern instrumentation for miniaturized liquid chromatography coupled to mass spectrometry." *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 128 (2020): 115910. [HTML]
- Medina, Deyber Arley Vargas, Edvaldo Vasconcelos Soares Maciel, and Fernando Mauro Lanças. "Miniaturization of liquid chromatography coupled to mass spectrometry. 3. Achievements on chip-based LC–MS devices." *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 131 (2020): 116003. [HTML]
- Meisner, Annelein, Beatrix Wepner, Tanja Kostic, Leo S. van Overbeek, Christine J. Bunthof, Rafael Soares Correa de Souza, Marta Olivares et al. "Calling for a systems approach in microbiome research and innovation." *Current opinion in biotechnology* 73 (2022): 171-178. [sciencedirect.com](https://www.sciencedirect.com)
- Meissner, Felix, Jennifer Geddes-McAlister, Matthias Mann, and Marcus Bantscheff. "The emerging role of mass spectrometry-based proteomics in drug discovery." *Nature Reviews Drug Discovery* 21, no. 9 (2022): 637-654. [HTML]
- Meklati, Fawzi Rostane, Anthi Panara, Ahmed Hadeif, Amel Meribai, Meriem H. Ben-Mahdi, Marilena E. Dasenaki, and Nikolaos S. Thomaidis. "Comparative assessment of antibiotic residues using Liquid Chromatography Coupled with Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS) and a rapid screening



test in raw milk collected from the North-Central Algerian dairies." *Toxics* 10, no. 1 (2022): 19. [mdpi.com](https://doi.org/10.3390/tox1001019)

- Miller, S. A., Ferreira, J. P., and LeJeune, J. T. "Antimicrobial use and resistance in plant agriculture: a one health perspective." *Agriculture* (2022). [mdpi.com](https://doi.org/10.3390/ag12010010)
- Minic, R. and Zivkovic, I. "Optimization, validation and standardization of ELISA." *Norovirus* (2020). [intechopen.com](https://doi.org/10.5772/intechopen.90454)
- Mishra Rakesh, V., Mali ChinmayM, S. PatodiNidhi, and N. Pandit Neha. "THE EMERGING THREATS OF ANTIBIOTICS IN THE ENVIRONMENT: CURRENT STATE OF KNOWLEDGE AND ACTION." *dypvp.edu.in*
- Mittal, Amit K., Rohit Bhardwaj, Priya Mishra, and Satyendra K. Rajput. "Antimicrobials misuse/overuse: adverse effect, mechanism, challenges and strategies to combat resistance." *The Open Biotechnology Journal* 14, no. 1 (2020). [openbiotechnologyjournal.com](https://doi.org/10.21767/2474-3658.1000010)
- Mnisi, Caven M., Victor Mlambo, Akho Gila, Allen N. Matabane, Doctor MN Mthiyane, Cebisa Kumanda, Freddy Manyeula, and Christian S. Gajana. "Antioxidant and antimicrobial properties of selected phytochemicals for sustainable poultry production." *Applied Sciences* 13, no. 1 (2022): 99. [mdpi.com](https://doi.org/10.3390/app13010099)
- Moga, Ancuta, María Vergara-Barberán, María Jesús Lerma-García, Enrique Javier Carrasco-Correa, José Manuel Herrero-Martínez, and Ernesto Francisco Simó-Alfonso. "Determination of antibiotics in meat samples using analytical methodologies: A review." *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 20, no. 2 (2021): 1681-1716. [HTML]
- Moghadam, N.R.; Arefhosseini, S.R.; Javadi, A.; Lotfipour, F.; Ansarin, M.; Tamizi, E.; Nemati, M. Determination of Enrofloxacin and Ciprofloxacin Residues in Five Different Kinds of Chicken Tissues by Dispersive Liquid-Liquid Microextraction Coupled with HPLC. *Iran. J. Pharm. Res.* 2018, 17, 1182–1190.
- Mokh, Samia, Khaled El Hawari, Haifa Abdul Rahim, Mohamad Al Iskandarani, and Farouk Jaber. "Antimicrobial residues survey by LC-MS in food-producing animals in Lebanon." *Food Additives & Contaminants: Part B* 13, no. 2 (2020): 121-129. [foodsafetyasia.org](https://doi.org/10.1080/17513758.2020.1768888)

- More, S. J. "European perspectives on efforts to reduce antimicrobial usage in food animal production." Irish veterinary journal (2020). [springer.com](https://www.springer.com)
- Mugwanya, Muziri, Mahmoud AO Dawood, Fahad Kimera, and Hani Sewilam. "Updating the role of probiotics, prebiotics, and synbiotics for tilapia aquaculture as leading candidates for food sustainability: a review." Probiotics and antimicrobial proteins (2021): 1-28. [researchgate.net](https://www.researchgate.net)
- Mukhtar, Mahwash, Saman Sargazi, Mahmood Barani, Henning Madry, Abbas Rahdar, and Magali Cucchiari. "Application of nanotechnology for sensitive detection of low-abundance single-nucleotide variations in genomic DNA: a review." Nanomaterials 11, no. 6 (2021): 1384. [mdpi.com](https://www.mdpi.com)
- Mulchandani, Ranya, Yu Wang, Marius Gilbert, and Thomas P. Van Boeckel. "Global trends in antimicrobial use in food-producing animals: 2020 to 2030." PLOS Global Public Health 3, no. 2 (2023): e0001305. [plos.org](https://www.plos.org)
- Mulchandani, Ranya, Yu Wang, Marius Gilbert, and Thomas P. Van Boeckel. "Global trends in antimicrobial use in food-producing animals: 2020 to 2030." PLOS Global Public Health 3, no. 2 (2023): e0001305. [plos.org](https://www.plos.org)
- Muteeb, G., Rehman, M. T., Shahwan, M., and Aatif, M. "Origin of antibiotics and antibiotic resistance, and their impacts on drug development: A narrative review." Pharmaceuticals (2023). [mdpi.com](https://www.mdpi.com)
- Mutuku, Christopher, Zoltan Gazdag, and Szilvia Meleg. "Occurrence of antibiotics and bacterial resistance genes in wastewater: resistance mechanisms and antimicrobial resistance control approaches." World Journal of Microbiology and Biotechnology 38, no. 9 (2022): 152. [springer.com](https://www.springer.com)
- Naresh, V. and Lee, N. "A review on biosensors and recent development of nanostructured materials-enabled biosensors." Sensors (2021). [mdpi.com](https://www.mdpi.com)
- Nazarska, G. "Opportunities for an Academic Career of Women Scientists at the Bulgarian Academy of Sciences (mid. 1940s-1980's)." Балканистичен Форум (2021). [academia.edu](https://www.academia.edu)
- Needs, Sarah H., Jeremy Pivetal, Jessica Hayward, Stephen P. Kidd, HoYin Lam, Tai Diep, Kiran Gill, Martin Woodward, Nuno M. Reis, and Alexander D. Edwards. "Moving microcapillary antibiotic susceptibility testing (mcAST) towards the clinic: unravelling kinetics of detection of uropathogenic E. coli,

mass-manufacturing and usability for detection of urinary tract infections in human urine." *Sensors & Diagnostics* 2, no. 3 (2023): 736-750. [rsc.org](https://www.rsc.org)

- Needs, Sarah H., Natnaree Saiprom, Zara Rafeque, Wajiha Imtiaz, Narisara Chantratita, Chakkaphan Runcharoen, Jeeranan Thammachote et al. "Miniaturised broth microdilution for simplified antibiotic susceptibility testing of Gram negative clinical isolates using microcapillary devices." *Analyst* 147, no. 15 (2022): 3558-3569. [rsc.org](https://www.rsc.org)
- Nehra, M., Dilbaghi, N., Kumar, R., and Kumar, S. "Trends in point-of-care optical biosensors for antibiotics detection in aqueous media." *Materials Letters* (2022). [HTML]
- Ngashangva, Lightson, Bahaa A. Hemdan, Mohamed Azab El-Liethy, Vinay Bachu, Shelley D. Minter, and Pranab Goswami. "Emerging bioanalytical devices and platforms for rapid detection of pathogens in environmental samples." *Micromachines* 13, no. 7 (2022): 1083. [mdpi.com](https://www.mdpi.com)
- Nowakiewicz, A., Zięba, P., Gnat, S., and Matuszewski, Ł "Last call for replacement of antimicrobials in animal production: modern challenges, opportunities, and potential solutions." *Antibiotics* (2020). [mdpi.com](https://www.mdpi.com)
- Nunes, M. João, Victória Paz, Cristina M. Cordas, João Paulo Noronha, and Luís C. Branco. "LC-MS/MS methodology development and validation for the screening and quantification of five antibiotics in water." *Analytical Methods* 14, no. 9 (2022): 935-948. [HTML]
- O'Rourke, Aubrie, Sinem Beyhan, Yongwook Choi, Pavel Morales, Agnes P. Chan, Josh L. Espinoza, Chris L. Dupont et al. "Mechanism-of-action classification of antibiotics by global transcriptome profiling." *Antimicrobial agents and chemotherapy* 64, no. 3 (2020): 10-1128. [asm.org](https://www.asm.org)
- Ogundairo, Oluwatosin, Oluwatoyin Ayo-Farai, Chinedu Paschal Maduka, Chiamaka Chinaemelum Okongwu, Abdulraheem Olaide Babarinde, and Olamide Tolulope Sodamade. "Review on MALDI mass spectrometry and its application in clinical research." *International Medical Science Research Journal* 3, no. 3 (2023): 108-126. [fepbl.com](https://www.fepbl.com)
- Olayemi, W. A., G. A. Williams, O. P. Olatidoye, and E. O. Omofunmilola. "Influence of dietary inclusion of phytobiotics on growth performance, carcass

and organ weight of broiler chickens." Journal of Agriculture and Food Sciences 18, no. 2 (2020): 26-38. [ajol.info](http://ajol.info)

- Oliveira, N. A., B. L. Gonçalves, S. H. Lee, C. A. F. Oliveira, and C. H. Corassin. "Use of antibiotics in animal production and its impact on human health." J. Food Chem. Nanotechnol 6, no. 01 (2020): 40-47. [academia.edu](http://academia.edu)
- Oviaño, Marina, and Belén Rodríguez-Sánchez. "MALDI-TOF mass spectrometry in the 21st century clinical microbiology laboratory." Enfermedades infecciosas y microbiología clínica (English ed.) 39, no. 4 (2021): 192-200. [researchgate.net](http://researchgate.net)
- Pagkalis, S.; Mantadakis, E.; Mavros, M.N.; Ammari, C.; Falagas, M.E. Pharmacological Considerations for the Proper Clinical Use of Aminoglycosides. Drugs 2011, 71, 2277–2294. [CrossRef] [PubMed]
- Pan, Yantong, Huijuan Yang, Kai Wen, Yuebin Ke, Jianzhong Shen, and Zhanhui Wang. "Current advances in immunoassays for quinolones in food and environmental samples." TrAC Trends in Analytical Chemistry 157 (2022): 116726. [HTML]
- Parmar, J. K., Chaubey, K. K., Gupta, V., and Bharath, M. N. "Assessment of various veterinary drug residues in animal originated food products." Veterinary world (2021). [nih.gov](http://nih.gov)
- Parshikov, I.A.; Sutherland, J.B. Microbial transformations of antimicrobial quinolones and related drugs. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 2012, 39, 1731–1740. [CrossRef] [PubMed]
- Patel, S.J.; Wellington, M.; Shah, R.M.; Ferreira, M.J. Antibiotic Stewardship in Food-Producing Animals: Challenges, Progress, and Opportunities. Clin. Ther. 2020, 42, 1649–1658. [CrossRef] [PubMed]
- Pauter, K., Szultka-Młyńska, M., and Buszewski, B. "Determination and identification of antibiotic drugs and bacterial strains in biological samples." Molecules (2020). [mdpi.com](http://mdpi.com)
- Peixoto, Raquel S., Derek M. Harkins, and Karen E. Nelson. "Advances in microbiome research for animal health." Annual Review of Animal Biosciences 9, no. 1 (2021): 289-311. [HTML]

- Pérez-Rodríguez, M.; Pellerano, R.G.; Pezza, L.; Pezza, H.R. An overview of the main foodstuff sample preparation technologies for tetracycline residue determination. *Talanta* 2018, 182, 1–21. [CrossRef]
- Peris-Vicente, Juan, Ester Peris-García, Jaume Albiol-Chiva, Abhilasha Durgbanshi, Enrique Ochoa-Aranda, Samuel Carda-Broch, Devasish Bose, and Josep Esteve-Romero. "Liquid chromatography, a valuable tool in the determination of antibiotics in biological, food and environmental samples." *Microchemical Journal* 177 (2022): 107309. [sciencedirect.com](https://doi.org/10.1016/j.microchem.2022.107309)
- Peris-Vicente, Juan, Ester Peris-García, Jaume Albiol-Chiva, Abhilasha Durgbanshi, Enrique Ochoa-Aranda, Samuel Carda-Broch, Devasish Bose, and Josep Esteve-Romero. "Liquid chromatography, a valuable tool in the determination of antibiotics in biological, food and environmental samples." *Microchemical Journal* 177 (2022): 107309. [sciencedirect.com](https://doi.org/10.1016/j.microchem.2022.107309)
- Petersen, M., Yu, Z., and Lu, X. "Application of Raman spectroscopic methods in food safety: A review." *Biosensors* (2021). [mdpi.com](https://doi.org/10.3390/bios11090168)
- Petrarca, Mateus Henrique, Patrícia Aparecida de Campos Braga, Felix Guillermo Reyes Reyes, and Adriana Pavesi Ariseto Bragotto. "Exploring miniaturized sample preparation approaches combined with LC-QToF-MS for the analysis of sulfonamide antibiotic residues in meat-and/or egg-based baby foods." *Food Chemistry* 366 (2022): 130587. [sciencedirect.com](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.130587)
- Petrovic, J.; Baltic, M.; Cupic, V.; Stefanović, S.; Stojanovic, D. Residues of enrofloxacin and its main metabolite ciprofloxacin in broiler chickens. *Acta Vet. Brno.* 2006, 56, 497–506.
- Pettinato, M. C. "Introduction to antibody-drug conjugates." *Antibodies* (2021). [mdpi.com](https://doi.org/10.3390/antib11010001)
- Picó, Y. "Chromatography–mass spectrometry: Recent evolution and current trends in environmental science." *Current Opinion in Environmental Science & Health* (2020). [HTML]
- Pietschmann, Jan, Dominik Dittmann, Holger Spiegel, Hans-Joachim Krause, and Florian Schröper. "A novel method for antibiotic detection in milk based on competitive magnetic immunodetection." *Foods* 9, no. 12 (2020): 1773. [mdpi.com](https://doi.org/10.3390/foods9121773)

- Pinto Ferreira, Jorge, Delfy Gochez, Morgan Jeannin, Mduduzi Welcome Magongo, Camille Loi, Karen Bucher, Gerard Moulin, and Elisabeth Erlacher-Vindel. "From OIE standards to responsible and prudent use of antimicrobials: Supporting stewardship for the use of antimicrobial agents in animals." JAC-Antimicrobial Resistance 4, no. 2 (2022): dlac017. oup.com
- Porath J. From gel filtration to adsorptive size exclusion. J Protein Chem 1997;16:463–8.
- Porath J. Immobilized metal ion affinity chromatography. Protein Expr Purif 1992;3:263–81.
- Pongmalai, Panicha, Anumart Buakeaw, Songchan Puthong, and Nanthika Khongchareonporn. "A specific monoclonal antibody for chlortetracycline detection in milk and honey samples based on ELISA." Food and Agricultural Immunology 32, no. 1 (2021): 163-173. tandfonline.com
- Qadri, Masroor, Sierra Short, Kalani Gast, Jordan Hernandez, and Adam Chun-Nin Wong. "Microbiome innovation in agriculture: development of microbial based tools for insect pest management." Frontiers in Sustainable Food Systems 4 (2020): 547751. frontiersin.org
- Queiroz JA, Tomaz CT, Cabral JM. Hydrophobic interaction chromatography of proteins. J Biotechnol 2001;87:143–59.
- Rabetafika, Holy N., Aurélie Razafindralambo, Bassey Ebenso, and Hary L. Razafindralambo. "Probiotics as antibiotic alternatives for human and animal applications." Encyclopedia 3, no. 2 (2023): 561-581. mdpi.com
- Rafiq, Kazi, Muhammad Tofazzal Hossain, Rokeya Ahmed, Md Mehedi Hasan, Rejaul Islam, Md Ismail Hossen, Sourendra Nath Shaha, and Mohammad Rafiqul Islam. "Role of different growth enhancers as alternative to in-feed antibiotics in poultry industry." Frontiers in veterinary science 8 (2022): 794588. frontiersin.org
- Rahman, M. R. T., Fliss, I., and Biron, E. "Insights in the development and uses of alternatives to antibiotic growth promoters in poultry and swine production." Antibiotics (2022). mdpi.com

- Rahman, M. R. T., Fliss, I., and Biron, E. "Insights in the development and uses of alternatives to antibiotic growth promoters in poultry and swine production." *Antibiotics* (2022). mdpi.com
- Rahman, M. S., Hassan, M. M., and Chowdhury, S. "Determination of antibiotic residues in milk and assessment of human health risk in Bangladesh." *Heliyon* (2021). cell.com
- Rahman, Md Mominur, Mst Afroza Alam Tumpa, Mehrukh Zehravi, Md Taslim Sarker, M. D. Yamin, Md Rezaul Islam, Md Harun-Or-Rashid et al. "An overview of antimicrobial stewardship optimization: the use of antibiotics in humans and animals to prevent resistance." *Antibiotics* 11, no. 5 (2022): 667. mdpi.com
- Ramzan, Muhammad, Ayaz Ahmed, Yamina Usmani, Amna Jabbar Siddiqui, Muhammad Salman Bhatti, and Syed Ghulam Musharraf. "Flow Injection-High Resolution-Electrospray Ionization-Mass Spectrometry (FI-HR-ESI-MS) Method for the Screening of Antimicrobial Pharmaceutical Drugs and Compounds against *Klebsiella pneumoniae*." *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 157 (2021): 105633. [HTML]
- Randolph, C. E., Blanksby, S. J., and McLuckey, S. A. "Enhancing detection and characterization of lipids using charge manipulation in electrospray ionization-tandem mass spectrometry." *Chemistry and physics of lipids* (2020). nih.gov
- Rapid Alert System in Food and Feed [RASFF], 2019. Brussels European Commission. Available online: [https://ec.europa.eu/food/safety/rasff\\_en](https://ec.europa.eu/food/safety/rasff_en) (accessed on 20 November 2022).
- Rawat, Ashutosh, Dashrathbhai B. Kanzariya, Prem Lama, and Tapan K. Pal. "A Zn (II) coordination polymer as a dual sensor for ppb level detection of antibiotics and organo-toxins in a green solvent." *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 295 (2023): 122579. [HTML]
- Razzagh, M.; Reza, N. Determination of enrofloxacin residue in chicken eggs using FPT and ELISA methods. *J. Res. Health* 2015, 5, 159–164.
- Regnier FE. High-performance liquid chromatography of biopolymers. *Science* 1983. p. 245–52.



- Regulski, Krzysztof, Patrick Champion-Arnaud, and Jérôme Gabard. "Bacteriophage manufacturing: From early twentieth-century processes to current GMP." *Bacteriophages: Biology, Technology, Therapy* (2021): 699-729. [HTML]
- Remko, M.; von der Lieth, C.-W. Theoretical study of gas-phase acidity, pKa, lipophilicity, and solubility of some biologically active sulfonamides. *Bioorg. Med. Chem.* 2004, 12, 5395–5403. [CrossRef]
- Rhee, Chanu, Sameer S. Kadri, John P. Dekker, Robert L. Danner, Huai-Chun Chen, David Fram, Fang Zhang, Rui Wang, Michael Klompas, and CDC Prevention Epicenters Program. "Prevalence of antibiotic-resistant pathogens in culture-proven sepsis and outcomes associated with inadequate and broad-spectrum empiric antibiotic use." *JAMA network open* 3, no. 4 (2020): e202899-e202899. jamanetwork.com
- Roberts, Jason A., Gavin M. Joynt, Anna Lee, Gordon Choi, Rinaldo Bellomo, Salmaan Kanji, M. Yugan Mudaliar et al. "The effect of renal replacement therapy and antibiotic dose on antibiotic concentrations in critically ill patients: data from the multinational sampling antibiotics in renal replacement therapy study." *Clinical Infectious Diseases* 72, no. 8 (2021): 1369-1378. [HTML]
- Rodrigues, Gisele, Mariana Rocha Maximiano, and Octávio Luiz Franco. "Antimicrobial peptides used as growth promoters in livestock production." *Applied Microbiology and Biotechnology* (2021): 1-7. [HTML]
- Rodriguez-Saona, L. and Ayvaz, H. "Infrared and raman spectroscopy." *Nielsen's Food Analysis* (2024). [HTML]
- Rossi, R.; Saluti, G.; Moretti, S.; Diamanti, I.; Giuseppeponi, D.; Galarini, R. Multiclass methods for the analysis of antibiotic residues in milk by liquid chromatography coupled to mass spectrometry: A review. *Food Addit. Contam. Part A Chem. Anal. Control. Expo. Risk Assess.* 2018, 35, 241–257. [CrossRef]
- Rusu, A. and Buta, E. L. "The development of third-generation tetracycline antibiotics and new perspectives." *Pharmaceutics* (2021). mdpi.com
- Salek Maghsoudi, Armin, Shokoufeh Hassani, Kayvan Mirnia, and Mohammad Abdollahi. "Recent advances in nanotechnology-based biosensors development

for detection of arsenic, lead, mercury, and cadmium." International Journal of Nanomedicine (2021): 803-832. tandfonline.com

- Sande, Maria G., Joana L. Rodrigues, Débora Ferreira, Carla J. Silva, and Ligia R. Rodrigues. "Novel biorecognition elements against pathogens in the design of state-of-the-art diagnostics." Biosensors 11, no. 11 (2021): 418. mdpi.com
- Sargazi, Saman, Iqra Fatima, Maria Hassan Kiani, Vahideh Mohammadzadeh, Rabia Arshad, Muhammad Bilal, Abbas Rahdar, Ana M. Díez-Pascual, and Razieh Behzadmehr. "Fluorescent-based nanosensors for selective detection of a wide range of biological macromolecules: A comprehensive review." International Journal of Biological Macromolecules 206 (2022): 115-147. sciencedirect.com
- Sartelli, Massimo, Timothy C. Hardcastle, Fausto Catena, Alain Chichom-Mefire, Federico Coccolini, Sameer Dhingra, Mainul Haque et al. "Antibiotic use in low and middle-income countries and the challenges of antimicrobial resistance in surgery." Antibiotics 9, no. 8 (2020): 497. mdpi.com
- Scopes RK. Use of differential dye-ligand chromatography with affinity elution for enzyme purification: 2-keto-3-deoxy-6-phosphogluconate aldolase from Zymomonas mobilis. Anal Biochem 1984;136:525–9.
- Seidavi, Alireza, Masoomah Tavakoli, Fariborz Asroosh, Colin G. Scanes, Mohamed E. Abd El-Hack, Mohammed AE Naiel, Ayman E. Taha, Lotfi Aleya, Khaled A. El-Tarabily, and Ayman A. Swelum. "Antioxidant and antimicrobial activities of phytonutrients as antibiotic substitutes in poultry feed." Environmental Science and Pollution Research (2022): 1-26. [HTML]
- Serebrennikova, Kseniya V., Olga D. Hendrickson, Elena A. Zvereva, Demid S. Popravko, Anatoly V. Zherdev, Chuanlai Xu, and Boris B. Dzantiev. "A comparative study of approaches to improve the sensitivity of lateral flow immunoassay of the antibiotic lincomycin." Biosensors 10, no. 12 (2020): 198. mdpi.com
- Serwecińska, L. "Antimicrobials and antibiotic-resistant bacteria: a risk to the environment and to public health." Water (2020). mdpi.com

- Seth, S. and Rathinasabapathi, P. "A short review on detection of antibiotics in milk using nanomaterial-based biosensor." Food Analytical Methods (2022). [HTML]
- Shaikh, Omer A., Zoha Asghar, Rameel M. Aftab, Shifa Amin, Gulrukh Shaikh, and Abdulqadir J. Nashwan. "Antimicrobial resistant strains of Salmonella typhi: The role of illicit antibiotics sales, misuse, and self-medication practices in Pakistan." Journal of Infection and Public Health 16, no. 10 (2023): 1591-1597. sciencedirect.com
- Sharma, K. and Sharma, M. "Optical biosensors for environmental monitoring: Recent advances and future perspectives in bacterial detection." Environmental Research (2023). [HTML]
- Sherman J, Fried B, Dekker M. Handbook of Thin-Layer Chromatography New York, NY; 1991.
- Shi, Lulu, Ahsan Habib, Lei Bi, Huanhuan Hong, Rockshana Begum, and Luhong Wen. "Ambient ionization mass spectrometry: application and prospective." Critical Reviews in Analytical Chemistry (2022): 1-50. researchgate.net
- Singh, Simranjeet, Vijay Kumar, Daljeet Singh Dhanjal, Shivika Datta, Ram Prasad, and Joginder Singh. "Biological biosensors for monitoring and diagnosis." Microbial biotechnology: basic research and applications (2020): 317-335. nih.gov
- Socas-Rodríguez, Bárbara, Gerardo Álvarez-Rivera, Alberto Valdés, Elena Ibáñez, and Alejandro Cifuentes. "Food by-products and food wastes: Are they safe enough for their valorization?." Trends in Food Science & Technology 114 (2021): 133-147. sciencedirect.com
- Sotnikov, Dmitriy V., Anatoly V. Zherdev, Elena A. Zvereva, Sergei A. Eremin, and Boris B. Dzantiev. "Changing cross-reactivity for different immunoassays using the same antibodies: Theoretical description and experimental confirmation." Applied Sciences 11, no. 14 (2021): 6581. mdpi.com
- Sotnikov, Dmitriy V., Lyubov V. Barshevskaya, Anastasia V. Bartosh, Anatoly V. Zherdev, and Boris B. Dzantiev. "Double competitive immunodetection of

small analyte: Realization for highly sensitive lateral flow immunoassay of chloramphenicol." Biosensors 12, no. 5 (2022): 343. mdpi.com

- Stanton, Isobel C., Aimee K. Murray, Lihong Zhang, Jason Snape, and William H. Gaze. "Evolution of antibiotic resistance at low antibiotic concentrations including selection below the minimal selective concentration." Communications biology 3, no. 1 (2020): 467. nature.com
- Stavrianidi, A. "A classification of liquid chromatography mass spectrometry techniques for evaluation of chemical composition and quality control of traditional medicines." Journal of chromatography A (2020). [HTML]
- Stavroulaki, A.; Tzatzarakis, M.N.; Karzi, V.; Katsikantami, I.; Renieri, E.; Vakonaki, E.; Avgenaki, M.; Alegakis, A.; Stan, M.; Kavvalakis, M.; et al. Antibiotics in Raw Meat Samples: Estimation of Dietary Exposure and Risk Assessment. Toxics 2022, 10, 456. [CrossRef]
- Stoddard JM, Nguyen L, Mata-Chavez H, Nguyen K. TLC plates as a convenient platform for solvent-free reactions. Chem Commun (Camb) 2007;12:1240–1.
- Stolker, A.A.M.; Brinkman, U.A.T. Analytical strategies for residue analysis of veterinary drugs and growth-promoting agents in food-producing animals—A review. J. Chromatogr. A 2005, 1067, 15–53. [CrossRef]
- Subramaniam, G. and Girish, M. "Antibiotic resistance—A cause for reemergence of infections." The Indian Journal of Pediatrics (2020). [HTML]
- Sun, Y., Zhao, J., and Liang, L. "Recent development of antibiotic detection in food and environment: The combination of sensors and nanomaterials." Microchimica Acta (2021). researchgate.net
- Tao, X., Peng, Y., and Liu, J. "Nanomaterial-based fluorescent biosensors for veterinary drug detection in foods." Journal of Food and Drug Analysis (2020). nih.gov
- Tavangar, Pouya, Shahabodin Gharahveysi, Vahid Rezaeipour, and Mehrdad Irani. "Efficacy of phytobiotic and toxin binder feed additives individually or in combination on the growth performance, blood biochemical parameters, intestinal morphology, and microbial population in broiler chickens exposed to

aflatoxin B1." Tropical Animal Health and Production 53, no. 3 (2021): 335. researchgate.net

- Terreni, M., Taccani, M., and Pregnolato, M. "New antibiotics for multidrug-resistant bacterial strains: latest research developments and future perspectives." Molecules (2021). mdpi.com
- Tetyana, P., Shumbula, P. M., and Njengele-Tetyana, Z. "Biosensors: design, development and applications." Nanopores (2021). intechopen.com
- The European Commission. Commission Regulation (EU) No 37/2010 of 22 December 2009 on pharmacologically active substances and their classification regarding maximum residue limits in foodstuffs of animal origin. Off. J. Eur. Union. 2009, 15, 1–72.
- The European Parliament and the Council of the European Union Regulation (EC) No 1831/2003 of the European Parliament and of the Council of 22 September 2003 on additives for use in animal nutrition. Off. J. Eur. Union 2003, 268, 29–43.
- Thwala, Lungile Nomcebo, Sphumelele Colin Ndlovu, Kelvin Tafadzwa Mpofu, Masixole Yvonne Lugongolo, and Patience Mthunzi-Kufa. "Nanotechnology-based diagnostics for diseases prevalent in developing countries: current advances in point-of-care tests." Nanomaterials 13, no. 7 (2023): 1247. mdpi.com
- Tian, Hongjing, Tong Liu, Guodong Mu, Fengming Chen, Muyi He, Song You, Minli Yang, Yinlong Li, and Feng Zhang. "Rapid and sensitive determination of trace fluoroquinolone antibiotics in milk by molecularly imprinted polymer-coated stainless steel sheet electrospray ionization mass spectrometry." Talanta 219 (2020): 121282. sciencedirect.com
- Tirado, M.C.; Clarke, R.; Jaykus, L.A.; McQuatters-Gollop, A.; Frank, J.M. Climate change and food safety: A review. Food Res. Int. 2010, 43, 1745–1765. [CrossRef]
- Tiseo, Katie, Laura Huber, Marius Gilbert, Timothy P. Robinson, and Thomas P. Van Boeckel. "Global trends in antimicrobial use in food animals from 2017 to 2030." Antibiotics 9, no. 12 (2020): 918. mdpi.com

- Treiber, F. M. and Beranek-Knauer, H. "Antimicrobial residues in food from animal origin—A review of the literature focusing on products collected in stores and markets worldwide." *Antibiotics* (2021). [mdpi.com](https://doi.org/10.3390/antib12010010)
- Treiber, F. M. and Beranek-Knauer, H. "Antimicrobial residues in food from animal origin—A review of the literature focusing on products collected in stores and markets worldwide." *Antibiotics* (2021). [mdpi.com](https://doi.org/10.3390/antib12010010)
- Treiber, F. M. and Beranek-Knauer, H. "Antimicrobial residues in food from animal origin—A review of the literature focusing on products collected in stores and markets worldwide." *Antibiotics* (2021). [mdpi.com](https://doi.org/10.3390/antib12010010)
- Treiber, F. M. and Beranek-Knauer, H. "Antimicrobial residues in food from animal origin—A review of the literature focusing on products collected in stores and markets worldwide." *Antibiotics* (2021). [mdpi.com](https://doi.org/10.3390/antib12010010)
- Tsuji, K.; Robertson, J.H. Improved high-performance liquid chromatographic method for polypeptide antibiotics and its application to study the effects of treatments to reduce microbial levels in bacitracin powder. *J. Chromatogr. A* 1975, 112, 663–672. [CrossRef]
- Uddin, Mohammed Ashraf, Bupasha Hekim Suton, Malik Abdul Rub, Shamim Mahbub, Maha Moteb Alotaibi, Abdullah M. Asiri, Shahed Rana, Md Anamul Hoque, and Mahbub Kabir. "UV-Visible spectroscopic and DFT studies of the binding of ciprofloxacin hydrochloride antibiotic drug with metal ions at numerous temperatures." *Korean Journal of Chemical Engineering* (2022): 1-10. [HTML]
- Van, Thi Thu Hao, Zuwera Yidana, Peter M. Smooker, and Peter J. Coloe. "Antibiotic use in food animals worldwide, with a focus on Africa: Pluses and minuses." *Journal of global antimicrobial resistance* 20 (2020): 170-177. [sciencedirect.com](https://doi.org/10.1016/j.jgar.2020.05.005)
- Varenina, Ivana, Nina Bilandžić, Đurđica Božić Luburić, Božica Solomun Kolanović, and Ines Varga. "High resolution mass spectrometry method for the determination of 13 antibiotic groups in bovine, swine, poultry and fish meat: An effective screening and confirmation analysis approach for routine laboratories." *Food Control* 133 (2022): 108576. [HTML]

- Vasala, Antti, Vesa P. Hytönen, and Olli H. Laitinen. "Modern tools for rapid diagnostics of antimicrobial resistance." *Frontiers in cellular and infection microbiology* 10 (2020): 308. frontiersin.org
- Vasala, Antti, Vesa P. Hytönen, and Olli H. Laitinen. "Modern tools for rapid diagnostics of antimicrobial resistance." *Frontiers in cellular and infection microbiology* 10 (2020): 308. frontiersin.org
- Vekemans, Johan, Mateusz Hasso-Agopsowicz, Gagandeep Kang, William P. Hausdorff, Anthony Fiore, Elizabeth Tayler, Elizabeth J. Klemm et al. "Leveraging vaccines to reduce antibiotic use and prevent antimicrobial resistance: a World Health Organization action framework." *Clinical Infectious Diseases* 73, no. 4 (2021): e1011-e1017. oup.com
- Veterinary Manual. Available online: <https://www.merckvetmanual.com/pharmacology/antibacterial-agents> (accessed on 20 November 2022).
- Vidovic, N. and Vidovic, S. "Antimicrobial resistance and food animals: Influence of livestock environment on the emergence and dissemination of antimicrobial resistance." *Antibiotics* (2020). mdpi.com
- Virto, M., Santamarina-García, G., Amores, G., and Hernández, I. "Antibiotics in dairy production: where is the problem?." *Dairy* (2022). mdpi.com
- Virto, M., Santamarina-García, G., Amores, G., and Hernández, I. "Antibiotics in dairy production: where is the problem?." *Dairy* (2022). mdpi.com
- Von Woedtke, T., Mounir Laroussi, and M. Gherardi. "Foundations of plasmas for medical applications." *Plasma Sources Science and Technology* 31, no. 5 (2022): 054002. iop.org
- Walls D, Sinéad T. Loughran. *Protein Chromatography: Methods and Protocols*, Methods in Molecular Biology.vol. 681;2011.
- Wang, Jing, Lufang Deng, Meixia Chen, Yuyan Che, Lu Li, Longlong Zhu, Guoshun Chen, and Tao Feng. "Phytogenic feed additives as natural antibiotic alternatives in animal health and production: A review of the literature of the last decade." *Animal Nutrition* (2024). sciencedirect.com
- Wang, K., Zhuang, T., Su, Z., Chi, M., and Wang, H. "Antibiotic residues in wastewaters from sewage treatment plants and pharmaceutical industries:



Occurrence, removal and environmental impacts." Science of the Total Environment (2021). [HTML]

- Wang, Liang, Wei Liu, Jia-Wei Tang, Jun-Jiao Wang, Qing-Hua Liu, Peng-Bo Wen, Meng-Meng Wang, Ya-Cheng Pan, Bing Gu, and Xiao Zhang. "Applications of Raman spectroscopy in bacterial infections: principles, advantages, and shortcomings." Frontiers in microbiology 12 (2021): 683580. frontiersin.org
- Wang, Qiandi, Qiongying Xu, Siyuan Zhai, Qindi Zhao, Wenzong Liu, Zhuqi Chen, and Aijie Wang. "Understanding the coordination behavior of antibiotics: Take tetracycline as an example." Journal of Hazardous Materials 460 (2023): 132375. [HTML]
- Wang, Qun, Qiang Xue, Tao Chen, Jiawei Li, Yuehua Liu, Xiaohan Shan, Fei Liu, and Jianbo Jia. "Recent advances in electrochemical sensors for antibiotics and their applications." Chinese Chemical Letters 32, no. 2 (2021): 609-619. [HTML]
- Wang, Zhe, Muhammad Sher Afgan, Weilun Gu, Yuzhou Song, Yun Wang, Zongyu Hou, Weiran Song, and Zheng Li. "Recent advances in laser-induced breakdown spectroscopy quantification: From fundamental understanding to data processing." TrAC Trends in Analytical Chemistry 143 (2021): 116385. [HTML]
- Wang, Zile, Yuanze Sun, Demei Liang, Yuyang Zeng, Shuang He, Ghulam Mujtaba Mari, Tao Peng, and Haiyang Jiang. "Highly sensitive chromatographic time-resolved fluoroimmunoassay for rapid onsite detection of streptomycin in milk." Journal of dairy science 103, no. 10 (2020): 8750-8760. sciencedirect.com
- Weis, Caroline, Aline Cuénod, Bastian Rieck, Olivier Dubuis, Susanne Graf, Claudia Lang, Michael Oberle et al. "Direct antimicrobial resistance prediction from clinical MALDI-TOF mass spectra using machine learning." Nature Medicine 28, no. 1 (2022): 164-174. biorxiv.org
- Wilchek M, Chaiken I. An overview of affinity chromatography in affinity chromatography—Methods and protocols. Humana Press 2000. p. 1–6.

- World Health Organization. WHO Guidelines on Use of Medically Important Antimicrobials in Food-Producing Animals: Web Annex A: Evidence Base; World Health Organization: Geneva, Switzerland, 2017.
- Xiong, Ying, Yuankui Leng, Xiangmin Li, Xiaolin Huang, and Yonghua Xiong. "Emerging strategies to enhance the sensitivity of competitive ELISA for detection of chemical contaminants in food samples." *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 126 (2020): 115861. [HTML]
- Yang, Qiulian, Yuan Gao, Jian Ke, Pau Loke Show, Yuhui Ge, Yanhua Liu, Ruixin Guo, and Jianqiu Chen. "Antibiotics: An overview on the environmental occurrence, toxicity, degradation, and removal methods." *Bioengineered* 12, no. 1 (2021): 7376-7416. tandfonline.com
- Yang, Qiulian, Yuan Gao, Jian Ke, Pau Loke Show, Yuhui Ge, Yanhua Liu, Ruixin Guo, and Jianqiu Chen. "Antibiotics: An overview on the environmental occurrence, toxicity, degradation, and removal methods." *Bioengineered* 12, no. 1 (2021): 7376-7416. tandfonline.com
- Yao, Lingling, Noemi Becza, Andrea Maul-Pavicic, Jack Chepke, Greg A. Kirchenbaum, and Paul V. Lehmann. "Four-Color ImmunoSpot® Assays Requiring Only 1–3 mL of Blood Permit Precise Frequency Measurements of Antigen-Specific B Cells-Secreting Immunoglobulins of All Four Classes and Subclasses." In *Handbook of ELISPOT: Methods and Protocols*, pp. 251-272. New York, NY: Springer US, 2024. springer.com
- Ye, Yingwang, Tingting Wu, Xiuting Jiang, Jinxuan Cao, Xiao Ling, Qingsong Mei, Hua Chen, Deman Han, Jing-Juan Xu, and Yizhong Shen. "Portable smartphone-based QDs for the visual onsite monitoring of fluoroquinolone antibiotics in actual food and environmental samples." *ACS Applied Materials & Interfaces* 12, no. 12 (2020): 14552-14562. [HTML]
- Yoon, E. J. and Jeong, S. H. "MALDI-TOF mass spectrometry technology as a tool for the rapid diagnosis of antimicrobial resistance in bacteria." *Antibiotics* (2021). mdpi.com
- Yu, W. and Zhao, L. "Chemiluminescence detection of reactive oxygen species generation and potential environmental applications." *TrAC Trends in Analytical Chemistry* (2021). [HTML]

- Zaikina, Anastasiya S., Nikolai P. Buryakov, Maria A. Buryakova, Artem Yu Zagarin, Artem A. Razhev, and Dmitrii E. Aleshin. "Impact of supplementing phytobiotics as a substitute for antibiotics in broiler chicken feed on growth performance, nutrient digestibility, and biochemical parameters." *Veterinary Sciences* 9, no. 12 (2022): 672. [mdpi.com](https://mdpi.com)
- Zalewska, Magdalena, Aleksandra Błażejewska, Agnieszka Czapko, and Magdalena Popowska. "Antibiotics and antibiotic resistance genes in animal manure—consequences of its application in agriculture." *Frontiers in Microbiology* 12 (2021): 610656. [frontiersin.org](https://frontiersin.org)
- Zhang, L., Guo, W., and Lu, Y. "Advances in cell-free biosensors: principle, mechanism, and applications." *Biotechnology Journal* (2020). [authorea.com](https://authorea.com)
- Zhang, X., Li, Q., and Dou, J. "Mass spectrometry-based metabolomics in health and medical science: A systematic review." *RSC advances* (2020). [rsc.org](https://rsc.org)
- Zhao, C., Si, Y., Pan, B., Taha, A. Y., Pan, T., and Sun, G. "... and fabrication of a highly sensitive and naked-eye distinguishable colorimetric biosensor for chloramphenicol detection by using ELISA on nanofibrous membranes." *Talanta* (2020). [sciencedirect.com](https://sciencedirect.com)
- Zhao, Cunyi, Bofeng Pan, Minyuan Wang, Yang Si, Ameer Y. Taha, Gangyu Liu, Tingrui Pan, and Gang Sun. "Improving the sensitivity of nanofibrous membrane-based ELISA for on-site antibiotics detection." *ACS sensors* 7, no. 5 (2022): 1458-1466. [HTML]
- Zhao, Fangkai, Lei Yang, Gang Li, Li Fang, Xinwei Yu, Yu-Ting Tang, Min Li, and Liding Chen. "Veterinary antibiotics can reduce crop yields by modifying soil bacterial community and earthworm population in agro-ecosystems." *Science of the Total Environment* 808 (2022): 152056. [HTML]
- Zhao, G., Yang, M., Zhang, T., Jia, B., Xu, L., and Cheng, P. "... and on-line detection of organic and heavy metal components in water using a novel nebulization-assisted injection plasma ionization triple quadruple mass ...." *Analytica Chimica Acta* (2024). [HTML]
- Zhao, Man, Xiaolin Yao, Jiawei Li, Hulan Hu, Jing Ren, Jingke Xu, Jianlong Wang, and Daohong Zhang. "Antibiotic-enzyme-inorganic nanoflowers based

immunoassay for the ultrasensitive detection of *Staphylococcus aureus*." *Biosensors and Bioelectronics* 230 (2023): 115264. [HTML]

- Zhao, Yi, Qiu E. Yang, Xue Zhou, Feng-Hua Wang, Johanna Muurinen, Marko P. Virta, Kristian Koefoed Brandt, and Yong-Guan Zhu. "Antibiotic resistome in the livestock and aquaculture industries: Status and solutions." *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* 51, no. 19 (2021): 2159-2196. tandfonline.com
- Zhong, Wen-Bin, Ru-Xia Li, Jie Lv, Tao He, Ming-Ming Xu, Bin Wang, Lin-Hua Xie, and Jian-Rong Li. "Two isomeric In (III)-MOFs: unexpected stability difference and selective fluorescence detection of fluoroquinolone antibiotics in water." *Inorganic Chemistry Frontiers* 7, no. 5 (2020): 1161-1171. google.com
- Zhou, C., Zou, H., Sun, C., and Li, Y. "Recent advances in biosensors for antibiotic detection: Selectivity and signal amplification with nanomaterials." *Food chemistry* (2021). [HTML]
- Zhou, C., Zou, H., Sun, C., and Li, Y. "Recent advances in biosensors for antibiotic detection: Selectivity and signal amplification with nanomaterials." *Food chemistry* (2021). [HTML]
- Zozaya González, N., B. Alcalá Revilla, P. Arrazola Martínez, J. R. Chávarri Bravo, I. Cuesta Esteve, A. J. García Rojas, F. Martín-Torres et al. "Pathway towards an ideal and sustainable framework agreement for the public procurement of vaccines in Spain: a multi-criteria decision analysis." *Human Vaccines & Immunotherapeutics* 16, no. 11 (2020): 2873-2884. tandfonline.com
- Zucko, Jurica, Antonio Starcevic, Janko Diminic, Damir Oros, Amir M. Mortazavian, and Predrag Putnik. "Probiotic—friend or foe?." *Current Opinion in Food Science* 32 (2020): 45-49. [HTML]

Υπεύθυνη Δήλωση Συγγραφέα: Δηλώνω ρητά ότι, σύμφωνα με το άρθρο 8 του Ν.1599/1986, η παρούσα εργασία αποτελεί αποκλειστικά προϊόν προσωπικής μου εργασίας, δεν προσβάλλει κάθε μορφής δικαιώματα διανοητικής ιδιοκτησίας, προσωπικότητας και προσωπικών δεδομένων τρίτων, δεν περιέχει έργα/εισφορές τρίτων για τα οποία απαιτείται άδεια των δημιουργών/δικαιούχων και δεν είναι προϊόν μερικής ή ολικής αντιγραφής, οι πηγές δε που χρησιμοποιήθηκαν περιορίζονται στις βιβλιογραφικές αναφορές και μόνον και πληρούν τους κανόνες της επιστημονικής παράθεσης.