

**ΤΑΧΕΙΕΣ – ΔΙΕΡΕΥΝΗΤΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ
ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΧΗΜΙΚΩΝ
ΚΙΝΔΥΝΩΝ ΣΤΑ ΤΡΟΦΙΜΑ ΖΩΙΚΗΣ
ΠΡΟΕΛΕΥΣΗΣ**

Δημήτριος Ι. Φλετούρης
Καθηγητής

Τομέας Υγιεινής και Τεχνολογίας Τροφίμων Ζωικής Προελεύσεως
Τμήμα Κτηνιατρικής
Σχολή Επιστημών Υγείας
Α.Π.Θ.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η αλματώδης αύξηση του πληθυσμού της γης σε συνδυασμό με τις νέες συνήθειες διατροφής του ανθρώπου επέβαλαν, κατά την τελευταία τριακονταετία, εντατικοποίηση της ζωικής παραγωγής για την αντιμετώπιση της προοδευτικά αυξανόμενης ζήτησης ζωικών πρωτεϊνών. Η εντατικοποίηση αυτή είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση της κατανάλωσης των φαρμακευτικών ουσιών (Πίνακας 1) που χρησιμοποιούνται για την πρόληψη ή θεραπεία ασθενειών και για τη βελτίωση των ζωικών αποδόσεων. Η αύξηση της κατανάλωσης έφτασε τα τελευταία χρόνια σε τέτοια επίπεδα ώστε να υπολογίζεται ότι ο αριθμός των παραγωγικών ζώων στα οποία έχει χορηγηθεί, προληπτικά ή θεραπευτικά για μικρό ή μεγάλο χρονικό διάστημα, κάποια φαρμακευτική ουσία αντιστοιχεί σε ποσοστό που υπερβαίνει το 80% του παγκόσμιου ζωικού κεφαλαίου. Η χορήγηση, όμως, στα παραγωγικά ζώα φαρμακευτικών ουσιών συνεπάγεται, πολλές φορές, την παρουσία αξιοσημείωτων συγκεντρώσεων καταλοίπων των ουσιών αυτών στα τρόφιμα ζωικής προέλευσης. Η παρουσία τέτοιων καταλοίπων είναι δυνατόν να εγκυμονεί κινδύνους για την υγεία του καταναλωτή που εκτίθεται καθημερινά στη δράση τους (1, 2).

Πίνακας 1. Ομάδες κτηνιατρικών φαρμάκων που χρησιμοποιούνται στα παραγωγικά ζώα

Αντιμικροβιακά	Κορτικοστεροειδή
Ανθελμινθικά	Διουρητικά
Αντιοκκιδιακά	Χρωστικές
Ορμόνες	Ηρεμιστικά
Αντιμυκητιακά	Αντιφλεγμονώδη
β-Αγωνιστές	Θυρεοστατικά

Εκτός, όμως, από τις φαρμακευτικές ουσίες υπάρχει ένας τεράστιος αριθμός άλλων χημικών ουσιών που μπορούν να βρεθούν στα τρόφιμα ζωικής προέλευσης ρυπαίνοντας είτε την τροφή των ζώων είτε το έτοιμο τρόφιμο. Τέτοιες ουσίες είναι οι χημικές ουσίες που χρησιμοποιούνται στη γεωργία, τα απορρυπαντικά, τα απολυμαντικά, οι τοξίνες φυτικής προέλευσης, οι πλαστικοποιητές, οι τοξίνες που σχετίζονται με οστρακοειδή, τα βαρέα μέταλλα, τα νιτρώδη και τα νιτρικά άλατα, τα ραδιενεργά στοιχεία, οι διοξίνες, και τα πολυχλωριωμένα διφαινύλια (PCBs). Επίσης, οι τοξίνες βακτηρίων (π.χ. οι εντεροτοξίνες του *Staphylococcus aureus*) ή μυκήτων (μυκοτοξίνες), που παράγονται κατά την ανάπτυξη των αντίστοιχων μικροοργανισμών στα τρόφιμα ζωικής προέλευσης ή στις ζωοτροφές (μύκητες), και ορισμένες άλλες ουσίες όπως οι νιτροζαμίνες, το βενζοπυρένιο, η ισταμίνη και η μηλονική διαλδεϋδη, που σχηματίζονται στο τρόφιμο κατά την παρασκευή ή συντήρησή του, είναι δυνατόν να προκαλέσουν βλάβη στην υγεία του καταναλωτή.

Κάτω από την πίεση ενός τεράστιου και συνεχώς αυξανόμενου αριθμού επικίνδυνων χημικών ουσιών που μπορούν να βρεθούν στα τρόφιμα ζωικής προέλευσης, δημιουργούνται απαιτήσεις για μεθόδους ικανές να προσδιορίσουν πολλές ουσίες ταυτόχρονα, σε σύντομο χρονικό διάστημα και με ικανοποιητική ευαισθησία. Οι ταχείες – διερευνητικές μέθοδοι που έχουν αναπτυχθεί μέχρι σήμερα μπορούν να ταξινομηθούν σε τρεις μεγάλες κατηγορίες, στις μικροβιολογικές, στις ανοσοχημικές και στις ενζυμικές.

1. ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ

Αποτελούν διερευνητικές (screening) μεθόδους για την ανίχνευση καταλοίπων αντιμικροβιακών ουσιών στα τρόφιμα ζωικής προέλευσης. Πρώτη περιγράφηκε το 1941 η μέθοδος των κυλίνδρων, ενώ η μέθοδος των δίσκων αναπτύχθηκε το 1944 (3). Από τότε μέχρι σήμερα έχουν αναπτυχθεί πολλά αναλυτικά συστήματα, τα οποία υπάγονται στην ευρύτερη περιοχή των μικροβιολογικών μεθόδων, ενώ αρκετές από τις δοκιμές που περιλαμβάνουν εφαρμόζονται σε πολλές χώρες ως επίσημα αναγνωρισμένες μέθοδοι.

Στις μικροβιολογικές μεθόδους υπάγονται:

α. Οι μέθοδοι ανάσχεσης της ανάπτυξης μικροοργανισμών (microbial growth inhibition assays) που βασίζονται στην ανάσχεση της ανάπτυξης ενός ευαίσθητου στελέχους μικροοργανισμού που ενοφθαλμίζεται σε κατάλληλο θρεπτικό υπόστρωμα, εξαιτίας της παρουσίας αντιμικροβιακών ουσιών στο δείγμα που εξετάζεται. Τα στελέχη μικροοργανισμών που συνήθως χρησιμοποιούνται είναι ο *Geobacillus* (πρώην *Bacillus*) *stearothermophilus* variety *calidolactis* C953 ή ATCC 10149, ο *B. subtilis* ATCC 6633, ο *B. subtilis* BGA, ο *B. megaterium* ATCC 9885, ο *Streptococcus thermophilus* T.J., ο *S. thermophilus* T101, ο *B. cereus* var. *mycoides* ATCC 9634, ο *Micrococcus luteus* ATCC 9341, *M. luteus* NCTC 8340 και η *Escherichia coli* 28PR271 (1, 2, 4-15). Μπορούν να διακριθούν στις **μεθόδους διάχυσης σε άγαρ** και στις **χρωματομετρικές μεθόδους**.

❖ Στις **μεθόδους διάχυσης σε άγαρ** (microbial agar diffusion assays) η ανάσχεση της ανάπτυξης του μικροοργανισμού γίνεται αντιληπτή από το σχηματισμό, γύρω από το σημείο εναπόθεσης του δείγματος, μιας διαυγούς ζώνης της οποίας η διάμετρος βρίσκεται σε γραμμική συσχέτιση με το λογάριθμο της συγκέντρωσης της αντιμικροβιακής ουσίας. Στις μεθόδους αυτές περιλαμβάνονται η μέθοδος των δίσκων (Σχήμα 1), η μέθοδος των κυλίνδρων, η μέθοδος των βοθρίων, το Cube Inhibition Test (CIT), το Swab Test On Premises (STOP), το Calf Antibiotic and Sulfonamide Test (CAST), το Fast Antimicrobial Screen Test (FAST), το Live Animal Sulfa Test (LAST) και το New Kidney Dutch Test (NKDT) (1, 2, 4-15).



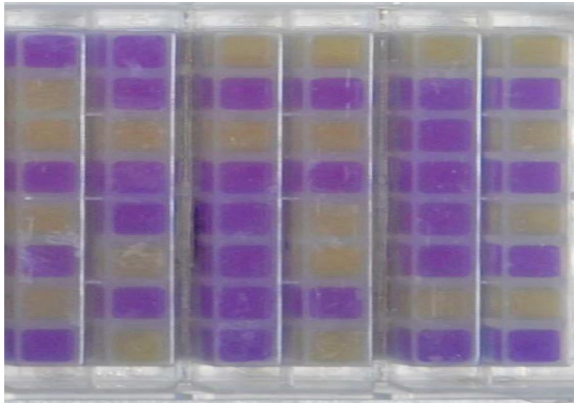
Σχήμα 1. Μέθοδος των δίσκων.

- ❖ Στις **χρωματομετρικές μεθόδους** (colorimetric assays) το θρεπτικό υπόστρωμα εμπλουτίζεται με κατάλληλο δείκτη, ώστε η ανάπτυξη του μικροοργανισμού να γίνεται αντιληπτή από την αλλαγή του χρώματος του δείκτη, εξαιτίας της παραγωγής ενζύμων (Lumac), αναγωγικών ουσιών (Brilliant Black Reduction test) ή οξέων (Delvotest-SP) από το μεταβολισμό των θρεπτικών συστατικών του υποστρώματος. Η αλλαγή του χρώματος του υποστρώματος υποδηλώνει την απουσία αντιμικροβιακών ουσιών, ενώ διατήρηση του χρώματος, που οφείλεται στην ανασχεση της παραγωγής ενζύμων, αναγωγικών ουσιών ή οξέων λόγω της ανασχεσης της ανάπτυξης του μικροοργανισμού, υποδηλώνει την παρουσία αντιμικροβιακών ουσιών. Στις μεθόδους αυτές, μεταξύ άλλων, υπάγονται το Brilliant Black Reduction test (B.R. test), το Delvotest-SP (Σχήμα 2), το Valio T101 test, το Charm Farm Test (CFT), Charm AIM-96, το Accusphere test, το Lumac test και η δοκιμή οξίνισης (1, 2, 4, 5, 16, 17).

Οι μέθοδοι που αναφέρθηκαν παραπάνω χαρακτηρίζονται από αρκετά πλεονεκτήματα τα κυριότερα από τα οποία είναι:

- Μεγάλη ευαισθησία για ορισμένες αντιμικροβιακές ουσίες (Πίνακες 2 και 3).
- Δυνατότητα ελέγχου της παρουσίας πολλών ταυτόχρονα αντιμικροβιακών ουσιών.
- Δυνατότητα ανίχνευσης των μεταβολιτών που έχουν αντιμικροβιακή δράση.
- Δυνατότητα ανάλυσης πολλών δειγμάτων ταυτόχρονα.
- Μικρός χρόνος ανάλυσης σε ορισμένες εφαρμογές (2-5 ώρες, συνήθως, ενώ το Lumac test 45 min, περίπου).
- Απλότητα χειρισμών.
- Απλός και χαμηλός κόστους εργαστηριακός εξοπλισμός.

- Χαμηλό κόστος ανάλυσης.
- Δεν απαιτείται εξειδικευμένο προσωπικό.



Σχήμα 2. Delvotest-SP

Παρουσιάζουν, όμως, και σοβαρά μειονεκτήματα όπως:

- Χαμηλή ευαισθησία για ορισμένες αντιμικροβιακές ουσίες (Πίνακες 2 και 3).
- Αδυναμία ανίχνευσης των μεταβολιτών που δεν έχουν αντιμικροβιακή δράση.
- Αδυναμία ανίχνευσης των δεσμευμένων σε μακρομόρια αντιμικροβιακών ουσιών.
- Παρεμβολές από ενδογενείς ουσίες με αντιμικροβιακή δράση.
- Μεγάλος χρόνος ανάλυσης σε ορισμένες εφαρμογές.
- Μέτρια επαναληψιμότητα μετρήσεων.
- Μικρή εκλεκτικότητα.
- Αδυναμία αξιόπιστου ποσοτικού προσδιορισμού.

β. Η μέθοδος μικροβιακού υποδοχέα (microbial receptor assay ή Charm test II) που βασίζεται στην τάση κάθε αντιμικροβιακής ουσίας να προσβάλλει ένα συγκεκριμένο σημείο του βακτηριακού κυττάρου και στην αμετάκλητη δέσμευσή της στο εν λόγω σημείο. Προσθέτοντας, σε ορισμένη ποσότητα του προς εξέταση δείγματος, συγκεκριμένη ποσότητα ενός ευαίσθητου μικροοργανισμού και μιας επισημασμένης με ^{14}C ή ^3H αντιμικροβιακής ουσίας και μετρώντας την ποσότητα της επισημασμένης ουσίας που δεσμεύτηκε στο ειδικό σημείο, μπορούμε να υπολογίσουμε τη συγκέντρωση της ουσίας στο δείγμα. Όσο μεγαλύτερη ποσότητα επισημασμένης ουσίας δεσμεύεται στο ειδικό σημείο, τόσο μικρότερη είναι η συγκέντρωση της αντιμικροβιακής ουσίας στο άγνωστο δείγμα, γιατί αναπτύσσεται ανταγωνισμός για τα σημεία δέσμευσης ο οποίος αποβαίνει σε βάρος της επισημασμένης αντιμικροβιακής ουσίας (1, 2, 4, 5, 18).

Στη μέθοδο αυτή χρησιμοποιούνται κύτταρα από ευαίσθητα, στις αντιμικροβιακές ουσίες, βακτηριακά στελέχη (όπως ο *G. stearothermophilus* var. *calidolactis* ATCC 10149) για την ανίχνευση επτά ομάδων αντιμικροβιακών ουσιών (αμινογλυκοσίδες, αμφαινικόλες, β-λακτάμες, μακρολίδια, λινκοσαμίδες, σουλφοναμίδες, τετρακυκλίνες) και της νοβοβοκίνης σε τρόφιμα ζωικής προέλευσης.

Πλεονεκτήματα της μεθόδου του μικροβιακού υποδοχέα (Charm test II) είναι:

- Μεγάλη ευαισθησία για τις περισσότερες αντιμικροβιακές ουσίες (Πίνακες 2 και 3).
- Ικανοποιητική επαναληψιμότητα μετρήσεων.
- Εξαιρετικά μικρός χρόνος ανάλυσης (15 min).
- Δυνατότητα ανάλυσης πολλών δειγμάτων ταυτόχρονα.
- Δυνατότητα ταυτοποίησης των αντιμικροβιακών ουσιών κατά ομάδες (π.χ. μακρολίδια, β-λακτάμες, λινκοσαμίδες, σουλφοναμίδες κτλ).
- Απλότητα χειρισμών.
- Δεν απαιτείται εξειδικευμένο προσωπικό.

Τα κυριότερα μειονεκτήματα είναι:

- Αδυναμία ανίχνευσης των μεταβολιτών που δεν έχουν αντιμικροβιακή δράση.
- Αδυναμία ανίχνευσης των δεσμευμένων σε μακρομόρια αντιμικροβιακών ουσιών.
- Αδυναμία αξιόπιστου ποσοτικού προσδιορισμού.
- Αδυναμία ταυτοποίησης των αντιμικροβιακών ουσιών.
- Υψηλό κόστος ανάλυσης.
- Υψηλού κόστους εργαστηριακός εξοπλισμός.

Πίνακας 2. Ευαισθησία (ppm) μικροβιολογικών μεθόδων για ορισμένες αντιμικροβιακές ουσίες σε γάλα (5, 19-28).

Αντιμικροβιακή Ουσία	Disk assay ¹	Three plate test	Six plate test	Charm test II	BR test	Delvotest	Lumac test	Valio T101 test	CFT	MRLs ² /EU
Αμπικιλίνη	0.005	0.005	0.005	0.005	0.005	0.005	0.002	0.01	0.004	0.004
Χλωραμφαινικόλη	15.0	2.0	15.0	0.08	15.0	15.0	1.0	1.0	--	0.0003 ³
Χλωροτετρακυκλίνη	0.45	--	0.45	--	0.45	0.45	0.25	--	--	0.1
Κλοξασιλίνη	0.035	0.03	0.035	0.03	0.035	0.035	0.002	0.2	0.05	0.03
Ερυθρομυκίνη	2.25	0.1	2.25	0.02	2.25	2.25	1.25	0.05	0.25	0.04
Γενταμικίνη	--	--	--	0.01	--	--	0.5	--	0.04	0.1
Καναμυκίνη	28.0	--	28.0	--	28.0	28.0	5.0	--	--	--
Νεομυκίνη	22.0	20.0	22.0	--	22.0	22.0	5.0	0.5	0.125	0.5
Στρεπτομυκίνη	--	0.3	--	0.01	--	--	10.0	1.0	--	0.2
Οξυτετρακυκλίνη	0.5	0.5	0.5	0.1	0.5	0.5	0.3	0.2	0.1	0.1
Πενικιλίνη G	0.0035	0.003	0.0035	0.003	0.004	0.0035	0.001	0.003	0.0025	0.004
Ναφκιλλίνη	0.011	0.01	0.011	--	0.011	0.011	0.05	--	--	0.03
Σουλφοναμίδες	0.1-1.0	0.1-1.0	1.0-1.2	0.001-0.003	0.1-1.0	0.1-1.0	--	1.0	0.01-0.015	0.1
Τετρακυκλίνη	0.4	0.4	0.4	0.08	0.4	0.4	0.3	0.2	0.06	0.1

¹ Disk assay με *G. stearothermophilus* var. *calidolactis* ATCC 10149.

² Ανώτατα επιτρεπόμενα όρια σύμφωνα με την Ευρωπαϊκή Ένωση.

³ MRPL: Minimum Required Performance Limit

Πίνακας 3. Ευαισθησία (ppm) μικροβιολογικών μεθόδων για ορισμένες αντιμικροβιακές ουσίες σε ζωικούς ιστούς (1, 6, 18-28).

Αντιμικροβιακή Ουσία	German three plate test	EEC four plate test	Charm test II	New Dutch Kidney Test	STOP	CAST	FAST	CFT	MRLs ¹ /EU
Αμπικιλίνη	0.01	0.01	0.04	0.025	0.01	0.1	--	0.008	0.05
Χλωραμφαινικόλη	1.0	1.0	--	5.0	0.5	0.5	--	--	0.0003 ²
Χλωροτετρακυκλίνη	0.005	--	0.1	0.25	0.01	0.05	0.3	0.3	0.1-0.6
Κολιστίνη	10.0	50.0	--	500.0	50.0	10.0	--	--	0.15-0.2
Ερυθρομυκίνη	0.025	0.05	0.4	0.5	0.1	0.1	0.05	0.3	0.4
Γενταμικίνη	0.1	0.5	0.4	10.0	0.01	0.1	0.05	0.25	0.1-1
Καναμυκίνη	0.1	50.0	--	25.0	0.025	0.05	--	--	--
Νεομυκίνη	0.1	0.5	0.8	50.0	0.1	0.1	0.1	0.3	0.5-5
Ολεαντομυκίνη	0.1	--	--	10.0	0.25	0.5	--	--	--
Οξυτετρακυκλίνη	0.05	--	0.5	1.0	0.1	0.1	0.7	0.3	0.1-0.6
Πενικιλίνη G	0.025	--	0.02	0.025	0.01	0.1	0.1	0.005	0.05
Σπιραμυκίνη	0.25	0.1	--	100.0	0.5	1.0	--	--	0.2-0.3
Στρεπτομυκίνη	0.1	--	0.15	50.0	0.025	0.5	1.0	1.5	0.5-1
Σουλφαδιμεθοξίνη	0.1	--	0.01	0.05	10.0	0.1	4.0	0.06	0.1
Σουλφαγουανιδίνη	2.5	--	--	10.0	--	2.5	--	--	
Σουλφαμεθαζίνη	0.05	--	0.025	0.5	50.0	0.25	3.0	0.1	
Τετρακυκλίνη	0.05	--	0.05	1.0	0.05	0.1	0.7	0.2	0.1-0.6

¹ Ανώτατα επιτρεπόμενα όρια σύμφωνα με την Ευρωπαϊκή Ένωση.

² MRPL: Minimum Required Performance Limit

2. ΑΝΟΣΟΧΗΜΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ

Οι ανοσοχημικές μέθοδοι (immunochemical methods) έχουν τύχει, τα τελευταία 10 χρόνια, ευρύτατης αποδοχής από τους ερευνητές, και λόγω των πλεονεκτημάτων που εμφανίζουν έναντι των κλασσικών αναλυτικών μεθόδων, έχουν εξελιχθεί σε μεθόδους ρουτίνας για την ανίχνευση καταλοίπων χημικών ουσιών στα τρόφιμα ζωικής προέλευσης. Οι μέθοδοι αυτές αποδεικνύονται σχετικά γρήγορες και ευαίσθητες, ενώ η εξαιρετική εκλεκτικότητά τους προσφέρει νέες δυνατότητες στην ανάλυση των τροφίμων.

Οι ανοσοχημικές μέθοδοι βασίζονται στην ικανότητα των αντισωμάτων να αναγνωρίζουν την τρισδιάστατη δομή των ουσιών (αντιγόνα) και να συνδέονται μαζί τους. Πρώτη περιγράφηκε το 1959 η ραδιοανοσολογική μέθοδος (RIA, radioimmunoassay) για τον προσδιορισμό ορμονικών ουσιών στο αίμα (29). Από τη στιγμή εκείνη υπήρξε τεράστια ανάπτυξη στις εφαρμογές αυτών των μεθόδων, ιδιαίτερα στην κλινική χημεία. Αυτό προέκυψε, κυρίως, μετά την ανάπτυξη το 1971 από τους Engvall και Perlman (30) της ανοσοενζυμικής μεθόδου (enzyme immunoassay) ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) για τον προσδιορισμό της ανοσοσφαιρίνης IgG.

Η εφαρμογή των ανοσοχημικών μεθόδων στην ανάλυση των τροφίμων έγινε σχετικά αργά (31), αλλά την τελευταία δεκαετία η χρησιμοποίηση των μεθόδων αυτών για τον προσδιορισμό καταλοίπων χημικών ουσιών στα τρόφιμα ζωικής προέλευσης έχει αυξηθεί σημαντικά. Τα πλεονεκτήματα που τις χαρακτηρίζουν έναντι των κλασσικών μεθόδων ανάλυσης είναι:

- Μικρός χρόνος ανάλυσης.
- Εύκολη εκτέλεση.
- Μεγάλη ευαισθησία μέτρησης.
- Μεγάλη εκλεκτικότητα.
- Δυνατότητα ανάλυσης πολλών δειγμάτων ταυτόχρονα.
- Δυνατότητα μέτρησης καταλοίπων δεσμευμένων σε μακρομόρια των ιστών.
- Δυνατότητα αυτοματοποίησης.

Οι ανοσοχημικές, όμως, μέθοδοι έχουν και σοβαρά μειονεκτήματα που πρέπει να συνεκτιμούνται πριν αποφασιστεί η επιλογή τους.

- Τα εμπορικά διαθέσιμα αντισώματα δεν καλύπτουν όλο το φάσμα των αναλύσεων.
- Διακυμάνσεις στη δράση των εμπορικά διαθέσιμων αντισωμάτων.
- Παρεμβολές, σε χαμηλές συγκεντρώσεις, από άλλες ουσίες.

- Ανίχνευση, συνήθως, μιας μόνο ουσίας σε κάθε ανάλυση.
- Χρήση, σε ορισμένες εφαρμογές, επικίνδυνων ραδιενεργών ισοτόπων.

Από τις μεθόδους που αναφέρθηκαν παραπάνω η RIA χρησιμοποιείται, σήμερα, σε περιορισμένη μόνο κλίμακα και ιδιαίτερα σε αναλύσεις που απαιτείται μεγάλη ευαισθησία, όπως στον προσδιορισμό ορμονών και ορισμένων αντιμικροβιακών ουσιών σε βιολογικά υλικά. Μια τέτοια μέθοδος που αναπτύχθηκε, σχετικά, πρόσφατα στις ΗΠΑ είναι το Charm Antibody test (5). Η μέθοδος αυτή είναι τυποποιημένη, ταχύτατη (10-15 min) και ευαίσθητη και χρησιμοποιείται στην ανίχνευση τετρακυκλινών, σουλφοναμιδών, γλωραμφαινικόλης και γενταμικίνης σε τρόφιμα ζωικής προέλευσης. Στην εν λόγω μέθοδο χρησιμοποιούνται βακτηριακά κύτταρα στο τοίχωμα των οποίων έχουν προσκολληθεί αντισώματα έναντι της αντιμικροβιακής ουσίας που θέλουμε να ανιχνεύσουμε. Προσθέτοντας, επομένως, σε ορισμένη ποσότητα του προς εξέταση δείγματος, συγκεκριμένη ποσότητα μικροοργανισμού και μιας επισημασμένης με ^3H αντιμικροβιακής ουσίας και μετρώντας την ποσότητα της επισημασμένης ουσίας που δεσμεύτηκε στα ειδικά αντισώματα, μπορούμε να υπολογίσουμε τη συγκέντρωση της αντιμικροβιακής ουσίας στο δείγμα. Όσο μεγαλύτερη ποσότητα επισημασμένης ουσίας δεσμεύεται στα αντισώματα, τόσο μικρότερη είναι η συγκέντρωση της αντίστοιχης μη επισημασμένης ουσίας στο άγνωστο δείγμα, επειδή αναπτύσσεται ανταγωνισμός για τα σημεία δέσμευσης ο οποίος αποβαίνει σε βάρος της επισημασμένης ουσίας.

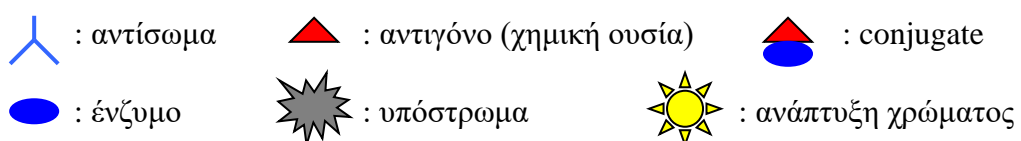
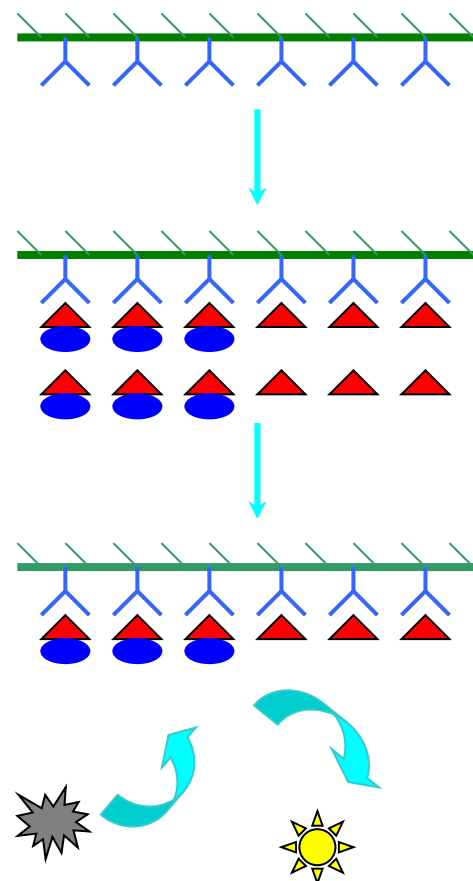
Η μέθοδος, όμως, επιλογής για την ανίχνευση ή/και τον προσδιορισμό καταλοίπων χημικών ουσιών στα τρόφιμα ζωικής προέλευσης είναι η ELISA (1). Η τελευταία προσφέρει πολλά πλεονεκτήματα έναντι της RIA όπως:

- Σταθερότητα αντιδραστηρίων.
- Φθηνός και όχι εξειδικευμένος εξοπλισμός.
- Απουσία κινδύνων από ραδιενέργεια.
- Εύκολη εκτέλεση ακόμη και εκτός εργαστηρίου.

Από τους διάφορους τύπους ELISA ο ανταγωνιστικός τύπος (competitive) είναι εκείνος που συνήθως χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό καταλοίπων χημικών ουσιών στα τρόφιμα ζωικής προέλευσης (1, 32-35). Για την εφαρμογή της μεθόδου μπορούν να χρησιμοποιηθούν δοκιμαστικοί σωλήνες, πλάκες μικροτιτλοδότησης με 96 βοθρία και ειδικές ταινίες ή μεμβράνες. Η εκτέλεση της μεθόδου γίνεται σε τρεις φάσεις (Σχήμα 3) με ενδιάμεσα πλυσίματα εφόσον χρησιμοποιούνται πλάκες ή σωλήνες. Σε μια πρώτη φάση γίνεται προσκόλλησή, στο τοίχωμα του σωλήνα ή του βοθρίου της πλάκας, αντισωμάτων έναντι της χημικής ουσίας (αντιγόνου) που εξετάζεται. Στη συνέχεια, προστίθεται συγκεκριμένη ποσότητα του

προς εξέταση δείγματος με τη μορφή μίγματος με συγκεκριμένη ποσότητα αντιγόνου συνδεδεμένου με ένζυμο (conjugate). Ακολουθεί η προσθήκη του κατάλληλου δείκτη του ενζύμου (υπόστρωμα, substrate) που, με την υδρόλυσή του από το ένζυμο και την ανάπτυξη χρώματος, καθιστά έμμεσα δυνατή την ανίχνευση του αντιγόνου. Όσο μικρότερη ποσότητα conjugate δεσμεύεται στα αντισώματα, τόσο μεγαλύτερη είναι η συγκέντρωση του αντιγόνου στο άγνωστο δείγμα, επειδή αναπτύσσεται ανταγωνισμός για τα σημεία δέσμευσης ο οποίος αποβαίνει σε βάρος του conjugate. Δεδομένου ότι η περίσσεια του conjugate απομακρύνεται με το πλύσιμο, όσο μεγαλύτερη ποσότητα από αυτό δεσμεύεται στα αντισώματα τόσο εντονότερη θα είναι η ένταση του χρώματος και κατ' επέκταση μικρότερη η συγκέντρωση της ουσίας που εξετάζεται. Η συγκέντρωση μπορεί να προσδιοριστεί μετρώντας την ένταση του χρώματος με φασματοφωτόμετρο.

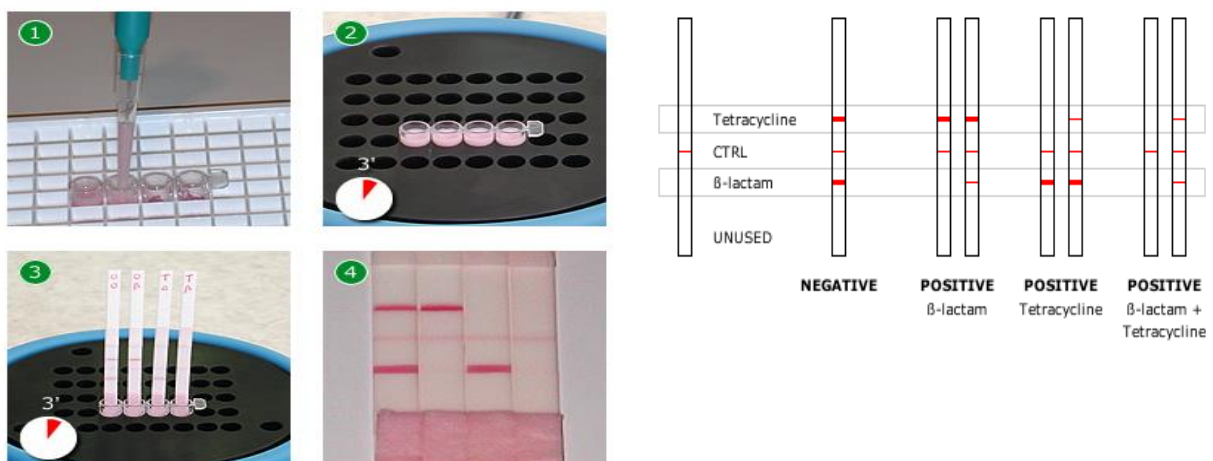
1. Προσκόλληση του αντισώματος στο τοίχωμα του σωλήνα ή βοθρίου
2. Προσθήκη δείγματος (αντιγόνου) και conjugate
3. Προσθήκη υποστρώματος (substrate) και ανάπτυξη χρώματος



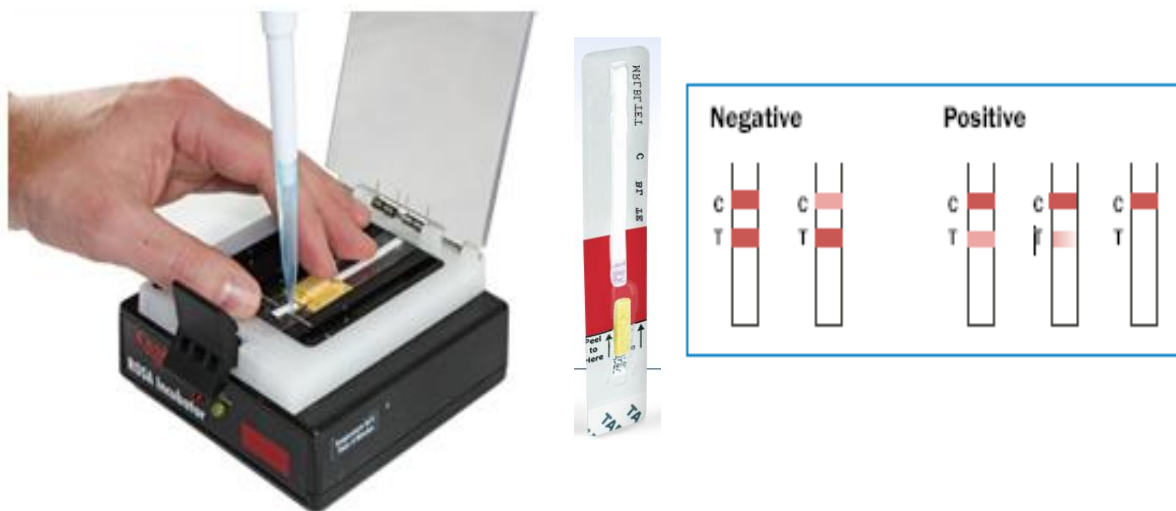
Σχήμα 3. Σχηματική παράσταση της ανταγωνιστικής ELISA.

Αξίζει, επίσης, να αναφερθεί μια διαφορετική ανοσοχημική προσέγγιση, όπως αυτή της μεθόδου συγκόλλησης σωματιδίων latex (latex agglutination immunoassay ή spot test). Η μέθοδος αυτή βασίζεται (5, 36) στη χρήση μονοκλωνικών αντισωμάτων και ειδικών σωματιδίων latex, η επιφάνεια των οποίων φέρει προσκολλημένη την ουσία που θέλουμε να ανιχνεύσουμε. Εφαρμόζεται στην ανίχνευση της πενικιλίνης G, της κλοξακιλλίνης και της κεφαπυρίνης σε νωπό γάλα. Η παρουσία των ουσιών αυτών στο προς εξέταση δείγμα δεσμεύει τα αντισώματα οπότε δεν παρατηρείται συγκόλληση των σωματιδίων τα οποία παραμένουν σε μορφή γαλακτώματος. Στην αντίθετη περίπτωση τα σωματίδια συγκολλούνται ισχυρά. Η χρονική διάρκεια της μεθόδου είναι μόνο 8 min.

Αξιοσημείωτο, τέλος, είναι το γεγονός ότι τα τελευταία χρόνια πολλοί εμπορικοί οίκοι ανέπτυξαν γρήγορες, ευαίσθητες και εύκολες στην εφαρμογή τους ανοσοχημικές δοκιμές (37, 38) οι οποίες είναι διαθέσιμες στην αγορά με τυποποιημένη μορφή (Parallux, SNAP, Beta s.t.a.r., Twinsensor, Charm ROSA MRL). Από τις παραπάνω ανοσοχημικές δοκιμές η Twinsensor (Σχήμα 4) και η Charm ROSA MRL (Σχήμα 5) αποτελούν σήμερα τις δοκιμές επιλογής για την ανίχνευση καταλοίπων β-λακταμών και τετρακυκλινών σε γάλα (Twinsensor) και β-λακταμών, τετρακυκλινών, σουλφοναμιδών, χλωραμφαινικόλης και ενροφλοξασίνης σε γάλα, και ενροφλοξασίνης σε αβγό και ζωικούς ιστούς (Charm ROSA MRL). Στον Πίνακα 4 αναγράφεται η ευαισθησία ορισμένων τυποποιημένων ανοσοχημικών δοκιμών για συγκεκριμένες αντιμικροβιακές ουσίες σε γάλα.



Σχήμα 4. Ανοσοχημική δοκιμή Twinsensor.



Σχήμα 5. Ανοσοχημική δοκιμή Charm ROSA MRL.

3. ENZYΜΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ

Ενδιαφέρον παρουσιάζουν οι τυποποιημένες δοκιμές Penzyme και Delvo-X-Press, που εφαρμόζονται διερευνητικά (screening) στην ανίχνευση καταλοίπων β -λακταμικών αντιβιοτικών σε γάλα, και Charm CideLite, που ανιχνεύει κατάλοιπα εντομοκτόνων σε τρόφιμα ζωικής προέλευσης.

α. Η ενζυμική χρωματομετρική δοκιμή **Penzyme** βασίζεται (5) στην αδρανοποίηση του ενζύμου καρβοξυπεπτιδάση (DD-carboxypeptidase), που είναι υπεύθυνο για τη σύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος των βακτηρίων, από τη δράση των β -λακταμικών αντιβιοτικών. Τα αντιβιοτικά αυτά συνδέονται εκλεκτικά με την καρβοξυπεπτιδάση, την οποία αδρανοποιούν, με αποτέλεσμα τη δημιουργία ελαττωματικού τοιχώματος και το θάνατο του κυττάρου. Για την εκτέλεση της δοκιμής αναμιγνύονται συγκεκριμένες ποσότητες ενζύμου και του προς εξέταση δείγματος γάλακτος. Η παρουσία β -λακταμικών αντιβιοτικών προκαλεί αδρανοποίηση του ενζύμου σε βαθμό που εξαρτάται από την ποσότητα των εν λόγω αντιβιοτικών στο άγνωστο δείγμα. Το ενεργό ένζυμο που απομένει ανιχνεύεται με την προσθήκη ενός αντιδραστήριου που περιέχει D-αλανίνη, η οποία απελευθερώνεται σε ποσότητα ανάλογη με την ποσότητα του ενεργού ενζύμου, οξειδώνεται με ταυτόχρονη παραγωγή υπεροξειδίου του υδρογόνου το οποίο, στη συνέχεια, ανιχνεύεται με ένα δείκτη χρώματος.

Πίνακας 4. Ευαισθησία (ppm) ορισμένων εμπορικά διαθέσιμων ανοσοχημικών δοκιμών (kit) για συγκεκριμένες αντιμικροβιακές ουσίες σε γάλα

Αντιμικροβιακή Ουσία	Ridascreen	CITE Test	Charm Antibody test	LacTek	EZ-Screen	Spot test	Twinsensor	Charm ROSA MRL	MRL/ EU
Αμοξικιλίνη	--	0.01	--	0.005	--	--	0.003	0.003	0.004
Αμπικιλίνη	--	0.01	--	0.01	--	--	0.003	0.003	0.004
Κεφτιοφούρη	--	0.01	--	>0.1	--	--	0.01	0.05	0.1
Κεφαπυρίνη	--	0.005	--	0.01	--	0.015	0.04	0.005	0.01
Χλωροτετρακυκλίνη	--	0.03	0.006	--	--	--	0.025	0.05	0.1
Χλωραμφαινικόλη	0.001	--	0.001	--	--	--	--	0.0001	0.0003*
Κλοξακιλλίνη	--	0.1	--	0.01	--	0.0625	0.004	0.02	0.03
Γενταμικίνη	--	0.03	0.01	0.03	0.03	--	--	--	0.1
Οξυτετρακυκλίνη	--	0.03	0.08	--	--	--	0.03	0.1	0.1
Πενικιλίνη G	--	0.005	--	0.005	--	0.0037	0.002	0.002	0.004
Στρεπτομυκίνη	0.02	>1.0	--	>1.0	--	--	--	--	0.2
Σουλφαδιμεθοξίνη	--	0.01	0.01	0.1	0.005	--	--	< 0.01	0.1
Σουλφαμεραζίνη	--	--	0.005	0.1	>1.0	--	--	< 0.01	
Σουλφαμεθαζίνη	0.01	0.005	0.0005	0.01	0.01	--	--	< 0.01	
Σουλφαθαζόλη	--	0.01	>0.1	>1.0	>1.0	--	--	< 0.01	
Τετρακυκλίνη	0.0001	0.03	0.003	--	--	--	0.04	0.015	0.1

* MRPL: Minimum Required Performance Limit

β. Η δοκιμή **Delvo-X-Press** (39, 40), μολονότι ομοιάζει αρκετά με τις ανοσοχημικές μεθόδους, δεν κατατάσσεται σ' αυτές γιατί δεν χρησιμοποιεί αντισώματα. Δεν είναι, όμως, ούτε καθαρά ενζυμική μέθοδος, αλλά περιγράφεται εδώ διότι η παρουσία ενζύμου είναι απαραίτητη για την ανάπτυξη του χρώματος στην τελική φάση εφαρμογής της μεθόδου. Χρησιμοποιείται για την ανίχνευση καταλοίπων β-λακταμικών αντιβιοτικών σε γάλα και βασίζεται στη δέσμευση των αντιβιοτικών αυτών από μια ειδική πρωτεΐνη που είναι συνδεδεμένη με το ένζυμο horseradish peroxidase (conjugate). Για την εκτέλεση της δοκιμής αναμιγνύονται συγκεκριμένες ποσότητες γάλακτος και conjugate ώστε αν υπάρχουν β-λακτάμες στο δείγμα να δεσμευτούν από την πρωτεΐνη. Στη συνέχεια, το μίγμα μεταφέρεται σε ένα δοκιμαστικό σωλήνα στο τοίχωμα του οποίου έχει προσκολληθεί β-λακταμικό αντιβιοτικό, με αποτέλεσμα το ελεύθερο conjugate να δεσμευθεί στο προσκολλημένο στο τοίχωμα αντιβιοτικό. Ακολουθεί έκπλυση του σωλήνα και προσθήκη του κατάλληλου δείκτη του ενζύμου (substrate) που καθιστά έμμεσα δυνατή την ανίχνευση του αντιβιοτικού με την υδρόλυσή του από το ένζυμο και την παραγωγή μπλε χρώματος, η ένταση του οποίου είναι αντιστρόφως ανάλογη με τη συγκέντρωση του αντιβιοτικού στο δείγμα. Η ευαισθησία της δοκιμής αυτής για την πενικιλίνη G είναι 4 ppb.

Οι παραπάνω ενζυμικές δοκιμές είναι εξαιρετικά γρήγορες (Penzyme περίπου 20 min και Delvo-X-Press περίπου 10 min) και εύκολες στην εφαρμογή τους, με ικανοποιητική επαναληψιμότητα και ευαισθησία στην ανίχνευση των β-λακταμικών αντιβιοτικών. Το υψηλό κόστος ανάλυσης, η αδυναμία αξιόπιστου ποσοτικού προσδιορισμού και ο περιορισμός της χρήσης τους στην ανάλυση μόνο β-λακταμικών αντιβιοτικών σε γάλα, αποτελούν τα κυριότερα μειονεκτήματα των δοκιμών αυτών.

γ. Η δοκιμή **Charm CideLite** χρησιμοποιείται διερευνητικά (screening) για τη γρήγορη (15 min) ανίχνευση καταλοίπων 7 καρβαμιδικών, και 44 οργανοφωσφορικών εντομοκτόνων μαζί με τους ενεργούς μεταβολίτες τους, σε τρόφιμα ζωικής προέλευσης και βασίζεται στην αδρανοποίηση ενός ενζύμου που προκαλείται από τη σύνδεσή του με τις εν λόγω ουσίες. Για τη μέτρηση του βαθμού σύνδεσης χρησιμοποιείται ένα ειδικό υπόστρωμα βιοφωταύγειας. Η ένταση της φωταύγειας που μετράται είναι αντιστρόφως ανάλογη της συγκέντρωσης του εντομοκτόνου, ενώ η ευαισθησία της δοκιμής, όταν αυτή χρησιμοποιείται στην ανάλυση γάλακτος, κυμαίνεται, σύμφωνα με την εταιρεία που την προσφέρει στην αγορά, μεταξύ 0.1 και 75 ppb.

Πολλές από τις μικροβιολογικές, ανοσοχημικές και ενζυμικές μεθόδους που αναφέρθηκαν παραπάνω έχουν τύχει, τα τελευταία χρόνια, ευρύτατης αποδοχής από τους ερευνητές,

και λόγω των πλεονεκτημάτων που εμφανίζουν έναντι των κλασσικών αναλυτικών μεθόδων, έχουν εξελιχθεί σε μεθόδους ρουτίνας για την ανίχνευση καταλοίπων χημικών ουσιών στα τρόφιμα ζωικής προέλευσης. Γενικά, οι μέθοδοι αυτές, αποδεικνύονται εύκολες στην εφαρμογή, σχετικά γρήγορες, ευαίσθητες και με δυνατότητα ανάλυσης πολλών δειγμάτων ταυτόχρονα. Τα σημαντικά αυτά πλεονεκτήματα τις καθιστούν απαραίτητα εργαλεία στον καθημερινό έλεγχο της ποιότητας των τροφίμων ζωικής προέλευσης. Αρκετές από τις παραπάνω μεθόδους είναι τυποποιημένες και λόγω της απλότητας και της σύντομης διάρκειάς τους μπορούν να χρησιμοποιηθούν διερευνητικά ακόμα και στο επίπεδο του στάβλου. Η σχετικά περιορισμένη εκλεκτικότητα αρκετών από αυτές τις μεθόδους, η πιθανότητα ψευδών θετικών αποτελεσμάτων και η αδυναμία ασφαλούς ποσοτικού προσδιορισμού, αποτελούν τα κυριότερα μειονεκτήματα που καθιστούν επιτακτική την ανάγκη επιβεβαίωσης των αποτελεσμάτων με φυσικοχημικές τεχνικές (υγροχρωματογραφία υψηλής απόδοσης, αεριοχρωματογραφία, φασματομετρία μαζών).

Αξίζει, τέλος, να σημειωθεί ότι για πολλές από τις επικίνδυνες χημικές ουσίες που μπορούν να ρυπάνουν τα τρόφιμα ζωικής προέλευσης, δεν υπάρχουν ταχείες μέθοδοι για τον προσδιορισμό τους. Για τον προσδιορισμό αυτών των ουσιών χρησιμοποιούνται, συνήθως, φυσικοχημικές μέθοδοι ανάλυσης οι οποίες χαρακτηρίζονται από σημαντικά πλεονεκτήματα, αλλά μειονεκτούν στο γεγονός ότι είναι επίπονες, χρονοβόρες και οικονομικά ασύμφωρες, ενώ για την εφαρμογή τους απαιτείται εξειδικευμένο προσωπικό και ακριβός εργαστηριακός εξοπλισμός.

Συμπερασματικά, θα μπορούσαμε να πούμε ότι καθεμιά από τις μεθόδους που αναφέρθηκαν παραπάνω έχει τα πλεονεκτήματα και τα μειονεκτήματά της, τα οποία πρέπει να εξετάζονται προσεκτικά κάθε φορά που γίνεται προσπάθεια επιλογής της πλέον κατάλληλης από αυτές για ένα δεδομένο εργαστήριο και ένα δεδομένο κατάλοιπο φαρμάκου ή χημικού ρυπαντή. Το σημαντικότερο πρόβλημα στον προσδιορισμό των καταλοίπων είναι το γεγονός ότι ο εκάστοτε αναλυτής δεν γνωρίζει την παρουσία τους στο τρόφιμο και εφόσον υπάρχουν δεν γνωρίζει το είδος και την ποσότητά τους. Δεδομένου του τεράστιου και συνεχώς αυξανόμενου αριθμού καταλοίπων χημικών ουσιών που μπορούν να βρεθούν στα τρόφιμα ζωικής προέλευσης, η λύση του προβλήματος είναι η προσφυγή στις ταχείες διερευνητικές μεθόδους ρουτίνας (screening methods), αν υπάρχουν, και στη συνέχεια, στην επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων με φυσικοχημικές τεχνικές (υγροχρωματογραφία υψηλής απόδοσης, αεριοχρωματογραφία, φασματομετρία μαζών).

Στον Πίνακα 5 συνοψίζονται τα χαρακτηριστικά ορισμένων εμπορικά διαθέσιμων τυποποιημένων δοκιμών που χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση καταλοίπων χημικών ουσιών σε τρόφιμα ζωικής προέλευσης.

Πίνακας 5. Χαρακτηριστικά ορισμένων εμπορικά διαθέσιμων τυποποιημένων δοκιμών (kits) που χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση καταλοίπων χημικών ουσιών σε τρόφιμα ζωικής προέλευσης.

Εμπορικός οίκος	Ονομασία δοκιμής	Ουσίες που ανιχνεύονται	Κατηγορία μεθόδου	Είδος τροφίμου	Διάρκεια προετοιμασίας δείγματος	Διάρκεια δοκιμής	Όριο ανίχνευσης (ppb)
Charm Sciences Inc.	Charm CideLite Pesticides	Εντομοκτόνα	Ενζυμική	Τρόφιμα ζωικής προέλευσης	0-1 h	15 min	0.1-200
Charm Sciences Inc.	Charm MRL-BL/TET	β -Λακτάμες/τετρακυκλίνες	Ανοσοχημική	Γάλα	0	8 min	4-100
Charm Sciences Inc.	Charm MRL-TET	Τετρακυκλίνες	Ανοσοχημική	Γάλα	0	4 min	100
Charm Sciences Inc.	Charm ENROFLOX	Ενροφλοξασίνη	Ανοσοχημική	Κρέας	20 min	8 min	30
Charm Sciences Inc.	Charm Aflatoxin SL	Αφλατοξίνη M ₁ & M ₂	Ανοσοχημική	Γάλα	0	8 min	0.5
Charm Sciences Inc.	Charm test II	Αντιμικροβιακές ουσίες	Μικροβιολογική	Τρόφιμα ζωικής προέλευσης	0-30 min	15 min	0.05-100
Enterotox	BR test-AS Blue Star	Αντιμικροβιακές ουσίες	Μικροβιολογική	Γάλα	0	3 h	2-12500
Gist-brocades	Delvotest	Αντιμικροβιακές ουσίες	Μικροβιολογική	Γάλα	0	3 h	3.5-28000
Gist-brocades	Delvo-X-Press	β -Λακτάμες	Ενζυμική	Γάλα	0	10 min	4-30
Immunotech	Histamarine	Ισταμίνη	Ανοσοχημική	Ιχθυρά	1 h/ 10 δείγματα	1 h	1000
Lumac B.V.	Lumac	Αντιμικροβιακές ουσίες	Μικροβιολογική	Γάλα	0	45 min	1-10000
R-Biopharm	Ridascreen Fast Aflatoxin M ₁	Αφλατοξίνη M ₁	Ανοσοχημική	Γαλακτοκομικά προϊόντα, γάλα	10 min	15 min	0.25
R-Biopharm	Ridascreen Fast Clenbuterol	Κλενβουτερόλη	Ανοσοχημική	Γάλα, κρέας, ήπαρ, μάτι, σύρα	0-2 h	1 h	0.1

Εμπορικός οίκος	Ονομασία δοκιμής	Ουσίες που ανιχνεύονται	Κατηγορία μεθόδου	Είδος τροφίμου	Διάρκεια προετοιμασίας δείγματος	Διάρκεια δοκιμής	Όριο ανίχνευσης (ppb)
R-Biopharm	Ridascreen Fast Trenbolone	Τρενμπολόνη	Ανοσοχημική	Ήπαρ, μύες, ούρα, κόπρανα	4 h	3 h	0.1
R-Biopharm	Ridascreen DES	Διαιθλοστυλβοιστρόλη	Ανοσοχημική	Ήπαρ, μύες, ούρα, κόπρανα	4 h	3 h	0.2
R-Biopharm	Ridascreen Fast Ochratoxin A	Οχρατοξίνη Α	Ανοσοχημική	Τρόφιμα ζωικής προέλευσης	5 min	15 min	5
R-Biopharm	Ridascreen Saxitoxin	Σαξιτοξίνη	Ανοσοχημική	Οστρακοειδή	1 h	1.5 h	2
R-Biopharm	Ridascreen SET A,B,C,D,E	Εντεροτοξίνες <i>S. aureus</i> (A,B,C,D & E)	Ανοσοχημική	Τρόφιμα ζωικής προέλευσης	20 min	2.5 h	0.2-0.7
R-Biopharm	Ridascreen Streptomycin	Στρεπτομυκίνη	Ανοσοχημική	Γάλα, μέλι, κρέας	1-1.5 h	3 h	20
R-Biopharm	Ridascreen Tetracycline	Τετρακυκλίνη	Ανοσοχημική	Γάλα, κρέας	10 min-2 h	2 h	0.1-0.5
Riedel-de Haen	Elisa-Systems Aflatoxin M ₁	Αφλατοξίνη M ₁	Ανοσοχημική	Γαλακτοκομικά προϊόντα, γάλα	2 h/ 40 δείγματα	3.5 h	0.005-0.05
Riedel-de Haen	Elisa-Systems Zeranol	Ζερανόλη	Ανοσοχημική	Κρέας, πλάσμα, ούρα	2.5-4 h/ 10 δείγματα	1 h	0.03
Riedel-de Haen	Elisa-Systems Chloramphenicol	Χλωραμφαινικόλη	Ανοσοχημική	Γάλα, αυγά, κρέας, ούρα	0.5-2 h/ 10 δείγματα	3-5 h	0.1-1.0
Riedel-de Haen	Elisa-Systems Sulfadimidine	Σουλφαδιμιδίνη	Ανοσοχημική	Γάλα	2 h/ 40 δείγματα	3 h	2.5
Idexx Inc.	Parallux	β-Λακτάμες/τετρακυκλίνες, σουλφοναμίδες	Ανοσοχημική	Γάλα	0	4 min	3-125

Idexx Inc.	SNAP	<i>β</i> -Λακτάμες/τετρακυκλίνες	Ανοσοχημική	Γάλα	0	10 min	2-85
Unisensor	Twinsensor	<i>β</i> -Λακτάμες/τετρακυκλίνες	Ανοσοχημική	Γάλα	0	6 min	2-50
UCB-Bioproducts	Beta s.t.a.r.	<i>β</i> -Λακτάμες	Ανοσοχημική	Γάλα	0	5 min	2-150
UCB-Bioproducts	Penzyme	<i>β</i> -Λακτάμες	Ενζυμική	Γάλα	0	20 min	3-40

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. N.A. Botsoglou and D.J. Fletouris, *Drug Residues in Foods. Pharmacology, Food Safety, and Analysis* (N.A. Botsoglou and D.J. Fletouris, Eds.), Marcel Dekker, Inc, New York (2001).
2. N.A. Botsoglou and D.J. Fletouris, in *Handbook of Food Analysis* (L.M.L. Nollet, Ed), Marcel Dekker, Inc, New York, p. 1171 (1996).
3. J.C. Bruhn, R.E. Ginn, J.W. Messer and E.M. Mikolajcik, in *Standard Methods for the Examination of Dairy Products* (G.H. Richardson, Ed.), 15th edition, APHA, Washington, p. 265 (1985).
4. International Dairy Federation, *Bull. Int. Dairy Fed.*, 220 (1987).
5. International Dairy Federation, *Bull. Int. Dairy Fed.*, 258 (1991).
6. G. Schramm, L. Ellerbroek, E. Weise, and G. Reuter, in *Residues of Veterinary Drugs in Food*, Proc. Euroresidue II Conf., Veldhoven, May 3-5, 1993 (N. Haagsma, A. Ruiter and P.B. Czedik-Eysenberg, Eds.), Fac. Vet. Med., Univ. Utrecht, The Netherlands, p. 632 (1993).
7. G.O. Korsrud, J.O. Boison, J.F.M. Nouws, and J.D. MacNeil, *J. AOAC Int.*, 81:21 (1998).
8. L. Ellerbroek, C. Schwartz, G. Hildebrandt, E. Weise, E.-M. Bernoth, H.-J. Pluta, and G. Arndt, *Arch. Lebensmittelhyg.*, 48:3 (1997).
9. L. Ellerbroek, *Arch. Lebensmittelhyg.*, 49:7 (1998).
10. R.W. Johnston, R.H. Reamer, E.W. Harris, H.G. Fugate, and B. Schwab, *J. Food Prot.*, 44:828 (1981).
11. R.W. Johnston, R.H. Reamer, E.W. Harris, H.C. Fugate, and B. Schwab, *J. Food Prot.*, 44:828 (1981).
12. S.A. Bright, S.L. Nickerson, and N.H. Thaker, Poster presented at the Association of Official Analytical Chemists's Annual Meeting, St. Louis, MO (1989).
13. J.D. MacNeil, and R.L. Ellis, in *Chemical Analysis for Antibiotics Used in Agriculture* (H. Oka, H. Nakazawa, K. Harada, and J.D. MacNeil, Eds.), AOAC International, Arlington, VA, p. 1 (1995).
14. Food Safety Update, *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 200:886 (1992).
15. J.P. Tritschler, R.T. Duby, S.P. Oliver, and R.W. Prange, *J. Food Prot.*, 50:97 (1987).
16. K. Bugeyi, W. Black, S. Mcewen, and A.H. Meek, *J. Food Prot.*, 57:141 (1994).
17. D.N. Loyd, and D. van der Merwe, *J. S. Afr Vet Assoc.*, 183:35 (1987).

18. S.E. Charm, in *Analysis of Antibiotic/Drug Residues in Food Products of Animal Origin* (V. K. Agarwal, Ed.), Plenum Press, New York, p. 31 (1992).
19. *Official Journal of the European Communities*, No. L224, Brussels, p. 1 (1990).
20. *Official Journal of the European Communities*, No. L205, Brussels, p. 1 (1998).
21. *Official Journal of the European Communities*, No. L205, Brussels, p. 7 (1998).
22. *Official Journal of the European Communities*, No. L205, Brussels, p. 10 (1998).
23. *Official Journal of the European Communities*, No. L343, Brussels, p. 8 (1998).
24. *Official Journal of the European Communities*, No. L102, Brussels, p. 58 (1999).
25. *Official Journal of the European Communities*, No. L118, Brussels, p. 23 (1999).
26. *Official Journal of the European Communities*, No. L118, Brussels, p. 28 (1999).
27. *Official Journal of the European Communities*, No. L122, Brussels, p. 24 (1999).
28. *Official Journal of the European Communities*, No. L122, Brussels, p. 30 (1999).
29. R.S. Yalow and S.A. Berson, *Nature*, 184:1648 (1959).
30. E. Engvall and P. Perlmann, *Immunochemistry*, 8:871 (1971).
31. B.A. Morris and M.N. Clifford, in *Immunoassays in food analysis*, Elsevier Applied Science, London (1985).
32. A. van Amerongen, D. Barug and M. Lauwaars (Eds.), *Rapid Methods for Biological and Chemical Contaminants in Food and Feed*, Wageningen Academic Publishers, The Netherlands (2005).
33. J. Chiou, A.H.H. Leung, H.W. Lee and W. Wong, *J. Integrative Agriculture*, 14:2243 (2015).
34. A.-C. Huet, M. Bienenmann-Ploum, U. Vincent and P. Delahaut, *Anal Bioanal Chem* 405:7733 (2013).
35. B. Ngom, Y. Guo, X. Wang and D. Bi, *Anal Bioanal Chem* 397:1113 (2010).
36. J.J. Ryan, E.E. Wildman, A.H. Duthie and H.V. Atherton, *J. Dairy Sci.*, 69:1510 (1986).
37. T. Perme, M. Bizjak, K.Š. Gačnik and A. Kirbiš, *Slov. Vet. Res.*, 47:97 (2010).
38. R. Zvirauskiene and J. Salomskiene, *Food Control*, 18:541 (2007).
39. M. Mitchell, B. Bodkin and J. Martin, *J. Food Prot.*, 58:577 (1995).
40. C. Bell, J.R. Rhoades, P. Neaves and D. Scannella, *Neth. Milk Dairy J.*, 49:15 (1995).